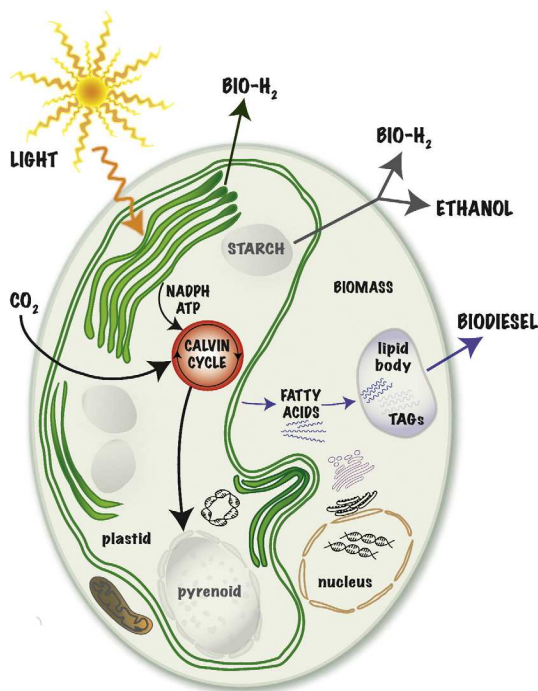


**Etude de la famille génétique des NAD(P)H déshydrogénases de type II chez l'algue  
verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* et étude de la fonction d'une  
déshydrogénase chloroplastique**



Thèse présentée par Frédéric Jans en vue de l'obtention du grade de Docteur en Sciences

Année académique 2010 – 2011



**Promoteur**

Professeur Fabrice Franck  
Laboratoire de Biochimie Végétale, Université de Liège

**Co-promoteur**

Professeur Claire Remacle  
Laboratoire de Génétique des Microorganismes, Université de Liège

**Jury**

Professeur Jacques Dommes	Université de Liège (Président)
Professeur Francis Sluse	Université de Liège
Professeur Alain Vanderpoorten	Université de Liège
Professeur Roland Valcke	Université de Hasselt
Docteur Giovanni Finazzi	Université Pierre et Marie Curie, Paris, France
Docteur Pierre Cardol	Université de Liège

La réalisation de cette thèse a été soutenue financièrement par le Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture (FRIA).

*Me voici arrivé au moment d'écrire les remerciements de ma thèse. Il conviendra de n'oublier personne, sous peine de honte, jalousie et autre(s) sentiment(s) qui pourrai(en)t résulter d'une carence de remerciement.*

*Tout d'abord, je tiens à remercier le professeur Claire Remacle. Depuis dix ans que je connais le professeur Remacle, celle-ci a toujours été une personne de confiance pour moi. Merci de m'avoir accueilli dans son laboratoire, de m'avoir conseillé durant les étapes de ce doctorat, et pour la confiance qu'elle a placée en moi. Je garde également le souvenir d'une certaine tempête de neige, mais je suppose qu'il s'agissait d'une épreuve académique.*

*Je tiens également à remercier le professeur Fabrice Franck qui m'a également accueilli dans son laboratoire. Merci pour les conseils avisés qu'il m'a prodigués tout au long de ce travail et pour m'avoir fait découvrir les subtilités de la photobiologie.*

*Je me dois également de remercier le docteur Pierre Cardol, tant pour les conseils techniques et scientifiques que pour les moments de détente quand il faisait trop chaud ou froid au labo.*

*Je ne peux décemment écrire de remerciements sans avoir une pensée pour « le chef » René Matagne, qui n'a pas forcément suivi de près cette thèse, mais qui n'a jamais manqué de se renseigner sur son avancement à chacune de nos rencontres.*

*J'ai également une pensée très forte pour le professeur Francis Sluse, pour ses remarques avisées sur mon travail et pour m'avoir fait découvrir Strasbourg by night, notamment.*

*Je ne vois pas non plus comment je pourrais écrire des remerciements sans parler de Michèle et Nadine, les deux fées du labo, pour leur bonne humeur légendaire, les manips, et surtout les ragots et potins de la bota.*

*Enfin, les doctorants Emmanuel Mignolet et Delphine Aigoïn m'ont également apporté une grande aide. Manu pour avoir mis au point un « bioréacteur bi-tubulaire à mouvement basculant et agitation par bille » permettant la culture de mes mutants dans un confort inégalé et Delphine pour m'avoir aidé pour les analyses phylogénétiques et pour les pêches au thon.*

*J'ai maintenant terminé de remercier les personnes qui m'ont apporté leurs soutien et conseils au cours de cette thèse, il me faut maintenant parler des autres. Je vais commencer par Marie et Layla, dont l'une des principales occupations au labo était de libérer de la place dans les congélos pour planquer de la glace vanille. Il est relativement mal aisé de travailler dans une ambiance remplie de ballons (roses), de monstre rouge dans la chambre noire (et du canadien fou), et du culte à maître Fria (qui peut ce qu'un autre ne peut pas). Je m'étonne d'avoir pu maintenir le cap avec deux collègues aussi marrantes. C'est probablement dû au*

*fait que Caroline soit partie à temps, sinon, à trois, elles auraient été infernales. Je tiens à saluer Nicolas et Mathieu pour avoir supporté nos histoires de labo pendant les repas et les jeux de société qui s'en suivaient. Finalement, je crois que dans ce groupe d'amis, c'est Gwegwe, Elisabeth et Fayçal qui ont le plus contribué à ma thèse.*

*Ensuite sont arrivés Véronique et Renaud, et j'ai vite compris que mes ennuis allaient aller en s'empirant. Véronique, malgré son intérim dans les experts « youaïsse » en était au même point que moi pour repeindre la chambre froide en vert chlamys. Quant à Renaud, il suffit de voir les posters de Jey Jey derrière son bureau pour comprendre que la recherche scientifique belge va mal.*

*Mais il ne faut pas croire que notre labo renfermait la honte de la botanique, la situation était relativement la même à l'autre bout du couloir, et Sophie, Glwadys, Johanna, Karim, Isabelle, Pierre-Alain, Bart, Virginie, Laurent et d'autres que j'oublie sûrement ne relevaient pas le niveau. Mon seul espoir est que Françoise n'ai pas été trop perturbée pour la suite de sa carrière lors de son passage au labo.*

*Heureusement que les gars du jeudi soir étaient là pour mettre un peu de subtilité et de finesse dans ma réflexion scientifique. Merci à Thierry, Joffrey, David, Nicolas, Philippe, John, Sacha, Samuel, Remy, Marc, Regi,... il y en a trop à citer, tant pis, certains vont m'en vouloir. Je dois également remercier les honorables membres du Cisbu (Cercle interdisciplinaire scientifique de la botanique unie), mais là, c'est plus par peur des représailles en cas d'oubli.*

*Quelques amis aussi que je ne peux pas oublier : Hanane et Franklin, So, Gladys.*

*Je vais également remercier ma famille, qui sourit toujours autant quand je leur raconte mes histoires d'algues. Maman et Papa évidemment, Marraine et Arthur aussi, Philippe, Marie-Anne, Marine, Justine, Robin, Quentin et ceux qui gravitent autour.*

*Et enfin, mes plus grands remerciements vont à ma reine de cœur. Ma merveilleuse Zülfiye, qui embellit ma vie depuis bientôt dix ans, et qui m'a donné le plus beau des cadeaux dont un jeune Papa puisse rêver. Merci à toi, Zülfiye, pour tout, et pour notre petite Elizabeth.*

*Essayons de voir ce qu'on peut en tirer.*

*Ce qui importe, c'est de savoir si c'est intéressant,  
enthousiasmant !*

*(Douglas Adams, issu de Gaiman 1987)*

## Résumé

Les NAD(P)H déshydrogénases de type II (Ndh-II) sont des enzymes de faible poids moléculaire capables d'oxyder le NAD(P)H et de transférer les électrons à un groupement quinone (plastoquinone ou ubiquinone). On les appelle « de type II » par opposition aux déshydrogénases de type I qui correspondent au complexe I mitochondrial. Chez *Arabidopsis thaliana*, des protéines Ndh-II ont été identifiées sur les faces interne et externe de la membrane interne mitochondriale, sur la membrane des peroxysomes, et au niveau de la membrane thylacoïdale du chloroplaste.

Au niveau de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, les protéines Ndh-II constituent une voie alternative aux complexes I et II pour l'apport des électrons au pool d'ubiquinones. Cette voie alternative permettrait une adaptation de la chaîne de transport d'électrons en fonction du métabolisme de l'algue. Au niveau de la chaîne de transport d'électrons chloroplastique, les protéines Ndh-II participeraient à plusieurs mécanismes d'adaptation de la chaîne à la quantité et à la qualité de la lumière disponible : transitions d'états, transport cyclique d'électrons autour du photosystème II. Leur fonction serait de catalyser la réduction non-photochimique du pool de plastoquinones.

En 2005, sept open reading frame correspondant à des NAD(P)H déshydrogénases de type II hypothétiques (*NDA1* à *NDA7*) ont été identifiées dans le génome nucléaire de *Chlamydomonas*. Ces séquences étaient cependant largement incomplètes du fait de régions non séquencées dans le génome de *Chlamydomonas*. Les données récoltées au cours de ce travail ont permis l'obtention d'une version complète de la séquence codante des gènes *NDA* de *Chlamydomonas*. Ces analyses ont démontré que le gène putatif *NDA4* correspondait, en fait, à des régions internes non attribuées au gène *NDA2*.

Chez *Arabidopsis thaliana* et *Solanum tuberosum*, une corrélation entre le positionnement phylogénétique des gènes *NDH-II* et la localisation subcellulaire de la protéine correspondante a été mise en évidence. L'analyse phylogénétique des séquences des protéines *Nda* de *Chlamydomonas* montre que les gènes *NDA1*, 2 et 3 seraient proches phylogénétiquement et seraient à positionner dans le clade des protéines Ndh-II mitochondriales des plantes supérieures. A l'inverse, la protéine *Nda5* serait d'origine cyanobactérienne et se positionne dans le même clade que les protéines identifiées dans le chloroplaste des plantes supérieures. Les protéines *Nda6* et 7 sont très proches du point de vue de la séquence, suggérant une duplication récente des gènes *NDA6* et 7. Ces deux protéines se

positionnent dans un nouveau clade, apparemment intermédiaire entre le domaine eucaryote et le domaine procaryote.

Une étude d'expression des gènes *NDA* de *Chlamydomonas* a permis de mettre en évidence l'expression apparemment majoritaire du gène *NDA2*. Pour étudier la fonction spécifique de *NDA2*, nous avons inactivé l'expression de ce gène par RNA interférence afin d'étudier le phénotype des mutants obtenus. Contrairement aux prédictions *in silico*, il est apparu que la protéine Nda2 se localise au niveau du chloroplaste. L'étude de la fluorescence chlorophyllienne de deux mutants montre que la capacité de ces mutants à réduire de manière non-photochimique le pool de plastoquinones est largement diminuée. D'autre part, les mutants sont largement affectés dans leur capacité à modifier la distribution de l'énergie d'excitation entre les deux photosystèmes (transition d'état) lorsque la respiration mitochondriale est inhibée.

Il est connu que les transitions d'état sont initiées par des changements de l'état rédox du pool de plastoquinones, qui est lui-même dépendant de l'état rédox de la cellule. Dans ce cadre, nous proposons que la protéine Nda2 pourrait servir de « senseur » du métabolisme cellulaire de l'algue et permettrait d'adapter les flux d'électrons chloroplastiques en réponse aux changements du contexte énergétique cellulaire.

## Summary

The type II NAD(P)H dehydrogenases (Ndh-II) are low molecular weight enzymes that oxidize the NAD(P)H and transfer the electrons to a quinone group (plastoquinone or ubiquinone). They are called « type II » in opposition to type I dehydrogenase like the mitochondrial complex I. In *Arabidopsis thaliana*, Ndh-II proteins have been identified on the internal and external sides of the mitochondrial inner membrane, on the peroxysome membrane and on the chloroplastic thylakoid membrane.

In the mitochondrial electrons transport chain, Ndh-II proteins led an alternative pathway to complexes I and II for the electron transfer to ubiquinone pool. This alternative pathway would allow an adaptation of the electron transport chain to algal metabolism. In the photosynthetic electron transport chain, Ndh-II proteins could contribute in several adaptation mechanisms of the chain in response to quantity and quality of available light: state transitions, cyclic electron transport around the photosystem II. Their function would be the non-photochemical reduction of the plastoquinone pool.

In 2005, seven open reading frames corresponding to hypothetical type II NAD(P)H dehydrogenases (*NDA1* to *NDA7*) have been identified in the nuclear genome of *Chlamydomonas*. These sequences were however incomplete because of gaps in the sequenced genome of *Chlamydomonas*. During this work, we obtained the full coding sequences of *Chlamydomonas's* *NDA* genes. Data showed that the putative *NDA4* gene corresponds, in fact, to internal regions non-attributed to *NDA2* gene.

In *Arabidopsis thaliana* and *Solanum tuberosum*, there is a correlation between the *NDH-II* gene phylogenetic position and the cellular localisation of the corresponding protein. Phylogenetic analysis of the *Nda* proteins sequences from *Chlamydomonas* shows that the *NDA1*, 2 and 3 genes are phylogenetically close and could be placed in the taxa of mitochondrial Ndh-II proteins from higher plants. In opposite, *Nda5* protein could originate from cyanobacteria and could be placed in the same taxa than chloroplastic protein from higher plants. *Nda6* and 7 proteins sequences are very close, suggesting a recent duplication of *NDA6* and 7 genes. These two proteins are placed in a new taxa, between the eukaryotic and prokaryotic domains.

An expression overview of *NDA* genes of *Chlamydomonas* allow us to show the apparent major expression of the *NDA2* gene. To study the function of *NDA2*, the expression of this gene was inactivated by RNA interference in order to study the phenotype of obtained mutants. Contrasting *in silico* predictions, it appears the *Nda2* protein localizes in the



chloroplast. The study of chlorophyll fluorescence of two mutants shows a diminution of non-photochemical plastoquinone reduction capacity for these mutants. Moreover, mutants are largely affected in their capacity to modify the excitation energy distribution between the two photosystems (state transition) when the mitochondrial respiration is inhibited.

It is well known that state transitions are initiated by changes in the redox state of the plastoquinone pool, itself depending of the cellular redox state. In this context, we propose that the Nda2 protein could serve as a « sensor » for cellular metabolism of the alga and could allow an adaptation of chloroplastic electron fluxes in response to changes in the background of cellular energy.

## Table des matières

<u>Introduction</u>	
<b>1. <u>La mitochondrie</u></b>	<b>1</b>
<b>2. <u>Chaîne respiratoire mitochondriale de <i>Chlamydomonas</i></u></b>	<b>2</b>
<b>2.1. Complexes de la voie principale de la chaîne respiratoire mitochondriale de <i>Chlamydomonas</i></b>	<b>5</b>
▪ <i>Le complexe I</i>	
▪ <i>Le complexe II</i>	
▪ <i>L'ubiquinone</i>	
▪ <i>Le complexe III</i>	
▪ <i>Le cytochrome c</i>	
▪ <i>Le complexe IV</i>	
▪ <i>L'ATP synthétase</i>	
<b>2.2. Les transporteurs de NAD(P)H</b>	<b>8</b>
▪ <i>L'échangeur malade-oxaloacétate</i>	
▪ <i>La navette malate-aspartate</i>	
▪ <i>Les glycérol-3 phosphate déshydrogénases</i>	
<b>2.3. Enzymes réalisant l'oxydation directe de substrats carbonés</b>	<b>10</b>
▪ <i>D-lactate déshydrogénase</i>	
▪ <i>Flavoprotéine déshydrogénase</i>	
▪ <i>L-galacto-1,4-lactone déshydrogénase</i>	
<b>2.4. Les protéines découplantes</b>	<b>11</b>
<b>2.5. L'oxydase alternative</b>	<b>12</b>
<b>2.6. Les NAD(P)H déshydrogénases de type II</b>	<b>12</b>
<b>3. <u>Les NAD(P)H déshydrogénases de type II</u></b>	<b>14</b>
<b>3.1. Classification phylogénétique des <i>NDH-II</i></b>	<b>14</b>
<b>3.2. Localisation intracellulaire des déshydrogénases</b>	<b>16</b>
<b>3.3. Régulation de l'expression des <i>NDH-II</i></b>	<b>17</b>
<b>3.4. Régulation de l'activité des <i>Ndh-II</i> par le calcium et le pH</b>	<b>19</b>
<b>3.5. Analyse de la séquence des <i>NDH-II</i></b>	<b>20</b>
<b>4. <u>Le chloroplaste</u></b>	<b>22</b>
<b>5. <u>La chaîne de transport d'électrons chloroplastique</u></b>	<b>23</b>
<b>5.1. Le transport d'électrons linéaire</b>	<b>23</b>
<b>5.2. Adaptation de la chaîne photosynthétique</b>	<b>24</b>
5.2.1. Le transport d'électrons cyclique	
5.2.2. Les transitions d'état	
5.2.3. Autres voies de régulation	
<b>5.3. Les composants de la chaîne de transport d'électrons chloroplastique</b>	<b>27</b>
▪ <i>Le photosystème I</i>	
▪ <i>Le photosystème II</i>	
▪ <i>Le pool de plastoquinone</i>	
▪ <i>Le cytochrome b6/f</i>	
▪ <i>Le plastocyanine</i>	
▪ <i>La ferrédoxine</i>	
▪ <i>Ferrédoxine NADP<sup>+</sup> oxydoréductase</i>	
▪ <i>L'ATP synthétase</i>	

<b>5.4. La chlororespiration</b>	<b>30</b>
▪ Réduction non photochimique des plastoquinones	
▪ L'oxydase terminale plastidiale	

<b>5.5. La photoproduction d'hydrogène</b>	<b>32</b>
--------------------------------------------	-----------

**6. Hypothèses sur la nature de l'enzyme qui catalyse la réduction non photochimique du pool de plastoquinone chez *Chlamydomonas*** **35**

- Les NAD(P)H déshydrogénases chloroplastiques de type II
- Succinate déshydrogénase
- Ferrédoxine-PQ oxydoréductase
- Glycolate : quinone oxydoréductase

**7. Buts de la thèse** **38**

<b><u>Matériel et méthodes</u></b>
------------------------------------

**8. Matériel** **39**

**8.1. Souches algales** **39**

**8.2. Souches bactériennes** **39**

**8.3. Milieux de culture** **39**

8.3.1. Milieu pour bactéries

- Milieu LB
- Milieu NZY

8.3.2. Milieu pour *Chlamydomonas*

- Milieu Tris-Acétate-Phosphate (TAP)
- Milieu Tris-Acétate-Nitrate (TAP-NO<sub>3</sub>)
- Milieu Tris-Minimal-Phosphate (TMP)
- Milieu Tris-Acétate-Phosphate carencé en soufre

**8.4. Plasmides** **41**

- pGEM-T Easy vector
- pBCKS+
- pPN10
- pHyg3

**8.5. Oligonucléotides synthétiques** **42**

**9. Méthode**

**9.1. Extraction de DNA et de RNA totaux de *Chlamydomonas*** **44**

**9.2. Purification de RNA polyA à partir de RNA total** **44**

**9.3. Extraction rapide de DNA total de *Chlamydomonas* par digestion à la protéinase K** **45**

**9.4. Analyse spectrophotométrique des acides nucléiques** **45**

**9.5. Electrophorèse sur gel d'agarose** **45**

**9.6. Purification de DNA** **46**

- A partir d'un gel d'agarose

**9.7. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)** **46**

**9.8. Amplification d'ARN par RT-PCR et 5'RACE** **46**

**9.9. Restriction du DNA** **47**

**9.10. Ligation** **47**

**9.11. Extraction de DNA plasmidique** **47**

- Préparation de DNA plasmidique (mini)(méthode de boiling)
- Medium préparation de DNA plasmidique (medium)

<b>9.12. Séquençage</b>	<b>48</b>
<b>9.13. Transformation bactérienne</b>	<b>48</b>
<b>9.14. Préparation de cellules compétentes</b>	<b>48</b>
<b>9.15. Northern Blotting</b>	<b>48</b>
▪ <i>Transfert de RNA</i>	
▪ <i>Hybridation de la membrane par une sonde marquée à la digoxigénine</i>	
▪ <i>Révélation et quantification</i>	
▪ <i>Déshybridation de la membrane</i>	
<b>9.16. Transformation d'algue</b>	<b>50</b>
<b>9.17. Extraction de mitochondries de <i>Chlamydomonas</i> par digestion à la digitonine</b>	<b>51</b>
<b>9.18. Extraction de chloroplaste de <i>Chlamydomonas</i> par Nebulisation</b>	<b>51</b>
<b>9.19. Méthode de Bradford</b>	<b>52</b>
<b>9.20. Western blotting</b>	<b>53</b>
▪ <i>Transfert des protéines</i>	
▪ <i>Détection de la protéine par l'anticorps primaire</i>	
▪ <i>Ajout de l'anticorps secondaire et révélation</i>	
<b>9.21. Dosage de la chlorophylle</b>	<b>54</b>
<b>9.22. Screening banque phagique</b>	<b>54</b>
▪ <i>Préparation des cellules</i>	
▪ <i>Titrage de la banque</i>	
▪ <i>Crible de la banque</i>	
▪ <i>Transfert sur membranes</i>	
▪ <i>Traitement à la protéinase K et Northern blotting</i>	
▪ <i>Affinement de la banque de phage et étape ultérieure de criblage</i>	

<b><u>Résultats et Discussion</u></b>
---------------------------------------

<b><u>10. Résultats</u></b>	<b>57</b>
<b>10.1. Obtention des séquences complètes des gènes de la famille des NAD(P)H déshydrogénases de <i>Chlamydomonas</i></b>	<b>57</b>
10.1.1. Analyse de la 2 <sup>o</sup> version du séquençage de <i>Chlamydomonas</i>	
10.1.2. Intégration des ESTs disponibles et modification manuelle de la prédiction	
10.1.3. Détermination des régions internes non séquencées des gènes NDA	
10.1.4. Détermination des séquences 5' terminales des gènes NDA	
10.1.5. Intégration de la troisième version du séquençage au modèle génique	
10.1.6. Structure des gènes NDA	
<b>10.2. Analyse des séquences complètes des séquences obtenues</b>	<b>68</b>
10.2.1. Analyse séquences des gènes NDA	
10.2.2. Analyse de la structure protéique	
▪ <i>Analyse des domaines internes conservés</i>	
▪ <i>Analyse de la région N-terminale</i>	
▪ <i>Analyse de la région C-terminale</i>	
<b>10.3. Analyse phylogénétique</b>	<b>74</b>
<b>10.4. Etude d'expression des NAD(P)H déshydrogénases de type II</b>	<b>77</b>
10.4.1. Profil d'expression par Northern blotting	
▪ <i>Réalisation des sondes</i>	
▪ <i>Visualisation de l'expression</i>	
10.4.2. Essai de mise en évidence des déshydrogénases mitochondriales et chloroplastique(s).	
10.4.3. Profil d'expression par RT-PCT	
10.4.4. Intégration des résultats obtenus	

<b>10.5. Localisation subcellulaire des protéines Nda</b>	<b>81</b>
10.5.1. Données préliminaires	
10.5.2. Analyse du signal d'adressage des protéines Nda	
10.5.3. Fusion de protéine Nda avec une protéine fluorescente (Gfp)	
▪ Construction pPN10-NDA2-GFP	
▪ Construction pPN10-NDA5-GFP	
▪ Construction pPN10-NDA6-GFP	
▪ Transformation de <i>Chlamydomonas</i> et analyse des clones obtenus.	
10.5.4. Inactivation du gène NDA2 par RNA interférence	
<b>10.6. Caractérisation des mutants NDA2-RNAi obtenus</b>	<b>90</b>
10.6.1. Courbes de croissance	
10.6.2. Analyse détaillée du phénotype des mutants	
10.6.3. Localisation de la protéine Nda2 par Western blot	

**Article : “A type II NAD(P)H dehydrogenase mediates light-independent plastoquinone reduction in the chloroplast of *Chlamydomonas*”** **95**

<b><u>11. Discussion</u></b>	<b>101</b>
<b>11.1. Etude de la famille génétique des NAD(P)H déshydrogénases de type II chez l'algue verte unicellulaire <i>Chlamydomonas reinhardtii</i></b>	
11.1.1. Classification des gènes <i>NDA</i> de <i>Chlamydomonas</i>	
11.1.2. Analyse des domaines internes conservés	
11.1.3. Etude d'expression des gènes <i>NDA</i> de <i>Chlamydomonas</i>	
11.1.4. Localisation des protéines Nda de <i>Chlamydomonas</i>	
<b>11.2. Etude de la fonction d'une déshydrogénase chloroplastique.</b>	<b>108</b>

<b><u>Bibliographie</u></b>
-----------------------------

<b><u>12. Bibliographie</u></b>	<b>111</b>
---------------------------------	------------

<b><u>Annexes</u></b>
-----------------------

Disponible dans la version informatique uniquement.

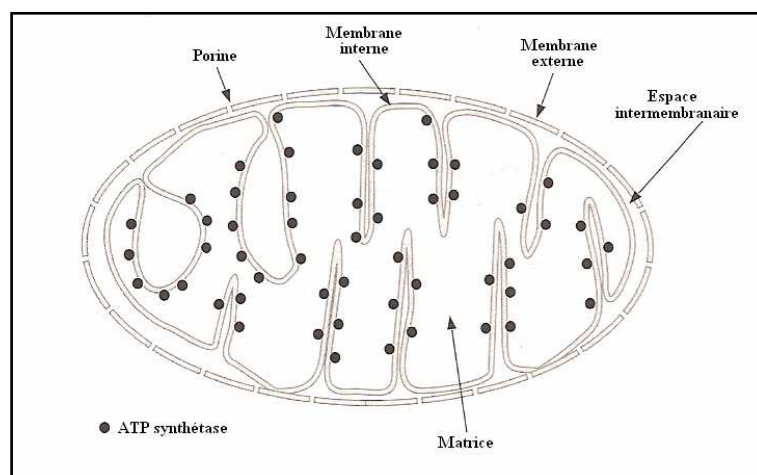
<b>Annexe 1 : Séquences des gènes <i>NDA</i></b>	<b>123</b>
<b>Annexe 2 : Séquences de protéines Nda</b>	<b>126</b>
<b>Annexe 3 : Alignement des protéines Nda ayant servi à l'analyse phylogénétique</b>	<b>127</b>
<b>Annexe 4 : Séquences des protéines Nda de l'alignement</b>	<b>152</b>

## 1. La mitochondrie

La mitochondrie se compose de deux membranes séparées l'une de l'autre par un espace intermembranaire. La surface de la membrane interne est fortement augmentée par la présence de crêtes dont la forme varie d'une espèce à l'autre. Cette membrane interne est le siège de la phosphorylation oxydative. L'espace défini par la membrane interne est la matrice mitochondriale, où sont localisées les enzymes du cycle de Krebs à l'exception de la succinate déshydrogénase, liée à la membrane interne. La membrane externe comprend notamment des protéines, nommées porines, qui agissent comme des pores non spécifiques pour les solutés présentant une masse molaire inférieure à 10 kDa. Cette membrane est donc perméable aux ions et à la plupart des métabolites.

La membrane interne est par contre dépourvue de porines. Le  $\text{NAD}^+$  et le  $\text{NADP}^+$  matriciels ne peuvent traverser cette membrane, mais l'ADP et l'ATP disposent d'un échangeur spécifique ANT (Heimpel *et al.*, 2001). Cette imperméabilité de la membrane interne, couplée à l'action des complexes de la chaîne respiratoire, provoque l'apparition d'un gradient de charge, la face matricielle étant chargée négativement (Frey et Mannella, 2000).

Chez *Chlamydomonas*, l'observation par microscopie électronique de cellules synchronisées montre que la morphologie des mitochondries varie entre deux extrêmes. L'une des formes décrites montre une mitochondrie de grande taille, en contact avec le noyau et présentant une matrice étendue. L'autre extrême présente la mitochondrie sous la forme d'un réseau complexe de tubulures dispersées dans l'intégralité du cytoplasme. Suivant le degré de dispersion observé, cinq stades spécifiques ont été décrits (Ehara *et al.*, 1995).



**Figure 1.1 :** Représentation schématique d'une mitochondrie (adapté de Nicholls et Ferguson, 2002)

## **2. Chaîne respiratoire mitochondriale de *Chlamydomonas***

La phosphorylation oxydative résulte de l'activité des différents complexes de la chaîne respiratoire. Ces complexes permettent l'établissement d'un potentiel électrochimique, localisé de part et d'autre de la membrane interne de la mitochondrie. L'ATP synthétase utilise ce potentiel pour libérer de l'ATP. La voie principale de la chaîne respiratoire est composée d'un ensemble de complexes transporteurs d'électrons. Ceux-ci sont composés de multiples sous-unités. Ces sous-unités sont pour la plupart encodées dans le génome nucléaire, mais un nombre réduit d'entre elles sont encodées dans le génome mitochondrial.

La chaîne de transport d'électrons mitochondriale de *Chlamydomonas* est représentée à la figure 2.1 (page 4). Les électrons en provenance du NADH ou du succinate sont transférés au pool d'ubiquinone via le complexe I (NADH : ubiquinone oxydoréductase) ou le complexe II (succinate : ubiquinone oxydoréductase) respectivement. Ils sont ensuite acheminés au cytochrome c par l'intermédiaire du complexe III (ubiquinol : cytochrome c oxydoréductase). Le dernier accepteur d'électrons est l'oxygène moléculaire vers lequel les électrons sont acheminés en provenance du cytochrome c via le complexe IV (cytochrome c oxydase).

Le NAD(P)H cytoplasmique n'a pas directement accès à la matrice mitochondriale et ne peut dès lors pas être utilisé par la chaîne respiratoire. Une navette malate-aspartate et un échangeur malate-oxaloacetate permettent le transfert de potentiel réducteur au travers de cette membrane et deux glycérol phosphate déshydrogénases réalisent l'oxydation du pool d'ubiquinone à partir de NADH cytoplasmique. Cette dernière voie est souvent considérée comme une voie de transfert de potentiel réducteur du cytoplasme vers la mitochondrie (Nicholls et Ferguson, 2002).

Le passage des électrons au travers des complexes I, III et IV détermine le transfert de protons à travers la bicouche lipidique, permettant l'établissement d'un gradient électrochimique transmembranaire. Cette voie principale est dite conservatrice d'énergie, par opposition aux voies alternatives qui ne participent pas à l'établissement d'un potentiel électrochimique.

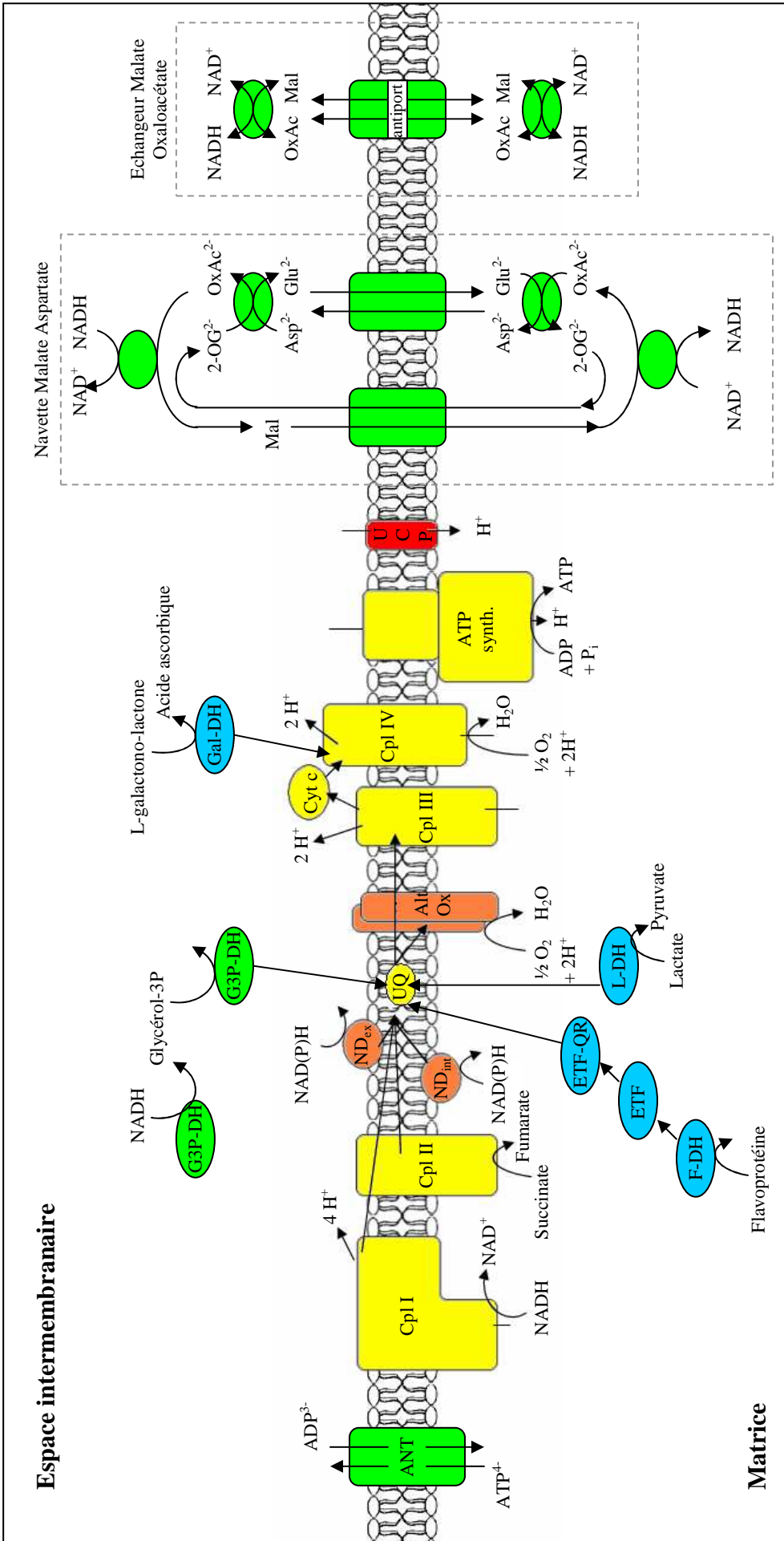
Plusieurs voies alternatives ont été mises en évidence chez *Chlamydomonas*. Les deux voies les plus importantes sont les NAD(P)H déshydrogénases alternatives (dites Ndh-II, par opposition au complexe I) (Cardol *et al.*, 2005) et l'oxydase alternative (Aox) qui transfère les électrons directement du pool d'ubiquinone réduit à l'oxygène moléculaire, court-circuitant ainsi la voie des cytochromes composée des complexes III et IV (voir figure 2.1).

Ces protéines permettent un passage des électrons en dehors de la voie translocatrice de protons et ne vont donc pas contribuer à la production d'ATP (Finnegan *et al.*, 2004 ; Møller, 1997, 2001 ; Rasmusson *et al.*, 2004). En fonction du substrat utilisé pour la respiration, l'Aox et les Ndh-II sont théoriquement capables de diminuer le rendement de production d'ATP d'environ 60 et 30% respectivement (Rasmusson *et al.*, 2008). Chez *Arabidopsis thaliana*, il a été démontré que l'adaptation de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale à l'environnement cellulaire passait par une régulation de l'expression des gènes des voies alternatives, tandis que les gènes de la voie principale sont apparemment peu sujets aux modifications d'expression (Clifton *et al.*, 2005).

Les gènes encodant plusieurs autres déshydrogénases alternatives, telles que des D-lactate déshydrogénases ou des flavoprotéine déshydrogénases, présentées dans la suite du travail, se retrouvent dans le génome de *Chlamydomonas* (voir figure 2.1) Ces enzymes réalisent l'oxydation directe de substrats carbonés. Ces enzymes ne participent pas à l'élaboration d'un gradient électrochimique, mais offrent comme avantage une diversité d'entrée de substrat dans la chaîne de transport d'électrons.

Enfin, trois Ucp ont été identifiées chez *Chlamydomonas* (Cardol *et al.*, 2005) (voir figure 2.1). Ces protéines permettent le retour des protons dans la matrice sans passage par l'ATP synthétase (Krauss *et al.*, 2005).





**Figure 2.1 : Représentation de la chaîne respiratoire mitochondriale de *Chlamydomonas reinhardtii* (en jaune). Le schéma intègre les voies alternatives (en orange), les enzymes permettant l'oxydation directe de substrats carbonés (en bleu), les protéines découplantes (en rouge) et différents transporteurs de métabolites (en vert).**  
 Légende : Cpl : Complexe de la voie respiratoire principale ; ATP synth. : ATP synthétase ; Cyt c : Cytochrome c ; UQ : ubiquinone ; UCP ; Protéine découplante ; ND : NAD(P)H déshydrogénase de type II pouvant être positionnée sur la face matricielle (interne) ou intermembranaire (externe) ; Alt Ox : Oxydase alternative ; L-DH : D-lactate déshydrogénase ; Gal-DH : L-galactono-1,4-lactone déshydrogénase ; F-DH : Flavoprotéine déshydrogénase ; ETF et ETF-QR : Intermédiaire de transfert d'électrons entre la flavoprotéine déshydrogénase et le pool qu'ubiquinone (Electron transfert flavoprotéin et Electron transfert flavoprotéin quinone reductase) ; G3P-DH : Glycérol 3-phosphate déshydrogénase ; ANT : échangeurs ADP/ATP (Adenosine nucleotide transfert) ; Mal : Malate ; OxAc : Oxaloacétate ; OG : oxoglutarate ; OxAc : oxaloacétate ; Asp : aspartate ; Glu : glutamate.

## **2.1. Complexes de la voie principale de la chaîne respiratoire mitochondriale de *Chlamydomonas***

- **Le complexe I**

Le complexe I catalyse le transfert de deux électrons depuis le NADH vers l'ubiquinone dans une réaction associée à la translocation de protons à travers la membrane. La stœchiométrie est supposée être égale à quatre protons extrudés pour deux électrons transférés (Nicholls et Ferguson, 2002). Le complexe I de *Chlamydomonas* présente une masse apparente comprise entre 950 et 1000 kDa, ce qui en fait le complexe le plus important de la chaîne respiratoire. Il est composé de 42 sous-unités présentant des masses comprises entre 7 et 77 kDa (van Lis *et al.*, 2003 ; Cardol *et al.*, 2004). 14 de ces sous-unités se retrouvent dans l'homologue bactérien du complexe I (Dupuis *et al.*, 1998 ; Friedrich *et al.*, 1998). 19 autres sous-unités sont communes avec les complexes I d'autres organismes eucaryotiques incluant le bœuf, *Neurospora crassa* ou *Arabidopsis thaliana* (Cardol *et al.*, 2005). Parmi les 9 sous-unités restantes, 2 se retrouvent chez les plantes et les levures, mais pas chez les mammifères tandis que 4 sont apparemment spécifiques aux plantes. Les 3 dernières seraient spécifiques aux algues vertes (Cardol *et al.*, 2004 ; 2005 ; 2008). Ces sous-unités supplémentaires seraient vectrices de fonctions enzymatiques additionnelles. Ainsi, le complexe I des plantes comprendrait une activité GalL déshydrogénase impliquée dans la synthèse d'ascorbate (Heazlewood *et al.*, 2003 ; Millar *et al.*, 2003). Des mesures par microscopie électronique ont démontré que le complexe I présente une forme en L, avec un bras dans la membrane interne mitochondriale, et un autre bras faisant protubérance dans la matrice (Guenebaut *et al.*, 1998 ; Sazanov *et al.*, 2003 ; Rademacher *et al.*, 2006). Le bras matriciel serait le siège de la réduction du NADH et comprend un groupement FMN et neuf centres fer-soufre tandis que le bras membranaire serait le siège de la translocation des protons et de la réduction de l'ubiquinone (Hinchliffe et Sazanov, 2005).

- **Le complexe II**

Le complexe II achemine les électrons du succinate vers l'ubiquinone. C'est la seule enzyme du cycle de Krebs liée à la membrane interne de la mitochondrie. Ce transfert d'électrons n'est associé à aucun transfert de proton à travers la membrane. La structure de la succinate déshydrogénase des plantes comprend quatre polypeptides, également présents chez *Chlamydomonas* (Yankovskaya *et al.*, 2003 ; Cardol *et al.*, 2005). Le polypeptide le plus éloigné de la membrane comprendrait un FAD lié de façon covalente. Les électrons transiteraient au travers de ce FAD avant de rejoindre la partie membranaire via trois centres

fer soufre (Nicholls et Ferguson, 2002). Chez les plantes, la succinate déshydrogénase comprendrait des fonctions supplémentaires comme la mobilisation des sucres contenus dans les lipides dans les graines en germinations (Hodges, 2002 ; Plaxton et Podesta 2006).

- **L'ubiquinone**

L'ubiquinone est un lipide composé d'un groupement benzoquinone connecté à une chaîne polyisoprénique d'une longueur pouvant varier de 6 à 10 unités. L'ubiquinone tient un rôle central au niveau de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale. Il permet l'acheminement des électrons en provenance du complexe I, du complexe II, des NAD(P)H déshydrogénases de type II, ainsi que de différentes autres déshydrogénases secondaires (voir figure 2.1) vers le complexe III et l'oxydase alternative. De plus, le niveau de réduction du pool d'ubiquinones régule l'activité des protéines découplantes (Ucp) chez les plantes supérieures, les mammifères et les protistes (Turunen *et al.*, 2004 ; Sluse *et al.*, 2004).

- **Le complexe III**

L'acheminement des électrons depuis l'ubiquinol vers le cytochrome c se fait via le complexe III. Ce transfert est également associé à la translocation de protons à travers la membrane. Le complexe III se compose d'une dizaine de sous-unités bien conservées. Trois de ces sous-unités comportent des groupements rédox : le cytochrome b, le cytochrome  $c_1$  et la protéine Rieske (Braun et Schmitz, 1995-a, 1995-b ; Iwata *et al.*, 1998 ; Eubel *et al.*, 2003). L'isolement du complexe III de *Chlamydomonas* a permis d'identifier quatre polypeptides par spectrométrie de masse (Atteia *et al.*, 2003). Les six autres polypeptides ont été identifiés par analyse du génome de l'algue (Cardol *et al.*, 2005).

- **Le cytochrome c**

Le cytochrome c permet l'acheminement des électrons depuis le complexe III vers le complexe IV. C'est une protéine soluble, encodée par un gène nucléaire unique, très proche de ceux identifiés au niveau des plantes supérieures (Amati *et al.*, 1988). L'expression de ce gène est induite par la présence d'acétate et par la lumière. Il n'est par contre pas induit par des inhibiteurs de la chaîne respiratoire, mais bien par le DCMU, inhibiteur de la chaîne de transport d'électrons chloroplastique (Felitti *et al.*, 2000).

- **Le complexe IV**

Ce complexe catalyse le transfert de quatre électrons du cytochrome c à l'oxygène moléculaire, produisant ainsi deux molécules d'eau. Les protons requis pour la réduction de l'oxygène sont pris du côté matriciel, alors que les électrons provenant de l'oxydation du cytochrome c viennent du côté intermembranaire. Par couple d'électrons transférés, quatre protons sont pris du côté matriciel : deux serviront à la production d'une molécule d'eau, les deux autres sont relâchés du côté intermembranaire (Nicholls et Ferguson, 2002). Le complexe IV est composé de 12 sous-unités chez la levure (Taanman et Capaldi, 1992), 13 sous-unités chez les mammifères (Yanamura *et al.*, 1988), et 10 à 12 chez *Arabidopsis thaliana* (Eubel *et al.*, 2003). Trois sous-unités, généralement encodées par le génome mitochondrial, forment le cœur catalytique de l'enzyme (Cox1, 2 et 3). Les autres sous-unités, encodées par le génome nucléaire, sont supposées intervenir dans la régulation et dans la biogénèse de l'enzyme. Le complexe IV de *Chlamydomonas* est composé de 10 sous-unités (Cardol *et al.*, 2005 ; Jansch *et al.*, 1996 ; Hamanaka *et al.*, 2005) et présente une organisation proche de celle du complexe IV d'*Arabidopsis thaliana*. Chez *Chlamydomonas*, contrairement à la situation rencontrée chez les autres organismes, les gènes *COX2* et *COX3* sont encodés dans le génome nucléaire. De plus, Cox2 est encodé par deux gènes nucléaires distincts (*COX2a* et *COX2b*). Ces sous-unités comportent des extensions C et N-terminale, absentes de la sous-unité Cox2 conventionnelle, potentiellement impliquées dans l'assemblage et la stabilisation de la sous-unité Cox2 mature (Pérez-Martínez *et al.*, 2001). Avec le complexe III, le complexe IV compose la voie dite des cytochromes.

- **L'ATP synthétase**

Parfois considérée comme le cinquième complexe de la chaîne respiratoire, l'ATP synthétase catalyse la phosphorylation et la libération d'ATP dans la matrice mitochondriale en utilisant le potentiel électrochimique généré par les complexes I, III et IV comme source d'énergie. La fonction de l'ATP synthétase est de maintenir un large déséquilibre, de 7 à 10 ordre de magnitude, par rapport à l'équilibre ADP/ATP (Nicholls et Ferguson, 2002).

L'ATP synthétase est organisée en deux domaines : le domaine associé à la membrane  $F_0$  impliqué dans la translocation des protons et le domaine extrinsèque  $F_1$  catalysant la synthèse d'ATP. Chez les mammifères, le domaine  $F_0$  se compose des sous unités  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , et  $c_{10}$ . Les 10 sous-unités  $c$  forment un anneau tandis que les autres sous-unités s'organisent en un bras rotatif. La région  $F_1$  se subdivise en un cœur catalytique (sous-unités  $\alpha_3$ ,  $\beta_3$ ), un bras

périphérique (sous-unités OSCP, *b*, *d*,  $F_6$ ), la sous-unité *a* et la sous-unité dite « mineure » (sous-unités A6L, *e*, *f*, *g*) (Golden et Pedersen, 1998 ; Ko *et al.*, 2000 ; Walker et Dickson, 2006). Le flux de protons traversant l'enzyme provoque la rotation de l'anneau de sous-unités *c* du domaine  $F_0$ . Ce mouvement entraîne le bras-rotatif de  $F_0$  dont la rotation engendre un changement de conformation des trois sous-unités  $\alpha\beta$  de  $F_1$ . Ces sous-unités réalisent successivement la fixation de l'ADP et d'un phosphate inorganique, la phosphorylation de l'ADP en ATP et la libération de l'ATP (Itoh *et al.*, 2004).

L'ATP synthétase de *Chlamydomonas* se compose de seize sous-unités différentes. Huit de ces sous-unités sont homologues aux sous-unités  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$ ,  $\epsilon$ , *a*, *c* et OSCP, soit le domaine  $F_0$  et une partie  $F_1$  incluant le cœur catalytique (Franzén et Falk, 1992 ; Nurami et Franzén, 1996 ; Funes *et al.*, 2002 ; van Lis *et al.*, 2003 ; Cardol *et al.*, 2005 ; Vàsquez-Acevedo *et al.*, 2006). Les huit autres sous-unités seraient spécifiques aux algues chlorophycées (Cardol *et al.*, 2005 ; Vàsquez-Acevedo *et al.*, 2006). Celles-ci seraient impliquées dans la formation du dimère stable d'ATP synthétase observé chez *Chlamydomonas* (van Lis *et al.*, 2003, 2005).

## **2.2. Les transporteurs de NAD(P)H**

### **• L'échangeur malate-oxaloacétate**

La présence de deux malate déshydrogénases réversibles et d'un échangeur malate-oxoglutarate permet un transfert de NAD(P)H au travers de la membrane interne mitochondriale (voir figure 2.1). Cet antiport neutre a été identifié dans la membrane interne mitochondriale de *Solanum tuberosum* et *Pisum sativum* (Ebbighausen *et al.*, 1985), mais également au niveau de la membrane interne du chloroplaste de l'épinard (Flügge et Heldt, 1991). L'import de NADH au niveau de la membrane interne est cependant défavorable au vu de la concentration en NADH au sein de la mitochondrie. De plus, le gradient d'oxaloacétate au niveau de cette membrane va dans le sens d'un import de ce composé, et va donc également à l'encontre d'un import de NADH (Ebbighausen *et al.*, 1985 ; Krömer et Heldt, 1991). Une fonction d'import de NADH depuis le cytoplasme vers la mitochondrie a cependant été observée chez l'épinard, en conditions de photorespiration (Hanning et Heldt, 1993), et confirmée par les modifications d'expression des gènes encodant des malate déshydrogénases en fonction de la lumière (Rasmusson et Escobar, 2007). Différents gènes encodant des malate déshydrogénases potentiellement impliqués dans cette navette malate-oxaloacétate ont été identifiés dans le génome nucléaire de *Chlamydomonas* (Merchant *et al.*, 2007).

- **La navette malate-aspartate**

Une navette malate-aspartate permet le transfert de NADH au travers de la membrane interne mitochondriale. Le principe repose sur la réduction NADH-dépendante de l'oxaloacétate en malate du côté intermembranaire et réoxydation de celui-ci en oxaloacétate dans la matrice avec libération de NADH. Le passage du malate au travers de la bicouche lipidique est réalisé par un antiport avec du 2-oxoglutarate. La réaction est associée avec un antiport glutamate/aspartate permettant la réoxydation de l'oxaloacétate du côté intermembranaire et la réduction du 2-oxoglutarate du côté matriciel (voir figure 2.1). Chez les mammifères, l'import de NADH au travers de la membrane interne est soutenu par un transfert de protons accompagnant l'échange aspartate-glutamate (Krämer et Palmieri, 1989). Chez les plantes, l'échangeur aspartate-glutamate semble être passif, suggérant que le transfert de potentiel serait indépendant du gradient électrochimique et apparemment orienté vers un export du NADH (Laloi *et al.*, 1999 ; Rasmusson *et al.*, 2008). Plusieurs enzymes potentiellement impliquées dans la navette malate-aspartate ont été identifiées dans le génome de *Chlamydomonas* (Merchant *et al.*, 2007).

- **Les glycérol-3 phosphates déshydrogénases (G3P-DH)**

Présentes chez les animaux (Nicholls et Fergusson, 2002), *A. thaliana* (Shen *et al.*, 2003, 2006), *Chlamydomonas* (Klöck et Kreuzberg, 1989) et d'autres microorganismes, ces enzymes participent à l'oxydation du NADH cytoplasmique par l'intermédiaire de deux isoformes. Celles-ci sont localisées dans le cytoplasme et sur la face intermembranaire de la membrane interne mitochondriale. Leur combinaison forme un transporteur transmembranaire d'équivalents réducteurs (voir figure 2.1). La première isoforme produit du glycérol-3P en oxydant du NADH cytosolique, la seconde isoforme oxyde le glycerol-3P en dihydroxyacétone phosphate en réduisant le pool d'ubiquinone de la membrane interne mitochondriale. Chez la levure, il a été démontré que la G3P-DH forme un complexe multiprotéique avec les Ndh-II externes et que ces enzymes interviendraient de façon majoritaire dans le maintien de l'équilibre oxydo-réducteur de la cellule en condition de croissance aérobie (Rigoulet *et al.*, 2004 ; Grandier-Vazeille *et al.*, 2001). Chez *Arabidopsis*, un tel complexe n'existe pas et aucune corrélation d'expression n'a pu être démontrée entre l'expression des *NDH-II* et des deux isoformes de la G3P-DH (Rasmusson *et al.*, 2007). L'analyse d'un mutant de l'isoforme cytosolique a permis de mettre en évidence une augmentation du rapport NADH/NAD<sup>+</sup> cellulaire, suggérant une implication significative dans l'oxydation du NADH cytoplasmique (Shen *et al.*, 2003, 2006)

### **2.3. Enzymes réalisant l'oxydation directe de substrats carbonés**

Outre le complexe II catalysant l'oxydation du succinate en fumarate, plusieurs enzymes impliquées dans l'oxydation directe de substrats carbonés ont été identifiées chez les plantes et les animaux. La plupart du temps, les électrons acheminés à ces enzymes vont réduire un groupement FAD avant d'être acheminés au pool d'ubiquinone. Cette opération va permettre l'utilisation de substrat autre que le NADH pour alimenter en électrons la voie des cytochromes. Ces fonctions peuvent également jouer un rôle important dans la régulation de la concentration de ces substrats au niveau cellulaire (Rasmusson *et al.*, 2008).

- **D-lactate déshydrogénase (L-DH)**

Le D-lactate est un produit de la voie des glyoxalases dont la fonction est la dégradation du méthylglyoxal, un sous-produit de la glycolyse et de l'oxydation des lipides (Kalapos, 1999). Chez le tabac, on sait que cette voie métabolique est impliquée dans la tolérance au stress salin (Singla-Pareek *et al.*, 2003, 2006). Le D-lactate apparaît donc comme un substrat alternatif pour la phosphorylation oxydative dans certaines conditions de stress. La D-lactate déshydrogénase est présente dans les membranes d'*E. coli* où elle réduit directement le pool de quinones (Dym *et al.*, 2000). Une D-lactate déshydrogénase est également présente dans les mitochondries de levures, de mammifères et a été identifiée chez *Chlamydomonas* (Atlante *et al.*, 2005, Husic et Tolbert, 1987). Une enzyme analogue a été identifiée dans les mitochondries de plantes où l'oxydation du D-lactate est couplée avec un transport d'électrons par le complexe III (Atlante *et al.*, 2005).

- **Flavoprotéine déshydrogénase (F-DH)**

Dans les mitochondries de mammifères, l'oxydation des flavoprotéines implique au moins neuf flavoprotéines déshydrogénases et deux enzymes intermédiaires permettant le transfert d'électrons au pool d'ubiquinones (Etf et EtfQ-QR). La plupart de ces enzymes ont également été identifiées dans les mitochondries de plantes (Ishizaki *et al.*, 2005, 2006 ; Sweetlove *et al.*, 2007). Deux gènes encodant des protéines (*ETFA* et *ETFB*) homologues de sous-unités de flavoprotéine déshydrogénase d'autres espèces ont été identifiées dans le génome de *Chlamydomonas* (Merchant *et al.*, 2007).

- **L-galactono-1,4-lactone déshydrogénase (GalL-DH)**

La L-galactono-1,4-lactone déshydrogénase participe à l'une des deux voies identifiées de synthèse de l'ascorbate chez les plantes (Valpuesta et Botella, 2004). L'oxydation du GalL en acide ascorbique est réalisée par une déshydrogénase avec transfert des électrons au cytochrome c mitochondrial (Bartoli *et al.*, 2000). Chez *A. thaliana*, cette enzyme serait apparemment associée au complexe I (Heazlewood *et al.*, 2003) et son action serait inhibée par la roténone, empêchant la synthèse d'ascorbate (Millar *et al.*, 2003). Un gène encodant une protéine (*GLDH*) homologue à la GalL-DH d'*Arabidopsis thaliana* a été identifiée dans le génome nucléaire de *Chlamydomonas* (Merchant *et al.*, 2007).

Deux autres enzymes sont spécifiées dans la littérature comme participant à la réduction directe de substrats carbonés associée à la réduction du pool d'ubiquinone. Il s'agit de la L-gulono-1,4-lactone déshydrogénase, homologue de la GalL déshydrogénase qui participerait à la seconde voie de synthèse de l'ascorbate chez les plantes (Valpuesta et Botella, 2004) et la proline déshydrogénase, enzyme FAD-dépendante associée à la membrane mitochondriale des plantes et des animaux, première enzyme de la voie de dégradation de la proline (Adams et Franck, 1980). Ces gènes n'ont jusqu'à présent pas été mis en évidence dans le génome nucléaire de *Chlamydomonas* (Merchant *et al.*, 2007).

#### **2.4. Les protéines découplantes (UCP)**

Les protéines découplantes sont localisées dans la membrane interne mitochondriale et présentes dans tout le monde eucaryote. Elles permettent le retour des protons dans l'espace intermembranaire au dépens du gradient de protons sans phosphorylation d'ATP (Krauss *et al.*, 2005). Ce transfert s'accompagne de libération de chaleur, qui semble être la fonction principale des Ucp dans les tissus adipeux bruns animaux (Ricquier et Bouillaud, 2000 ; Silva, 2006). La présence d'Ucp a cependant été mise en évidence dans d'autres tissus dont la fonction n'est pas la thermogénèse (Brand et Esteves, 2005). Chez les plantes, la présence d'Ucp a également été mise en évidence (Vercesi *et al.*, 2006 ; Laloï *et al.*, 1997 ; Hourton-Cabassa *et al.*, 2004), ainsi que chez *Chlamydomonas* (*UCP1*, 2 et 3) (Cardol *et al.*, 2008). Chez les plantes, les Ucp sont induites par la présence d'anion superoxyde et de produit de la peroxydation des lipides (Considine *et al.*, 2003 ; Smith *et al.*, 2004), suggérant un mécanisme de défense contre la production de ROS (Reactive oxygen species).



## **2.5. L'oxydase alternative (AOX)**

Présente chez les plantes, certains protistes et plusieurs champignons, l'oxydase alternative est une enzyme catalysant la réduction de l'oxygène à partir d'électrons du pool d'ubiquinone. Cette voie, parallèle à la voie des cytochromes ne contribue pas à l'établissement du gradient de protons. Chez certaines *Araceae*, la fonction de l'Aox serait la production de chaleur (Moore et Siedow, 1991), mais sa fonction principale serait plutôt la régulation du métabolisme du carbone et de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale (Lambers, 1982). Selon cette hypothèse, l'Aox permettrait la continuation de la glycolyse et du cycle de Krebs en cas de surcharge de la voie des cytochromes (Wagner et Krab, 1995 ; Vanlerberghe et McIntoch, 1997). L'Aox servirait également à éviter la production de ROS par sur-réduction de la chaîne mitochondriale. Encodée par une famille réduite de gène, l'Aox des plantes supérieures est induite dans différentes conditions incluant des stress oxydatifs (Wagner, 1995; Vanlerberghe and McIntosh 1996 ; Yukioka *et al.*, 1998; Huh and Kang, 2001), l'inhibition de la synthèse de protéine mitochondriale (Zhang, 1996), l'inhibition de la voie des cytochromes (Saisho *et al.*, 1997; Wagner and Wagner, 1997; Tanudji *et al.*, 1999; Ducos *et al.*, 2001) ou la présence d'acétate (Vanlerberghe and McIntosh, 1996; Lennon *et al.*, 1997; Potter *et al.*, 2000). L'Aox de *Chlamydomonas* est encodée par deux gènes (*AOX1* et *AOX2*), l'expression du gène *AOX1* étant majoritaire et dépendante de la disponibilité du nitrate comme source d'azote dans le milieu (Baurain *et al.*, 2003).

## **2.6. Les NAD(P)H déshydrogénases de type II (NDH-II)**

Les NAD(P)H déshydrogénases mitochondriales de type II sont des polypeptides simples d'environ 40 à 65 kDa (Jaworowski *et al.*, 1981-a ; 1981-b ; de Vries et Grivell 1988, Michalecka 2003, Melo 1999). Elles sont localisées sur la face externe de la membrane interne de la mitochondrie et capables d'oxyder le NAD(P)H cytoplasmique sans transfert de charge à travers la membrane, ou présentes sur la face interne, oxydant le NAD(P)H matriciel sans translocation de protons. Ces enzymes alimentent en électrons le pool d'ubiquinones à partir du NAD(P)H cellulaire et sont insensibles à la roténone (Nicholls et Fergusson, 2003). Ces enzymes sont généralement liées de manière non-covalente à un groupement FAD, à l'exception d'une *archea hyperthermophyle* où le FAD est remplacé par un FMN (Melo *et al.*, 2004).

La spécificité et l'activité des Ndh-II seraient influencées par le pH et par la disponibilité en calcium (Geisler *et al.*, 2007, Michalecka *et al.*, 2003). Le  $K_{m\text{NADH}}$ <sup>1</sup> des Ndh-II internes est dix fois plus élevé que celui du complexe I (Møller et Palmer, 1982 ; Rasmusson et Moller, 1991). Cette différence semble limiter l'action des NDH-II uniquement en présence d'une forte concentration en potentiel réducteur matriciel (Dry et Wiskich, 1985 ; Igamberdiev *et al.*, 1997 ; Igamberdiev et Gardeström, 2003). Cependant, à l'inverse du complexe I, ces enzymes ne réalisent pas de transfert de proton et peuvent donc réduire le pool d'ubiquinone indépendamment du gradient de proton.

Les premières caractérisations de Ndh-II datent du début des années 80 et concernaient la bactérie *E. coli* (Jaworowski *et al.*, 1981-a ; 1981-b). Par la suite, ce type d'enzyme a été identifié chez des levures (de Vries et Grivell, 1988 ; Melo *et al.*, 2001) et plusieurs plantes supérieures comme le haricot, le riz, la pomme de terre ou *Arabidopsis* (Menz et Day, 1996 ; Ohyanagi *et al.*, 2006 ; Rasmusson *et al.* 1999 ; Michalecka *et al.*, 2003), mais pas chez les animaux.

En 2005, sept open reading frame homologues aux gènes de NAD(P)H déshydrogénase de type II d'autres organismes ont été identifiés dans le génome nucléaire de *Chlamydomonas* (NDA1 à 7) (Cardol *et al.*, 2005). Ces enzymes sont le sujet principal de cette thèse. Le chapitre suivant présente une revue de la littérature disponible sur ces protéines.

---

<sup>1</sup> Constante de Michaelis reflétant l'affinité de l'enzyme pour son substrat, un  $K_m$  faible indique une grande affinité.

### **3. Les NAD(P)H déshydrogénases de type II.**

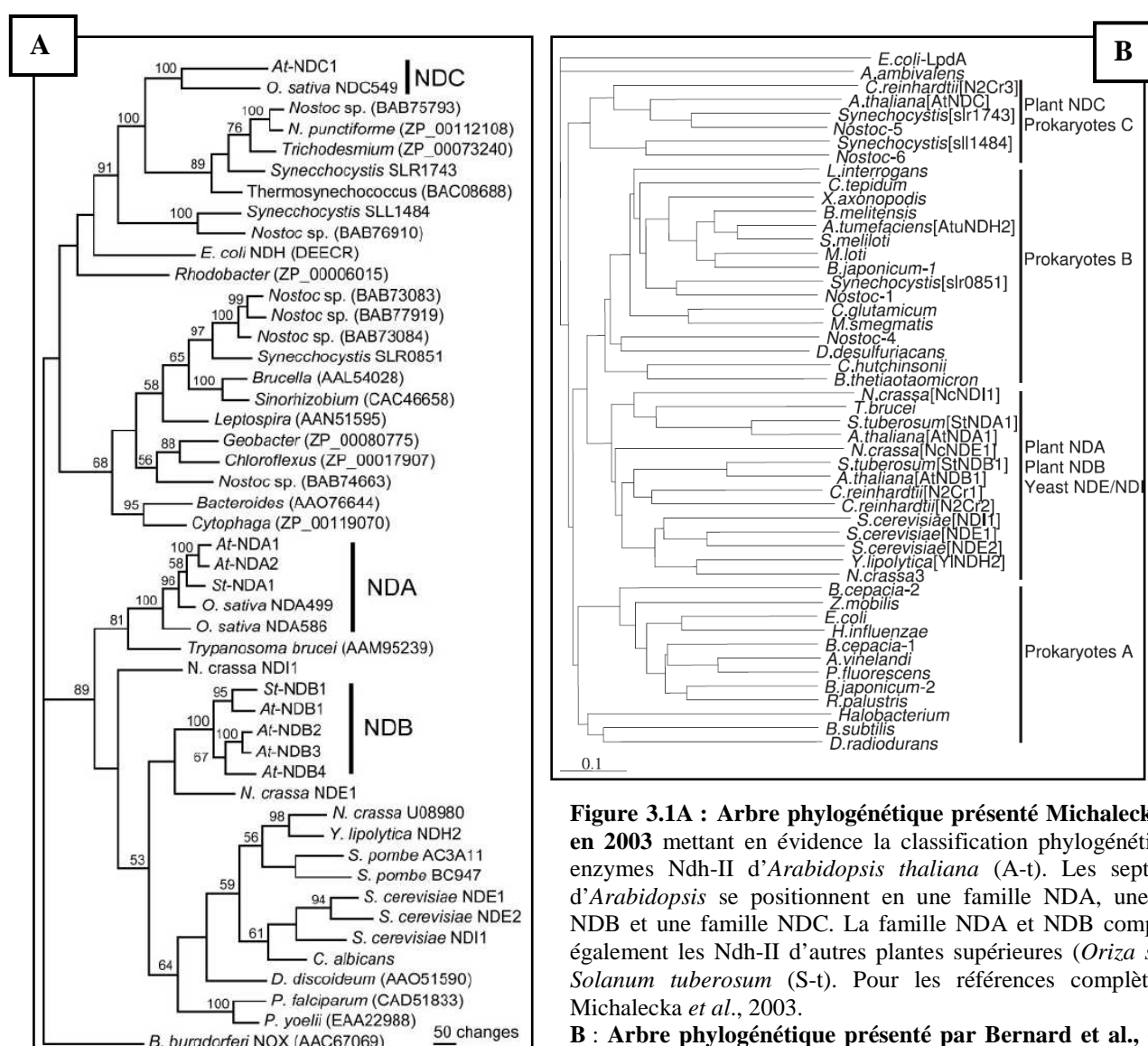
Comme dit précédemment, les NAD(P)H de type II ont été identifiées chez de nombreux eucaryotes et procaryotes, mais pas chez les animaux. Historiquement, plusieurs noms ont été donnés à ce type d'enzyme : NDE et NDI chez les levures, NDH chez *E. coli*, NDA pour NAD(P)H déshydrogénase alternative dans certaines publications, NDA, NDB ou NDC en fonction de leurs origines phylogénétiques chez les plantes supérieures, ou même N2-Cr dans une publication récente en parlant des déshydrogénases de *Chlamydomonas* (Bernard *et al.*, 2006). Par simplification ce type d'enzyme sera dénommé dans cette ouvrage des Ndh-II, et les gènes des NAD(P)H déshydrogénases de *Chlamydomonas* seront désignés sous l'appellation *NDA1*, *NDA2*... ou sous l'appellation *Cr-NDA1*, *Cr-NDA2*... si une différenciation est nécessaire.

Ces enzymes ont été identifiés chez de nombreux organismes, dont *Arabidopsis thaliana* (Michalecka *et al.*, 2003). Les Ndh-II de cette espèce sont actuellement les mieux caractérisées et une littérature abondante est disponible sur le sujet. Celle-ci couvre notamment la localisation des Ndh-II au sein de la cellule, la régulation transcriptionnelle et post-transcriptionnelle des *NDH-II*, ainsi que leur classification et l'analyse de leurs séquences.

#### **3.1. Classification phylogénétique des NDH-II**

Une première classification des Ndh-II en fonction de leur origine phylogénétique a été proposée par Michalecka *et al.* en 2003. La comparaison des séquences protéiques de Ndh-II de plantes supérieures, de bactéries, de levures a permis de mettre en évidence l'existence de trois familles de gènes *NDH-II* (voir figure 3.1-A). Les familles ND-A et ND-B présentent une plus grande homologie avec les Ndh-II des levures et des protistes. A l'inverse, la famille ND-C présente une homologie avec les Ndh-II des cyanobactéries. Cette classification indique que les gènes de la famille NDC des plantes auraient été intégrés dans la cellule par l'intermédiaire du précurseur du chloroplaste, un transfert ayant par la suite déplacé le gène depuis le chloroplaste vers le noyau. Chez les plantes, les protéines de la famille ND-B se différencient des protéines ND-A par la présence dans leur séquence d'un motif EF-Hand impliqué dans la fixation du calcium. Ce motif présente deux hélices  $\alpha$ , nommées E et F d'après le motif de fixation du calcium identifié dans la séquence de la parvalbumine, séparées par une boucle. Ce motif est également présent chez l'homologue Nde1 de *N. crassa* (Michalecka *et al.*, 2003).

Par ailleurs, une classification plus précise des protéines Ndh-II des organismes procaryotes a été réalisée par Bernard *et al.* en 2006. Trois clades phylogénétiques ont été définis, comprenant les enzymes Ndh-II procaryotiques non classifiées par Michalecka *et al.*. La figure 3.1-B montre que les Ndh-II « cyano-like » de plantes ainsi qu'une Ndh-II de *Chlamydomonas* (*NDA5*) appartiennent à la famille procaryotique. Deux autres familles procaryotiques (procaryote A et B) sont également définies. La famille procaryote A regroupe la plupart des eubactéries connues, incluant *E. coli*, *B. subtilis* et *A. vinelandii*, tandis que la famille procaryote B comprend un mélange d'eubactéries et de cyanobactéries. (Bernard *et al.*, 2006).



**Figure 3.1A :** Arbre phylogénétique présenté Michalecka *et al.*, en 2003 mettant en évidence la classification phylogénétique des enzymes Ndh-II d'*Arabidopsis thaliana* (A-t). Les sept Ndh-II d'*Arabidopsis* se positionnent en une famille NDA, une famille NDB et une famille NDC. La famille NDA et NDB comprennent également les Ndh-II d'autres plantes supérieures (*Oriza sativa* et *Solanum tuberosum* (S-t)). Pour les références complètes, voir Michalecka *et al.*, 2003.

**B :** Arbre phylogénétique présenté par Bernard *et al.*, en 2006 mettant en évidence l'existence de trois familles phylogénétiques

comportant les enzymes Ndh-II d'organismes procaryotes. La famille NDC proposée par Michalecka *et al.* en 2003 est englobée dans une famille procaryotique comportant les enzymes Ndh-II chloroplastiques de plantes supérieures et les enzymes Ndh-II d'une partie des cyanobactéries de l'arbre. L'arbre inclut également trois Ndh-II de *Chlamydomonas reinhardtii* dénommées N2Cr1, 2 et 3 correspondant respectivement à *NDA1*, *NDA3* et *NDA5*. Pour les références complètes, voir Bernard *et al.*, 2006.

### **3.2. Localisation intracellulaire des déshydrogénases**

Les protéines Ndh-II sont présentes au sein des cellules eucaryotes au niveau de la membrane interne de la mitochondrie. Elles peuvent être localisées sur la face externe, oxydant le NAD(P)H cytoplasmique sans transfert de charge à travers la membrane, ou sur la face interne, oxydant le NAD(P)H matriciel sans translocation de proton (Nicholls et Fergusson, 2003).

Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, il existe deux Ndh-II localisées sur la face externe (Nde) et une Ndh-II localisée sur la face interne (Ndi) de la membrane interne mitochondriale. Cette dernière remplace le complexe I mitochondrial, absent chez *S. cerevisiae* en oxydant le NADH présent dans la matrice (de Vries *et al.*, 1992 ; Luttkik *et al.*, 1998 ; Small et McAlister-Henn, 1998). Quant au champignon *Neurospora crassa*, il possède au moins deux Nde et une Ndi, cette fois en complément d'un complexe I (Melo *et al.*, 2001).

Chez *Solanum tuberosum*, deux Ndh-II ont été identifiées, une localisée sur la face interne de la membrane interne mitochondriale (St-Nda1), l'autre localisée sur la face externe de cette membrane (St-Ndb1) (Rasmusson et Agius, 2001 ; Rasmusson *et al.*, 1999).

Chez *Arabidopsis thaliana*, sept gènes (*NDA1-2*, *NDB1-4* et *NDC*) classés selon l'origine phylogénétique des protéines correspondantes ont été identifiés. Les protéines Nda1, Nda2 et Ndc seraient localisées sur la face interne de la membrane mitochondriale tandis que Ndb1 à 4 seraient localisées du côté externe (Michalecka *et al.*, 2003 ; Elhafez *et al.*, 2006). Ces localisations mettent en évidence une corrélation nette chez les plantes supérieures entre la présence d'un motif EF-Hand et un positionnement sur la face externe de la membrane mitochondriale.

Par ailleurs, la protéine Ndc d'*Arabidopsis* a également été retrouvée par analyse protéomique dans des extraits chloroplastiques (Vidi *et al.*, 2006 ; Ytterberg *et al.*, 2006). Ceci a été confirmé récemment par des expériences de fusion GFP où le double adressage mitochondrial et chloroplastique de la protéine Ndc d'*Arabidopsis* a été mis en évidence (Carrie *et al.*, 2008). De plus, il a été montré par la même technique que les protéines Nda1, Nda2 et Ndb1 étaient dirigées non seulement vers la mitochondrie, mais également vers les peroxysomes. Chez *Chlamydomonas*, qui ne possède pas de peroxysome (Goyal, 2002), une activité NAD(P)H déshydrogénase de type II a été détectée au sein du chloroplaste par des mesures de flux d'électrons photosynthétiques en présence d'inhibiteurs du photosystème II et de la chaîne respiratoire. Cette activité est par contre inhibée par les inhibiteurs des Ndh-II (DPI et Flavone) (Mus *et al.*, 2005).

### **3.3. Régulation de l'expression des NDH-II**

L'analyse de l'expression des gènes *NDH-II* rentre dans le cadre plus général de l'expression des voies alternatives (*AOX* et *UCP*). Celles-ci sont régulées par de nombreux stimuli environnementaux (Finnegan *et al.*, 1997 ; Laloï *et al.*, 1997 ; Svensson et Rasmusson, 2001 ; Svensson *et al.*, 2002), alors que l'expression des gènes encodant les complexes de la chaîne respiratoire principale sont peu soumis à de telles régulations (Clifton *et al.*, 2005).

L'étude la plus complète actuellement a été réalisée en 2005 par Clifton *et al.* sur des suspensions cellulaires d'*Arabidopsis thaliana*. Les niveaux de transcripts des gènes encodant des protéines des complexes I à IV de la chaîne respiratoire ont été déterminés par micro-arrays après différents traitements (Pour la liste complète des traitements et leurs effets voir tableau 3.3). Ceux-ci sont restés majoritairement stables quel que soit le traitement, et la même tendance a été observée pour les gènes encodant des protéines du cycle de Krebs et les Ucps (NB : Un traitement a été considéré comme stable si la variation observée ne dépassait le double/la moitié de l'expression initiale). Par contraste, les gènes encodant des membres de la famille *NDH-II* ou *AOX* ont montré une variation largement plus importante et des réponses variées aux différents traitements.

Une analyse en RT-PCR quantitative a été réalisée pour analyser l'abondance de transcripts de la famille *AOX*, *UCP* et *NDH-II* (voir figure 3.2) et sur certains gènes encodant des protéines de la chaîne respiratoire principale. A nouveau, les gènes encodant des protéines de la voie respiratoire principale montrent peu de variation d'expression. Deux exceptions notables concernent le cytochrome c et le gène *IDH2* (Sous-unité 2 de l'isocitrate déshydrogénase du cycle de Krebs) qui ont réagi à la plupart des traitements. Au niveau des gènes des voies alternatives, des comportements variables ont été observés, y compris dans une même famille génétique. Ainsi, le gène *NDB1* montre peu de variation, alors que les gènes *NDB2* et *4* présentent une induction en présence de nombreux traitements. L'expression du gène *UCP1* est globalement stable alors que l'expression du gène *UCP2* présente une légère induction en présence de cinq des quinze traitements proposés (voir figure 3.2).

Un travail équivalent a été réalisé par Elhafez *et al.*, en 2006 sur des plantes entières. Les données obtenues par Clifton *et al.*, en 2005 et Elhafez *et al.* en 2006 ne sont pas totalement compatibles, mais suggèrent une réponse concertée des gènes *NDB2* et *AOX1* aux différents traitements, associée à une réponse des gènes *NDB4* ou *NDA1* pour certains traitements. Sur plante entière, il a également été montré que *NDA1* présente une expression majoritaire et que les gènes *NDA1* et *NDB2* sont sur-exprimés à la lumière. L'expression tissulaire des gènes *NDA* d'*Arabidopsis* a également été déterminée (voir figure 3.2).

Gène	Localisation intracellulaire	Localisation tissulaire	Inducteur	Répresseur
NDA1 At1g07180	Mito interne Peroxisome	C, Fe, B, Fl	Cys, Chl, Glu, Mal, Rot,	
NDA2 At2g29990	Mito interne Peroxisome	R, C, Fe, B, Fl	Cys, Cit, Glu, Mal, AS, chl	
NDB1 At4g28220	Mito externe Peroxisome	R, C, Fe, B, Fl	Glu	Oli
NDB2 At4g05020	Mito externe	R, B, Fl	AA, Chl, Cit, Cys Ery, FCCP, Glu, H2O2, Mal, AS, Nor, Oli, Par, Rot, AS	
NDB3 At4g21490	Mito externe	R, B, Fl	Signal trop faible pour permettre une analyse	
NDB4 At2g20800	Mito externe	R, C, Fe, B, Fl	Chl, AS, Cys, Ery, , Glu, Mal, Nor, Par, Rot,	
NDC At5g08740	Mito interne Chloroplaste	R, C, Fe, B, Fl	AA, Cys, Mal, Man, Glu, AS	FCCP
AOX1a At3g22370	Mito	nd	Chl, Cys, Ery, FCCP, Glu, H2O2, Mal, Man, Oli, Para, Rot, AS,	-
AOX1c AT3g27620	Mito		Chl, Cys, Glu, AS	Ery, Oli
AOX2 At5g64210	Mito		AB, Cys, Nor, Par	AA, Chl, Cit, Ery, FCCP, H <sub>2</sub> O <sub>2</sub> , Mal, Oli, AS
UCP1 At3g54110	Mito		-	Man
UCP2 At5g54110	Mito		Cys, Ery, Glu, Mal, Nor	-

**Figure 3.2 :** Résumé des informations concernant l'expression des gènes encodant les voies alternatives respiratoires chez *Arabidopsis thaliana*. La localisation tissulaire fait référence à C : Cotylédon ; Fe : Feuille ; B ; bourgeon floral ; Fl : Fleur ; R : Racine et provient de Elhafez *et al.*, 2006. Les colonnes « inducteurs » et « répresseurs » font référence aux traitements indiqués à la figure 3.3 qui provoquent au moins un doublement de l'expression du gène (induction) ou au contraire une diminution par moitié de son expression (répression) selon Clifton *et al.*, 2005. La localisation intracellulaire est donnée à titre de référence selon les informations du point 2.2, « interne » fait référence à une localisation du côté matriciel de la membrane interne mitochondriale, « externe » fait référence à une localisation face à l'espace intermembranaire sur cette membrane. Nd : La localisation tissulaire des enzymes Aox et Ucp n'a pas été déterminée par Elhafez *et al.*

Sigle	Traitement	Conc.	Effet
AA	Antimycine A	5µM	Inhibiteur du complexe III
AB	Acide Bongkreki	50µM	Inhibiteur de l'ouverture des canaux de perméabilité transitoire.
Chl	Chloramphénicol	200µM	Inhibiteur de la synthèse des protéines au niveau des organelles.
Cit	Citrate	10mM	Signal rétrograde du cycle de Krebs
Cys	Cystéine	1mM	Modulateur du potentiel Rédox et de la synthèse d'acides aminés
Ery	Erythromycine	200µM	Inhibiteur de la synthèse des protéines des plastes
FCCP	FCCP	2,5µM	Découpleur du potentiel membranaire
Glu	Glucose	3% (w/v)	Apport de carbone alternatif / signal direct de sucre
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	10mM	Signal inducteur de ROS / oxydation directe
Mal	Malonate	5mM	Inhibiteur du complexe II mitochondrial et du cycle de Krebs
Man	Mannitol	3% (w/v)	Stress hyper-osmotique
Nor	Norflurazon	100µM	Inhibiteur de la synthèse des caroténoïdes
Oli	Oligomycine	1,25µM	Inhibiteur de l'ATP synthétase mitochondriale
Par	Paraquate	0,04 g/l	Producteur de ROS
Rot	Roténone	100µM	Inhibiteur du complexe I
AS	Acide salicylique	10 µM	Signal de défense / découpleur de la respiration

**Figure 3.3 :** Traitements testés par Clifton *et al.* pour l'étude de l'expression des gènes des voies respiratoires alternatives. Source : Clifton *et al.*, 2005.

### **3.4. Régulation de l'activité des Ndh-II par le calcium et le pH**

L'oxydation du NAD(P)H par des mitochondries intactes est connue depuis longtemps comme étant affectée par le pH et la concentration en calcium. Cependant, des données souvent contradictoires ont été publiées au cours des deux dernières décennies (Møller, 1997, Rasmusson *et al.*, 2004 Nash et Wiskich, 1983 ; Zottini *et al.*, 1993).

En 2007, Geisler *et al.*, ont analysé avec précision la spécificité de substrats (NADH ou NADPH) et la capacité de liaison au calcium des protéines Ndb1, 2 et 4 d'*Arabidopsis thaliana*. Pour ce faire, ils ont réalisé des protéines de fusion et les ont exprimées chez *Escherichia coli*. Les auteurs ont montré que les protéines Ndb1 et Ndb2 sont capables de lier le calcium et qu'un changement d'acide aminé dans le motif EF-Hand de Ndb1 abolit la liaison au calcium. Les protéines Ndb2 et 4 complètent fonctionnellement un mutant d'*E. coli* dépourvu de NAD(P)H déshydrogénase (type I et type II absent). Les auteurs ont également mis en évidence la protéine Ndb1 chez *E. coli*, mais sans complémentation du mutant. Des extraits membranaires des trois mutants bactériens Ndb1, 2 et 4 ont ensuite été utilisés pour oxyder du NAD(P)H.

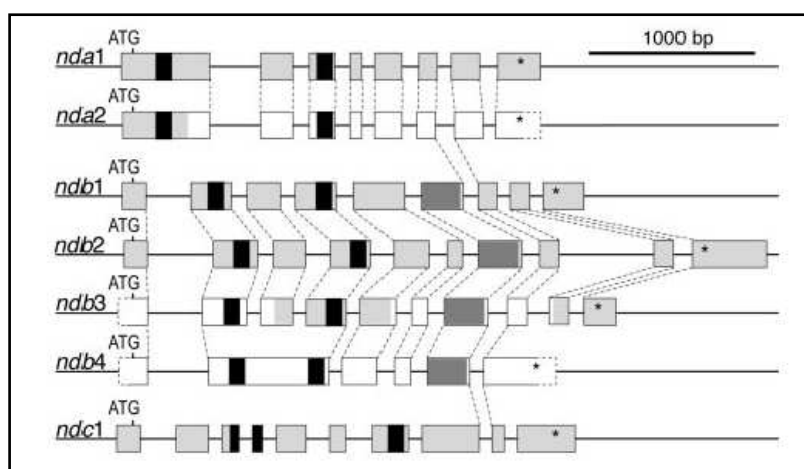
Dans des conditions physiologiques de pH (pH 7,2) et de concentrations en NAD(P)H (80µM), la protéine Ndb1 présente un vitesse d'oxydation cinq fois plus important pour le NADPH que pour le NADH et son activité est totalement dépendante de la présence de calcium. Ndb2 est par contre spécifique du NADH et son action est stimulée par le calcium. Ndb4 présente également une nette spécificité pour le NADH, mais son activité est indépendante de la présence de calcium.

L'activité de ces enzymes a également été mesurée à différents pH physiologiques (de 6,8 à 7,8) en présence de 120 µM de NAD(P)H. Dans le cas de Ndb1, 80 % de l'activité NADPH oxydase est dépendante de la présence de calcium à un pH de 7,2, mais est seulement à 25 % dépendante à un pH de 6,8. L'activité NADPH déshydrogénase de Ndb2 est également pH dépendante.



### 3.5. Analyse de la séquence des *NDH-II* :

L'analyse de la structure des gènes *NDH-II* d'*Arabidopsis thaliana* et du riz montre que la localisation et la longueur des introns présents sont bien conservés pour les deux gènes de la famille NDA d'*Arabidopsis* et du gène *NDA499* du riz, et en partie pour le gène *NDA549* du riz (voir figure 3.4 pour une représentation des gènes *NDH-II* d'*Arabidopsis thaliana*). Dans la famille NDB d'*Arabidopsis*, la structure des gènes est bien conservée à l'exception du gène *NDB4* qui semble avoir perdu certains introns présents chez *NDB1*, 2 et 3. Les positions des introns du gène *NDC* d'*Arabidopsis* et du gène *NDC549* du riz sont également communes (Michalecka *et al* ; 2003).



**Figure 3.4 :** Représentation de la structure exon-intron des gènes *NDH-II* d'*Arabidopsis thaliana*. Les rectangles représentent les exons. Les sites de fixations des dinucléotides sont représentés en noir. Le motif EF-Hand est indiqué en gris foncé. Les segments confirmés par séquençage de cDNA sont représentés en gris clair tandis que les sections en blanc ont été prédites par bioinformatique. Le codon STOP est indiqué par une astérisque. Source : Michalecka *et al.*, 2003.

Le motif EF-Hand de fixation du calcium, base de la classification de la famille NDB, présente également une bonne conservation dans sa localisation chez *Arabidopsis* et *Solanum tuberosum* (Michalecka *et al.*, 2003 ; Rasmusson *et al.*, 1999). Cette localisation est également conservée avec le motif EF-Hand de la protéine Nde1 de *N. crassa* (Melo *et al.*, 2001 ; Kerscher, 2000 ; Michalecka *et al.*, 2003), bien que le motif soit plus éloigné (voir figure 3.5).

At-Ndb1	456	STIAQRKLLIGDIANIFKKAADADNSGTLTMELEGVDDIIVRYPOVELYLKSKHMRHINDLLADSEGCNA----RKEVDIEAFKLLALSEADSOMKT
At-Ndb2	467	TINQRKVMEDVSAIFSKADKDKSGTLTKKEFOBAMDDICVRYPOVELYLKSKRMRGTADLLKEAETDDVSKNNIELKTEEPKSALSQVDSQVKF
At-Ndb3	466	TINQRKVMEDIAAIFKADKENSGLTLMKEFHEVMSDIDRYPOVELYLKSKGMHGTDDLKQQAENGSKSVELDTEELKSAALCOVDSQVKL
At-Ndb4	467	TINQRKVMEDIAAIFNKADKQNTCTLKKKDFNSVVKDIDCORYPOVELYLKKNKLNINLLKSNCEP-----TQVNIKFKQALSEVDSQMKN
St-Ndb1	462	SVDQHKVMEDISTIFEAADKIDSGTLSVEEERDVLIEDIITRYPOVDLYLKNKHLEAKDLFRDSEGCNE----REVDIECFKLLALSHVDSQMKS
Nc-Nde1	478	TIQNVADHITFTFIRNLAWKHGKDPESELHLHFSWDRVVAQQIKK-RFPQAAHLKRLDKLFEELYKDKQ----NGTLDVFGELRELLKQIDSKLITS

**Figure 3.5 :** Comparaison de la séquence du motif EF-Hand des protéines Ndb d'*Arabidopsis thaliana* (voir Michalecka *et al.*, 2003), de la protéine Ndb1 de *Solanum* (CAB52797) et de la protéine Nde1 de *N. crassa* (NP-013865). Adapté de Michalecka *et al.*, 2003.



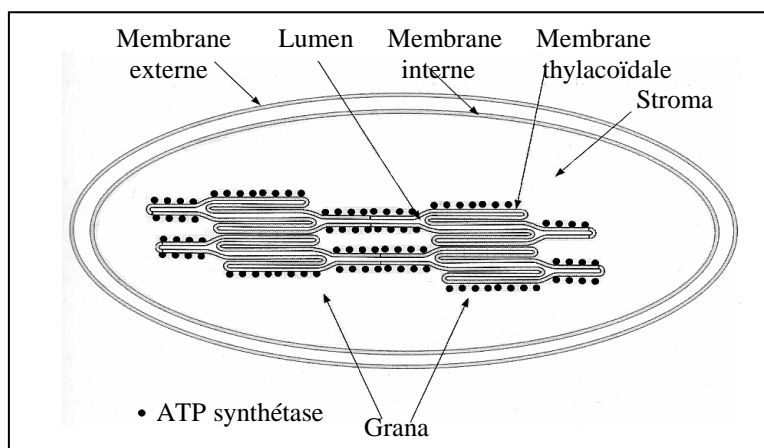
#### 4. Le chloroplaste

Comme la mitochondrie, le chloroplaste est entouré de deux membranes séparées l'une de l'autre par un espace intermembranaire. La membrane interne délimite la matrice chloroplastique : le stroma (voir figure 4.1). Au sein du stroma, un réseau membranaire complexe est formé par des vésicules aplaties : les thylacoïdes. Cette membrane thylacoïdale peut se replier sur elle-même pour former des empilements appelés grana, reliés entre eux par des thylacoïdes non-accolés. L'espace interne défini par la membrane thylacoïdale est le lumen (Staelin *et al.*, 1976 ; Albertsson *et al.*, 1991).

Le chloroplaste est le siège de la photosynthèse. Celle-ci a pour fonction la transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique sous forme de molécules organiques. Cet ensemble de réactions est divisé en deux phases:

- La phase claire, comprenant des réactions photochimiques entraînant le transfert d'électrons extraits de l'eau vers le  $\text{NADP}^+$  et la création d'un potentiel électrochimique localisé de part et d'autre de la membrane des thylacoïdes permettant la synthèse d'ATP. Le transfert d'électrons de l'eau au  $\text{NADP}^+$  requiert de l'énergie, celle-ci vient de la lumière absorbée par des pigments organisés en photosystèmes.
- La phase sombre est séparée spatialement et temporellement de la phase claire. Elle comprend un ensemble de réactions enzymatiques formant le cycle de Calvin au cours duquel le carbone est fixé et réduit pour donner des trioses-phosphates. C'est au cours de ces réactions que le NADPH et l'ATP produits par la phase claire sont utilisés. Les enzymes du cycle de Calvin sont localisées dans le stroma.

*Chlamydomonas* possède un chloroplaste unique qui représente les deux tiers du volume de l'algue. La membrane thylacoïdale du chloroplaste de *Chlamydomonas* présente une organisation proche de celle observée chez les plantes supérieures, mais les disques de grana ont une distribution plus irrégulière en taille et en orientation (Sager et Palade, 1957).



**Figure 4.1** : Représentation schématique d'un chloroplaste (adapté de Nicholls et Fergusson, 2002)

## 5. La chaîne de transport d'électrons chloroplastique

### 5.1. Le transport d'électrons linéaire

Contrairement à ce qui se produit dans la mitochondrie, l'énergie nécessaire à la production de potentiel réducteur et à la synthèse d'ATP par le chloroplaste ne provient pas du catabolisme de molécules organiques, mais de l'absorption d'énergie lumineuse. La transformation de l'énergie lumineuse en énergie chimique se réalise au niveau de complexes pigments-protéines appelés photosystèmes. Ceux-ci se composent de deux parties de fonctions différentes : l'antenne collectrice et un centre réactionnel. L'antenne collectrice se subdivise en une antenne interne, entourant le centre réactionnel, et une antenne périphérique.

La chaîne de transport d'électrons comporte deux photosystèmes. Le photosystème I (PSI) permet le transfert d'électrons depuis les plastocyanines vers la ferrédoxine et le photosystème II (PSII) catalyse la photolyse de l'eau et le transfert des électrons libérés au pool de plastoquinones (voir figure 5.1). Une partie de l'antenne périphérique peut, selon les conditions, s'associer à l'un ou l'autre des deux photosystèmes.

Dans les photosystèmes, les photons sont absorbés par des pigments (chlorophylle *a* et *b* et caroténoïdes) associés aux protéines de l'antenne collectrice. L'énergie d'excitation est transférée par résonance jusqu'à une « paire spéciale » de chlorophylles *a* présente dans le centre réactionnel. A l'état excité, la « paire spéciale » possède un potentiel rédox très électronégatif et peut transférer un électron à un accepteur primaire.

Les deux photosystèmes font partie intégrante d'une chaîne, dite linéaire, de transport d'électrons située dans les membranes thylacoïdales (voir figure 5.1). En présence de lumière activant le PSII, les électrons libérés par photolyse de l'eau vont être transférés au pool de plastoquinones. Les plastoquinones réduites vont transférer leurs électrons au cytochrome *b6/f* qui va lui-même les transférer au photosystème I (PSI) par le biais des plastocyanines. Le potentiel réducteur généré par le PS I en présence de lumière va permettre la réduction de la ferrédoxine qui réduira à son tour le  $\text{NADP}^+$  en NADPH nécessaire à la phase sombre. L'ATP synthétase utilise l'énergie du gradient électrochimique généré par le PS II et le cytochrome *b6/f* pour libérer l'ATP synthétisé sur ses sites catalytiques.

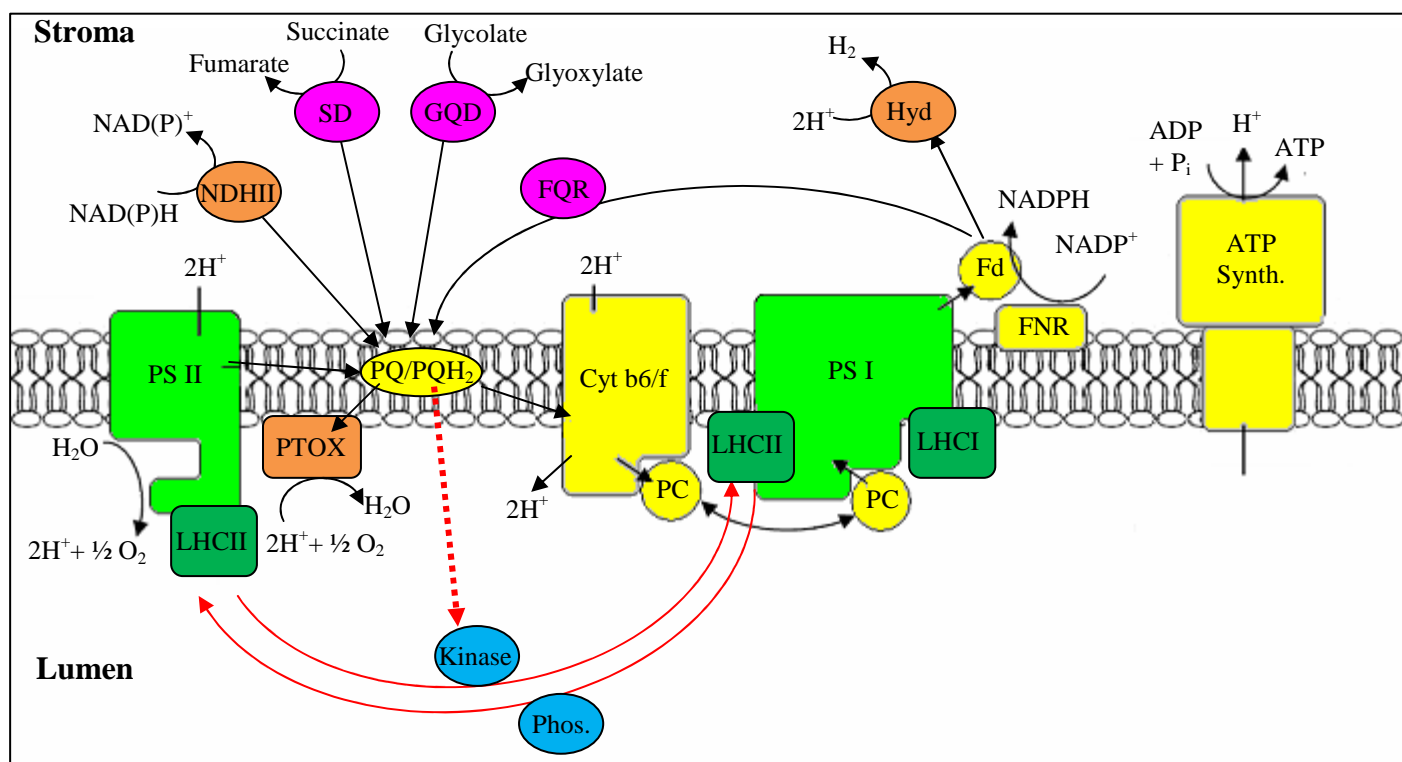


Figure 5.1 : Représentation de la chaîne photosynthétique de *Chlamydomonas reinhardtii*. Le schéma intègre les deux photosystèmes (PS I et II) (en vert clair), la voie linéaire de transport d'électrons et l'ATP synthétase (en jaune), les enzymes de la chlororespiration, et l'hydrogénase (en orange), les antennes périphériques (en vert foncé) et les enzymes liées aux transitions d'états (en bleu). Trois enzymes susceptibles de réaliser la réduction non-photochimique du pool de plastoquinones ont été ajoutées en violet. Légende :PS : photosystème I et II ; PQ : plastoquinone ; PC : plastocyanine ; Cyt b6f :cytochrome b6f ; Fd : ferrédoxine ; FNR : ferrédoxine NADP<sup>+</sup> oxydoréductase (FNR) ; ATP Synth. : ATP synthétase ; Phos. : Phosphatase ; NDHII : NAD(P)H déshydrogénase de type II ; SD : Succinate déshydrogénase ; GQD : glycolate quinone oxydoréductase ; FQR : ferrédoxine PQ oxydoréductase ; Hyd : hydrogénase ; PTOX : oxydase terminale plastidale ; LHC : antenne collectrice de lumière périphérique.

## 5.2. Adaptation de la chaîne photosynthétique

La chaîne de transport d'électrons chloroplastique présente une grande capacité d'adaptation, ce qui lui permet de s'ajuster de manière dynamique à la quantité et la qualité de lumière disponible. Cette adaptation repose sur plusieurs mécanismes dont le temps de réponse varie de quelques secondes à plusieurs jours. Ces mécanismes, revus par Kanervo *et al.* (2005), ont pour buts d'adapter la production énergétique (NAD(P)H et ATP) au métabolisme de l'algue et/ou de protéger l'appareil photosynthétique.

### 5.2.1. Le transport d'électrons cyclique

L'établissement d'un transport d'électrons cyclique autour du PSI permet la génération d'un gradient de protons et la production d'ATP au détriment de la production d'équivalents réducteurs (Niyogi, 2000 ; Johnson, 2005). Cette voie est notamment active quand la régénération du NADP<sup>+</sup> est limitée par la vitesse du cycle de Calvin.

Dans les faits, au moins deux voies cycliques ont été identifiées. Elles mettent en jeu une réduction des plastoquinones qualifiée de « non-photochimique », c'est-à-dire

indépendant du photosystème II. Les voies de transport cyclique diffèrent selon le système enzymatique qui catalyse cette réduction non-photochimique (voir figure 5.1). L'une, sensible à l'antimycine A, impliquerait une hypothétique ferrédoxine-plastoquinone réductase (FQR), catalysant une réduction non-photochimique du pool de plastoquinones par la ferrédoxine réduite (Bendall et Manasse, 1995). Un flux cyclique d'électrons insensible à l'antimycine A a également été observé, prouvant l'existence d'une ou plusieurs autres voies de réduction non-photochimique du pool de plastoquinone (Shikanai *et al.*, 1998 ; Horvath *et al.*, 2000 ; Joet *et al.*, 2002 ; Cardol *et al.*, 2003 ; Rumeau *et al.*, 2005). Chez les plantes supérieures, un complexe protéique Ndh, analogue au complexe I mitochondrial, a été trouvé dans le chloroplaste. Ce complexe catalyse la réduction du pool de plastoquinones à l'aide de NAD(P)H. *Chlamydomonas* est cependant dépourvue de complexe Ndh. Plusieurs voies de réduction non-photochimique ont été proposées pour les espèces dépourvues du complexe Ndh, notamment la présence d'une hypothétique NAD(P)H déshydrogénase de type II, du même type que celles rencontrées au sein de la mitochondrie (pour revue, voir Peltier et Cournac, 2002 ; Nixon, 2000).

Des voies « pseudo-cycliques » de transport d'électrons, incluant le PSII seul ou le PSII et le PSI, ont également été identifiées. Dans ces voies, les électrons extraits de l'eau par le photosystème II retournent à l'oxygène de différentes façons. Les électrons provenant des plastoquinones réduites par le PSII peuvent être transférés :

- soit jusqu'au PSI où les électrons sont transférés à l'oxygène moléculaire avec formation d'un radical superoxyde (Mehler, 1951). Ce radical hautement réactif peut ensuite être éliminé par une superoxyde dismutase (SOD) et une ascorbate peroxydase avec génération d'eau et de monodéshydroascorbate, finalement réduit en acide ascorbique par des électrons provenant de la ferrédoxine (Asada, 1999). On parle alors du cycle de l'eau (the water-water cycle).
- soit directement à l'oxygène grâce à une oxydase terminale (PTOX). Cette dernière participerait aussi, avec une NAD(P)H déshydrogénase de type I ou II, au transport d'électrons à partir du NAD(P)H vers l'oxygène moléculaire. Cette forme de respiration localisée dans le chloroplaste a été appelée chlororespiration (Bennoun, 1982).

### **5.2.2. Les transitions d'état**

Chez les plantes et les algues vertes, les changements dans l'état redox des plastoquinones provoquent des déplacements rapides, graduels et réversibles d'une partie des protéines appartenant à l'antenne périphérique LHC-II d'un photosystème à l'autre. On parle

d'état 1 quand ces protéines sont associées au PSII, et d'état 2 quand elles sont associées au PSI. Il en résulte des changements de distribution de l'énergie d'excitation entre les deux photosystèmes (Murata, 1969 ; Allen, 1992 ; Wollman 2001 ; McConnell *et al.*, 2002 ; Mullineaux et Emlyn-Jones 2005 ; Bellafiore *et al.*, 2005). Au niveau moléculaire, les changements dans la répartition des protéines mobiles du LHC-II entre les deux photosystèmes sont causés par la phosphorylation ou la déphosphorylation de ces protéines (Allen, 1992 ; Wollman, 2001 ; Gal *et al.*, 1997). L'état 2 est provoqué par la phosphorylation des Lhc-II grâce à une kinase activée suite à la réduction des plastoquinones. Cette réduction du pool peut avoir plusieurs causes : (a) une excitation préférentielle du PSII, (b) une lumière intense ou (c) une réduction non photochimique du pool de plastoquinones. Le retour à l'état 1 résulte de l'action d'une phosphatase constitutive. Chez *Chlamydomonas*, l'analyse d'un mutant dépourvu du cytochrome b6f a prouvé la participation de ce dernier dans la transmission du signal qui provoque la transition (Wollman et Lemaire, 1988). Cette participation a par la suite également été démontrée chez les plantes supérieures (Gal *et al.* 1987; Bennet *et al.* 1988). Il a été proposé que la fixation des plastoquinones réduites au niveau du site Q<sub>0</sub> du cytochrome b6f entraîne un déplacement de la protéine Rieske d'une manière analogue à ce qui se produit lors de la fixation de l'ubiquinone sur le complexe III mitochondrial. Ce déplacement pourrait provoquer l'activation d'une kinase (Zito *et al.*, 1999; Vener *et al.*, 1998). La ou les kinases responsables de la phosphorylation des LHC-II n'ont pas encore été clairement identifiées. Cependant, la participation des deux kinases Tak1 et Stn7 identifiées chez *Arabidopsis thaliana* (Snyders et Kohorn, 2001 ; Bellafiore *et al.*, 2005) a été démontrée et une protéine orthologue de Stn7, Stt7, a également été identifiée chez *Chlamydomonas* (Depège *et al.*, 2003).

Chez les plantes supérieures, seuls 15 à 20% des LHC-II migrent d'un PS à l'autre lors des transitions d'états (Allen, 1992). La proportion de LHC-II concernée est quantitativement plus importante chez *Chlamydomonas*, soit 80% (Delosmes *et al.*, 1996). Chez *Chlamydomonas*, cette migration importante des LHC-II pourrait participer à l'établissement d'une voie cyclique majoritaire de transport d'électrons autour du PSI à l'état 2 (Wollman *et al.*, 2001 ; Finazzi *et al.*, 1999).

### 5.2.3. Autres voies de régulation

En condition de lumière intense, d'autres mécanismes sont également actifs. Par exemple, la dissipation de l'énergie lumineuse collectée sous forme de chaleur ou le renouvellement rapide de la protéine D1 du PSII.

### **5.3. Les composants de la chaîne de transport d'électrons chloroplastique**

- **Le photosystème I**

La fonction du photosystème I (PSI) est l'utilisation de la lumière pour le transport d'électrons depuis la plastocyanine vers la ferrédoxine. Le rendement quantique de la réaction photochimique de ce photosystème est proche de 1 (Nelson et Yocum, 2006), et le potentiel rédox ainsi généré est le plus négatif trouvé dans la nature.

Le PSI se subdivise en deux complexes membranaires. Le complexe principal, qui est également appelé centre réactionnel bien qu'il comprenne également l'antenne interne, et les antennes périphériques. Le complexe principal assure la collecte de la lumière et le transport d'électrons. Les antennes périphériques de collecte de la lumière (LHC-I, pour light harvesting complex), associées au complexe principal, optimise la collecte de la lumière. Chez les plantes, l'ensemble du complexe principal et des antennes périphériques se compose d'au moins 19 protéines et d'approximativement 200 cofacteurs ; majoritairement des molécules de chlorophylle, mais aussi 2 phylloquinones et 3 centres fer/soufre (Ben-Shem *et al.*, 2003 ; Jensen *et al.*, 2007).

15 sous-unités protéiques (PsaA à PsaL et PsaN à PsaP) composent le complexe principal. Les sous-unités PsaA-B et C fixent les cofacteurs qui constituent la chaîne de transport d'électrons (chlorophylles a, phylloquinones et centres fer-soufre). Une centaine de chlorophylles et une vingtaine de  $\beta$ -carotène sont associées à un hétérodimère PsaA/B (Ben-Shem *et al.*, 2003 ; Jordan *et al.*, 2001). L'ensemble présente un maximum d'absorbance dans le rouge à 680nm (Gobets *et al.*, 2001 ; Karapetyan *et al.*, 2006). Les autres sous-unités du centre réactionnel participent aux autres fonctions du PSI, notamment les interactions avec la plastocyanine et la ferrédoxine (Pour une revue des fonctions du PSI, voir Jensen *et al.*, 2007).

Les LHC-I comportent quatre types de protéines Lhca (Lhca1 à 4). Ces protéines servent à fixer des molécules de chlorophylle a et b, et de caroténoïdes (Croce *et al.*, 1998 ; Castellitti *et al.*, 2003). Sous certaines conditions, des trimères de protéines LHC-II, généralement associées au photosystème II (PSII), peuvent s'associer au PSI selon le mécanisme de transition d'état (voir page 25).

Le PSI des autres organismes photosynthétiques eucaryotes divergent en taille par rapport au PSI des plantes. Le PSI de *Chlamydomonas* est notamment plus large que celui des plantes et comporte trois fois plus de LHC-I (Germano *et al.*, 2002 ; Kargul *et al.*, 2003). Sa structure complète n'a pas encore été déterminée, mais la présence de 9 à 10 protéines LHC-I a été avancée (Dekker et Boekema, 2005; Boekema *et al.*, 2006 ; Takahashi *et al.*, 2004).



- **Le photosystème II**

Ce photosystème présente un maximum d'absorbance dans le rouge à 675 nm. Sa fonction est d'extraire les électrons à partir de l'eau et de les porter à un potentiel suffisamment négatif pour réduire les plastoquinones (PQ) en plastoquinols (PQH<sub>2</sub>). Le PSII existe sous forme de dimère, chaque monomère étant composé d'au moins 25 sous-unités. Chaque monomère est constitué d'un centre réactionnel, d'une antenne interne de collecte de lumière et d'une antenne périphérique de collecte de lumière (LHC-II).

Le centre réactionnel, formé par les protéines D1 et D2, comprend six molécules de chlorophylle *a*, deux phéophytines *a* et deux molécules de  $\beta$ -carotène (Kobayashi *et al.*, 1990 ; Eijchelhoff *et al.*, 1996). Les protéines D1 et D2 comportent les sites « Qa » et « Qb » de fixation des plastoquinones (PQa et PQb). D1 comprend le site Qb (sensible au DCMU), et D2 le site Qa. Ces deux protéines sont similaires, mais D1 comporte le centre réactionnel manganèse (4 atomes) qui permet l'oxydation de l'eau en oxygène moléculaire. L'absorption de quatre quanta est requise pour extraire 4 électrons de deux molécules d'eau et permettre la libération d'une molécule d'oxygène.

Les protéines Cp43 et Cp47 forment l'antenne interne de collecte de la lumière. Chaque protéine comprend environ quinze molécules de chlorophylles *a* et deux à trois molécules de  $\beta$ -carotène. La chlorophylle *b* est absente de cette antenne (Zheleva *et al.*, 1998).

L'antenne périphérique LHC-II est composée de trimères de protéines Lhcb1, 2 et 3. Cette antenne périphérique comprend de la chlorophylle *a*, de la chlorophylle *b*, ainsi que des xanthophylles (Dekker et Boekema, 2005). Comme dit précédemment, en fonction des conditions l'antenne périphérique peut se dissocier du PSII pour migrer vers le PSI (voir page 25, transition d'état).

- **Le pool de plastoquinones**

Contrepartie de l'ubiquinone mitochondriale, la plastoquinone est un lipide composé d'un groupement benzoquinone connecté à une chaîne polyisoprénique d'une longueur pouvant varier de 6 à 9 unités. La plastoquinone tient, comme l'ubiquinone dans la mitochondrie, un rôle central dans la chaîne de transport d'électrons photosynthétique. Elle participe au transport d'électrons linéaire, aussi bien que cyclique (Bendall et Manasse, 1995 ; Cardol *et al.*, 2003) ainsi qu'à la chlororespiration (Carol *et al.*, 1999 ; Cournac *et al.*, 2000 ; Wu *et al.*, 1999).

- **Le cytochrome b6/f**

Le cytochrome b6/f est un complexe protéique totalement inclus dans la membrane thylacoïdale. Il est homologue du complexe III mitochondrial, aussi bien en structure qu'en fonction. Il participe au transfert d'électrons entre les deux photosystèmes, faisant le lien entre la plastoquinone et la plastocyanine. Il génère également un transfert de protons et participe donc à la génération d'un gradient électrochimique permettant la synthèse d'ATP. Il est constitué de 4 sous-unités majoritaires, dont 3 (cytochrome b6, cytochrome f et protéine Rieske) participent au transfert d'électrons.

- **La plastocyanine**

La plastocyanine est une protéine soluble localisée dans le lumen. Elle présente un faible poids moléculaire (10,5 kDa), et comprend un atome de cuivre. C'est l'oxydation et la réduction de cet atome de cuivre qui permet le transport d'électrons depuis le cytochrome b6/f vers le PSI (Ke, 2002).

- **La ferrédoxine**

La ferrédoxine est une protéine soluble, présente dans le stroma du chloroplaste. Elle constitue l'accepteur d'électrons externe du PSI (Ke, 2002). Elle présente une taille de 11 kDa. Cette protéine fait également partie d'une voie cyclique de transport d'électrons autour du PSI. La ferrédoxine pourrait réduire le pool de plastoquinones grâce à une Ferrédoxine Plastoquinone Oxydoréductase (FQR) non encore identifiée (Peltier et Cournac, 2000 ; Nixon, 2000)

- **Ferrédoxine NADP<sup>+</sup> oxydoréductase (FNR)**

La ferrédoxine NADP<sup>+</sup> oxydoréductase est une enzyme hydrophile, comprenant un groupement FAD, dont la fonction est le transfert d'électrons entre la ferrédoxine et le NAD(P)H. Elle a été identifiée sous forme libre dans le stroma ou associée aux membranes thylacoïdales. Les interactions possibles de la FNR avec le complexe Ndh de plantes supérieures (Guedeney *et al.*, 1996 ; Quiles *et al.*, 2000), avec le cytochrome b6/f (Okutani *et al.*, 2005 ; Zhang *et al.*, 2001) ou avec le PSI (Andersen *et al.*, 1992) ont été considérées. Une participation de la FNR dans le transport cyclique d'électrons autour du PSI a été suggérée (Johnson, 2005).

- **L'ATP synthétase**

Les thylacoïdes contiennent une ATP synthétase qui catalyse la phosphorylation d'ADP et la libération d'ATP dans le stroma du chloroplaste en utilisant l'énergie du gradient électrochimique produit par le photosystème II et le cytochrome b6/f au cours de la phase claire de la photosynthèse. Sa structure est similaire à celle de l'ATP synthétase mitochondriale. La sous-unité F1, nommée CF1, comporte le même rapport de sous-unités  $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$  (Richter *et al.*, 2005). Ces sous-unités sont encodées par les gènes nucléaires *ATPC*, *ATPD* et par les gènes chloroplastiques *ATPA*, *ATPB* et *ATPE* (Henning et Herrmann, 1986). La sous-unité F0, nommée CF0, est également formée par un anneau de sous-unités c permettant la rotation du stator entraînant la libération d'ATP. Le nombre de sous-unités c est cependant de 14 au lieu de 10 pour l'ATP synthétase mitochondriale (Vollmar *et al.*, 2009).

#### **5.4. La chlororespiration**

Bennoun a été le premier à suggérer l'existence dans le chloroplaste d'une voie de transport d'électrons allant du NAD(P)H vers l'oxygène qu'il a qualifiée de « chlororespiration » (Bennoun, 1982, 1983). Le modèle actuel de la chlororespiration inclut une réduction non photochimique des plastoquinones par le NAD(P)H présent dans le stroma du chloroplaste et la réduction de l'oxygène par les plastoquinols, catalysées par une oxydase terminale plastidiale. Le pool de plastoquinones constitue donc un transporteur d'électrons intermédiaire entre le NAD(P)H et l'oxygène (Carol *et al.*, 1999 ; Cournac *et al.*, 2000 ; Wu *et al.*, 1999).

- **Réduction non photochimique des plastoquinones**

Chez les plantes supérieures, la réduction non-photochimique du pool de plastoquinones s'explique par la présence dans le chloroplaste d'un complexe enzymatique « Ndh » homologue du complexe I mitochondrial (Fearnley et Walker, 1992 ; Burrows et Sazanov, 1998 ; Casano *et al.*, 2000 ; Guedeney *et al.*, 1996 ; Horvath *et al.*, 2000 ; Kofer *et al.*, 1998 ; Shikanai *et al.*, 1998). La réduction non-photochimique des plastoquinones permettrait la réoxydation du NAD(P)H produit en excès par le métabolisme du carbone, par exemple lors de la dégradation de l'amidon (Peavey *et al.*, 1977 ; Chen *et al.*, 1991 ; Stitt, 1980).

Cette réduction non-photochimique peut être observée par mesure de la fluorescence chlorophyllienne. A température ordinaire, la fluorescence de la chlorophylle dépend principalement de l'état rédox de la plastoquinone primaire (Qa) du photosystème II. Or, l'état

rédox de Qa s'équilibre rapidement avec l'état rédox du pool de plastoquinones. Il en résulte que l'intensité de la fluorescence varie en fonction de l'état rédox du pool de plastoquinones.

Une réduction non-photochimique du pool de plastoquinones a également été observée chez des mutants du tabac dépourvus du complexe Ndh (Cournac *et al.*, 1998 ; Endo *et al.*, 1998), ainsi que chez des eucaryotes photosynthétiques dépourvus du complexe Ndh, notamment chez *Chlamydomonas*, (Bennoun 1983 ; Endo et Asada, 1996). Ces observations indiquent l'existence d'une voie de réduction non-photochimique des plastoquinones autre que celle du complexe Ndh.

La ou les enzymes responsables de la réduction non-photochimique des plastoquinones seraient alors de type NDH-II (Howitt *et al.*, 1999) ou succinate déshydrogénase (Cooley *et al.*, 2000 ; Willeford *et al.*, 1989), enzymes ne participant pas à l'établissement d'un gradient de proton transmembranaire.

- **L'oxydase terminale plastidiale**

Chez *Arabidopsis thaliana*, un phénotype de retard de croissance a été attribué à la perte d'une oxydase terminale plastidiale (Carol *et al.*, 1999 ). La protéine mutée, présentant une homologie de séquence avec l'oxydase alternative mitochondriale (Aox), a été nommée Ptox (plastid terminal oxydase). Cette protéine a par la suite été identifiée chez *Chlamydomonas* par analyse immunologique (Cournac *et al.*, 2000). L'expression de cette protéine chez *E. coli* a montré qu'elle possède une activité quinol oxydase résistante au cyanure, faiblement affectée par le SHAM, mais très sensible au propyl gallate (Cournac *et al.*, 1997 ; 2000 ; Josse *et al.*, 2000), tous deux inhibiteurs de l'AOX (Berthold, 1998).

En inhibant la respiration mitochondriale par ajout de myxothiazol et de SHAM et/ou la chlororespiration par ajout de propyl gallate sur des cellules cultivées en milieu TAP et puis transférées en milieu minimal, la vitesse de flux d'électrons engendrée par la chlororespiration à l'obscurité a été estimée à  $\pm 60$  nmol d'O<sub>2</sub> consommé par minute par mg de chlorophylle chez *Chlamydomonas*. Cette valeur représente approximativement 2% du flux maximum d'électrons de la photosynthèse (Peltier et Cournac, 2002 ; Cournac *et al.*, 2002).

La Ptox participe également à la régulation de la chaîne de transport d'électrons. Le flux d'électrons, dirigé vers l'oxygène via la Ptox, peut assurer une de protection pour la chaîne de transport d'électrons en cas de sur-réduction de ses composants (Niyogi, 2000). La Ptox agirait alors comme une valve de sécurité pour éviter la dégradation des composants de la chaîne, notamment en condition de lumière intense.

### 5.5. La photoproduction d'hydrogène

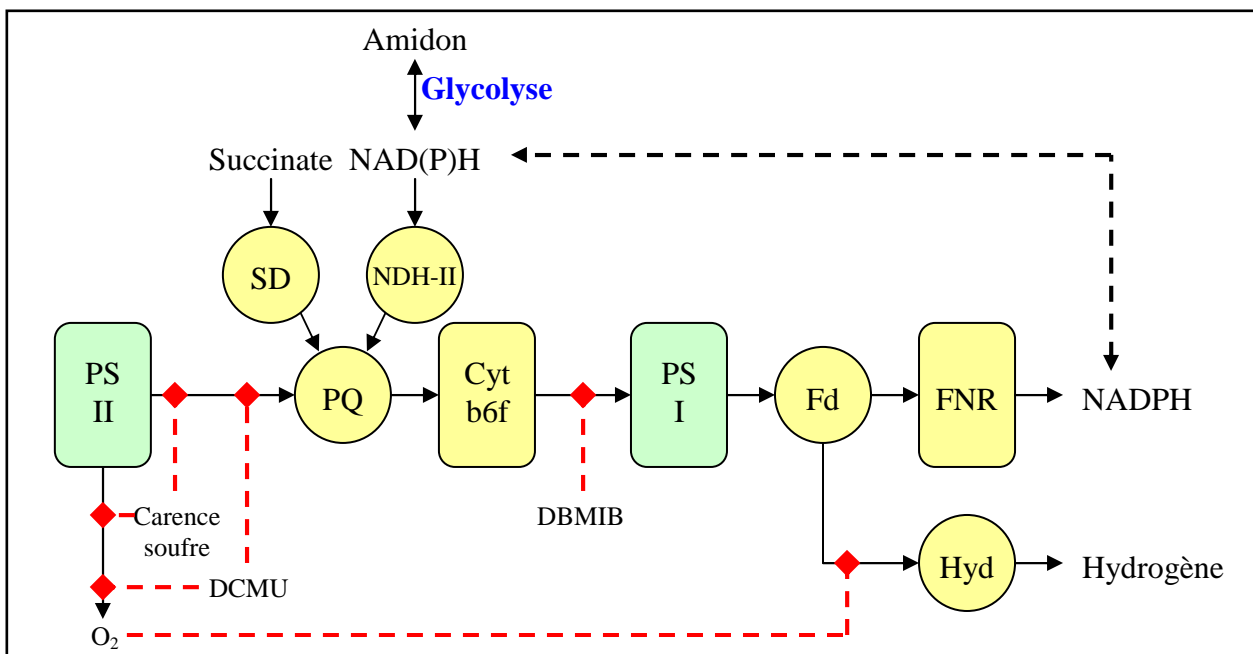
La première preuve d'une photoproduction d'hydrogène moléculaire par des algues unicellulaires a été apportée par une étude de Gaffron et Rubin en 1942. Cette activité a été observée chez différentes algues vertes comme *Scenedesmus obliquus* (Gaffron et Rubin, 1942 ; Bishop *et al.*, 1978 ; Schnackenberg *et al.*, 1993), *Chlorella fusca* (Kessler 1973, 1974, 1976), ou *Chlamydomonas reinhardtii* (McBride *et al.*, 1977 ; Greenbaum, 1982 ; Maione et Gibs, 1986).

Dans les premiers travaux, cette production d'hydrogène a été induite par une simple incubation des cellules à l'obscurité, condition qui entraîne l'anoxie. Lorsque les algues sont éclairées à la suite de cette incubation, elles produisent de l'hydrogène (Kessler 1973 ; Greenbaum 1982 ; Roessler et Lien, 1984 ; Happe et Naber 1993 ; Schulz 1996). Cependant, cette production est transitoire (60 à 90 s) du fait de l'inhibition rapide de la production d'hydrogène par l'oxygène produit à la lumière par le photosystème II (Ghirardi *et al.*, 1997). Chez *Chlamydomonas*, une pression partielle de 0,2% d'oxygène est suffisante pour inhiber 50% de la production d'hydrogène (Ghirardi *et al.*, 2000). Notons tout de même qu'une durée de production pouvant aller jusqu'à trois heures a été observé pour des *Scenedesmus* immobilisées en billes d'alginate ou dans du polyuréthane (Brouers *et al.*, 1984).

Il y a quelques années, l'équipe de Melis a montré que *Chlamydomonas*, maintenue à la lumière dans un milieu carencé en soufre, pouvait produire des quantités significatives d'hydrogène pendant plusieurs jours (Melis *et al.*, 2000). Dans un milieu carencé en soufre, l'activité photosynthétique diminue, principalement par une diminution de l'activité du PSII. Après une période de 20h de carence, l'activité photosynthétique n'est plus que de 5 à 10% de son niveau initial tandis que la respiration reste constante pendant 70h de carence avant de chuter lentement (Wykoff *et al.*, 1998 ; Melis *et al.*, 2000). Ces conditions provoquent rapidement l'anoxie dans une culture scellée.

La formation d'hydrogène est catalysée par des hydrogénases chloroplastiques, induites en anoxie, et capables d'utiliser une partie du flux d'électrons photosynthétique parvenant à la ferrédoxine pour réduire des protons et former ainsi de l'hydrogène moléculaire (voir figure 5.2).

Les hydrogénases identifiées chez *Chlamydomonas reinhardtii* font partie de la famille des hydrogénases à fer (Fe-hydrogénase), dont les activités sont beaucoup plus élevées que celles des hydrogénases à nickel-fer ou des hydrogénases non-métalliques (Happe *et al.*, 1994, Happe *et al.*, 2002). Les hydrogénases à fer de *Chlamydomonas*, encodées par le génome



**Figure 5.2 : Représentation schématique de la production d'hydrogène chez *Chlamydomonas reinhardtii*.** Les électrons servant à la réduction des plastoquinones (PQ) peuvent être fournis soit par l'oxydation du succinate en fumarate par une succinate déshydrogénase (SD) hypothétique, soit par l'oxydation du NAD(P)H par une NAD(P)H déshydrogénase de type II (NDH-II), soit par la photolyse de l'eau par le photosystème II (PSII). Les électrons sont ensuite transférés à la ferrédoxine par le biais du cytochrome b6/f et du photosystème I (PSI). La ferrédoxine peut ensuite transférer ses électrons soit à la ferrédoxine NADP<sup>+</sup> oxydoréductase (FNR) avec libération de NADPH, soit à une ou plusieurs hydrogénases (Hyd) avec libération d'hydrogène moléculaire. L'action des différents inhibiteurs est représentée par un trait rouge. La glycolyse permettant la production de NAD(P)H à partir d'amidon est symbolisée en bleu.

nucléaire (gènes *HYDA1* et *HYDA2*), sont dirigées vers le chloroplaste où elles peuvent former un complexe avec la ferrédoxine, déviant en partie le flux d'électrons photosynthétique (Ghirardi et al. 1997). La réaction est par nature réversible et sa direction dépend des conditions physiologiques déterminant les flux d'électrons ainsi que du potentiel redox environnant. Les deux gènes des hydrogénases sont inhibés en présence d'oxygène (Melis *et al.*, 2001, Happe et Kaminski, 2002) et les protéines correspondantes ne sont présentes ni sous forme active, ni sous forme de précurseur inactif dans les cellules en condition aérobie (Happe *et al.*, 1994 ; Forestier *et al.*, 2003). Ces protéines seraient inactivées par l'oxygène au niveau d'un des atomes de fer localisé dans le site catalytique (Ghirardi *et al.*, 2003).

La production d'hydrogène est également sensible au DBMIB, inhibiteur du cytochrome b6/f (Gfeller et Gibbs, 1985). Différentes études ont montré que l'activité du photosystème I était également nécessaire à la production d'hydrogène (Stuart et Gaffron, 1963 ; Redding *et al.*, 1999).

La question de l'origine des électrons servant à la production d'hydrogène a été longtemps discutée. Les électrons nécessaires proviennent soit (a) de la photolyse de l'eau réalisée à la lumière par le PSII, soit (b) du catabolisme oxydatif de composés organiques endogènes conduisant à une réduction non photochimique du pool de plastoquinones (voir figure 5.2).

Plusieurs composés ont été proposés comme agent de réduction non photochimique du pool de plastoquinones, comme le NAD(P)H, le succinate ou la ferrédoxine réduite. Par ailleurs, on observe d'importantes variations de la concentration en amidon pendant la production d'hydrogène (Zhang *et al.*, 2001). En condition de carence en soufre, les 25 premières heures de culture se caractérisent par une augmentation de la concentration cellulaire en amidon jusqu'à 330% chez *Chlamydomonas* (Ball *et al.*, 1990), accompagnée d'une augmentation de la concentration cellulaire en protéines totales à 150% (Melis *et al.*, 2000). Ces concentrations chutent ensuite régulièrement durant la période de production, atteignant après 120h une concentration de 80% de protéines totales par rapport au taux initial mesuré et une concentration en amidon de 250% par rapport à la concentration initiale de la culture (Melis *et al.*, 2000). Ces observations suggèrent que l'amidon pourrait être une source importante d'électrons pour la production d'hydrogène. Le NADH libéré par la glycolyse pourrait réduire les plastoquinones par l'intermédiaire d'une déshydrogénase chloroplastique (Godde et Trebst, 1980 ; Mus *et al.*, 2005).

Au cours des dernières années, différentes observations ont mis en évidence l'importance du PSII et de l'amidon comme source d'électrons pour la production d'hydrogène :

- Des résultats récents ont montré qu'un mutant dépourvu de PSII ou qu'un sauvage traité au DCMU (inhibiteur du PSII) directement après transfert en milieu carencé en soufre était incapable d'accumuler des quantités importantes d'amidon et de produire de l'hydrogène (Fouchard *et al.*, 2005 ; Hemschemeier *et al.*, 2008).
- Cependant, des cultures de *Chlamydomonas* ayant préalablement accumulé de l'amidon avant traitement au DCMU présentent une production d'hydrogène atténuée (Fouchard *et al.*, 2005).
- En 2009, Chochois *et al.*, ont observé que la production d'hydrogène en condition de carence en soufre d'un mutant de *Chlamydomonas* dépourvu d'amidon (*sta6*) n'était pas modifiée par rapport à un témoin sauvage.
- En présence de DCMU, cette production d'hydrogène est largement diminuée (de l'ordre de 10x) chez un témoin sauvage, et pratiquement abolie chez le mutant *sta6* dépourvu d'amidon.

Cette dernière observation confirme le rôle de l'amidon comme source d'électrons pour la production d'hydrogène, mais uniquement pour la voie non-photochimique de

réduction des plastoquinones et non pour la voie photochimique passant par le photosystème II (voir figure 5.2).

En 2008, Hemschemeier *et al.* ont pu quantifier les productions d'hydrogène de cellules de *Chlamydomonas* ayant accumulé de l'amidon et traitées, ou non, au DCMU. Leurs résultats montrent que le DCMU peut abolir 60% de la production d'hydrogène. (Hemschemeier *et al.*, 2008). Ces résultats sont cependant en contradiction avec les observations de Chochois *et al.*, (2009) qui montrent que l'utilisation de DCMU peut abolir près de 90% de la production d'hydrogène chez un témoin sauvage.

En résumé, les électrons nécessaires à la production d'hydrogène chez *Chlamydomonas* proviennent de la photolyse de l'eau réalisée à la lumière par le PSII, ainsi que du catabolisme oxydatif de composés organiques endogènes, principalement l'amidon. Des productions simultanées d'oxygène et d'hydrogène ont d'ailleurs été observées (Greenbaum, 1982).

Il apparaît que l'action du PSII n'est pas essentielle pour la production d'hydrogène elle-même, mais y contribuerait de manière importante en fournissant les électrons nécessaires à la production d'hydrogène elle-même et à l'accumulation d'amidon nécessaire à la voie de réduction non-photochimique des plastoquinones.

## **6. Hypothèses sur la nature de l'enzyme qui catalyse la réduction non photochimique du pool de plastoquinone chez *Chlamydomonas***

Plusieurs voies de réduction non-photochimiques ont été proposées pour les espèces dépourvues du complexe Ndh (Revue par Peltier et Cournac, 2002 ; Nixon 2000, voir p10). Des activités de type déshydrogénase alternative ont également été suspectées chez le tabac, organisme présentant un complexe Ndh fonctionnel (Cournac *et al.*, 1998 ; Joët *et al.*, 2001 ; Sazanov *et al.*, 1998). Les candidats possibles sont :

- une hypothétique ferrédoxine-PQ réductase qui participerait aussi au flux cyclique d'électrons, mais qui n'a pas encore été découverte.
- une ou plusieurs NAD(P)H déshydrogénases de type II. Ces flavoprotéines n'ont cependant pas encore été caractérisées. Elles pourraient aussi participer au flux cyclique.
- une succinate déshydrogénase, dont l'activité a déjà été observée chez *Chlamydomonas* où l'ajout de succinate à des chloroplastes ou à des préparations de thylacoïdes supporte un flux d'électrons à travers le PSI.
- une glycolate déshydrogénase.



- *Les NAD(P)H déshydrogénases chloroplastiques de type II*

En 2005, l'existence d'une activité NAD(P)H déshydrogénase de type II dans le chloroplaste de *Chlamydomonas reinhardtii* a été mise en évidence par des études biochimiques (Mus *et al.*, 2005). Des mesures du flux d'électrons passant par le PS I à partir de substrats exogènes ont été effectuées en mesurant la consommation d'oxygène à la lumière en présence de méthyl viologène (un accepteur des électrons du PS I dont la réduction consomme de l'oxygène) et de DCMU (inhibiteur du PSII). La préparation comprenait aussi des inhibiteurs du cytochrome bc et de l'alternative oxydase pour éviter toute consommation d'oxygène due à une éventuelle contamination mitochondriale. Plusieurs substrats ont été testés (malate, succinate, glycolate, NADH et NADPH). Seuls le NADH et le NADPH ont engendré un flux significatif. Ce flux d'électrons était résistant à la roténone (inhibiteur du complexe I mitochondrial), et au TTFA (inhibiteur de la succinate déshydrogénase et de la ferrédoxine NADP réductase). A l'opposé, le flux s'est montré sensible à plusieurs composés inhibiteurs des NAD(P)H déshydrogénases de type II comme le DPI. Des mesures de réduction des plastoquinones par fluorescence et des mesures de production d'hydrogène ont confirmé ces résultats (Mus *et al.*, 2005). Ces données ont indiqué qu'une ou plusieurs NAD(P)H déshydrogénases de type II catalyse(nt) la réduction non photochimique du pool de plastoquinones, ce qui permet de soutenir une production d'hydrogène chez *Chlamydomonas*.

Ce type d'enzyme pourrait également être présent dans les chloroplastes d'espèces pourvues d'un complexe Ndh fonctionnel comme chez *Arabidopsis thaliana*. Il a ainsi été montré qu'une NAD(P)H déshydrogénase de type II présente une double localisation, mitochondriale et chloroplastique, chez cette espèce (Rasmusson *et al.*, 2008 ; Vidi *et al.*, 2006 ; Ytterberg *et al.*, 2006).

- *Succinate déshydrogénase*

L'association d'une Succinate déshydrogénase à des thylacoïdes a d'abord été montrée chez des cyanobactéries, comme *Synechocystis sp* (Cooley *et al.*, 2000 ; Pearce *et al.*, 1969 ; Tanaka *et al.*, 1997). Outre cette déshydrogénase, les membranes internes de *Synechocystis* comprennent également un complexe Ndh de type I, au moins trois déshydrogénases de type II (Arnon et Chain, 1975 ; Cooley *et al.*, 2001), ainsi qu'une oxydase terminale (Cooley *et al.*, 2000 ; Pearce *et al.*, 1969 ; Tanaka *et al.*, 1997). Chez *Synechocystis*, des mesures du niveau redox du pool de plastoquinones, ainsi que des mesures de respiration de mutants de la chaîne de transport d'électrons photosynthétique ont montré que la succinate déshydrogénase de cette

cyanobactérie contribuait largement à la réduction du pool de plastoquinones à l'obscurité, comparativement aux déshydrogénases de type I et II (Cooley *et al.*, 2001).

En 1989, Willeford a démontré la présence d'une activité succinate déshydrogénase au niveau de la fraction cellulaire enrichie en chloroplastes de *Chlamydomonas*. Celle-ci était obtenue par traitement à la digitonine et purification par passage sur gradient de percoll (Willeford *et al.*, 1989). Une prise d'oxygène, provoquée par la réduction de méthyl viologène (MV) par le photosystème I à la lumière, a été observée en présence de succinate, sous une lumière spécifique du PS I. Cette réduction du MV est sensible au malonate, inhibiteur de la succinate déshydrogénase (Willeford *et al.*, 1989). La présence de cette enzyme n'a cependant pas été confirmée depuis lors dans le chloroplaste de *Chlamydomonas* et la présence d'une succinate déshydrogénase chloroplastique n'a pas été démontrée non plus chez *Arabidopsis thaliana* (Rich *et al.*, 2001).

- *Ferrédoxine-PQ oxydoréductase*

N'ayant jusqu'à présent jamais été caractérisée au niveau moléculaire (Peltier et Cournac, 2000 ; Nixon, 2000), la présence d'une Ferrédoxine plastoquinone oxydoréductase (FQR) a été prédite depuis des années comme un composant essentiel de la voie cyclique de transport d'électrons autour du PSI. Son existence expliquerait pourquoi la voie de réduction du pool de plastoquinones par le NAD(P)H sensible à l'antimycine A est stimulée par la ferrédoxine *in vitro* (voir p24) (Mills *et al.*, 1979 ; Rich *et al.*, 1998 ; Endo *et al.*, 1997).

- *Glycolate : quinone oxydoréductase*

Dans la photorespiration (fixation du dioxygène sur le ribulose diphosphate par la RubisCO à la place du dioxyde de carbone), une molécule de 2-phosphoglycolate est produite par molécule d'oxygène fixée. Ce 2-phosphoglycolate donne ensuite du glycolate qui est oxydé en glyoxylate. En 1996, Goyal et Tolbert ont proposé chez *Spinacia oleracea* et *Dunaliella tertiolecta* l'existence d'une voie d'oxydation du glycolate, localisée dans le chloroplaste et dépendante de la lumière permettant la réduction non-photochimique des plastoquinones (Goyal et Tolbert, 1996).

## 7. Buts de la thèse

Les données présentées dans l'introduction montrent que les NAD(P)H déshydrogénases de type II sont impliquées aussi bien dans la respiration mitochondriale qu'au sein de la photosynthèse chloroplastique. Cette classe d'enzymes a principalement été étudiée chez les plantes supérieures, la majorité des études ayant comme objet les déshydrogénases mitochondriales. A l'inverse, très peu d'informations sont disponibles sur les NAD(P)H déshydrogénases de type II chloroplastique.

Chez l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii*, sept ORF (Open reading frame) correspondant à des NAD(P)H déshydrogénases de type II hypothétiques (*NDA1* à *NDA7*) ont été identifiées dans le génome nucléaire. Les séquences codantes déterminées (Cardol *et al.*, 2005 ; Cardol non publié) sont cependant largement incomplètes du fait de régions non-séquencées dans le génome de *Chlamydomonas*. A ce jour, aucune étude des gènes *NDA* n'a été réalisée chez *Chlamydomonas*, ou toute autre algue verte. Il a pourtant été démontré qu'une activité déshydrogénase de type II chloroplastique était présente dans cet organisme, en l'absence d'un complexe Ndh (Mus *et al.*, 2005).

L'optique de ce travail est d'exploiter les données fragmentaires existantes sur les gènes *NDA* de *Chlamydomonas* pour réaliser une étude de cette famille génétique. Après avoir complété les séquences codantes, nous étudierons l'expression des différents gènes *NDA* et déterminerons leur classification phylogénétique. L'objectif suivant sera de déterminer, si possible, la localisation intracellulaire précise des protéines Nda.

Ce travail s'articule notamment dans le cadre d'une recherche plus vaste sur la production d'hydrogène par les algues vertes. Depuis une dizaine d'années, une littérature de plus en plus importante est disponible sur ce domaine de recherche. Les stratégies avancées consistent généralement à améliorer la production d'hydrogène soit en manipulant les hydrogénases, soit en contrôlant les conditions de culture. La stratégie novatrice avancée aux laboratoires de Biochimie Végétale et de Génétique des Microorganismes de l'Université de Liège consiste à manipuler les enzymes permettant l'apport en électrons aux hydrogénases plutôt que les hydrogénases elles-mêmes. L'identification de la protéine Nda chloroplastique de *Chlamydomonas* serait une étape nécessaire dans cette stratégie.

## 8. Matériel

### 8.1. Souches algales

Plusieurs souches de l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* ont été utilisées au cours de ce travail. Celles-ci sont reprises dans le tableau 8.1:

<u>Numéro de la souche</u>	<u>Génotype</u>	<u>Défaut biochimique</u>
2	<i>Mt</i> <sup>-</sup> , NR <sup>-</sup>	
25	<i>cw15</i> , <i>mt</i> <sup>+</sup> , NR <sup>-</sup>	-
84	<i>cw15</i> , <i>mt</i> <sup>-</sup> , NR <sup>+</sup>	-
300	<i>dum 19/25</i> , <i>mt</i> <sup>-</sup> , NR <sup>-</sup>	Complexes I et IV
662	<i>dum 22</i> , <i>mt</i> <sup>-</sup> , NR <sup>-</sup>	Complexes I et III
217	<i>dum20</i> , <i>cw15</i> , <i>mt</i> <sup>-</sup> , NR <sup>+</sup>	Complexe I

**Tableau 8.1:** Souches de *Chlamydomonas reinhardtii* utilisées au cours de la thèse. *cw15*: mutation responsable de l'absence de paroi; *mt*<sup>+</sup> et *mt*<sup>-</sup>: allèles déterminant le sexe de la souche haploïde; *dum19/25*: mutation des gènes mitochondriaux *COX1* et *ND1*, provoquant l'inactivation des complexes I et IV de la chaîne respiratoire. *dum22*: mutation des gènes mitochondriaux *COB* et *ND4*, provoquant l'inactivation des complexes I et III de la chaîne respiratoire; *dum20*: mutation du gène mitochondrial *ND1*, provoquant l'inactivation du complexe I (Remacle *et al.*, 2001; Remacle et Matagne 2002); NR<sup>+</sup> et NR<sup>-</sup>: présence (+) ou absence (-) des gènes *NIT1* et *NIT2* conférant à l'algue la capacité de croître en présence de nitrate comme seule source d'azote.

*Chlamydomonas* peut être cultivée en lumière modérée (75  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ), atténuée (5  $\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ ) ou à l'obscurité en présence d'acétate, à une température de 25 °C en milieu solide ou liquide.

### 8.2. Souches bactériennes

Les deux souches d'*Escherichia coli* utilisées au cours de ce travail sont la DH5 $\alpha$ , utilisée pour l'amplification de plasmide, et la C<sub>600</sub>, utilisée comme bactérie hôte pour la manipulation de phage. Toutes deux peuvent être cultivées en milieu solide ou liquide à 37°C.

### 8.3. Milieux de culture

#### 8.3.1. Milieux pour bactéries

- **Milieu LB (Luria Broth)**

Composition par litre : bactotryptone 10 g, extrait de levure 5 g, NaCl 10 g. Le pH est ajusté à 7,5 avec du NaOH. Si un milieu solide est souhaité, on ajoute 15 g/litre d'agar. Après autoclavage, il est possible d'ajouter de l'ampicilline (50 mg/l) ou du chloramphénicol (34 mg/l).

- **Milieu NZY** (milieu pour le screening de banque phagique)

Composition par litre : NaCl 5 g, MgSO<sub>4</sub> · 7H<sub>2</sub>O 2 g, extrait de levure 5 g, NZY (Gibco BRL, USA) 10 g. Le pH est ajusté à 7,5 avec du NaOH. Ce milieu se conserve trois jours au maximum. Si un milieu solide est souhaité, on ajoute 15 g/litre d'agar. La préparation d'un **TOP AGAR** est possible en remplaçant l'agar par 7 g d'agarose. Ce **TOP AGAR** se conserve à 4 °C en tube à essai et peut être rendu liquide par 15 minutes d'autoclave.

### 8.3.2. Milieux pour *Chlamydomonas*

Les milieux de culture de *Chlamydomonas* sont réalisés à partir de solutions mères.

- Solution A (pour 1 litre) : NH<sub>4</sub>Cl 8 g, MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O 2 g, CaCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O 1 g.
- Solution A-N (pour 1 litre) : MgSO<sub>4</sub> 7 H<sub>2</sub>O 2 g, CaCl<sub>2</sub> H<sub>2</sub>O 1 g.
- Solution A-S (pour 1 litre) : NH<sub>4</sub>Cl 8 g, MgCl<sub>2</sub> 6 H<sub>2</sub>O 1,65 g, CaCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O 1 g.
- Tris 0,2 M (pour 1 litre) : C<sub>4</sub>H<sub>11</sub>NO<sub>3</sub> 24,2 g, ajuster le pH à 6,8 – 7,0 à l'aide d'acide acétique glacial.
- Nitrate de sodium : NaNO<sub>3</sub> 400 mM.
- Tampon II (pour 100 ml) : K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 9,35 g, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 6,3 g, ajuster le pH à 6,8 – 7,0.
- Solution d'oligo-éléments \* (pour un litre) : EDTA 50 g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 11,4 g, ZnSO<sub>4</sub> 22 g, MnCl<sub>2</sub> 5,06 g, FeSO<sub>4</sub> 4,9 g, CoCl<sub>2</sub> 1,61 g, CuSO<sub>4</sub> 1,57 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 4 H<sub>2</sub>O 1,1 g.
- Solution d'oligo-éléments \* carencée en soufre (pour un litre) : EDTA 50 g, H<sub>3</sub>BO<sub>3</sub> 11,4 g, ZnCl<sub>2</sub> 18,57 g, MnCl<sub>2</sub> 5,06 g, FeCl<sub>2</sub> 4 H<sub>2</sub>O 6,4 g, CoCl<sub>2</sub> 1,61 g, CuCl<sub>2</sub> 2 H<sub>2</sub>O 1,68 g, (NH<sub>4</sub>)<sub>6</sub>Mo<sub>7</sub>O<sub>24</sub> 4 H<sub>2</sub>O 1,1 g.

\* : Les oligonucléotides sont préparés selon la méthode de Hutner *et al.*, (1950). Chaque sel est dissout dans l'ordre indiqué dans 550 ml d'eau. L'EDTA est dissout à part dans 250 ml d'eau chaude. La solution contenant les sels est alors chauffée à 100 °C, puis ajoutée à la solution d'EDTA. Le mélange est porté à 100 °C et le pH est ajusté à 6,8 – 7 avec du KOH préchauffé à 70 °C. La température de la solution doit rester au moins supérieure à 70 °C. Le pH mètre doit être réglé avec des solutions standards chauffées à 70 °C minimum. La solution est ensuite amenée à un litre puis laissée refroidir dans un flacon bouché avec de l'ouate. On filtre sur papier après apparition d'une coloration rougeâtre, plusieurs semaines sont nécessaires.

- **Milieu Tris – Acétate – Phosphate (TAP)**

L'ammonium (7,5 mM) constitue la source d'azote. Composition par litre : Tris 100 ml, A 50 ml, solution d'oligo-éléments 1 ml, Tampon II 1 ml. Le pH est ajusté à 7 par ajout d'acide acétique servant aussi de source de carbone exogène. Si un milieu solide est souhaité, ajouter de l'agar 15 g/litre. Après autoclavage, il est possible d'ajouter de l'hygromycine (50 mg/l).

- **Milieu Tris-Acétate-Nitrate (TAP-NO<sub>3</sub>)**

Variante du milieu TAP où le nitrate de sodium remplace l'ammonium comme source d'azote. La composition est identique au milieu TAP, mis à part la solution A remplacée par la solution A-N et l'ajout de nitrate de sodium à une concentration finale de 4 mM.

- **Milieu Tris – Minimal – Phosphate (TMP)**

Milieu Minéral de base pour la croissance autotrophe. La composition est identique au milieu TAP, mais tamponné à pH 7 au moyen d'acide chlorhydrique au lieu d'acide acétique.

- **Milieu Tris – Acétate – Phosphate – carencé en soufre (TAP-S)**

Variante du milieu TAP où toutes les sources de soufre (solution A et Oligo) ont été remplacées par leur équivalent sans soufre (Solution A-S et Oligo-S).

#### **8.4. Plasmides**

- **pGEM®-T easy vector**

C'est un vecteur commercialisé par la firme Promega (USA). Il possède entre autres une région de clonage multiple, une origine de répllication dans *E. coli* et un gène de résistance à l'ampicilline. Le site d'insertion est positionné dans le gène lac Z de la  $\beta$ -galactosidase présent sur le plasmide et permet l'« AT cloning », car il est pourvu de bases « T » simple brin. L'inactivation du gène lac Z suite à l'insertion d'un fragment de DNA indiquera la présence de l'insert par modification du phénotype de la souche d'*E coli* Lac Z utilisée.

- **pBCKS+**

Plasmide de 3,4 kb de la firme Stratagène (USA), vecteur de clonage porteur du gène lacZ permettant le criblage de bactéries recombinantes par le test blanc bleu. Ce plasmide contient en outre une cassette conférant la résistance au chloramphénicol (CamR).

- **pPN10**

Plasmide de 4,4 kb (4422 pb) résultant du clonage dans le pBCKS+ ouvert en *ApaI* et *SalI* du promoteur NIT1 de la nitrate réductase (Ohresser *et al.*, 1997).

- **pHyg3**

Plasmide dérivé du pUC BM20 (Boehringer. Mannheim) comprenant le gène *APH7* (aminoglycoside phosphotransferase) de *Streptomyces hygroscopicus* conférant une résistance à l'hygromycine B sous la dépendance du promoteur de la  $\beta$ 2tubuline de *Chlamydomonas reinhardtii* et comprenant également la 3'UTR de *rbcS2* de *Chlamydomonas*. Le premier intron de *rbcS2* de *Chlamydomonas* est inséré dans la séquence de *aph7* (Berthold *et al.*, 2002). L'hygromycine B est un antibiotique de type aminoglycoside produit par *Streptomyces hygroscopicus* qui inhibe la synthèse de protéines en interférant dans la translocation, causant une mauvaise traduction du ribosome 70s (Invitrogen, USA).

### **8.5. Oligonucléotides synthétiques**

Ceux-ci ont été commandés chez Eurogentec (Belgique). Leurs positions relatives sont indiquées dans le tableau 8.2 (page suivante) reprenant les différents gènes étudiés.

<u>Nom</u>	<u>Séquence 5'-3'</u>	<u>Tm (°C)</u> (50mM Na <sup>+</sup> )	<u>Position</u> cDNA / DNA par rapport à l'ATG
nda1-1F	ATGGCTGCTTCGGCGCTT	63	+ 1 / +1
nda1-2R	CGTCAGGTCGTACAGGTTGGG	61	+ 288 / +288
nda2-1F	AGCGCCTGCTTCAAGATGAG	59	+ 523 / +2387
nda2-2R	GATCTCCGTATTGCCGTCCA	59	+1470 / +>9499
nda2-3F-EcoRV	GATATCCAACGTCTGCAAACATGAACA	59	-14 / -14
nda2-4R-HpaI	GTTAACCACTCGCGAGATGTCGC	60	+ 1854 / +>11816
nda2-5F-SpeI	ACTAGTCAACGTCTGCAAACATGAACA	61	-14 / -14
nda2-6R-PstI	CTGCAGACCAGGTTGGGGTAGAGCTT	60	+828 / +>5904
nda3-1F	AGGTCAGCGACGCGGT	57	+ 839 / + 2050
nda3-2R	CTGCAGCAGCGTGACCTT	57	+ 1065 / +2277
nda5-1F	GGGTCACAGGCTCCGCAC	61	+ 184 / +292
nda5-2R	GTCGTACGGCAGCTGGGTG	61	+ 621 / + 1908
nda5-3F	CACGCTGGACCTGCTGTCTGAC	64	+ 729 / + 2224
nda5-4R	CCCCAGTGCCATCATGGAGC	65	+ 1464 / + 4848
nda5-5F	CTGATGGGCTTCCGTGC	57	+ 163 / + 271
nda5-6R	CGTCCGACAGCGTCACC	58	+ 601 / + 1888
nda5-7F	TCTTTGGCAGCGAGCCAGC	64	+ 16 / +16
nda5-8F	TTCAGTTTCTTCGATGCTTGCG	61	-13 / -13
nda5-9R	CAGCGTAGCTCCTCGGC	62	+ 1818 / -
nda5-10F	GTGTCCGTCGGCTGGATAGTT	60	- / + 5488
nda5-11R (SpeI-NdeI -HpaI)	ACTAGTCATATGGTTAACCAAGCGTAGCT CCTCTGTCCG	60	- / + 6031
nda6-1R	GGCCCATGTGATCTCAAAG	55	+ 132 / + 639
nda6-2R	CCAGTAGTTGATGGCAGCC	55	+ 189 / + 696
nda6-3R	CGAATGAGATCGTGTCGC	55	+ 226 / + 1676
nda6-4F	AGCCGCGCGACTCCATTGAC	56	- 391 / - 391
nda6-5R	GGCCGCTCGCACCA	58	+ 1285 / + 3651
nda6-6R	CCTGCTGCCGCTGCCGCCGT	60	+ 1377 / + 3770
nda7-1R	CCGATAAATTAACCCGAGG	55	+ 32 / + 32
nda7-2R	GACGGTGGTCCATGTCAGT	55	+ 134 / + 320
nda7-3R	GCTTGTGACTGTGGCCTG	55	+ 231 / + 603
nda7-4R	TGGAGGCCTTGATGTCCT	55	+ 403 / + 1250
nda7-5R	GTGCGCTCAACAATCTC	54	+ 471 / + 1318
nda7-6R	GCGACTCCAGCCACTTCT	55	+ 568 / + 1415
nda7-7F	GCGCTCACGGAGGACATCAA	63	+ 376 / + 1223
nda7-8R	GTTTGCCCTGCACCGAGGTG	65	+ 610 / + 1457
CrGFP-1F (EcoRV-StuI-HpaI)	GATATCAGGCCTGTTAACATGACCATGA TTACGCCAAGCT	59	+ 1
CrGFP-2R-SpeI	ACTAGTCAGCCCCGCCATGGA	60	+ 994
CrGFP-3F	CACACTAATACAGCCGGGC	55	Sur le pPN10
Cox3-1F	CAGCTGCTCCGCTTCC	62	+10 / +10
Cox3-2R	AGGCAGCTCACGTAGG	59	+464 / +1259

**Tableau 8.2 :** Oligonucléotides synthétiques utilisés. F : Forward, R : Reverse. La position par rapport à l'ATG putatif est donnée pour la séquence du cDNA.



## 9. Méthodes

### 9.1. Extraction de DNA et de RNA totaux de *Chlamydomonas* (adapté de Newman et *al.*, 1990)

$3.10^7$  à  $1.10^8$  cellules sont remises en suspension dans 500  $\mu$ l de tampon TEN (pour 100 ml : 1 mM Tris – HCl pH 8.0, 1 mM EDTA pH 8.0, 15 mM NaCl, eau distillée DMPC<sup>1</sup>) et centrifugées 2 min à 1500 g. Le culot est ensuite repris dans 150  $\mu$ l d'H<sub>2</sub>O DMPC glacée, et 300  $\mu$ l de tampon SDS-EB (10 mM Tris – HCl pH 8.0, 4 mM EDTA pH 8.0, 2 % SDS, 40 mM NaCl). On vortexe, puis on ajoute 350  $\mu$ l d'un mélange phénol/CIA (CIA : chloroforme / alcool isoamylique en proportion 24/1). Après 5 min de vortexage, on sépare les deux phases par 5 min de centrifugation à 15000 g. La phase aqueuse, supérieure et enrichie en acides nucléiques, est récupérée. On ajoute ensuite 300  $\mu$ l de CIA, et on traite les extraits comme précédemment.

- Pour l'extraction de DNA, on ajoute alors 2 volumes d'éthanol absolu glacé au surnageant obtenu et on incube 30 min minimum sur glace. On centrifuge 5 min à 15000 g et le culot est lavé avec 300  $\mu$ l d'éthanol 70%. Le culot final est repris dans 30  $\mu$ l d'eau stérile (concentration à environ 1  $\mu$ g DNA/ $\mu$ l).
- Pour l'extraction de RNA, on ajoute 1/3 de volume de LiCl 8 M et on incube au moins 3 h à 4 °C. Après cette étape, une centrifugation de 15 min à 15000 g permet d'obtenir un culot enrichi en RNA. Celui-ci est lavé avec 300  $\mu$ l d'éthanol 70 %. Le culot final est repris dans 15 à 20  $\mu$ l d'eau stérile DMPC (concentration à 3-5  $\mu$ g DNA/ $\mu$ l).

### 9.2. Purification de RNA polyA à partir de RNA total

Après extraction d'une grande quantité de RNA totaux (de l'ordre du mg) par la technique décrite au point précédent, les RNApolyA ont été purifiés en utilisant le kit PolyATtract® mRNA Isolation Systems de Promega (USA). Le principe de la purification repose sur l'association de la queue poly-A des mRNA avec une sonde poly-T accrochée à une bille métallique. Les billes sont ensuite séparées par utilisation d'un aimant.

---

<sup>1</sup> NB : Toutes nos solutions sont réalisées avec de l'eau additionnée de diméthylpyrocarbonate 0,1 % et autoclavées.

### 9.3. Extraction rapide de DNA total de *Chlamydomonas* par digestion à la protéinase K

Un demi centimètre carré d'algues est récupéré sur boîte de pétri et mélangée à 50µl de solution de protéinase (Pour 1 ml : 4 mg de protéinase K, tampon de PCR 1x final, amené à 1 ml avec de l'eau) dans un tube eppendorf. 30 µl de paraffine sont ajoutés en surface et l'échantillon est incubé 1 heure à 58 °C et 1 heure à 96 °C. Après 5 secondes de centrifugation, l'ADN se trouve dans la phase aqueuse. La solution se conserve à 4 °C et peut être utilisée pour une PCR en doublant la quantité de polymérase (voir point 9.7).

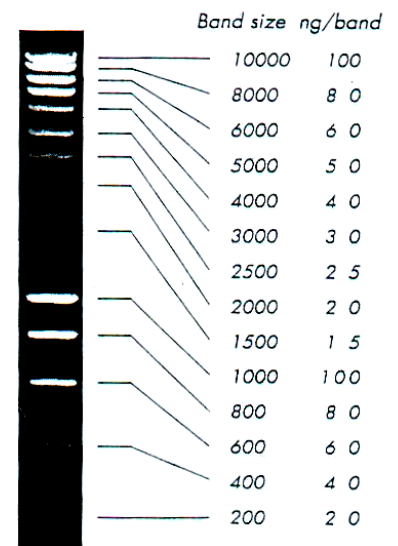
### 9.4. Analyse spectrophotométrique des acides nucléiques

Le spectre d'absorption des acides nucléiques présente un maximum vers 260 nm, et un minimum vers 230 nm. Le rapport des absorbances à ces deux longueurs d'onde permet d'apprécier la pureté d'un échantillon, tandis que la valeur d'absorbance à 260 nm renseigne sur la quantité de matériel présent dans l'échantillon.

Pour déterminer la concentration d'un échantillon, on considère qu'une concentration en acides nucléiques de 40 µg/ml correspond à une DO (densité optique) de 1 à 260 nm.

### 9.5. Electrophorèse sur gel d'agarose

Les acides nucléiques, chargés négativement en raison de la présence de groupements phosphates, vont migrer vers l'anode à une vitesse qui est fonction de leur taille. Pour visualiser cette migration, un aliquote de DNA ou de RNA est déposé sur gel d'agarose à 0,8 – 1 %, préparé dans du tampon TEA (40 mM Tris, 2 mM EDTA, amené à pH 8 avec de l'acide acétique). La migration s'effectue à 80-90 V (Cuve d'électrophorèse Gibco BRL, USA, ou Bio-Rad, USA). Une incubation de quelques minutes dans une solution de bromure d'éthidium permet de visualiser les acides nucléiques au transilluminateur UV (312 nm). Des images du gel peuvent être réalisées à l'aide du logiciel Bio-profil v6.0 (Vilbert-Lourmat)



Divers marqueurs de poids moléculaire peuvent être utilisés, le plus courant étant le Smart Ladder (Eurogentec, Belgique) donné en exemple ci-contre.

### **9.6. Purification de DNA**

- **A partir d'un gel d'agarose**

Le DNA ayant migré dans un gel d'agarose peut être récupéré en découpant directement la région désirée. Le kit *Wizard*® de Promega (USA) est utilisé pour la purification. L'agarose est dissout dans un bain à 65 °C, puis le DNA est récupéré en le fixant sur une mini-colonne. La fixation est basée sur le principe de l'interaction du DNA avec la silice échangeuse d'anions. La colonne est ensuite lavée avant d'éluer le DNA dans 50 µl d'eau stérile.

### **9.7. Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)**

Cette réaction, qui permet l'amplification d'une séquence de DNA, a pour principe la répétition de trois phases :

- dénaturation du DNA double brin à 94 °C.
- hybridation des amorces spécifiques de part et d'autre de la séquence cible, à une température dépendant des  $T_m$  des oligonucléotides utilisés.
- élongation des amorces à 72 °C.

Ces trois étapes peuvent être répétées entre 20 et 35 fois. La durée de la phase d'élongation est fonction de la longueur de DNA à amplifier, la norme étant d'une minute par millier de paires de bases. Le mélange réactionnel contient 200 µM de chaque dNTPs, 0,5 µM de chaque oligonucléotide, 1,5 mM de MgCl<sub>2</sub>, ainsi qu'une unité de Taq polymérase thermorésistante (Promega, USA). Le thermocycleur GeneAmp PCR system 9700 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA) a été utilisé. Lors de PCR sur bactéries, on ajoute une première phase de dix minutes à 94 °C permettant la lyse des bactéries et une dénaturation complète du DNA.

### **9.8. Amplification d'ARN par RT-PCR et 5'RACE**

Le premier brin d'ADNc est synthétisé à l'aide de la *Transcriptase Reverse Transcriptase* (Roche, Allemagne). De 0,2 à 2 µg d'ARN totaux sont incubés 1 heure à 55 °C en présence de 0,625 µM d'amorce spécifique, de 1 mM de dNTP, de 25 U d'enzyme et de 4 µl de tampon 5x pour un volume final de 20 µl. La réaction est ensuite stoppée par un traitement de 5 min à 85 °C. Afin d'amplifier spécifiquement la région 5' terminale du cDNA produit, on ajoute une queue poly-A à l'aide d'une *Terminale Transferase* (Roche, Allemagne). 10 µl de la solution de cDNA sont mis en présence de 0,2 mM de dATP, de tampon (10 mM Tris-HCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 mM KCl, pH 8,3) pour un volume final de

24 µl, et sont incubés 3 min à 94 °C. 80 unités d'enzymes sont alors ajoutées et la solution est laissée au moins 20 min à 37 °C. La terminale transférase est inactivée par un traitement de 10 min à 70 °C. L'ajout de cette queue poly-A va permettre l'utilisation de primer poly-T comme amorce pour des amplifications par PCR tel que décrit au point précédent.

### **9.9. Restriction du DNA**

L'utilisation d'endonucléases permet de cliver le DNA en des sites spécifiques. Les conditions optimales, ainsi que les tampons nécessaires sont fournis avec les enzymes commercialisées (Eurogentec, Belgique ou Gibco BRL, USA). La réaction se fait généralement à 37 °C durant une période de 2 h.

### **9.10. Ligation**

Les quantités de vecteur et d'insert doivent être calculées pour rester dans un rapport molaire variant de 1:1 à 1:3. Pour un volume de 10 µl, le mélange réactionnel comprendra également le tampon de ligation en concentration finale 1x, ainsi que 1 à 2,5 unités de T<sub>4</sub> DNA ligase. Le tout est laissé une nuit à 4 °C ou 16 °C en fonction des prescriptions du fournisseur. Alternativement, la réaction se déroulera 1 h à température ordinaire.

### **9.11. Extraction de DNA plasmidique**

#### **• Préparation de DNA plasmidique (mini)(méthode de boiling)**

Les cellules d'une culture overnight de 2 ml de LB - ampicilline (100 mg/litre) sont récupérées dans un eppendorf par centrifugation. Elles sont reprises en suspension dans 300 µl de STET (233 mM Saccharose, 5% Triton x-100, 50 mM EDTA, Tris-HCl 50 mM pH 8) et traitées par 2 minutes successivement à 4 °C et 100 °C. On précipite le DNA cellulaire par 15 minutes de centrifugation et on ajoute au surnageant 0,7 volume d'isopropanol et 0,1 volume de NaAc 3 M pH 4,8. Une nouvelle centrifugation de 30 minutes à 4 °C permet d'obtenir un culot de DNA plasmidique. Lavé par 1 ml d'éthanol 70 %, le culot final est repris dans 50 µl d'eau stérile. Le rendement est d'environ 10 µg de DNA.

#### **• Medium préparation de DNA plasmidique (medium)**

Cette extraction permet d'obtenir des plasmides de plus grande pureté. Le kit Nucleobond AX-100 de la firme Macherey-Nagel (USA) est utilisé. Il est basé sur la lyse alcaline des cellules, la précipitation des éléments cellulaires et l'interaction des acides nucléiques avec une résine de silice échangeuse d'anions.

### 9.12. Séquencage

Les fragments de DNA insérés dans le vecteur pGEM ont été séquencés grâce aux primers Universel et Reverse suivant le principe du cycle sequencing (Genome Express, Montreuil, France).

### 9.13. Transformation bactérienne

4  $\mu$ l du mélange de ligation sont ajoutés à 100  $\mu$ l de cellules compétentes d'*E coli*. Un témoin sans ligation est également réalisé. Le mélange est laissé 20 minutes sur glace avant de subir un choc thermique de 45 secondes à 42 °C. Une fois la solution refroidie, on ajoute rapidement 450  $\mu$ l de milieu LB liquide. Les cellules sont placées 30 min à 37 °C sous agitation. Il reste à déposer un volume compris entre 50 et 200  $\mu$ l sur un milieu LB gélosé rendu sélectif par l'ajout d'un antibiotique.

### 9.14. Préparation de cellules compétentes

100 ml de milieu LB sont inoculés avec 2 ml d'une culture over-night de DH5 $\alpha$ . La culture est placée à 37 °C sous agitation jusqu'à ce qu'elle atteigne une absorbance de 0,3 à 0,6 à 600 nm. Les cellules sont récupérées par une centrifugation de 10 minutes à 1450 g et remises en suspension dans 17 ml de CaCl<sub>2</sub> 50 mM. Après 25 minutes sur glace, les cellules sont centrifugées 10 minutes à 1000 g et remises en suspension dans 1,25 ml de CaCl<sub>2</sub> 100 mM et 1,25 ml de glycérol 40 %. Les cellules compétentes peuvent être conservées à -80 °C.

### 9.15. Northern Blotting<sup>2</sup>

#### • Transfert de RNA

Le matériel de départ consiste en 10 à 30  $\mu$ g de RNA totaux par puit du gel de migration. On ajoutera également un marqueur de poids moléculaire spécifique (RNA Ladder, Gibco BRL, USA, présentation ci-contre). Chaque échantillon sera dénaturé par un traitement de 15 min à 65 °C en présence de loading Buffer I (les composants du loading buffer doivent être ajoutés pour que l'échantillon ait une concentration finale de 50 % formamide désionisée, 6,5 % formaldéhyde, 1x MOPS, 6,5 mM bromure d'éthidium). Une fois la dénaturation effectuée, les échantillons sont conservés sur glace jusqu'au dépôt et 2  $\mu$ l du loading Buffer II sont alors ajoutés (50 % glycérol,



<sup>2</sup> Toutes les solutions contiennent du DMPC 0,1%

1 mM EDTA pH 8, 0,5 % bleu de bromophénol). Le gel est un gel d'agarose 1 %, formaldéhyde 2,2 %, préparé dans du tampon MOPS 1x (MOPS 10x : 0,2 M MOPS, 50 mM NaAc, 10 mM EDTA pH 8.0, pH 7, passé sur filtre Millipore 0,2 µm, conservé à l'abri de la lumière). La migration s'effectue dans du MOPS 1x.

Le gel est ensuite mis en contact avec une membrane de nylon non chargée (Nylon Hybond-N) humidifiée dans de l'eau DMPC. Le déplacement des RNA vers la membrane se fera en présence de SSC 20x (SSC 20x : 3 M NaCl, 0,3 M Citrate- $\text{Na}_3$  2 H<sub>2</sub>O, eau DMPC, pH 7) par capillarité overnight. On prendra soin de noter les emplacements des puits, ainsi que l'orientation de la membrane avant de la sécher à 80 °C sous vide pendant 2 h. La membrane pourra être conservée à 4 °C à l'abri de la lumière, scellée dans une enveloppe plastique.

- **Hybridation de la membrane par une sonde marquée à la digoxygénine**

- 1) Marquage de la sonde

La sonde est réalisée par une réaction de PCR en utilisant un mélange de dATP, dCTP et dGTP non marqués et de dUTP et dTTP liés à la digoxygénine (Roche, Allemagne). La qualité du marquage peut être vérifiée par comparaison sur gel d'agarose de la sonde par rapport à une PCR ne comprenant pas de dNTP marqués. Avant utilisation, 10µl de sonde sont dénaturés par un traitement de 5 min à 100 °C, puis refroidis sur glace.

- 2) Préhybridation

La membrane est placée dans un tube d'hybridation contenant 20 ml de solution d'hybridation (Solution d'hybridation : 5x SSC, 0,02 % SDS, 0,1 % N-lauryl sarcosine, 1 % blocking reagent (Roche, Allemagne)). La membrane est préhybridée à 50 °C pendant 1 à 4 h (four à hybridation Techno Hybridiser HB-ID).

- 3) Hybridation

La sonde marquée est ajoutée à la solution de préhybridation. La membrane est hybridée à 50 °C pendant au moins 16 h.

- 4) Lavage

La membrane est lavée deux fois 5 min dans une solution SSC 2x, SDS 0,1 %, puis deux fois 15 min à 50 °C dans une solution SSC 0,5x, SDS 0,1 %. Un autre lavage de 15 min à 50 °C dans une solution SSC 0,2x SDS 0,1x pourra être ajouté pour éliminer un excès de bruit de fond.

- **Révélation et quantification**

La membrane va être incubée 30 min dans 100 ml de tampon 2 (tampon 2 : diluer 10x la solution de blocking reagent (Roche, Allemagne) dans du tampon 1 ; tampon 1 : acide maléique 0,1 M, NaCl 0,15 M , pH 7,5 avec du NaOH), puis 30 min encore dans 20 ml de tampon 2 comprenant l'anticorps anti-Dig dilué à 75 U/ml. La membrane est alors lavée deux fois 15 min (tampon de lavage : tampon 1 + 0,3 % Tween (v/v)), puis équilibrée de 2 à 5 min dans un tampon de détection (tampon de détection : Tris-HCl 0,1 M , NaCl 0,1 M , pH 9,5). La membrane est déposée dans un film plastique et 1 ml de CSPD, utilisé comme substrat chemiluminescent, est appliqué sur la face comprenant les RNA. Les bulles d'air sont chassées et le film est scellé après 5 min à température ambiante. Le film plastique est déposé de 5 à 15 min à 37 °C pour augmenter le signal, puis va être disposé dans une cassette en présence d'un film autoradiographique. La révélation de ce film se fera après 1 à 90 minutes en fonction de l'intensité du signal.

#### **9.16. Déshybridation de la membrane**

Dès la fin de la révélation, la membrane est rincée à l'eau et conservée dans un bain de SSC 20x (maximum 48 h). La membrane est traitée par deux bains d'une heure chacun dans une solution de déshybridation chauffée à 80 °C (Formamide désionisée 50 %, SDS 5%, Tris-HCl pH 7,5 50 mM). Après un bain de 5 minutes dans du SSC2x, la membrane peut être conservée dans du SSC 2x à 4 °C jusqu'à hybridation.

#### **9.17. Transformation d'algues**

Une culture liquide de *Chlamydomonas* à une concentration de 3 à  $6 \cdot 10^6$  cellules/ml est centrifugée et remise en suspension dans du TMP + 40 mM Sucrose à une concentration de  $1 \cdot 10^8$  cellules/ml. Dans une cupule d'électroporation, on réalise un mélange comprenant 250 µl d'algues, 2,5 µl de DNA de sperme de Hareng 10 mg/ml stérile et le ou les plasmides à intégrer. Pour une intégration simple, 1 µg de plasmide est utilisé. En cas de co-transformation, on ajoute 1 µg de plasmide de sélection et 3 µg de plasmide d'intérêt. L'électroporation est réalisée à 1000 V, 800 Ω et 10 µF. Les algues sont ensuite remises en culture pendant une nuit dans 3 à 4ml de milieu non sélectif, sous agitation et à l'obscurité. Le lendemain, les algues sont centrifugées et remises en suspension dans 250 µl de milieu frais qui seront étalés sur deux boîtes de Pétri de milieu sélectif.

### **9.18. Extraction de mitochondries de *Chlamydomonas* par digestion à la digitonine**

Les mitochondries de *Chlamydomonas reinhardtii* sont isolées par la méthode de lyse à la digitonine à partir de cellules sans paroi (Cardol *et al.*, 2002).

$3.10^9$  cellules sont mises en suspension dans 10 ml de solution A + digitonine ( $K_3PO_4$  25 mM, PEG 6 %, BSA 0,4 %, digitonine 0,016 %). La suspension est amenée rapidement à 30 °C et maintenue à cette température pendant 30 secondes, puis refroidie sur glace pendant 5 minutes et centrifugée 1 minute à 2500 g. Le culot est lavé dans 40 ml de solution B (20 mM Hepes, 0,15 mM mannitol, 2 mM EDTA, 1 mM  $MgCl_2$ , 0,1 % BSA). Après 2 minutes de centrifugation à 1000g et élimination du surnageant, le culot est repris dans 2 ml de solution B et transféré dans un erlen froid. La solution va subir une agitation à l'aide d'un barreau magnétique pendant 45 secondes. 6 ml de solution D (20 mM Hepes, 0,15 mM mannitol, 0,8 mM EDTA, 4 mM  $MgCl_2$ ) sont ajoutés et la suspension est centrifugée pendant 3 minutes à 2000 g puis le surnageant résultant est à son tour centrifugé 10 minutes à 10 000 g. Le culot est finalement repris dans 100  $\mu$ l de solution D.

L'échantillon est ensuite déposé sur un gradient composé de trois couches successives de 15 ml de Percoll à 45, 21 et 13 % de Percoll dilué par du tampon MET (280 mM mannitol, 10 mM Tris-HCl pH 6,3, 0,5 mM d'EDTA, 0,1 % de BSA). Une centrifugation de 50 minutes à 40 000 g est ensuite réalisée. Les mitochondries forment alors une bande blanche à l'interface des couches 45 et 21 % de Percoll. Cette fraction est récupérée et diluée 10x dans du tampon MET, puis centrifugée 10 minutes à 10 000 g. Le culot est récupéré et dilué à nouveau dans du MET avant une seconde centrifugation de 10 minutes à 11 000g. Le culot est finalement repris dans 1 ml de solution D et les protéines conservées à -80 °C. Toutes les opérations se déroulent à 4 °C.

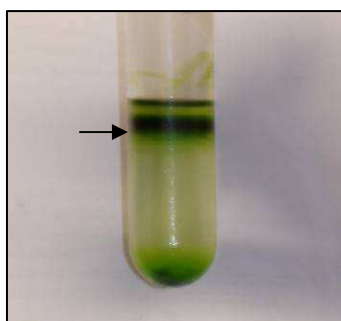
### **9.19. Extraction de chloroplastes de *Chlamydomonas* par nébulisation**

Les chloroplastes de *Chlamydomonas reinhardtii* sont isolés par nébulisation à partir de cellules sans paroi selon un protocole décrit par J.D. Rochaix (Rochaix, 2007).

Une culture de 2 litres d'algues dans du milieu TAP, à une concentration de  $3.10^6$  à  $4.10^6$  cellules par ml, est centrifugée pendant 5 minutes à 1000 g et remise en suspension dans 2 litres de milieu TMP. Ce milieu est ensuite agité pendant 2 à 3 heures à l'obscurité, puis centrifugé 5 minutes à 2700 g. Le culot est remis en suspension dans 500 ml de tampon phosphate 10 mM pH 7,2 puis centrifugé 5 minutes à 2700 g. Les cellules sont ensuite remises en suspension dans du tampon A (300 mM Sorbitol, 50 mM Hepes-KOH pH 7,2, 2 mM EDTA pH 8, 1 mM  $MgCl_2$ ) auquel on ajoute 1 mM de PMSF (Inhibiteur de protéase) à



une concentration finale de  $1.10^8$  cellules/ml. Les cellules sont ensuite passées dans un nébulisateur à une pression de 1,2 à 1,5 bar d'azote. Le lysat récupéré est centrifugé un bref instant à 3000 g et les chloroplastes sont remis en solution dans du tampon A + PMSF. Cette dernière étape est répétée 2 fois dans du tampon A + PMSF, puis une troisième fois dans 5 ml de tampon B (0,5 M Sorbitol, 50 mM Tris-HCl pH 7,9, 0,33 mM  $MgCl_2$ ) auquel on ajoute 1 mM de PMSF. La suspension obtenue est laissée sous agitation pendant 2 à 3 heures en chambre froide (4 °C), puis déposée sur gradient de Percoll. Deux gradients indépendants sont réalisés en parallèle pour diviser l'échantillon. Chaque gradient est composé de 30ml de Percoll 75 % et 20ml de Percoll 35 % dilué dans du tampon B. Après 20 minutes de centrifugation à 8000 g, les chloroplastes se sont stabilisés dans la partie supérieure de la fraction à 35 % (voir figure 9.1). La fraction chloroplastique est récupérée et diluée dans du tampon B. Cette solution est centrifugée un bref instant à 1900 g et lavée 2x dans du tampon B. A la fin de la deuxième centrifugation, les chloroplastes sont repris dans 1 ml de tampon B et conservés à -80 °C.



**Figure 9.1** : Visualisation de la fraction chloroplastique (mise en évidence par une flèche noire) dans un gradient de Percoll d'un extrait de protéines obtenu par nébulisation.

### **9.20. Méthode de Bradford**

Le dosage des protéines est réalisé selon la méthode de Bradford (1976). Une droite étalon est réalisée dans des concentrations croissantes en sérum albumine bovine (BSA) allant de 2 à 12  $\mu$ g de protéines dans 100  $\mu$ l de 0,1 N NaOH, 0,1 % Triton X100 auxquelles sont ajoutés 1 ml de réactif de Bradford (5 % éthanol, 8,5 % acide orthophosphorique, 0,01 mM bleu de Coomassie G250) (Biorad, USA).

La concentration protéique des extraits est ensuite déterminée en fonction de l'absorbance à 595 nm lue au spectrophotomètre en se référant à la droite étalon ( $x$   $\mu$ l d'échantillon,  $100-x$   $\mu$ l de 0,1 N NaOH, 0,1 % Triton X100, 1 ml de réactif de Bradford).

### 9.21. Western blotting

- **Transfert des protéines**

Une quantité voulue de protéines (entre 5 et 30 µg de protéines par puits) est diluée dans un volume final de 10 µl avant ajout de 10 µl de tampon de chargement 2x (125 mM Tris HCl pH 6,8, 4% SDS, 20 % glycérol, 2,9 mM sel sodique de Bleu de bromophénol, conservée à -20°C. Avant utilisation, 10 % de mercaptoéthanol sont ajoutés). La solution est ensuite chauffée 5 minutes à 100 °C puis refroidie sur glace pendant 1 minute. Après centrifugation, les protéines sont déposées à la seringue sur le gel. L'ajout d'un marqueur de poids moléculaire est possible (PageRuler – Fermentas, Canada).

Le gel est composé, dans sa partie inférieure, d'un « Running Gel » dont la concentration dépend de la taille attendue des protéines recherchées (Running Gel : 0,1 % SDS, 8 à 15 % acrylamide, 375 mM Tris-HCl pH 8,8 , 0,1% APS, 0,1% Temed). La partie supérieure du gel, le « Stacking Gel », présente une concentration fixe de 25 % d'acrylamide. La cuve utilisée au cours de ce travail est du type PROTEAN® II xi Cell (Bio-rad, USA). La migration se déroule dans du tampon de cuve (tampon de cuve 10x : 250 mM Tris, 1,91 M glycine, 1% SDS, ajuster le pH à 8,3 avec de l'HCl) à 180 V pendant 2 à 8 heures ou à 30 V pendant une nuit.

Le transfert des protéines sur membrane de Nylon (Nylon Hybond-P, Amersham) se réalise en présence d'un champ électrique dans une cuve de blotting PROTEAN® II xi Cell (Bio-rad, USA). Le gel est préalablement équilibré par un bain de 15 minutes dans du tampon de blotting (1 litre) : 25 mM Tris, 0,191 M glycine, 20 % méthanol, conserver à 4 °C). La membrane va également être équilibrée par trois bains successifs de 15 secondes dans du méthanol, 2 minutes dans de l'eau et 5 minutes au moins dans du tampon de blotting. Une fois le montage du blot suivant les prescriptions du producteur effectué, la migration se déroule en présence d'un champ électrique allant de 30 V (overnight) à 100 V (1 heure), en chambre froide.

- **Détection de la protéine par l'anticorps primaire**

La membrane est rincée dans du TBS (1 litre) : 50 mM Tris, 0,15 M NaCl, ajuster le pH à 7,5 avec de l'HCl, conservation pendant 3 mois à 4 °C) et incubée de 1 à 2 heures dans une solution de Blocking 1 % (Roche, Allemagne) à température ambiante sous agitation (four à hybridation Techno Hybridiser HB-ID), ou en chambre froide (4 °C) pendant une nuit sans agitation. La solution de Blocking est ensuite remplacée par l'anticorps primaire dilué

dans du Blocking 0,5 % pendant 1h30 sous agitation ou une nuit à 4 °C sans agitation. La quantité d'anticorps primaire est spécifique de chaque anticorps et doit être déterminée expérimentalement.

- **Ajout de l'anticorps secondaire et révélation**

La révélation va se faire par détection de l'anticorps primaire par un anticorps secondaire couplé à une réaction de chemiluminescence. La membrane est rincée deux fois 10 minutes dans du TBST (TBS + 0,1 % Tween), puis deux fois 10 minutes dans du Blocking 0,5 %. La membrane est ensuite incubée 30 minutes en présence de l'anticorps secondaire (BM Chemiluminescence Western Blotting kit (Mouse/Rabbit) de ROCHE) en four à hybrider. La membrane est ensuite lavée par 4 bains successifs de 15 minutes dans du TBST avant d'être transférée dans une farde plastique avec du TBST. Les étapes suivantes se déroulent en chambre noire et utilisent les réactifs du kit de BM Chemiluminescence Western Blotting kit (Mouse/Rabbit) de ROCHE suivant les prescriptions du producteur. Après une incubation de 60 secondes en présence des réactifs de la réaction de chemiluminescence, la membrane va être disposée dans une cassette en présence d'un film autoradiographique. La révélation du film se fera après 1 à 15 minutes d'exposition.

### **9.22. Dosage de la chlorophylle** (adapté de Lichtenthaler, 1987)

1 ml de la solution d'algues à tester est prélevé et centrifugé 5 minutes. Le surnageant est éliminé et le culot est remis en suspension dans 5 ml de méthanol avant d'être centrifugé à nouveau. La quantité de chlorophylle dans l'échantillon va être mesurée par absorbance au spectrophotomètre suivant la formule de Lichtenthaler :

$$[\text{Chlorophylle}_{a+b}] = 1,44 \cdot \text{Abs } 665,2 \text{ nm} + 24,93 \cdot \text{Abs } 652,4 \text{ nm}$$

### **9.23. Screening banque phagique**

- **Préparation des cellules**

Une culture de 50 ml de  $C_{600}$  dans du milieu LB +  $\text{MgSO}_4$  0,01 M + 0,2 % Maltose est suivie jusqu'à obtention d'une densité optique de 0,8 à 1 à 600 nm. Cette culture est ensuite centrifugée 10 minutes à basse vitesse et les cellules resuspendues dans du  $\text{MgSO}_4$  10 mM stérile jusqu'à obtention d'une densité optique proche de 0,5 à 600 nm. Les cellules se conservent à 4 °C et sont utilisables pendant 48 heures.

- **Titration de la banque**

Du Top Agar (voir matériel p40) doit être préparé à l'avance et refondu par passage de 15 minutes à l'autoclave, puis maintenu à température dans un bain à 48 °C. Des dilutions de la banque phagique sont préparées dans du tampon SM stérile (0,1M NaCl, 8 mM  $MgSO_4 \cdot 7 H_2O$ , 40 mM Tris-HCl pH 7,5, 0,005 % gélatine chaude) jusqu'à une dilution pouvant aller jusqu'à 10-12 pour le premier titrage de la banque. Des mix contenant 200  $\mu$ l de cellules préparées et 10  $\mu$ l de phage dilué sont alors incubés 15 minutes à 37 °C avant d'être mélangés au vortex avec un tube à essai de Top Agar fondu. La solution obtenue est coulée sur du milieu NZY solide et laissée en culture entre 8 et 12 heures à température ambiante. Le comptage des plages de lyse en fonction de la dilution des phages renseigne sur le titre de la banque.

- **Crible de la banque**

La manipulation est identique au titrage de la banque, mais les dilutions sont réalisées pour déposer l'équivalent de 20 000 phages par boîte de pétri de 90 cm de diamètre. Chaque boîte est réalisée en double exemplaire. Après culture, les boîtes de pétri sont placées 2 heures à 4 °C

- **Transfert sur membranes**

Des filtres de Nylon (Nylon Hybond-N) sont appliqués sur la surface de la boîte pendant 2 minutes. La position des filtres est marquée en réalisant des incisions dans le filtre et l'agar. Les membranes sont retirées et séchées 10 minutes sur papier Wathman dans l'enceinte de la hotte. Les membranes sont ensuite disposées sur du Wathman imbibé de solution de dénaturation (1,5 M NaCl, 0,5 M NaOH) pendant 3 minutes en s'assurant que la membrane reste humide par ajout de solution sur la face supérieure de la membrane. Après un bref séchage sur un nouveau Wathman, l'opération précédente est recommencée deux fois, d'abord par 5 minutes en remplaçant la solution de dénaturation par de la solution de neutralisation (1,5M NaCl, 0,5 M Tris-HCl, pH 8), puis par 5 minutes avec de la solution de rinçage (SSC 2x, 0,2 M Tris-HCl, pH 7,5). Les membranes sont finalement séchées sous vide, à 80 °C pendant 1h30 avant d'être conservées à 4 °C.

- **Traitement à la protéinase K et Northern blotting**

Les filtres sont placés sur une feuille d'aluminium et recouverts d'une solution de protéinase K à 2 mg/ml pendant 1h à 37°C. Les débris cellulaires sont ensuite éliminés en plaçant les membranes entre deux papiers Wathman imbibés d'eau et en appliquant une pression par roulement. Après cette étape, les membranes sont hybridées par Northern blotting, comme décrit au point 9.15.

- **Affinement de la banque de phage et étape ultérieure de criblage**

Une fois un signal obtenu par autoradiographie, la région correspondante de la boîte de pétri est récupérée et remise en suspension dans du tampon SM dans un tube eppendorf. Cette suspension est une nouvelle banque enrichie en phage recherché. Répéter les opérations de criblages jusqu'à obtention d'un signal uniforme après autoradiographie en diminuant à chaque étape le nombre de phages criblés : 1000 phages au 2° crible, 50 phages au 3°.

## **10. Résultats**

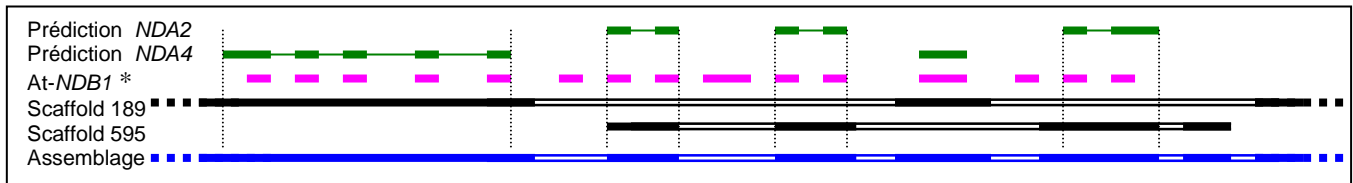
### **10.1. Obtention des séquences complètes des gènes de la famille des NAD(P)H déshydrogénases de *Chlamydomonas***

#### **10.1.1. Analyse de la 2<sup>o</sup> version du séquençage de *Chlamydomonas***

En décembre 2003, la deuxième version du séquençage du génome nucléaire de *Chlamydomonas* était publiée par l'Institut DOE (<http://www.jgi.doe.gov/>). La recherche de séquence homologue aux gènes de NAD(P)H déshydrogénase de type II d'autres organismes dans cette version du séquençage a permis au docteur Pierre Cardol de l'Université de Liège d'identifier 7 régions du génome de *Chlamydomonas* présentant des « open reading frame » pouvant encoder des NAD(P)H déshydrogénases de type II (Cardol *et al.*, 2005). Ces *NDH-II* putatives furent nommés *NDA1* à *NDA7* (Cardol *et al.*, 2005). Ces séquences étaient localisées sur les scaffolds (assemblage de plusieurs séquençages contigus) n°31 (*NDA1*), 189 (*NDA2*), 117 (*NDA3*), 595 (*NDA4*), 82 (*NDA5*) et 145 (*NDA6* et *NDA7*). De plus, l'Institut DOE propose, comme outil d'annotation de son séquençage, un programme de prédiction de gène basé sur la présence d'open reading frame, d'alignement avec des gènes homologues et de la présence d'EST (Expressed Sequenced Tag). Les modèles de la 2<sup>o</sup> version du séquençage des différents gènes de la famille *NDA* sont respectivement le C\_310108, C\_1890016, C\_1170009, C\_5950001, C\_820024, C\_1450028 et C\_1450029.

Cette version du séquençage présentait cependant des lacunes en raison de nombreuses régions non séquencées. Les scaffolds n°189, 595 et 82, correspondant respectivement aux gènes putatifs *NDA2*, *NDA4* et *NDA5* présentaient notamment plusieurs régions non séquencées à l'intérieur de la séquence des gènes discutés.

Concernant *NDA2* et *NDA4*, il est rapidement apparu que les prédictions proposées pour ces deux gènes étaient complémentaires. La figure 10.1 montre que les prédictions de *NDA2* et *NDA4* s'alignent, sans recouvrement mutuel, sur la séquence du gène encodant la protéine homologue Ndb1 d'*Arabidopsis thaliana* (At-Ndb1), suggérant fortement un gène unique. Les scaffolds 189 et 595, correspondant à *NDA2* et *NDA4*, ne présentent également pas de recouvrement. Un nouvel assemblage de ces deux scaffolds est possible en se servant des deux prédictions alignées sur *At-NDB1* comme références. La possibilité d'un morcellement du gène *NDA2/4* en deux régions génomiques distinctes étant faible, les séquences des deux scaffolds ont donc été combinées et le gène putatif *NDA4* abandonné.



**Figure 10.1 :** Représentation schématique d'alignement des séquences des Scaffolds 189 et 595, des EST disponibles dans la région des gènes *NDA2* et *NDA4* et de la séquence du gène *NDB1* d'*Arabidopsis thaliana* (*At-NDB1*). Les séquences des scaffolds comprennent des régions non séquencées représentées par un remplissage blanc. \* La structure intron/exon de la séquence de *At-NDB1* n'a pas été respectée, mais a été adaptée pour s'aligner sur la structure intron/exon de *NDA2/4*.

### 10.1.2. Intégration des EST disponibles et modification manuelle de la prédiction

Le programme de prédiction proposé par l'Institut *DOE* tient compte de la présence d'open reading frame dans la séquence génomique, et confirme celles-ci par alignement d'EST sur ces séquences. La comparaison de ces prédictions avec les EST disponibles dans les régions génomiques des gènes *NDA1* à *7* a cependant montré qu'une amélioration notable des prédictions était possible en incluant manuellement plusieurs EST non prises en compte par le programme, notamment aux extrémités 5' et 3' non codante des gènes.

De plus, dans le cas du gène *NDA2*, deux EST ne s'alignant pas sur les scaffolds 189 et 595, mais complétant de manière optimale l'alignement proposé à la figure 10.1 ont été incorporées au modèle de ce gène. Dans le cas de *NDA6*, deux régions génomiques de 57 et 60 paires de bases jouxtant des EST ont été ajoutées à l'alignement, ces ajouts permettant un meilleur alignement de la protéine Nda6 sur la protéine Nda7 de *Chlamydomonas*, tel que représenté à la figure 10.2. Différents ajouts de séquences génomiques ont ainsi été réalisés aux extrémités des EST pour permettre un meilleur alignement ou pour adapter/conservé la phase de lecture. La plupart de ces modifications se limitent à l'ajout d'une ou deux bases ajoutées ou retirées.

Nda6-DOE	53	PRVAAAAANYW	-----SALLSSGDTISFDFAAVCSGSSTSEL	PKSAAATSRGQRLAEMK	-----VWGVEMAARIVDAFAGKAV
Nda6-ajout	53	RVAAAAAINYWDIEDHGRVIOARVTCLEISQS	SALLSSGDTISFDFAAVCSGSSTSEL	PKSAAATSRGQRLAEMK	-GEITRSAKSIVVGGGSGVEMAARIVDAFAGKAV
Nda7	52	EVASRSATISKQDIEGMRFWQATVTSLSANSAVLSNGEITSPDAAALAGSSFS	TAPKSTAS	SRQRLAE	KALTDITNASKSIVVGGGPGVFAARIVDAFAGKAV

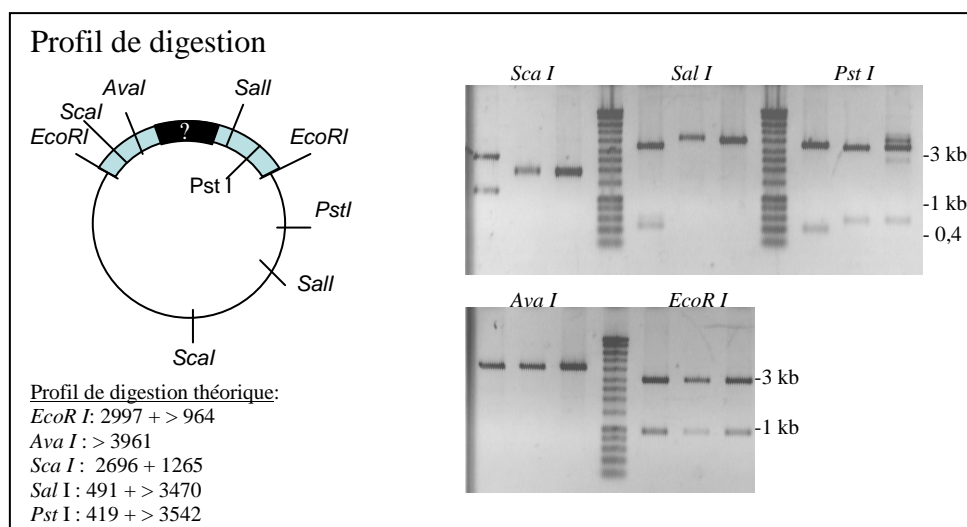
**Figure 10.2 :** Extrait d'un alignement de la séquence protéique des modèles de la protéine Nda6 et de la protéine Nda7 de *Chlamydomonas*. Les régions ajoutées manuellement sur base de la séquence génomique ont été surlignées en jaune.

### 10.1.3. Détermination des régions internes non séquencées des gènes NDA

L'intégration au modèle prédit par l'Institut *DOE* des différentes EST disponibles a permis l'obtention d'une première version des séquences des gènes de la famille *NDA*. Pour valider ces modèles, des alignements avec des protéines homologues d'autres organismes ont été réalisés. Ces alignements, présentés à la figure 10.7 (page 65), ont cependant mis en évidence la présence d'une région interne non séquencée dans la séquence du gène *NDA2*, de même que deux régions internes non séquencées dans la séquence du gène *NDA5*.

### Région interne non séquencée de *NDA2* :

L'obtention de la séquence interne non séquencée du gène *NDA2* a été effectuée par amplification PCR à partir d'une banque de cDNA de *Chlamydomonas* disponible au laboratoire. Deux amorces spécifiques ont été identifiées de part et d'autre de la première région génomique manquante du scaffold 189 (voir figure 10.1) dans des régions codantes du gène *NDA2*. Ces amorces (nda2-1F et nda2-2R) ont permis l'amplification d'un fragment de PCR d'environ 1000 pb. Après ligation de ce fragment dans le vecteur pGEM T-Easy, le plasmide obtenu a servi à la transformation d'une bactérie *E. coli*. Les clones ont ensuite été sélectionnés (a) sur milieu sélectif comprenant de l'ampicilline, (b) en fonction du test « blanc-bleu » basé sur l'inactivation du gène de la  $\beta$ -galactosidase du plasmide pGEM par l'insert, (c) par PCR en utilisant les amorces nda2-1F et nda2-2R et (d) par digestion enzymatique des plasmides extraits en fonction des régions connues de la séquence amplifiée (voir figure 10.3). Le premier clone de la figure 10.3 présentant un profil de digestion attendu, son ADN plasmidique a donc été séquencé et a permis l'obtention de la séquence codante de la région interne manquante du cDNA du gène *NDA2*, soit 128 bases manquantes.



**Figure 10.3 :** Profil de digestion théorique des clones ayant intégré le fragment de *NDA2* recherché et profil d'électrophorèse de trois clones ayant répondu positivement au test PCR, le premier clone présente un profil de digestion correct. Ladder : Smart Ladder.



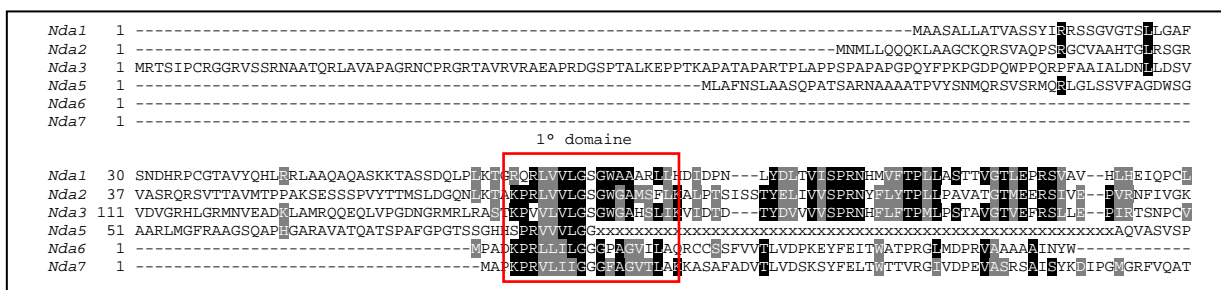
Régions internes non séquencées de NDA5 :

L'une des deux régions internes non séquencées de *NDA5* a été obtenue en suivant une démarche identique à celle utilisée pour celle de *NDA2*. Les amorces spécifiques *nda5-3F* et *nda5-4R* ont permis d'amplifier un fragment d'environ 700 pb. Deux PCR de 35 cycles ont ici été nécessaires pour obtenir suffisamment de matériel pour insérer le fragment dans le pGEM T-Easy. Après transformation d'*E. coli*, la sélection des clones s'est effectuée de manière identique à celle réalisée pour *NDA2*, soit par (a) sélection sur milieu sélectif, (b) en fonction du test « bleu-blanc », et (c) par amplification PCR utilisant les amorces spécifiques *nda5-3F* et *4R*. L'absence de site de restriction exploitable dans la séquence connue du gène *NDA5* n'a pas permis d'analyse de ce type. L'ADN plasmidique d'un clone positif a donc été séquencé et a permis l'obtention de la séquence codante de la 2<sup>o</sup> région interne inconnue du cDNA du gène *NDA5*, soit 603 bases manquantes.

Pour amplifier la région comprenant l'autre région interne non séquencée de *NDA5*, différents couples d'amorces spécifiques ont été utilisés (*nda5-1F/nda5-2R*, *nda5-1F/nda5-4R*, *nda5-1F/nda5-6R*, *nda5-5F/nda5-2R*, *nda5-5F/nda5-4R*, *nda5-5F/nda5-6R*, *nda5-7F/nda5-2R*, *nda5-7F/nda5-4R*, *nda5-7F/nda5-6R*,) et ce en variant les températures, tant à partir de la banque de cDNA qu'à partir de DNA extrait de *Chlamydomonas*, sans succès.

**10.1.4. Détermination des séquences 5' terminales des gènes *NDA***

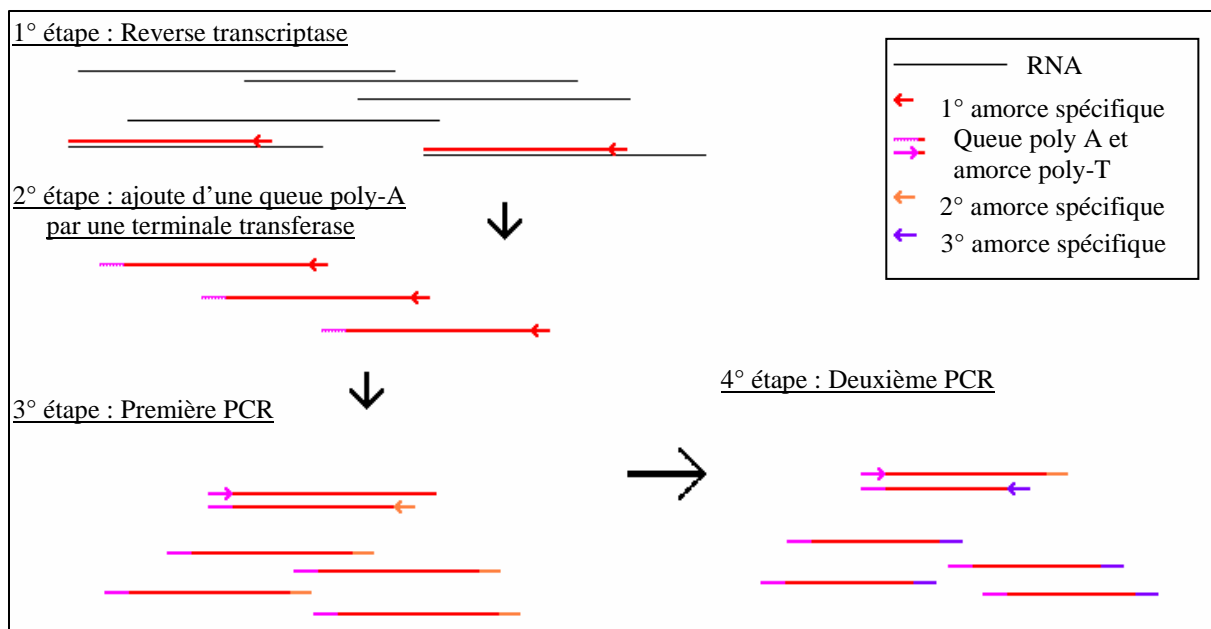
Alors que des séquences en amont du premier domaine conservé sont présentes pour les protéines *Nda1*, 2, 3 et 5, elles sont absentes chez les protéines *Nda6* et 7 (voir figure 10.4). Chez *A. thaliana*, la fusion de cette préséquence avec une séquence encodant une protéine fluorescente a démontré son implication dans l'import de la protéine au sein de la mitochondrie (Michalecka *et al.*, 2003). Nous avons réalisé une 5'RACE en vue de déterminer si ces deux gènes *NDA6* et 7 présentaient ou non une extension en 5'.



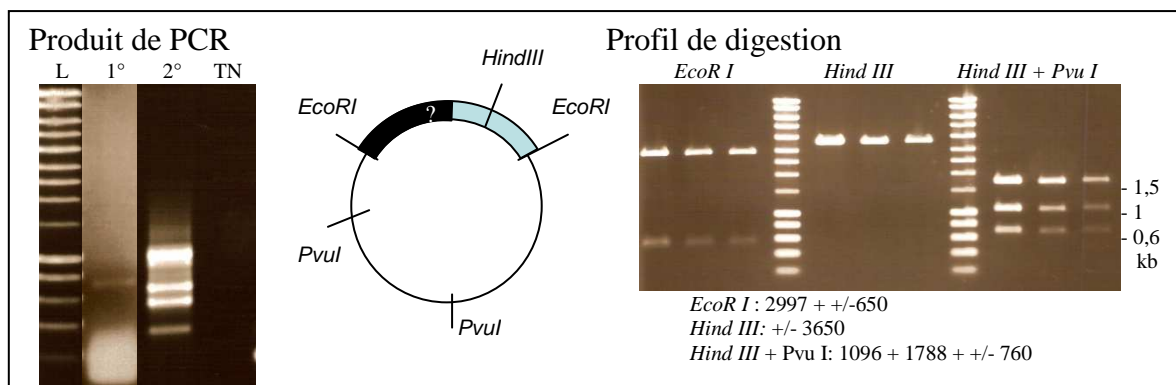
**Figure 10.4 :** Extrait d'alignement de la région 5' des protéines de la famille *NDA* de *Chlamydomonas reinhardtii*. Le premier domaine conservé a été encadré en rouge.

NDA6

Pour réaliser une 5'RACE, trois primers « reverse » positionnés sur le 2° et 3° exon du gène *NDA6* ont été utilisés (voir schéma explicatif à la figure 10.5). Celui situé le plus en aval, *nda6-3R*, a servi d'amorce spécifique pour une RT-PCR menée à partir de RNA total. Une queue poly-A a ensuite été ajoutée en 5' par le biais d'une terminale transférase. Une première PCR utilisant la seconde amorce spécifique *nda6-2R*, ainsi qu'un primer poly-T a permis d'amplifier un fragment d'environ 650 pb (voir figure 10.6). Une seconde PCR, utilisant la troisième amorce spécifique *nda6-1R* et le primer poly-T, a ensuite été effectuée à partir du produit total de PCR obtenu précédemment et a fourni 4 bandes dont une correspondant à la taille attendue en tenant compte de l'écart entre les primers.



**Figure 10.5** : Principe général de la technique de 5'RACE (voir texte et matériel et méthodes p 46).



**Figure 10.6** : **Obtention de la région 5' terminale de *NDA6***. Produit de PCR du gène *NDA6* à partir du mélange de RT-PCR avec l'amorce *nda6-2R* et un primer poly-T (1° colonne) et à partir du mélange de 1° PCR avec l'amorce *nda6-3R* et un primer poly-T (2° colonne). Profil de digestion théorique des clones ayant intégré le fragment de *NDA6* recherché et profil d'électrophorèse de trois clones ayant répondu positivement au test PCR. Tous les clones présentent un profil de digestion correct. Ladder : Smart Ladder.

Après ligation de la bande de la première PCR purifiée dans le pGEM et transformation dans *E. coli*, l'ADN plasmidique extrait de trois clones a ensuite été analysé par digestion enzymatique. Chacun des trois clones présentait un profil de digestion correspondant à nos attentes : la digestion par l'enzyme *EcoRI* libère un fragment d'environ 650pb, une digestion par l'enzyme *HindIII* linéarise le plasmide en coupant une seule fois dans l'insert et une double digestion par les enzymes *HindIII* et *PvuI* donne trois fragments d'environ 750 pb, 1 kb et 1750 pb (voir figure 10.6). L'ADN plasmidique d'un de ces clones a été séquencé. La séquence obtenue confirme en grande partie la séquence de l'EST, des différences minimales apparaissant entre les deux séquences. Ceci nous permet donc de confirmer la position de l'ATG initial et nous renseigne de la présence d'une 5'UTR de 391 pb.

### NDA7

La même expérience a été menée avec le gène *NDA7*. Pour ce faire, trois primers ont été utilisés (*nda7*-1R, 2R et 3R), le premier pour réaliser une RT-PCR à partir de RNA total extrait, les deux autres pour une première et une seconde PCR sur les cDNA produits. Aucune amplification n'a pu être obtenue (résultats non montrés). Nous avons modifié les différents paramètres de la réaction (T°, quantité de RNA), sans succès. Pour déterminer si cet échec était dû à un problème d'amorces, trois nouveaux primers positionnés plus en aval ont été identifiés (*nda7*-4R, 5R et 6R). Suivant la séquence probable de *NDA7*, cette expérience doit permettre au minimum l'amplification d'un fragment d'une taille de 470 pb. La première et la deuxième PCR n'ont donné aucun résultat, suggérant une expression trop faible du gène *NDA7* pour permettre son analyse par la technique de RT-PCR.

#### **10.1.5. Intégration de la troisième version du séquençage au modèle génique**

En octobre 2007, une troisième version du séquençage du génome nucléaire de *Chlamydomonas* a été publiée par l'Institut DOE (Merchant *et al.*, 2007). Bien que présentant de nombreuses modifications mineures dans la séquence des gènes *NDA*, ce nouveau séquençage nous a permis de confirmer les données obtenues précédemment, notamment par la publication de nouvelles EST pour les gènes *NDA*. La troisième version du séquençage comporte également un programme de prédiction de gène, mais celui-ci n'apporte pas d'information supplémentaire par rapport à celui de la version 2. Par contre, une annotation manuelle des gènes répertoriés a été effectuée par différents auteurs. Le docteur Pierre Cardol s'est notamment occupé de l'annotation des gènes *NDA* et le docteur Fuzukawa a présenté

une annotation pour le gène *NDA3* (Merchant *et al.*, 2007). Pour certaines annotations, des différences importantes sont parfois apparues entre la séquence publiée et celle obtenue au cours de ce travail. Ces différences sont dues (a) à la publication de nouvelles EST après la réalisation de l'annotation, (b) du fait des séquençages réalisés au cours de ce travail et (c) de différences dans les prédictions bioinformatiques, non vérifiables et sujettes à interprétation.

### *NDA1*

*NDA1* est présent sur le scaffold 42 de la troisième version du séquençage. La publication de nouvelles EST pour le gène *NDA1* confirme celles déjà disponibles dans la 2<sup>o</sup> version du séquençage. Étonnamment, une EST de la 2<sup>o</sup> version, positionnée en 3' du gène, a été éliminée de la troisième version du séquençage. Celle-ci a été conservée pour l'élaboration de notre modèle final.

### *NDA2*

La séquence du gène *NDA2* annotée dans la troisième version du séquençage confirme l'association des scaffolds 189 et 595 de la version 2. *NDA2* est maintenant positionné sur le scaffold 92. Cette 3<sup>o</sup> version comporte toujours des lacunes dans son séquençage, mais l'alignement de nouvelles EST confirme en grande partie le séquençage réalisé au laboratoire et nous renseigne sur la présence d'une 3'UTR de 1144 pb au lieu de 426 pb. À noter qu'une autre EST de 763 bases jouxte le gène *NDA2* du côté 3', mais son association est incertaine.

### *NDA3*

L'annotation du gène *NDA3* présente une taille et une organisation des exons qui confirme le modèle génique obtenu précédemment. Le gène *NDA3* est maintenant positionné sur le scaffold 117. H. Fuzukawa ignore le premier ATG de la séquence au profit du quatrième. Il en résulte que la 5'UTR passe de 45 à 471 pb, entraînant une diminution de la préséquence de la protéine de 151 à 9 acides aminés. En attendant une éventuelle confirmation de l'importance de cette préséquence, celle-ci est conservée dans notre modèle.

### *NDA5*

La séquence génomique du gène *NDA5* est complète dans la 3<sup>o</sup> version du séquençage et positionnée sur le scaffold 82. Cette version confirme le séquençage de la 2<sup>o</sup> région interne inconnue obtenu au laboratoire et place les 710 pb en 5 exons différents. La séquence génomique du 1<sup>o</sup> gap est désormais connue et recouvre 1063 pb. Cette région n'est toujours

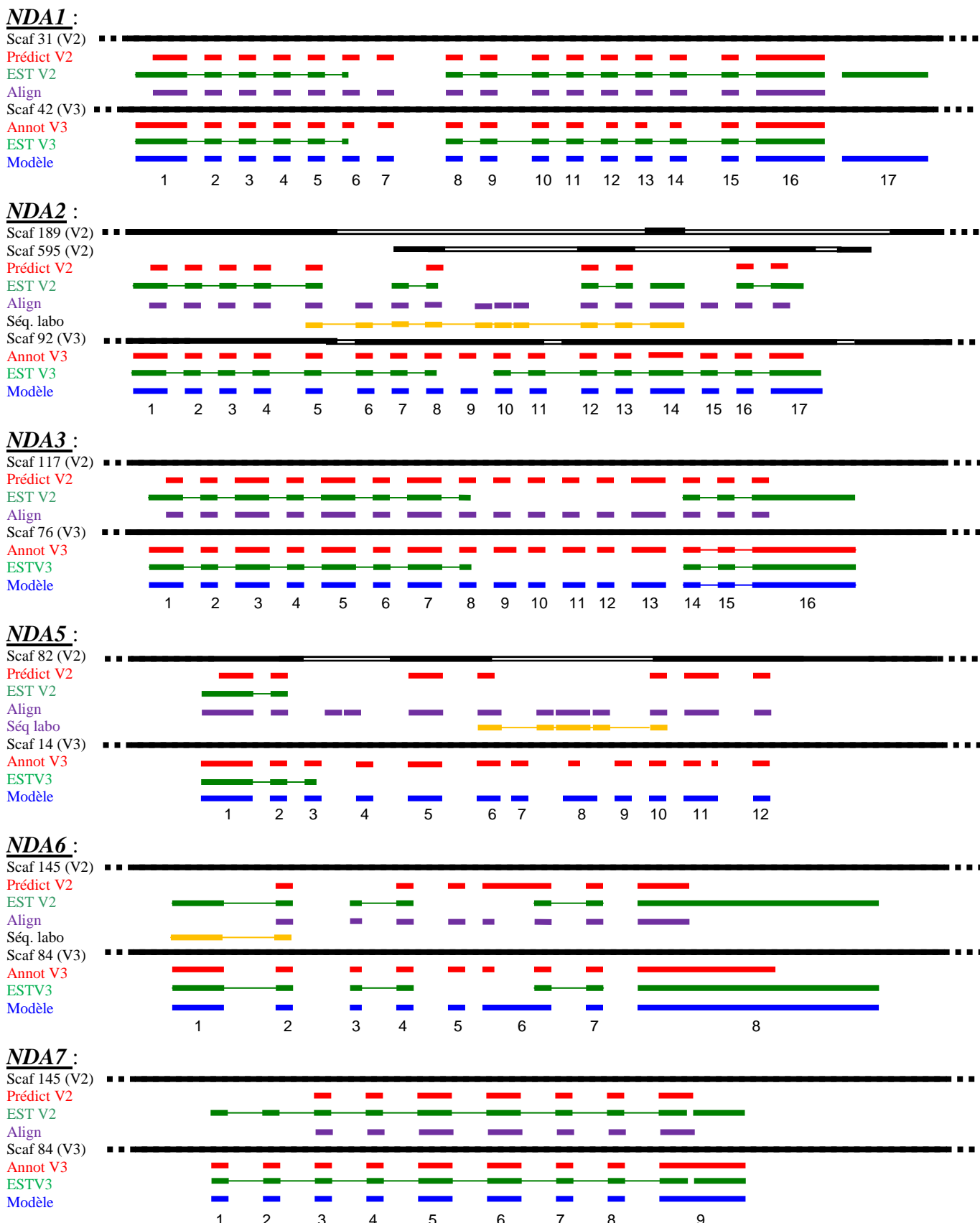
pas couverte par des EST, mais cette région de la protéine étant relativement conservée l'identification d'une séquence codante proche dans la séquence génomique est possible. Cette recherche permet de proposer l'existence probable de deux exons supplémentaires et de compléter le 2<sup>o</sup> exon existant.

#### NDA6 et 7

Ces deux derniers gènes n'ont subi que très peu de modifications avec la publication de la 3<sup>o</sup> version du séquençage. Aucune nouvelle EST n'apporte d'information supplémentaire et la séquence du scaffold 84 de la version 3 est proche de la séquence du scaffold 145 de la version 2.

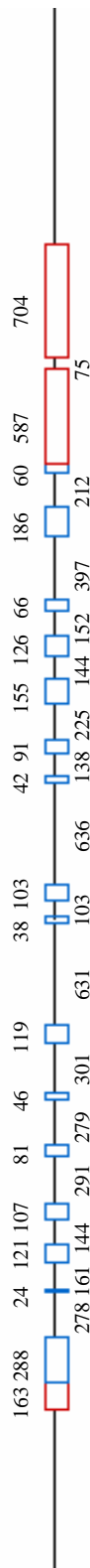
#### **10.1.6. Structure des gènes NDA**

Les différentes informations collectées ci-dessus ont amené à l'élaboration d'une cartographie complète de la famille *NDA*. Cette cartographie est évidemment sujette à modification puisqu'une partie non négligeable de celle-ci provient uniquement de prédiction bioinformatique. Cette version présente cependant la totalité des connaissances actuelles sur les séquences des gènes *NDA* et a été utilisée au cours de ce travail. Une représentation détaillée des séquences est donnée à la figure 10.8 et un alignement complet des protéines correspondantes à la figure 10.9. La figure 10.7 représente schématiquement les évolutions successives du modèle.

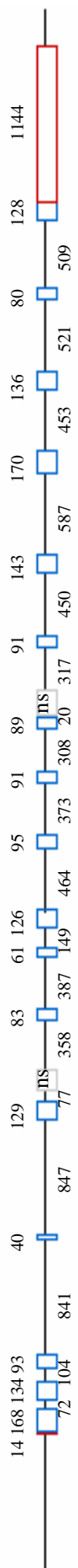


**Figure 10.7 :** Représentation schématique de l'évolution du modèle de la structure des gènes *NDA* de *Chlamydomonas*. L'alignement présente de haut en bas : (1) Le scaffold de la région génomique de la 2<sup>o</sup> version du séquençage. Les régions blanches indiquent une région interne non séquençée ; (2), la prédiction bioinformatique de la 2<sup>o</sup> version du séquençage, les blocs figurent des exons ; (3) le relevé des EST s'alignant sur cette région génomique en 2003, les traits entre les blocs indiquent que les EST présentent un recouvrement ; (4) la réalisation d'un alignement avec des protéines Ndh-II d'*Arabidopsis thaliana* ou de *Chlamydomonas* ; (5) Les séquençages obtenus au cours de ce travail ; (6) Le scaffold de la région génomique de la 3<sup>o</sup> version du séquençage. (7) L'annotation manuelle de la 3<sup>o</sup> version du séquençage ; (8) Les EST s'alignant sur cette région génomique en 2008 et (9) Le modèle utilisé au cours de ce travail, obtenu par comparaison des données disponibles.

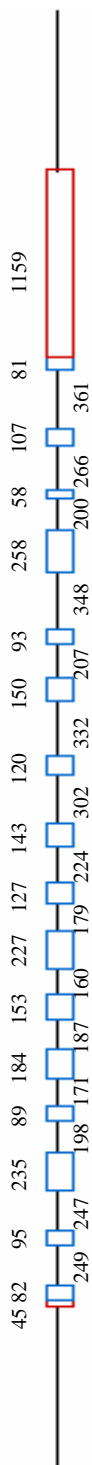
**NDA1 (cDNA: 3107 – Codant: 1653 – DNA: 7274)**



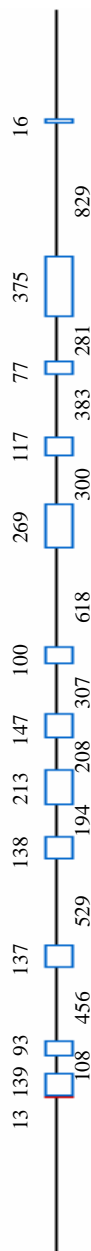
**NDA2 (cDNA: 3015 – Codant: 1857 – DNA: >9852)**



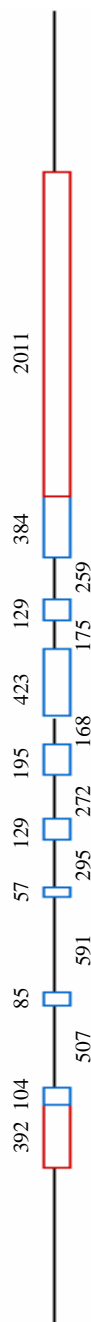
**NDA3 (cDNA: 3407 – Codant: 2202 – DNA: 7038)**



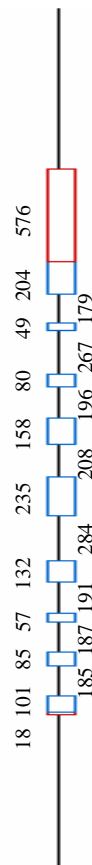
**NDA5 (cDNA: 1834 – Codant: 1821 – DNA: 6047)**



**NDA6 (cDNA: 3909 – Codant: 1506 – DNA: 6175)**



**NDA7 (cDNA: 1695 – Codant: 1101 – DNA: 3392)**



**Figure 10.8** : Représentation détaillée de la structure des gènes *NDA* de *Chlamydomonas reinhardtii*. Les exons codants sont représentés en bleu, les régions non codantes du cDNA en rouge. Le chiffre supérieur fait référence à la taille des exons, le chiffre inférieur fait référence aux introns. Les régions génomiques non séquencées de *NDA2* sont représentés par un ns. Les représentations des différents gènes sont à la même échelle.

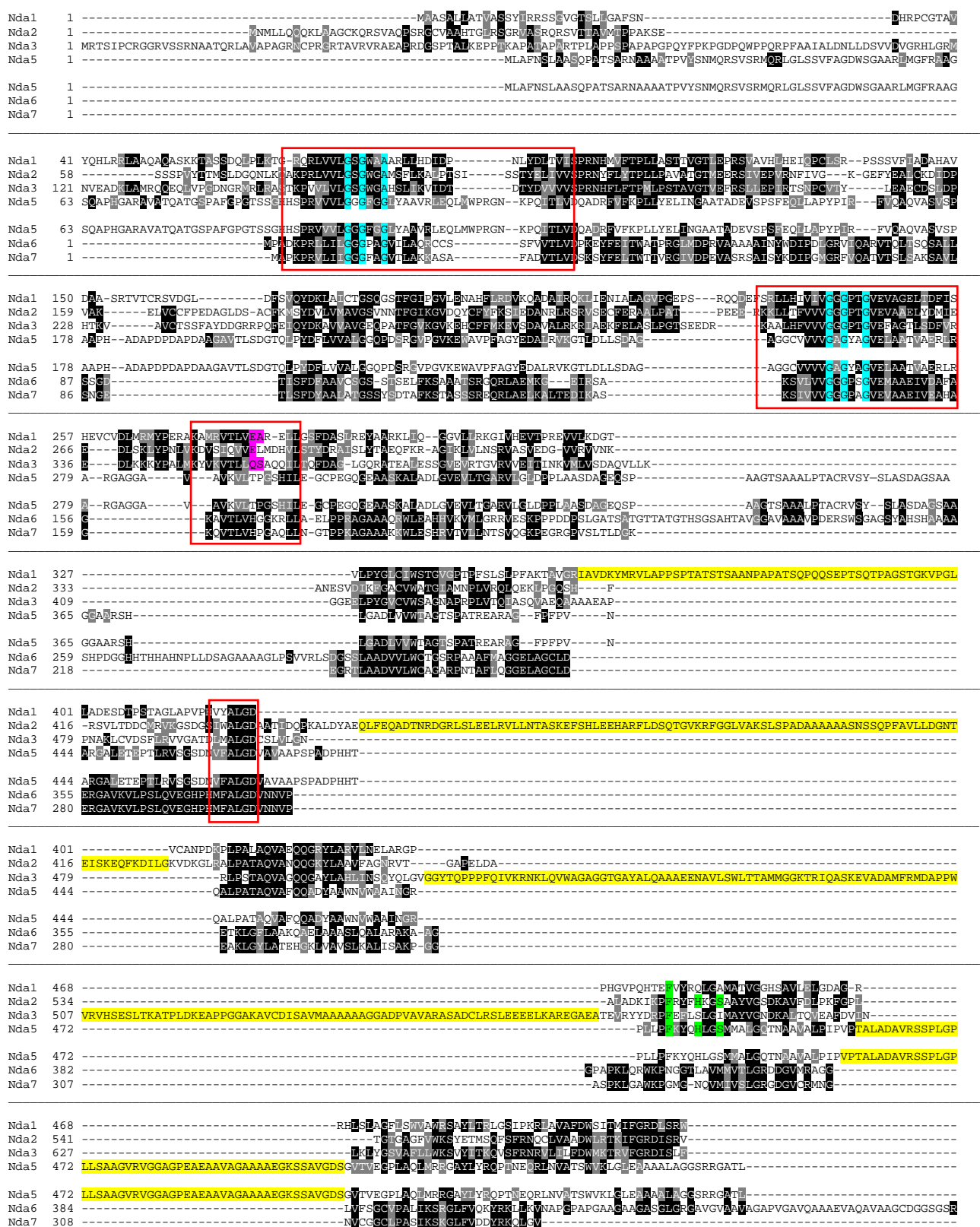


Figure 10.9 : Alignement des protéines Nda de *Chlamydomonas reinhardtii*. Les séquences des protéines Nda1, 2 et 3 présentant une bonne homologie ont été alignées ensemble. Les protéines Nda6 et 7 ont également été alignées ensemble vu leur grande similarité. La séquence de la protéine Nda5 s’alignant en partie sur le groupe Nda1-2-3 et en partie sur le groupe Nda6-7, celle-ci a été dupliquée et alignée sur les deux groupes de protéines. Seules certaines régions, encadrées en rouge, présentent une homologie pour toutes les protéines Nda de *Chlamydomonas*. Les motifs de fixation de dinucléotides sont surlignés en bleu. Les motifs de spécificité sont surlignés en mauve. Les régions surnuméraires, potentiellement impliquées dans la liaison du calcium dans le cas de Nda2 sont surlignées en jaune. Les motifs potentiellement impliqués dans la fixation des quinones sont surlignés en vert.



## 10.2. Analyse des séquences complètes des séquences obtenues

### 10.2.1. Analyse des séquences des gènes NDA

A l'inverse des gènes *NDH-II* de plantes supérieures, les gènes *NDA* de *Chlamydomonas* ne semblent pas organisés suivant une structure conservée. La représentation détaillée des gènes *NDA* de la figure 10.8 montre bien le manque de corrélation entre les tailles des exons et introns composant les différents gènes. La seule exception notable est observée pour les 4 premiers exons des gènes *NDA6* et 7 présentant une taille identique ou très proche.

On peut également observer une différence au niveau du nombre d'exons, les gènes *NDA1*, 2 et 3 s'organisant en 16-17 exons et les gènes *NDA6* et 7 en 8 et 9 exons. *NDA5* présente une organisation en 12 exons.

Les régions non traduites situées en 5' sont relativement courtes. Pour tous les gènes *NDA*, ces régions ont été prédites par alignement d'EST et confirmées expérimentalement dans le cas de *NDA6*. Il n'a cependant pas été possible de déterminer avec précision la présence de motif caractéristique de promoteur de *Chlamydomonas* (A savoir un motif TATA, une trentaine de bases avant le point de départ de la transcription, suivi d'une région riche en GC, Silflow, 1998). Ces motifs étaient soit absents, soit présents en plusieurs exemplaires dans la région génomique en amont du gène. Il faut cependant ajouter que ces motifs ne sont pas présents dans la totalité des gènes de *Chlamydomonas*.

Les régions non traduites situées en 3' présentent une taille plus importante allant de 0,5 à 2 kb, à l'exception de *NDA5* où elle n'a pu être déterminée par manque d'EST disponible. Des sites de polyadénylation proches du consensus proposé par Silflow (*TGTAA*) ont pu être identifiés en fin de séquence pour chaque gène *NDA*, y compris au niveau du gène *NDA5* où un motif *TGTAA* est présent au niveau du codon STOP (voir figure 10.10). La taille globale des gènes se situe aux alentours de 6 à 7 kb, à l'exception des gènes *NDA2* et *NDA7*, présentant respectivement une taille d'au moins 10 kb et de 3392 pb (voir figure 10.8).

<i>NDA1</i>	AGGGGGGGCGGTTCGTCCTCAAGGGGGTCCCGGGGATTTCGGGGCATGGGGTCTGGCACTT	TGTTCCGACCCCCCTGTCACCCC
<i>NDA2</i>	TGACGCCCATACCCAGCAGTGGCTAGGTGAAGGAGCCTGGCGGCGGAGGCACAGCTGCGCCTGACATA	AGTAAACGCTGC
<i>NDA3</i>	CATGCGCACGCATGGCGGCCGTTGCGGAGCCAGACAACATGCACCTGCTGTGGCGCTCTTG	TGTAAATAATATCGTGCTGCTGACA
<i>NDA5</i>	CGGCTGGTACGCCAGCAAGCCCTTCACACCTGCACCCCGCCTAAGAGCTGCCACCCGGACAG	AGGAGCTACGC
<i>NDA6</i>	TCTCGCGGGCATTGCCGGGTTCGATTTCGGACGGGCACCGCCGCTATGCGTCCGGCCGCTCCCGC	TGTCAAGTACAAGCACAGCAGGCA
<i>NDA7</i>	GTGTTGCGCAGTGGGGTTCGGGACCGGCACTTGCTCGAGTCCGCTGCGGGCTCAGCC	TGTAAACTACGGTACCGCGCA

**Figure 10.10** : Représentation des 80 dernières bases des gènes *NDA* de *Chlamydomonas*. Les régions surlignées en jaune sont des 3'UTR, la région surlignée en vert est une région codante. Les motifs surlignés en rouge sont proches du motif de polyadénylation proposé par Silflow (1998).

Les régions correspondant aux frontières introns/exons des gènes *NDA* sont dans leur grande majorité proches des séquences consensus proposés Silflow [(C/A)(A/C)G : GTG(A/C)G] et [(G/A)CAG : (G/A)] (Silflow, 1998). Il en est de même pour la région entourant la méthionine initiale, à l'exception du gène *NDA5* où la deuxième méthionine de la séquence présente un motif beaucoup plus proche du consensus [(A/C)A(A/C)(A/C)ATG(G/C)C(G/C)] que le premier site. L'utilisation de cette seconde méthionine comme codon initial diminuerait la préséquence de 28 acides aminés sans modifier pour autant les régions conservées de la protéine.

### **10.2.2. Analyse de la structure protéique**

L'alignement des séquences des protéines Nda présenté à la figure 10.9 met en évidence une série de motifs conservés. De ce point de vue, les protéines Nda1, 2 et 3 semblent être phylogénétiquement proches, une partie importante de leurs séquences présentant une homologie. Par ailleurs, les protéines Nda6 et 7 sont également très proches, Nda7 présentant une identité de séquence de 57% par rapport à Nda6 et une homologie de 71,5%. La protéine Nda5 semble tenir une position intermédiaire. Cette dernière présente une homologie avec une grande partie de la séquence du groupe Nda1-2-3, mais s'aligne mieux en certaines régions sur le groupe Nda6-7.

#### Analyse des domaines internes conservés

Il apparaît que peu de domaines sont conservés au niveau de toutes les protéines Nda de *Chlamydomonas*.

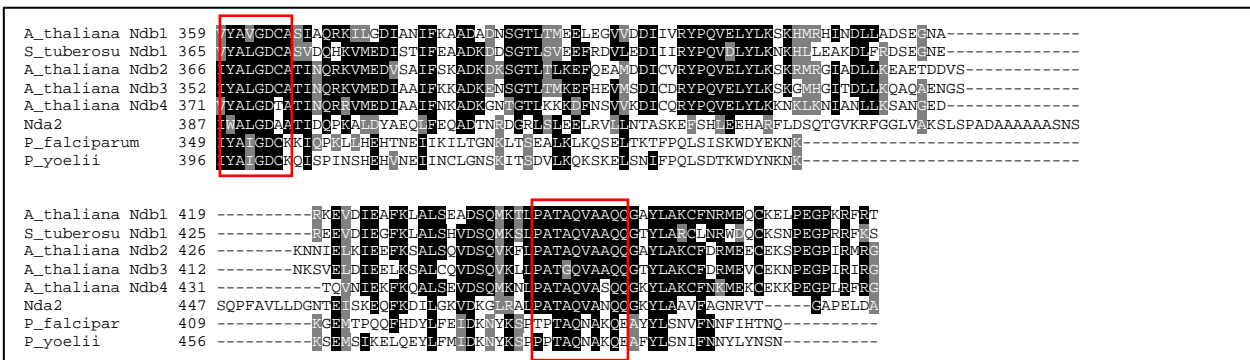
Deux de ces domaines participeraient à la fixation de dinucléotide, caractéristique des NAD(P)H déshydrogénases (voir introduction, point 3.5, page 20). Ces motifs GxGxx(G/A) sont surlignés en bleu dans la figure 10.9.

Un autre motif conservé serait impliqué dans la spécificité des protéines Ndh-II envers le NADH et le NADPH. Cette spécificité peut apparemment être déterminée par un motif présent dans le deuxième feuillet  $\beta$  du 2<sup>o</sup> domaine conservé (EA ou DV pour une spécificité au NADH, QS pour une spécificité au NADPH) (Michalecka *et al.*, 2004 ; Bernard *et al.*, 2006 ; Desplats *et al.*, 2007). Ces motifs ont été surlignés en mauve dans l'alignement de la figure 10.9. L'existence de ce motif suggère que la protéine Nda1 serait spécifique au NADH tandis que la protéine Nda3 serait spécifique au NADPH. Le motif de la protéine Nda2 (EL) ne concorde pas totalement avec celui identifié chez les Ndh-II de plantes supérieures, de levures et de bactéries, mais suggère une spécificité au NADH. Par contre, ce motif, bien que

dans un environnement relativement conservé, est différent pour les protéines Nda5 (TP), 6 (HG) et 7 (HP). L'absence de ce motif suggèrerait donc une appartenance des protéines Nda5, 6 et 7 à une autre famille phylogénétique.

Le quatrième et dernier motif conservé présente un motif « ALGD » qui n'est actuellement pas associé à une fonction biochimique précise. Cependant, chez plusieurs espèces, dont *A. thaliana*, *S. tuberosum*, *P. falciparum* et *P. yoelli*, ce motif est toujours positionné directement en amont de la région interne impliquée dans la liaison du calcium, dit motif en EF-Hand. Chez ces espèces, ce Ef-Hand est toujours suivi d'un motif « PATAQVA ». que l'on retrouve également chez les protéines Nda1, 2, 3 et 5 (voir figure 10.11).

Seule la protéine Nda2 semble posséder un motif de fixation du calcium entre les deux régions conservées ALGD et PATAQVA (voir figure 10.9). Cette région, bien que faiblement conservée par rapport au EF-Hand des plantes supérieures ou de levure (voir figure 10.11), a jusqu'à présent toujours été le signe d'une liaison du calcium chez les différentes protéines analysées.



**Figure 10.11 :** Extrait d'alignement des protéines Ndb1, 2, 3 et 4 d'*A. thaliana*, de la protéine Ndb1 de *S. tuberosum*, de la protéine Nda2 de *Chlamydomonas* et des protéines Nda de *P. falciparum* et *P. yoelli*. Les motifs « ALGD » et « PATAQVA » ont été entourés en rouge.

Il faut cependant noter que les protéines Nda1, 3 et 5 présenteraient chacune une région interne ne s'alignant pas sur les autres protéines. Celles-ci sont surlignées en jaune dans l'alignement de la figure 10.9. La réalisation d'alignements de séquence montre que ces régions internes s'alignent cependant mal sur les EF-Hand d'autres espèces. La fonction de ces régions est actuellement inconnue.

Enfin, parallèlement au site de fixation de dinucléotide, nous avons recherché un motif potentiellement impliqué dans la deuxième fonction enzymatique des protéines Nda : la fixation des quinones. La littérature contient peu d'informations à ce sujet, mais en 2000, Fisher et Rich ont proposé l'existence d'un motif FxxxHxxS présent chez plusieurs protéines

interagissant avec des quinones (Fisher et Rich, 2000). Un tel motif peut être retrouvé pour les protéines Nda2 et 5 (voir figure 10.9). Cette région est également conservée pour les protéines Nda1 et 3, mais sans conservation du motif complet.

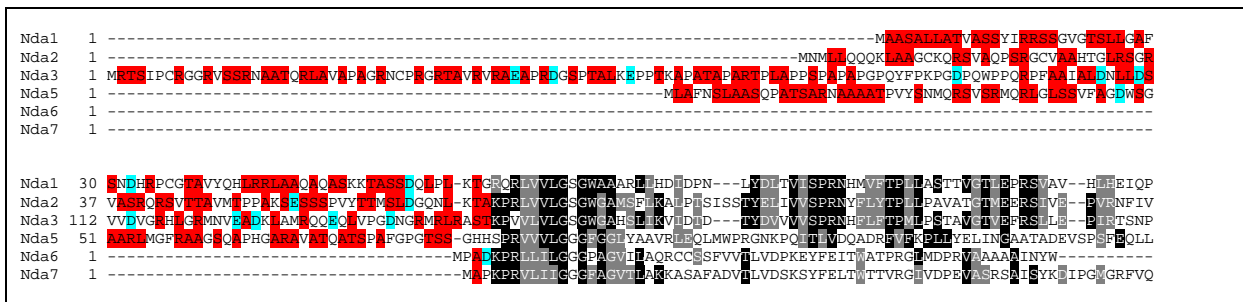
#### Analyse de la région N-terminale

Les signaux d'adressages des protéines mitochondriales synthétisées dans le cytoplasme sont de deux types : une préséquence d'adressage N-terminale clivable formant une hélice amphipathique dans le cas des protéines hydrophiles matricielles et des signaux internes d'adressages distribués tout le long de la séquence peptidique chez la plupart des protéines hydrophobes de la membrane interne de la mitochondrie (Chacinska *et al*, 2002). Chez les végétaux, certaines protéines de la membrane interne mitochondriale cumulent préséquence N-terminale et signaux internes (Lister *et al*, 2003). Si la nature des signaux internes d'adressage reste inconnue (Chacinska *et al*, 2002), on connaît bien les caractéristiques des peptides de transit N-terminaux chez les plantes. D'une longueur comprise entre 20 et 80 acides aminés, ils sont riches en leucine, sérine, thréonine, alanine et arginine, mais généralement pauvres en acides aminés chargés négativement (aspartate et glutamate). La plupart des peptides de transit peuvent potentiellement former une hélice  $\alpha$  amphipathique où les résidus chargés et les résidus hydrophobes sont distribués sur les faces opposées de l'hélice. Des résidus arginine sont souvent rencontrés en position -10 et -2 (ou plus rarement en positions -11 et -3) en amont du site de clivage (von Heijne *et al*, 1989 ; Chaumont et Boutry 1995, Whelan et Glaser 1997). Le site de clivage arginine-X-tyrosine ↓ (sérine/thréonine) est relativement conservé pour les préséquences ayant une arginine à la position -3 (Chaumont et Boutry 1995).

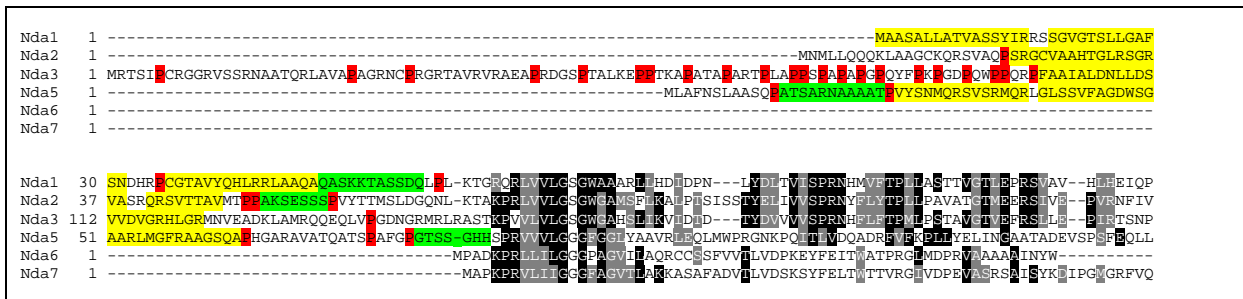
A l'inverse, les signaux d'adressages chloroplastiques montrent une grande diversité et sont moins bien connus. D'une taille de 30 à 100 AA, ils ne présentent pas de séquence consensus, et n'ont apparemment pas de structure secondaire caractéristique. Ils présentent une relative richesse en sérine et thréonine, et une déficience en aspartate et glutamate (Cline 2000).

En fonction de ces informations, les séquences N-terminales des protéines Nda ont été analysées pour déterminer la présence d'un peptide de transit. Tout d'abord, la richesse relative en acides aminés spécifiques des peptides de transit mitochondriaux ou chloroplastiques de ces séquences a été déterminée. La richesse en acides aminés leucine, sérine, thréonine, alanine et arginine des séquences des protéines Nda1, à 5 est évidente (Voir figure 10.12 page suivante). Cette richesse est de plus associée à une relative pauvreté en

acides aminés chargés négativement. L'utilisation du programme de prédiction Pepwheel (<http://bioinfo.nhri.org.tw/cgi-bin/emboss/pepwheel>) a également permis d'identifier plusieurs segments des protéines Nda1, Nda2, Nda5 et dans une moindre mesure Nda3 qui semblent capables de former une ou plusieurs hélices  $\alpha$  amphipatiques représentées en jaune à la figure 10.13. Dans le cas de Nda1, 2 et 5, ces régions sont suivies par une région pouvant former une hélice hydrophile (représentée en vert) localisée entre 10 et 25 acides aminés en amont du premier domaine. Bien que plusieurs arginines soient présentes dans la séquence des protéines Nda1 à Nda5, il est difficile de déterminer avec précision la localisation du site de clivage.

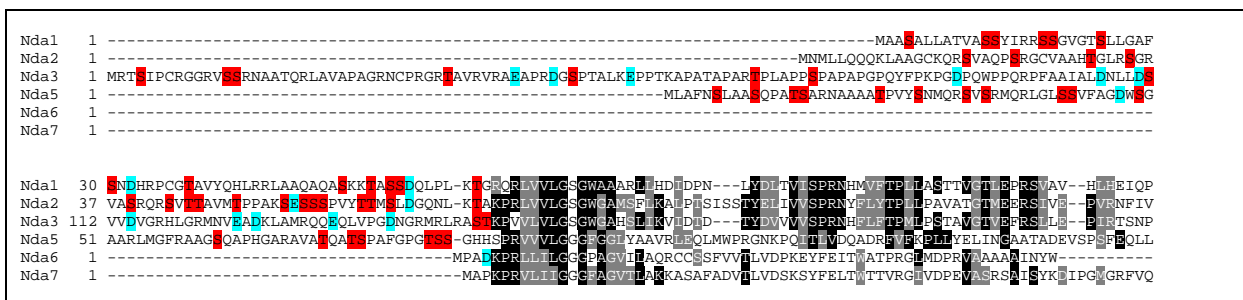


**Figure 10.12:** Alignement de la région N-terminale des protéines Nda de *Chlamydomonas*. Les acides aminés leucine, sérine, thréonine, alanine et arginine ont été surlignés en rouge. Les acides aminés aspartate et glutamate ont été surlignés en bleu.



**Figure 10.13 :** Alignement de la région N-terminale des protéines Nda de *Chlamydomonas*. Les régions pouvant former des hélices  $\alpha$  amphipatiques ont été surlignées en jaune. Les régions pouvant former une hélice  $\alpha$  hydrophile ont été surlignées en vert.

En contrepartie, la richesse en acides aminés sérine et thréonine est moins évidente comme le montre la figure 10.14. Seule la protéine Nda2 présente une région sensiblement plus riche en ces acides aminés, au niveau des 35 acides aminés directement en amont du premier domaine conservé.



**Figure 10.14 :** Alignement de la région N-terminale des protéines Nda de *Chlamydomonas*. Les acides aminés sérine et thréonine ont été surlignés en rouge. Les acides aminés aspartate et glutamate ont été surlignés en bleu.

Les différentes informations collectées ont été rassemblées dans le tableau 10.1.

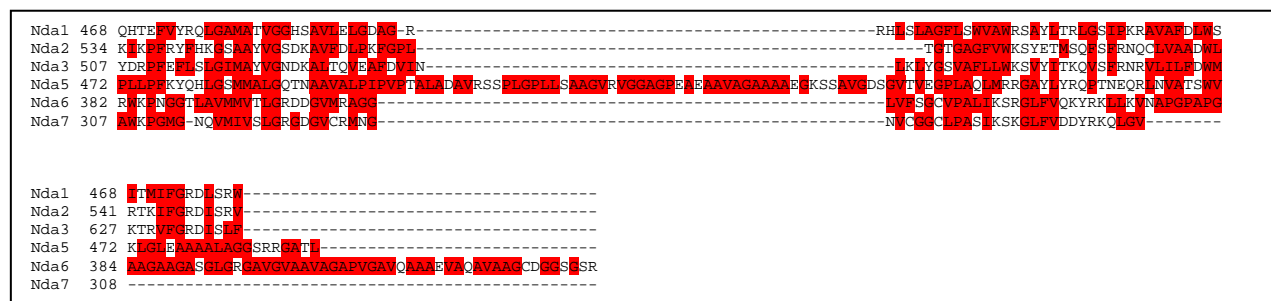
	<u>Mito</u>	<u>Chloro</u>	Région précédant le premier domaine conservé					
			<u>NDA1</u>	<u>NDA2</u>	<u>NDA3</u>	<u>NDA5</u>	<u>NDA6</u>	<u>NDA7</u>
Taille et position du peptide de transit	20 - 80 AA N-terminale	30 - 100 AA Variable	69	76	149	89	4	3
Présence d'une hélice amphipatique	oui	non	oui	oui	oui	oui	-	-
Richesse en AA	S T A R L	S T	STARL 40/69 ST 14/69	STARL 37/76 ST 17/76	STARL 64/149 ST 10/149	STARL 50/89 ST 18/89	STARL 1/4 ST 0/4	STARL 1/3 ST 0/3
AA déficient	D E	D E	2/69	2/76	11/149	1/89	1/4	0/3

**Tableau 10.1 :** Caractéristiques des NAD(P)H déshydrogénases de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Ces données suggèrent la présence d'un peptide de transit mitochondrial pour les protéines Nda1 à 5. A noter que ces analyses ont également été effectuées sur la région interne des protéines Nda6 et 7, mais que ces séquences ne présentent aucune richesse ou carence particulière.

### Analyse de la région C-terminale

La littérature nous renseigne que la région C-terminale de la protéine pourrait servir d'ancrage de la protéine dans la double couche lipidique (voir introduction, point 3.5). La région impliquée pourrait être caractérisée par une composition en acide aminé hydrophobe supérieure à la normale. La figure 10.15 donne un aperçu de l'hydrophobicité des régions C-terminales des protéines Nda en surlignant les acides aminés hydrophobes. Il semble évident que cette région présente une hydrophobicité importante, suggérant ainsi une implication dans l'ancrage de la protéine.



**Figure 10.15 :** Extrait d'alignement des régions C-terminales des protéines Nda de *Chlamydomonas reinhardtii*. Les acides aminés hydrophobes ont été surlignés en rouge.

### **10.3. Analyse phylogénétique**

L'arbre phylogénétique proposé par Bernard *et al.* (2006) (voir page 15) propose un alignement des protéines Nda1 et 2 de *Chlamydomonas* dans la famille eucaryotique et place la protéine Nda5 dans la famille procaryotique C.

Pour préciser ces résultats et positionner les autres protéines Nda de *Chlamydomonas*, nous avons entrepris la réalisation d'un arbre phylogénétique. Nous avons tout d'abord recherché dans la banque de données du « National Center for Biotechnology Information (USA) » (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) toutes les séquences des protéines renseignées dans la littérature comme correspondant à des NAD(P)H déshydrogénases de type II. Ces données proviennent principalement des deux articles Bernard *et al.*, (2006) et Michalecka *et al.*, (2003). Une fois ces 72 séquences centralisées, nous les avons introduites dans un programme d'alignement multiple.

Nous avons d'abord utilisé le programme « ClustalW » (<http://clustalw.genome.jp/>) précédemment utilisé par Bernard *et al.* (2006) et Michalecka *et al.* (2003). L'utilisation de ce programme a permis de confirmer le positionnement de la protéine Nda1 et 2 dans la famille eucaryotique, ainsi que la protéine Nda3. Nous avons également confirmé la position de la protéine Nda5 dans la famille procaryotique C correspondant à la famille NDC de Michalecka *et al.* (2003). Ce programme a été utilisé pour positionner la protéine Nda2 dans la famille NDB, telle que présenté à la 3<sup>e</sup> figure des « supplemental data » de Jans *et al.*, 2008 (voir figure 10.16-A) et la protéine Nda1 dans la famille NDA de Michalecka *et al.*

Ce programme ne nous a cependant pas permis de positionner de manière définitive les protéines Nda3, 6 et 7. En effet, en fonction des paramètres utilisés, les positions de ces trois protéines présentent des variations du fait de certaines imperfections du programme. Ce programme travaille par comparaison des séquences deux par deux à partir d'une séquence témoin. Ainsi, la modification de la séquence témoin modifie l'alignement obtenu. De plus, l'alignement des séquences deux par deux exclut la recherche de motif conservé et place chaque élément de la séquence sur un pied d'égalité.

Nous avons alors utilisé le programme « MAFFT6 » (<http://align.bmr.kyushu-u.ac.jp/mafft/online/server/>). Ce programme travaille par alignement successif de chacune des séquences de l'alignement avec les autres entrées. Cette opération est répétée un nombre important de fois (1000 dans notre cas) afin d'identifier les sites conservés et de s'appuyer dessus pour affiner l'alignement. Dans notre cas, 74 domaines conservés ont été identifiés par le programme. Nous avons par ailleurs demandé au programme un alignement de type « Neighbor Joining » selon un modèle de substitution « Jones Taylor Thornton », c'est-à-dire

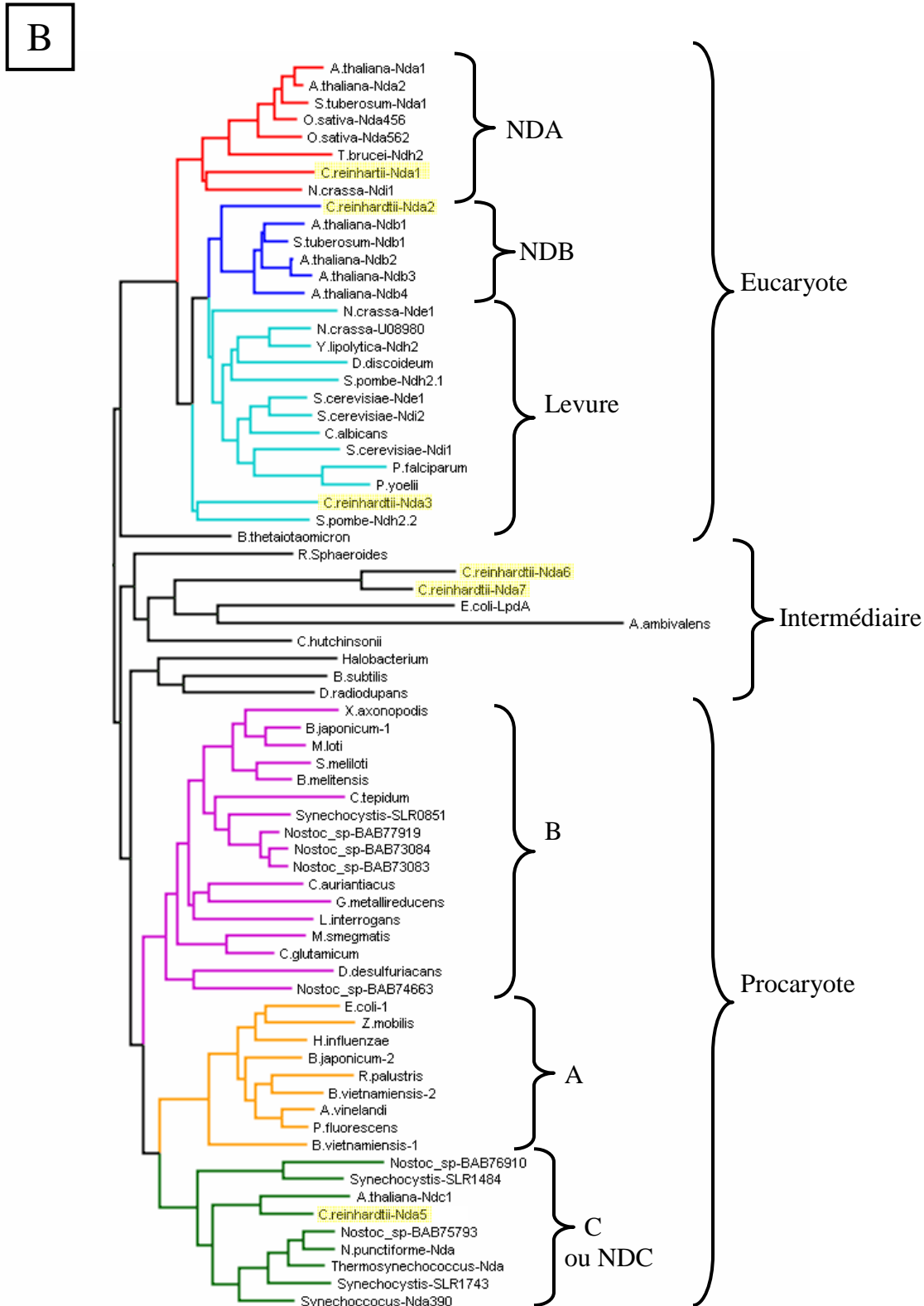
que le programme devait différencier les séquences selon le nombre de mutations à introduire pour passer d'une à l'autre. Après obtention de l'alignement, l'arbre a finalement été modélisé par utilisation du programme « Treeview » (<http://taxonomy.zoology.gla.ac.uk/rod/treeview.html>). L'arbre obtenu est également présenté à la figure 10.16-B.

Les deux arbres présentés respectent bien l'existence des deux familles phylogénétiques eucaryotes NDA et NDB proposées par Michalecka *et al.*(2003). Ces deux familles sont positionnées dans un clade comprenant des protéines de plantes supérieures et de levures. La plupart des séquences de levures ne se positionnent pas dans les deux familles NDA ou NDB à l'exception des protéines Ndh2 de *T. brucei* et de la protéine Ndi1 de *N. crassa* qui sont classées dans la famille NDA. En ce qui concerne les protéines Nda1, 2 et 3 de *Chlamydomonas*, notre second arbre positionne la protéine Nda1 dans la famille NDA et la protéine Nda2 dans la famille NDB. La protéine Nda3 est quant à elle positionnée dans le clade eucaryote, mais à l'extérieur des familles NDA et NDB.

Les trois familles procaryotes A, B et C proposées par Bernard *et al.* (2006, voir page 15) ont également été produites par notre second arbre (figure 10.16-B). La famille C comprend comme attendu des séquences de protéines Ndh-II de cyanobactéries et la protéine Ndc d'*Arabidopsis thaliana*. D'autres séquences de protéines de cyanobactérie se retrouvent également dans la famille procaryote B, mais aucune dans la famille A. La protéine Nda5 de *Chlamydomonas* se situe dans la famille procaryote C. Ce positionnement confirme son origine cyanobactérienne, ce qui en fait une bonne candidate pour une localisation chloroplastique.

Plusieurs protéines Ndh-II de bactéries n'ont pas été classées dans le clade procaryote. De part leur localisation dans l'arbre, ces protéines seraient « intermédiaires » entre le clade procaryote et le clade eucaryote. Notons toutefois que nous n'avons pas donné de racine à l'arbre proposé à la figure 10.16-B. Celui-ci ne renseigne pas sur l'évolution dans le temps des protéines Ndh-II, mais uniquement sur leur classification en tant que famille. En d'autres mots, il n'est pas certain que ces protéines non classées soient antérieures dans le temps, mais qu'elles sont les plus proches parentes entre les deux clades procaryotes et eucaryotes. L'arbre réalisé avec le programme « MATTF » positionne les protéines Nda6 et 7 dans ce clade intermédiaire entre les clades eucaryote et procaryote.

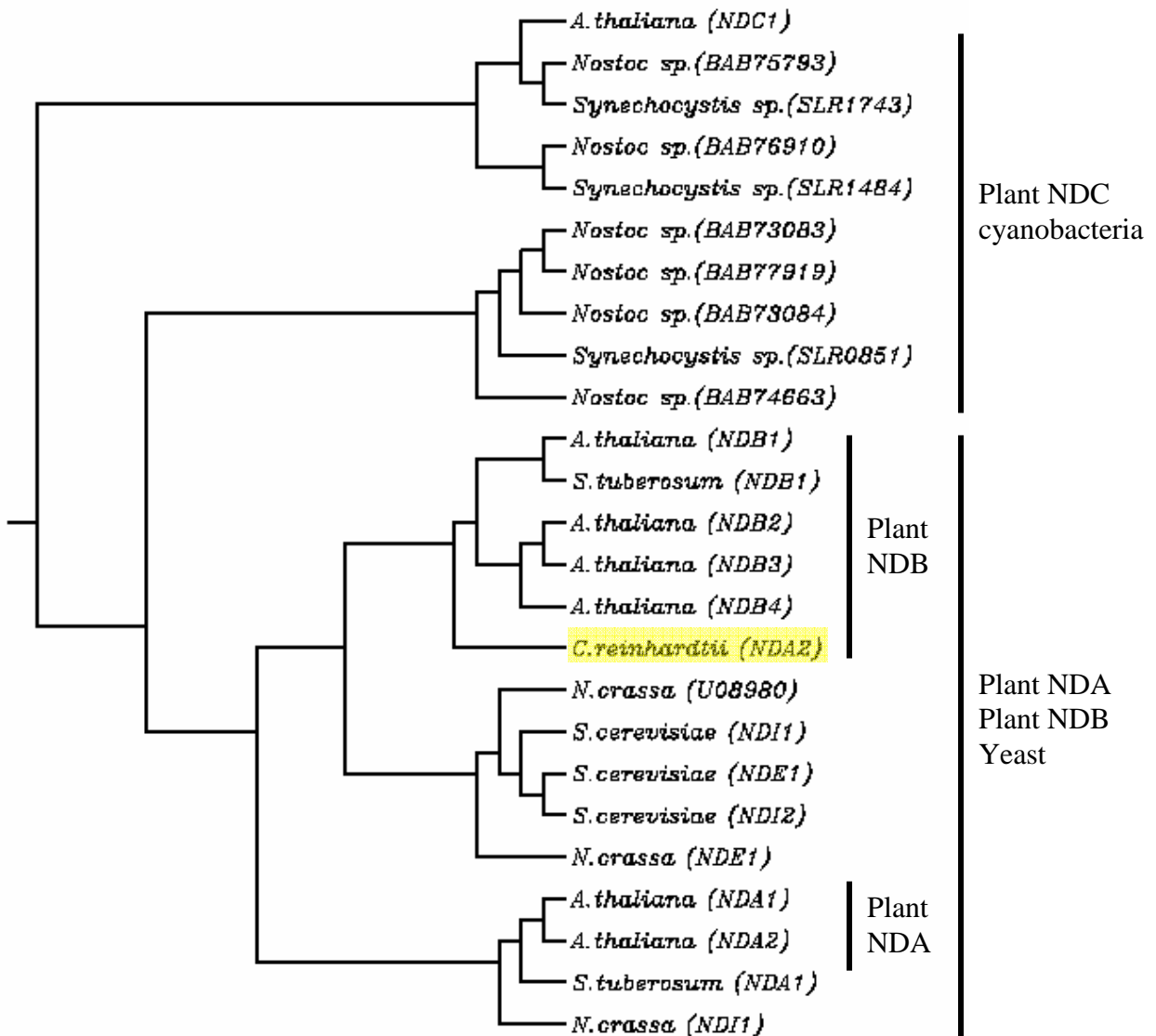




**Figure 10.16 :** A : Arbre phylogénétique réalisé avec le programme « ClustalW » présenté dans Jans *et al.*, 2008. B : Arbre phylogénétique réalisé avec le programme « MAFFT ». Les familles phylogénétiques proposées par Michalecka *et al.*, (2003) et Bernard *et al.*, (2006) ont été indiquées.

**Légende.** *A.thaliana* Nda1 (NP\_563783), Nda2 (NP\_180560), Ndb1 (NP\_567801), Ndb2 (NP\_567283), Ndb3 (193880), Ndb4 (179673), Ndc (NP\_568205); *S.tuberosum* Nda1 (CAB\_522796) Ndb1 (CAB\_52797); *O.sativa* Nda456 (NP\_001044694), Nda562 (NP\_001060003); *D.dictyostelium* (AAO\_51590); *P.falciparum* (CAD\_51833); *P.yoelli* (EAA\_22988); *Synechocystis* SLR1743 (NP\_441103), SLR1484 (NP\_442910), SLR0851 (NP\_441107); *Thermosynechococcus* (BAC08688); *N.punctiforme* (ZP\_00112108.1);

A



**Légende** (suite) : *S.cerevisiae* Nde1 (AAT92804), Nde2 (NP\_013865), Ndi1 (NP\_010198) ; *N.crassa* Nde1 (XP\_961885), U08980 (XP\_959008), Ndi1 (XP\_956666) ; *S.pombe* Ndh1 (CAB16382), Ndh2 (CAA17043) ; *Y.lipolytica* (XP\_505856) ; *C.albicans* (CAB\_77710) ; *E.coli* 1 (ZP\_03047352), Lpda (ZP\_03028152) ; *R.sphaeroides* (YP\_355218) ; *B.melitensis* (AAL\_54028) ; *S.meliloti* (CAC\_46658) ; *L.interrogans* (AAN\_51595) ; *G.metallireducens* (YP\_385981) ; *C.auriantiacus* (YP\_001636932) ; *B.thetaiotaomicron* (AAO\_76644) ; *C.hutchinsonii* (YP\_676882) ; *A.ambivalens* (CAD\_33806) ; *C.tepidum* (CAD\_56382) ; *X.Axonopodis* (AAM\_38664) ; *M.loti* (NP\_102176) ; *B.japonicum* 1 (NP\_767691), 2 (NP\_770367) ; *C.glutamicum* (CAB\_41413) ; *M.smegmatis* (AAC\_46302) ; *D.aculfuriacans* (YP\_387138) ; *B.vietnamiensis* 1 (YP\_001116342), 2 (YP\_001116694) ; *Z.mobilis* (AAD56918) ; *H.influenzae* (NP\_438906) ; *A.vinelandi* (AAK\_19737) ; *P.fluorescens* (AAF\_97237) ; *R.palustris* (NP\_946455) ; *Halobacterium* (NP\_279851) ; *B.subtilis* (NP\_389111) ; *D.radiodurans* (NP\_294674).

## **10.4. Etude d'expression des NAD(P)H déshydrogénases de type II**

Chez *Arabidopsis thaliana* et *Solanum tuberosum*, il a été démontré que les gènes encodant des déshydrogénases de type II présentaient des régulations différentes, y compris à l'intérieur d'une même famille phylogénétique (Clifton *et al.*, 2005, Elhafez *et al.*, 2006). Par ailleurs, l'expression du gène *NDA3* d'*Arabidopsis* n'a jamais pu être mise en évidence. Après avoir déterminé la séquence complète des gènes *NDA* de *Chlamydomonas* et avoir proposé une classification phylogénétique de ceux-ci, l'étape suivante de notre travail a été d'étudier l'expression de ces gènes.

Ces études ont notamment été réalisées dans le but d'identifier les candidats les plus intéressants pour de futures manipulations génétiques.

### **10.4.1. Profil d'expression par Northern blotting**

#### Réalisation des sondes

Pour étudier l'expression des différents gènes par la technique de Northern blotting, plusieurs sondes spécifiques ont été produites et marquées à la digoxigénine. Pour les gènes *NDA2*, *NDA5* et *NDA6*, des fragments internes de ces gènes ont déjà été obtenus par PCR sur une banque de cDNA ou par 5'RACE lors d'une étape précédente du travail (c.f. point 10.1.3 et 10.1.4, pages 58 à 62). Ces fragments ont été amplifiés en utilisant les couples d'amorces *nda2-1F/nda2-2R* ; *nda5-3F/nda5-4R* et *nda6-3R/nda6-4F*. Dans le cas de *NDA1* et *NDA3*, des amorces spécifiques ont été synthétisées afin d'amplifier l'un des exons de ces gènes. Les amorces spécifiques *nda1-1F/nda1-2R* permettent l'amplification du premier exon du gène *NDA1* tandis que les amorces *nda3-1F*, *nda3-2R* permettent l'amplification du 7<sup>o</sup> exon de *NDA3*. Dans le cas de *NDA7*, des amorces spécifiques ont été déterminées pour permettre l'amplification par PCR du 5<sup>o</sup> exon de ce gène (*nda7-7F* et *nda7-8R*). L'amplification de ce fragment a cette fois été réalisée sur un extrait d'ADN total de *Chlamydomonas*, l'amplification sur banque de cDNA n'ayant fourni aucun résultat.

Ces différents fragments ont été clonés dans le vecteur pGEM, puis introduits chez *E. coli* par transformation. Après vérification par séquençage, les différentes sondes ont été obtenues par amplification PCR à partir de ces plasmides en utilisant les amorces précitées.

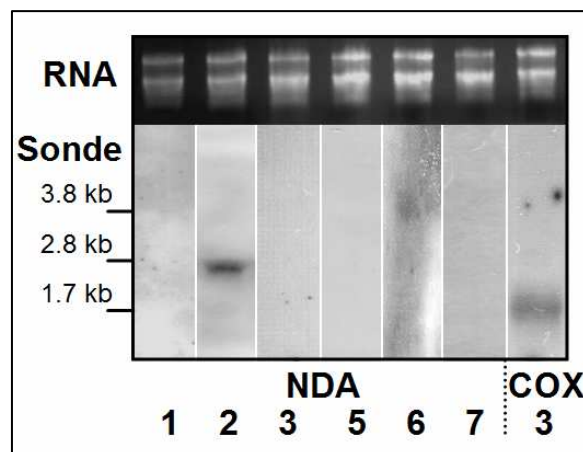
#### Visualisation de l'expression

Des RNA totaux ont été extraits d'une culture de 48h de la souche sauvage « 2 » cultivée en milieu TAP. Après extraction, la concentration des extraits a été déterminée par spectrophotométrie et leur qualité a été estimée par migration sur gel d'agarose. 10 µg d'échantillons ont ensuite été séparés par électrophorèse sur un gel d'agarose comprenant du

formaldéhyde. A cette étape, l'égalité des chargements a été contrôlée, tel que représenté à la figure 10.17. Après transfert des RNA sur une membrane de nylon, celle-ci a été hybridée avec les différentes sondes marquées à la digoxigénine correspondant aux six déshydrogénases.

En ce qui concerne les hybridations avec les sondes de *NDA1* – *NDA3* – *NDA5* et *NDA7*, aucun signal n'a été obtenu, même après un temps d'exposition prolongé. L'expérience a été renouvelée en déposant cette fois 25 µg de matériel, sans succès.

Nous avons cependant obtenu un signal pour les deux hybridations avec les sondes *NDA2* et *NDA6* (voir figure 10.17). La membrane hybridée avec la sonde *NDA2* donne un signal net d'une taille estimée entre 2800 et 3000 pb. Cette taille est en bonne corrélation avec la taille supposée du gène, soit 3015 pb (voir figure 10.8, page 66). L'expression du gène *NDA6* est très faible mais présente sur la membrane hybridée avec cette sonde. Cette bande apparaît sur la membrane après un temps d'exposition assez long, aux environs de 3800 à 3900 pb. Cette taille est également en bonne corrélation avec la taille supposée (3909 pb, voir page 66).



**Figure 10.17** RNA : Migration en gel d'agarose des RNA extraits d'une culture de 48h de la souche 2 cultivée en milieu TAP. Les 2 bandes fortement marquées sont dues aux rRNA. **Sonde** : Signaux obtenus après hybridations avec les sondes *NDA1* à *NDA7*. Les tailles des RNA ont été estimées avec un RNA Ladder (Gibco BRL, USA). Un témoin a été réalisé avec une sonde pour le gène *COX3* (1701 pb) pour estimer la qualité de la migration.

#### 10.4.2. Essai de mise en évidence des déshydrogénases mitochondriales et chloroplastique(s).

Chez le tabac, une absence du complexe I mitochondrial provoque une augmentation de l'oxydation du NADH cytoplasmique (Gutierrez *et al.*, 1997). Cette augmentation pourrait résulter de l'activité des NAD(P)H déshydrogénases mitochondriales. Nous avons donc utilisé deux souches de *Chlamydomonas* présentant des mutations dans la chaîne respiratoire. Les souches « 300 » et « 662 » présentent respectivement une inactivation des complexes mitochondriaux I + IV et I + III.

Par ailleurs, une carence en soufre déstabilise le photosystème II chloroplastique, entraînant une chute de la production d'oxygène et bloquant l'apport en électron de la chaîne de transport chloroplastique. En culture scellée, cette carence engendre une anaérobiose locale entraînant la production d'hydrogène et donc une réduction non photochimique du pool de plastoquinone (voir introduction). Cette carence pourrait donc induire l'expression de NAD(P)H déshydrogénases chloroplastiques capables de réaliser cette réduction non photochimique

Des cultures des souches 300, 662, et de la souche sauvage 2 ont donc été réalisées en condition normale ou en condition de carence en soufre et en milieu fermé. Après extraction des RNA totaux, ceux-ci ont été utilisés pour visualiser l'expression des gènes *NDA* par Northern blotting en utilisant le même protocole que décrit au point précédent. Les résultats obtenus pour les trois souches furent identiques à ceux obtenus pour la souche « 2 » cultivée en milieu TAP (résultat non montré). L'absence du complexe I mitochondrial ou du photosystème II chloroplastique ne provoque apparemment pas de modification de l'expression des gènes *NDA*.

#### **10.4.3. Profil d'expression par RT-PCR**

La littérature ne contient aucun exemple de mise en évidence de l'expression de gène *NDH-II* par la technique de Northern blotting. A l'inverse, plusieurs études ont été menées sur l'expression des gènes *NDH-II* par RT-PCR (reverse transcriptase PCR, voir page 17). Nous avons donc réalisé une série de RT-PCR pour détecter l'expression des gènes *NDA1*, 3 et 5. Cette technique est potentiellement plus sensible que le transfert sur membrane du fait de l'amplification des fragments réalisée par la PCR. Les expressions des gènes *NDA6* et 7 ont déjà été testées par RT-PCR au cours de ce travail, sans succès pour *NDA7* (voir point 10.1.4).

Des RT-PCR ont été réalisées à partir de RNA extraits d'une souche sauvage de *Chlamydomonas* cultivée pendant 48h en milieu TAP. Des cDNA ont été synthétisés pendant une heure par une *reverse transcriptase* en utilisant les amorces spécifiques *nda1-1R*, *nda2-2R*, *nda3-2R* et *nda5-4R*. Des PCR ont ensuite été réalisées sur les cDNA produits avec les amorces spécifiques correspondantes *nda1-1F nda1-2R* ; *nda2-1F, nda2-2R* ; *nda3-1F, nda3-2R* et *nda5-3F, nda5-4R*. Celles-ci ont été choisies car elles avaient déjà permis l'amplification de fragments de PCR à partir d'une banque de cDNA. La PCR effectuée avec les amorces de *NDA1*, *NDA2* et *NDA3* a permis l'amplification de fragments de taille attendue, soit environ 300 pb, 950 pb et 200 pb. Aucun résultat n'a été obtenu avec le gène *NDA5*.

#### 10.4.4. Intégration des résultats obtenus

La consultation des banques d'EST disponibles de *Chlamydomonas* nous apprend tout d'abord que toutes les NAD(P)H déshydrogénases identifiées sont effectivement exprimées, des EST ont été identifiées pour chacun des gènes étudiés.

Le fait que l'expression du gène *NDA2* ait pu être clairement visualisée par Northern blotting témoigne de son expression majoritaire, suivie par l'expression du gène *NDA6*. A l'inverse, l'expression de *NDA7* n'a jamais pu être mise en évidence, quelle que soit la technique utilisée. Cependant, *NDA7* présentant une identité de 57% par rapport à la séquence de *NDA6* et étant positionné près de *NDA6* sur le même scaffold, nous supposons qu'il pourrait résulter d'une duplication récente et sans doute peu fonctionnelle.

	<u>Présence d'EST dans les banques</u>	<u>Amplification sur cDNA</u>	<u>RT-PCR &amp; 5'RACE</u>	<u>Northern blotting</u>
<i>NDA1</i>	+	+	+	-
<i>NDA2</i>	+	+	+	+
<i>NDA3</i>	+	+	+	-
<i>NDA5</i>	+	+	-	-
<i>NDA6</i>	+	+	+	+/-
<i>NDA7</i>	+	-	-	-

**Tableau 10.2** : Résumé des données concernant l'expression des différents gènes *NDA*. Les banques de données consultées dans la recherche des EST sont celles disponibles sur le site du séquençage de *Chlamydomonas* (<http://www.chlamy.org>). Un « + » signifie une réponse positive. Le résultat positif pour la RT-PCR de *NDA2* est décrit page 84.

En résumé, l'expression de *NDA2* et 6 semble être plus importante que celle de *NDA1* et 3. Nous avons également pu amplifier une partie du gène *NDA5* à partir d'une banque de cNDA (cf point 10.1.3), et seule l'expression de *NDA7* n'a jamais pu être mise en évidence.

## **10.5. Localisation subcellulaire des protéines Nda.**

### **10.5.1. Données préliminaires**

Aucun résultat concernant la localisation subcellulaire des protéines Nda de *Chlamydomonas* n'a été décrit dans la littérature avant ce travail. Cependant, la mise en évidence d'une activité NAD(P)H déshydrogénase de type II au sein du chloroplaste de *Chlamydomonas* (Mus *et al.*, 2005) suggère qu'une ou plusieurs protéines Nda serai(en)t localisée(s) dans cet organite. Par analogie avec la situation observée chez les plantes supérieures, les autres protéines Nda devraient être localisées au sein de la mitochondrie.

Une première tentative de localisation des protéines Nda chez *Chlamydomonas* a été réalisée par le docteur Pierre Cardol. Des extraits de protéines mitochondriales et chloroplastiques ont été déposés sur des gels polyacrylamides non dénaturants de type Blue-Native. Après migration, la coloration des protéines au NADH-NBT permet de visualiser au moins quatre activités déshydrogénases de type II dans les extraits mitochondriaux et une dans des extraits chloroplastiques (Pierre Cardol, communication personnelle). Deux des signaux mitochondriaux visualisés ont pu être attribués par spectrométrie de masse aux protéines Nda1 et 3. Un signal estimé entre 60 et 65 kDa correspondrait à la protéine Nda3 et un autre aux alentours de 100 kDa correspondrait à la protéine Nda1. La masse des protéines Nda1 et 3 prédite sur base de leurs séquences est respectivement de 77,3 et 58,5 kDa. Cependant, si l'on retire la région précédant le premier domaine conservé, correspondant probablement au peptide de transit clivé lors de l'adressage, ces masses tombent à 61 et 52 kDa respectivement. La masse observée pour Nda3 serait donc en accord avec la prédiction, de même que pour Nda1 si le signal observé correspond à un dimère de la protéine.

Par ailleurs, le passage en spectrométrie de masse d'un échantillon de protéines mitochondriales réalisé par Layla Boutaffala, mémorante au sein du laboratoire, a permis l'identification de la protéine Nda6, suggérant une localisation mitochondriale de celle-ci (communication personnelle).

### **10.5.2. Analyse du signal d'adressage des protéines Nda**

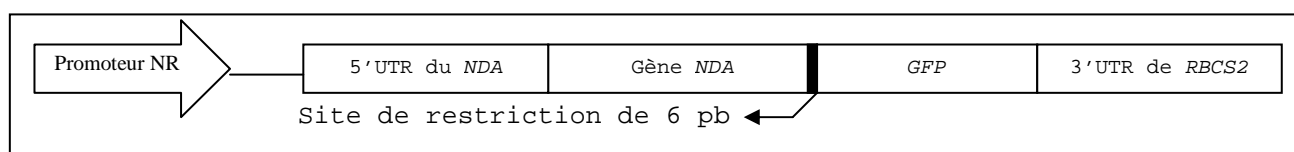
Plusieurs programmes de prédiction subcellulaires disponibles sur internet ont été utilisés pour déterminer la localisation des protéines Nda. Les résultats obtenus divergent d'un programme à l'autre et les résultats, exposés au tableau 10.3, sont globalement inutilisables. Ces programmes ont cependant été développés pour les protéines de plantes supérieures, il est possible que la machinerie d'import de *Chlamydomonas* diffère sensiblement.

	Predotar	Ipsort	Psort	Mitopred	Mitoprot	ChloroP
<b>Nda1</b>	50 % Chloro 20 % Mito	Mito	Réticulum	80 % Mito	99 % Mito	51 % Chloro
<b>Nda2</b>	18 % Chloro 12 % Mito	Mito	Cytoplasme ou Peroxysome	80 % Mito	99 % Mito	56 % Chloro
<b>Nda3</b>	2 % Chloro 28 % Mito	Mito	Mito ou Cytoplasme	0% Mito	99 % Mito	54 % Chloro
<b>Nda5</b>	56 % Chloro 15 % Mito	Mito	Chloro ou Mito	0% Mito	99 % Mito	57 % Chloro
<b>Nda6</b>	1 % Mito 0 % Chloro	Mito	Cytoplasme ou Lumen	0% Mito	7 % Mito	44 % Chloro
<b>Nda7</b>	1 % Chloro 11 % Mito	-	Cytoplasme ou Peroxysome	0% Mito	47 % Mito	45 % Chloro

**Tableau 10.3 :** Tableau récapitulatif des programmes utilisés pour prédire la localisation subcellulaire des protéines Nda.

### 10.5.3. Fusion de protéine Nda avec une protéine fluorescente (Gfp)

La protéine Nda5 semblant être la bonne candidate pour une localisation chloroplastique puisque d'origine cyanobactérienne, nous avons entrepris d'en déterminer la localisation expérimentalement. Pour ce faire, nous avons projeté de fusionner le cDNA de ce gène avec le cDNA d'une protéine fluorescence, la Gfp (green fluorescent protein). L'introduction de la construction dans le génome de *Chlamydomonas* permettra l'expression d'une protéine chimérique localisable par microscopie confocale. Une telle stratégie a déjà permis de déterminer la localisation intracellulaire de diverses protéines de *Chlamydomonas* (Fuhrmann *et al.*, 1999; Lechtreck *et al.*, 2002), notamment chloroplastiques (Nishiyama *et al.*, 2002; Komine *et al.*, 2002). Nous avons également entrepris la même analyse avec les protéines Nda2 et 6. Les données précédemment obtenues suggérant un peptide signal N-terminal dans le cas de Nda2 et 5, nous avons décidé de positionner la Gfp dans la région C-terminale du gène pour laisser la région N-terminale accessible à la machinerie de transport mitochondrial ou chloroplastique. La fusion entre les deux gènes sera réalisée en éliminant le codon stop du gène *NDA*, et en positionnant l'ATG initial du gène de la *GFP* dans la même phase de lecture. Entre le dernier codon du gène *NDA* et le premier de la *GFP*, un site de restriction de 6 pb servira de linker. Pour améliorer l'expression du gène-fusion, la 5'UTR du gène *NDA* sera conservée dans la construction. Le gène encodant une *GFP* adaptée à l'usage de codon de *Chlamydomonas* (pCrGFP, Biocat Germany) comporte une 3'UTR de *RBCS2*, également conservée. Le tout sera cloné dans le plasmide pPN10 sous la dépendance du promoteur de la nitrate réductase, couramment utilisé au laboratoire (Cardol *et al.*, 2006, 2008). La figure 10.18 schématise la construction planifiée.

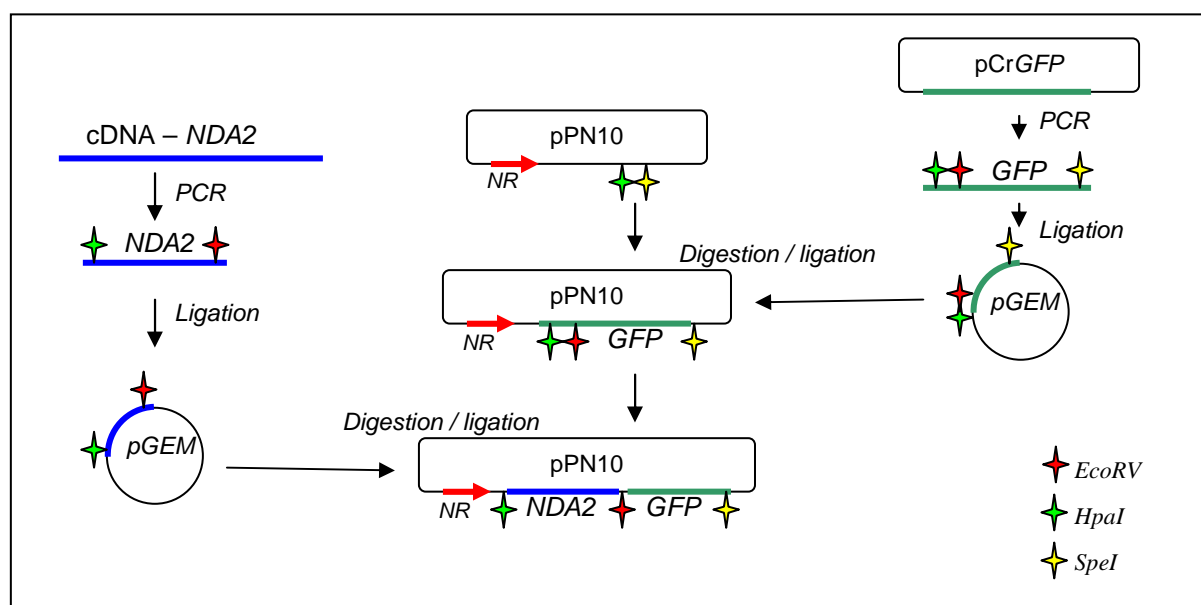


**Figure 10.18 :** Schéma représentant la construction envisagée pour la fusion du gène *NDA* avec la *GFP*.



### Construction pPN10-NDA2-GFP

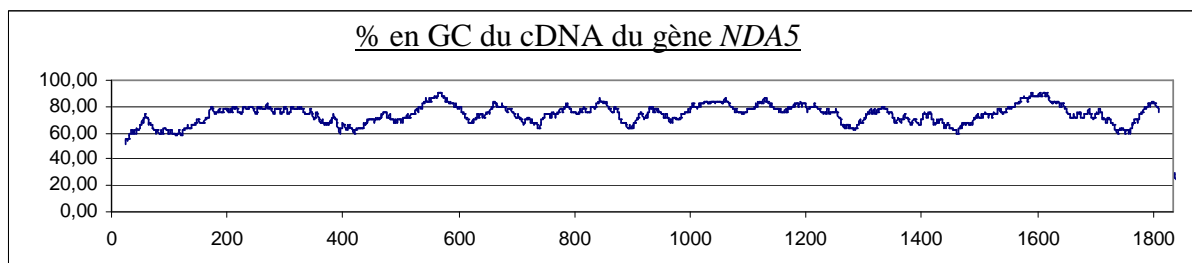
La stratégie envisagée pour réaliser la construction décrite à la figure 10.18 a été d'amplifier, par PCR à partir d'une banque de cDNA, une région du transcrite du gène *NDA* comprenant la 5'UTR et la région codante à l'exclusion du codon stop. Les amorces spécifiques *nda2-3F* et *nda2-4R* ont été utilisées pour ce faire. Ces amorces comprenaient également les sites de restrictions pour les enzymes *EcoRV* et *HpaI* afin de faciliter les étapes ultérieures de construction (voir figure 10.19). Le produit de PCR obtenu, d'environ 1,9 kb, a ensuite été cloné dans le vecteur pGEM et confirmé par séquençage. Parallèlement, un fragment de PCR comprenant le gène de la GFP et la majeure partie de la 3'UTR de *RBCS2* a été réalisé à partir du plasmide pCrGFP (Biocat, Allemagne) en utilisant les amorces *gfp-1F-EcoRV-StuI-HpaI* et *gfp-2R-SpeI*. Ce fragment a par la suite été cloné dans le pGEM et confirmé par séquençage. Nous avons ensuite digéré le pGEM ayant inclus le fragment de *GFP* par les enzymes *EcoRV* et *SpeI*. Le fragment ainsi libéré a été inséré par ligation dans le plasmide pPN10 (comprenant le promoteur de la nitrate réductase, voir page 42) digéré par les mêmes enzymes. Le plasmide pPN10-GFP obtenu a ensuite été digéré par les enzymes *EcoRV* et *HpaI*. Ces dernières digestions ont permis le clonage du fragment libéré par les mêmes enzymes à partir du plasmide pGEM-NDA2. Le plasmide ainsi obtenu a été nommé pPN10-NDA2-GFP et sa séquence a été confirmée par séquençage. La figure 10.19 représente les différentes étapes de cette construction.



**Figure 10.19** : Représentation schématique des étapes de la construction du plasmide pPN10-NDA2-GFP. Voir texte pour le détail de la construction.

### Construction pPN10-*NDA5*-GFP

Nous n'avons pas pu exploiter la même stratégie pour la construction pPN10-*NDA5*-GFP, aucune amplification de la région recherchée du cDNA de *NDA5* n'a été possible (nda5-8F, nda5-9R). Vu le pourcentage élevé en GC du cDNA de *NDA5* (73,7% de moyenne, voir figure 10.20), nous avons utilisé une DNA polymérase adaptée aux régions riches en GC (~84%) (Herculase – Stratagène, USA), mais sans plus de succès. Nous avons également essayé d'obtenir la séquence par RT-PCR à partir d'extrait de RNA total, ou à partir de RNApolyA purifié, en utilisant une *reverse transcriptase* (*HIV Reverse Transcriptase*, Ambion) et une polymérase (Herculase – Stratagène, USA) toutes deux adaptées aux génomes riches en GC, sans succès. Dans chaque cas, des amplifications de la séquence du gène *NDA2* (nda2-3F, nda2-4R) ont servi de témoin positif (résultat non montré).

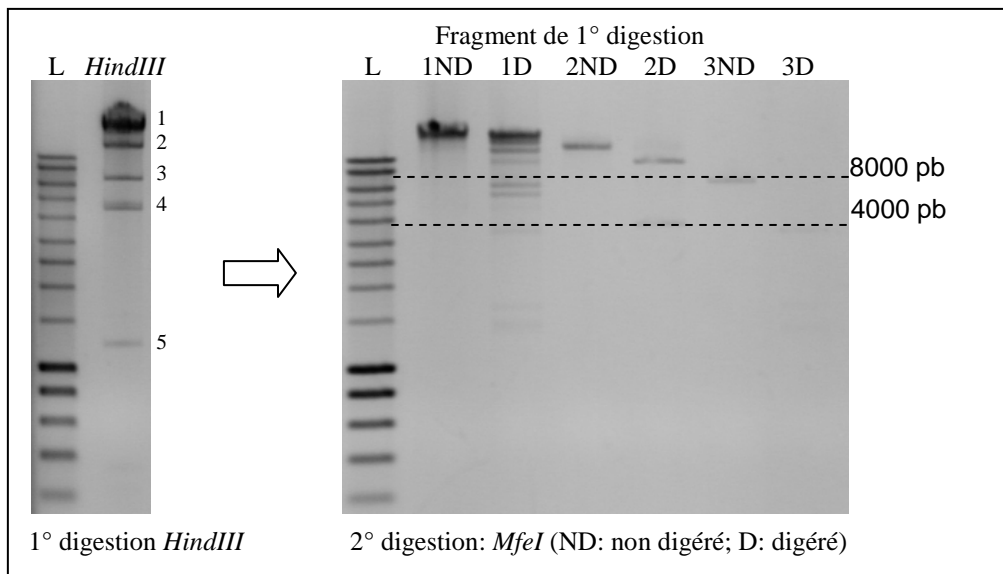


**Figure 10.20 :** Le % en GC a été calculé sur une fenêtre de 15 bases.

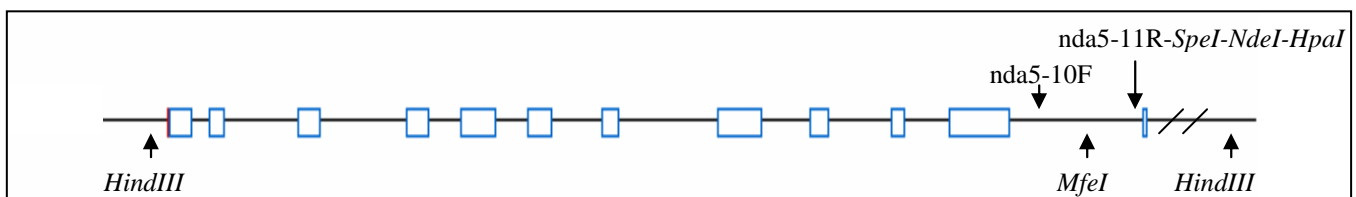
Pour obtenir la séquence du gène *NDA5*, nous avons envisagé une autre stratégie. L'entièreté du génome de *Chlamydomonas* est contenue dans des BACs (Bacterial Artificial Chromosome) dont les extrémités ont été séquencées. Par alignement de ces extrémités séquencées sur la séquence du scaffolds contenant *NDA5*, nous avons pu identifier un BAC contenant la région génétique de ce gène. Le BAC 27L19 a donc été commandé à l'Université de Clemson (USA) (<https://www.genome.clemson.edu/>).

L'analyse des sites de restriction de la région génomique de *NDA5* a permis d'identifier la présence de deux sites de restriction *HindIII* localisés de part et d'autre du gène (voir figure 10.22). Cependant, la présence de régions non séquencées dans le scaffold de *NDA5* ne permettait pas de déterminer la taille exacte du produit de digestion. La digestion de l'intégralité du BAC 27L19 par l'enzyme *HindIII* a produit 5 fragments d'une taille estimée à ~1250, ~4500, ~6500, ~12000 et >15000 pb. Les trois fragments de plus grande taille ont été purifiés et digérés par l'enzyme *MfeI*, dont l'action est sensée libérer un fragment de 6032 pb comportant la majeure partie de *NDA5* à l'exception de la région 3' terminale (voir figure 10.22). L'un des fragments, d'une taille proche de 6000 pb, produit à partir du fragment de

taille >15000 pb a ensuite été confirmé par séquençage comme étant la région génomique recherchée. La figure 10.21 reprend les différentes digestions réalisées.

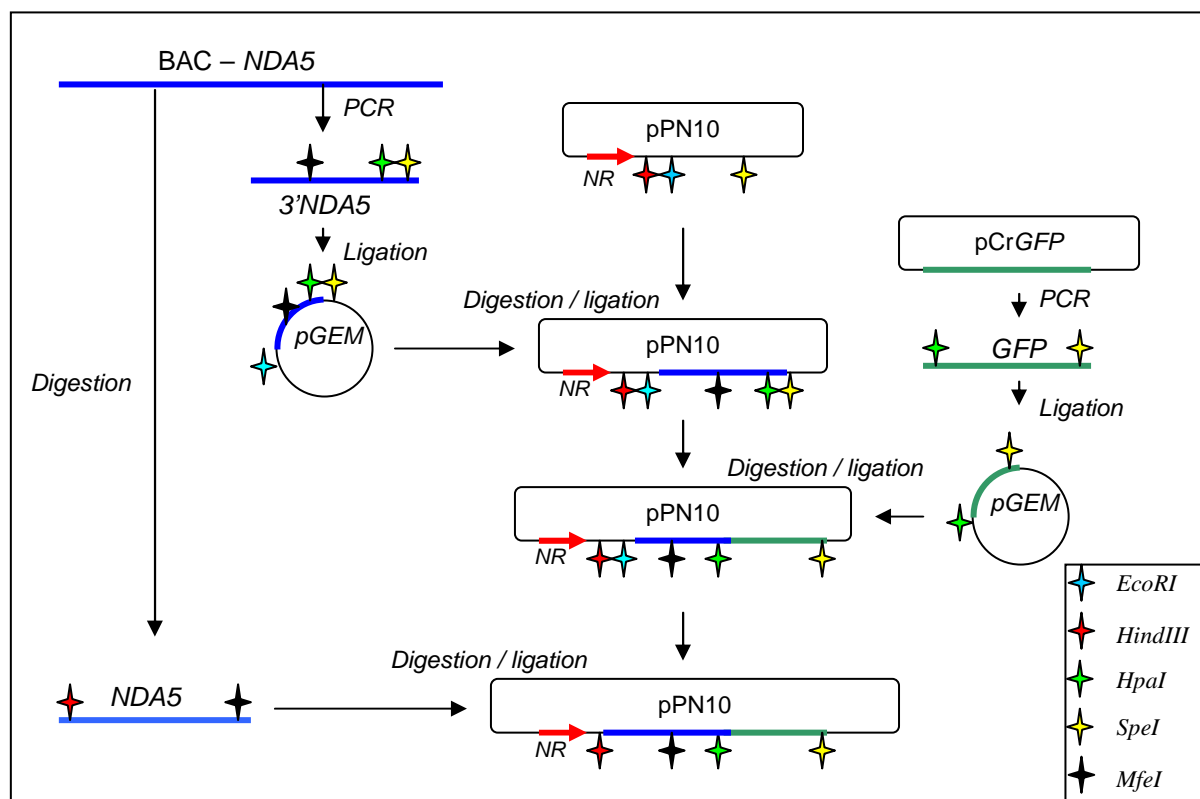


**Figure 10.21 :** Profil de digestion du BAC 27L/19 par l'enzyme *HindIII* (1° digestion) et par l'enzyme *MfeI* (2° digestion). Ladder : Smart Ladder.



**Figure 10.22 :** Représentation schématique du gène *NDA5*. Les cadres bleus représentent les exons. La région hachurée était non séquencée au moment de l'expérience. Pour les tailles précises des exons/introns, voir page 66.

Afin d'obtenir la partie manquante du gène *NDA5* jusqu'au codon précédent le stop, nous avons réalisé une PCR sur cette région génomique en profitant du fait que la proportion de GC de cette région est plus faible. Cette amplification a été réalisée à partir du BAC 27L19 en utilisant les amorces *nda5-10F* et *nda5-11R-SpeI-NdeI-HpaI*. Ce fragment de PCR (3'*NDA5*) a ensuite été cloné dans le vecteur pGEM confirmé par séquençage. Le pGEM a ensuite été digéré par les enzymes *EcoRI* et *SpeI* et le fragment libéré a été cloné dans le plasmide pPN10 ouvert aux mêmes sites (voir figure 10.23). Parallèlement, le plasmide pGEM-*GFP* utilisé pour la construction *NDA2-GFP* a été digéré par les enzymes *HpaI* et *SpeI* et le fragment libéré a ensuite été cloné dans le plasmide pPN10-3'*NDA5* digéré par les mêmes enzymes. Le plasmide obtenu a ensuite été digéré par les enzymes *HindIII* et *MfeI*, permettant l'intégration du produit de digestion du BAC *HindIII/MfeI* de 6032pb. La région correspondant à la *GFP* et au produit de PCR de *NDA5* a été confirmée par séquençage en utilisant les amorces *nda5-10F*, -11R, *gfp-1F*, -2R et -3F. La stratégie employée est résumée à la figure 10.23.



**Figure 10.23 :** Représentation schématique des étapes de la construction du plasmide pPN10-NDA5-GFP. Voir texte pour le détail de la construction.

### Construction pPN10-NDA6-GFP

Comme pour *NDA5*, aucune amplification du cDNA du gène *NDA6* n'a pu être obtenue, quelles que soient les conditions utilisées (*nda6-4F*, *nda6-5R*, *nda6-6R*). Par ailleurs, aucun BAC disponible ne semblait s'aligner sur la région génomique de *NDA6*.

En dernier recours, nous avons essayé de récupérer directement le cDNA du gène *NDA6* dans une banque phagique de cDNA de *Chlamydomonas* disponible au laboratoire. Au total, 200 000 phages ont été testés suivant le protocole donné page 54. Cette quantité de phages représente le quadruple de ce qui est préconisé pour ce genre d'expérience. La sonde utilisée pour les révélations était identique à celle déjà utilisée pour les études d'expressions (voir page 77). Cependant, aucune des membranes obtenues n'a présenté de signal après hybridation.

### Transformation de *Chlamydomonas* et analyse des clones obtenus

Les deux plasmides pPN10-*NDA2-GFP* et pPN10-*NDA5-GFP* ont ensuite été utilisés séparément pour co-transformer la souche sauvage n°84 de *Chlamydomonas* par électroporation en utilisant un plasmide de résistance à l'hygromycine comme marqueur de sélection. 300 transformants résistants à l'hygromycine ont ensuite été isolés pour chacune des transformations. Les clones obtenus ont ensuite été testés par amplification PCR à partir de cellules digérées à la protéinase K sur base de la présence de la séquence de la *GFP* dans le génome nucléaire en utilisant les amorces gfp-1F et gfp-2R. La présence de la séquence clonée du gène *NDA* en amont de celle de la *GFP* a également été testée de la même manière en utilisant les amorces internes nda2-1F/nda2-2R et nda5-10F/nda5-11R. Ce criblage a permis l'identification de 80 clones ayant intégré au moins en partie la construction *NDA2-GFP*, ainsi que 60 clones ayant intégré au moins en partie celle de *NDA5-GFP*.

Après culture, une immunodétection a été réalisée avec un anticorps anti-Gfp (Roche, Suisse) sur des westerns blots où des extraits totaux de protéines des différents transformants avaient été chargés. Ces extraits ont été obtenus par sonication. Un transformant comprenant une protéine fusion centrine-Gfp (don de Karl-Ferdinand Lechtreck ; Schoppmeier et *al.*, 2005) a servi de témoin positif pour la détection de l'anticorps anti-gfp. Malheureusement, aucun des transformants *NDA-GFP* n'a donné de signal positif. Plusieurs raisons peuvent expliquer l'absence de Gfp dans les transformants, notamment un problème de repliement de la protéine chimérique, un problème au niveau de l'expression du transcript, ou encore une dégradation rapide suite à un défaut d'adressage.

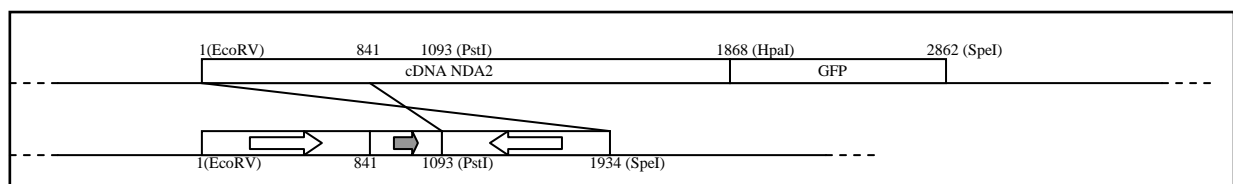
#### **10.5.4. Inactivation du gène *NDA2* par RNA interférence**

Une autre stratégie envisageable pour déterminer l'importance des déshydrogénases alternatives dans la respiration mitochondriale ou d'évaluer leur impact sur l'état rédox des plastoquinones et sur les transitions d'états chloroplastique est d'en modifier l'expression.

La RNA interférence (RNAi) est un processus qui permet l'inactivation, partielle ou totale, d'un gène sélectionné. Le mécanisme de « gene silencing », consiste à déclencher la dégradation de l'ARNmessenger au moyen de molécules d'ARN bicaténares artificielles dont la séquence correspond à celle du gène visé. L'ARN bicaténaire est dégradé par clivage en « small interfering RNA » (siRNA) double brin de 21 à 33 nucléotides. Ces siRNA double brin sont ensuite incorporés dans un complexe multiprotéique « RNA-induced silencing complex » (RISC) et vont servir de guide pour la dégradation spécifique de RNA ayant la

même séquence. (Zamore *et al.*, 2000, Bernstein *et al.*, 2001, Hammond *et al.*, 2000, 2001, Nykänen *et al.*, 2001, Elbashir *et al.*, 2001).

Nous avons commencé cette analyse en prenant le gène *NDA2* comme référence vu que l'expression de ce gène est détectable après Northern blot. Nous avons réalisé une construction répondant aux exigences de la RNA interférence, c'est-à-dire permettant la formation d'un RNA double-brin. Celle-ci a été aisément obtenue en remplaçant dans la construction pPN10-*NDA2-GFP* la partie terminale de cette construction par une copie inversée du début du cDNA de *NDA2*. Cette opération a été réalisée en mettant à profit la présence des sites de restriction *PstI* et *SpeI* dans la construction pPN10-*NDA2-GFP*, sites ayant été inclus dans les amorces spécifiques *nda2-5F-SpeI* et *nda2-6R-PstI* ayant servi à l'amplification de la région inversée. Après clonage du produit de PCR dans le pGEM, celui-ci a été digéré par ces deux enzymes, puis inséré en position tête-bêche dans le plasmide pPN10-*NDA2-GFP* digéré avec les mêmes enzymes. La figure 10.24 représente la stratégie employée.



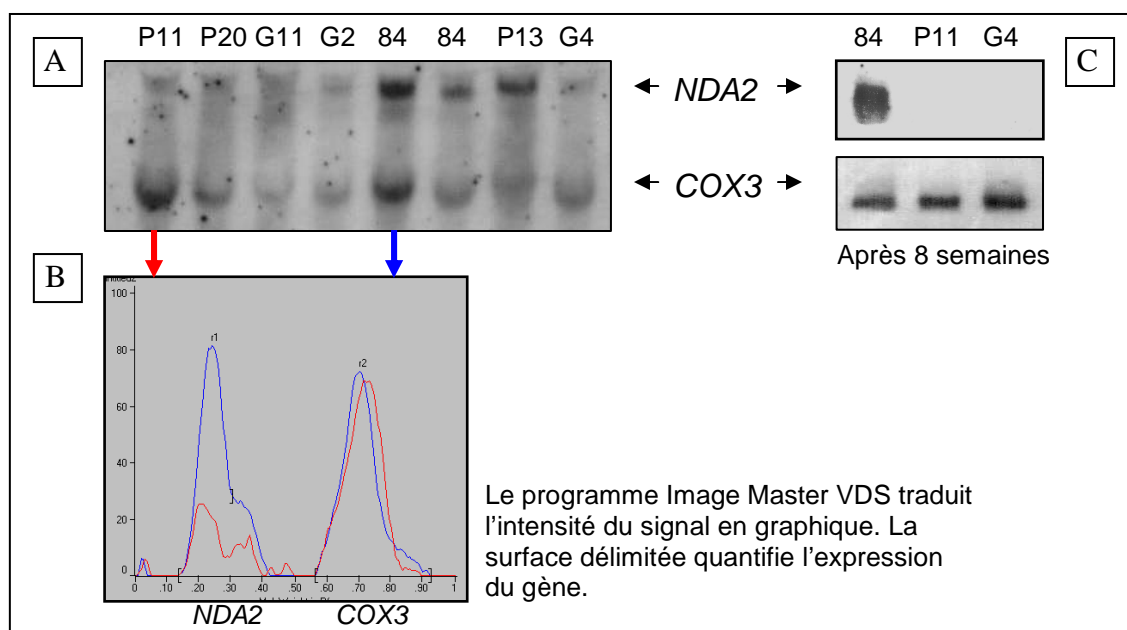
**Figure 10.24** : Schéma d'obtention de la construction RNAi à partir de la construction pPN10-*NDA2-GFP*

Une fois la construction obtenue, une co-transformation de la souche sauvage n° 84 de *Chlamydomonas* a été réalisée. Celle-ci s'est déroulée dans les mêmes conditions que pour la construction *NDA2-GFP* en utilisant un plasmide de résistance à l'hygromycine comme marqueur de sélection. 180 transformants résistants ont été ensuite testés par PCR à partir de cellules digérées à la protéinase K en utilisant le couple d'amorces spécifiques *nda2-3F/nda2-4R*. Ces amorces permettent l'amplification d'un fragment de 814 pb à partir de la cassette *NDA2-RNAi*. Des RNA totaux ont ensuite été extraits de 43 clones positifs cultivés sur milieu TAP-nitrate en vue de tester l'expression du gène *NDA2* par Northern blotting suivant le même protocole que celui utilisé pour l'étude d'expression. Deux de ces clones (P11 et G4) présentaient une diminution nette de l'expression de *NDA2*.

Pour quantifier le degré d'inactivation, une sonde correspondant au gène *COX3* a été utilisée. Le gène *COX3* de *Chlamydomonas* encode une sous-unité du complexe IV mitochondriale dont l'expression présente peu de variation. Cette sonde a été obtenue par amplification PCR à partir d'un plasmide comprenant le cDNA de *COX3* disponible au laboratoire, en utilisant les amorces *cox3-1F* et *cox3-2R*. Cette sonde a ensuite été utilisée

simultanément avec la sonde *NDA2* pour hybrider un Northern blot où des RNA des mutants et d'un témoin sauvage ont été déposés (voir figure 10.25-A). La quantification des signaux obtenus avec les deux sondes *NDA2* et *COX3* par le programme IMAGE MASTER VDS a permis de déterminer que les diminutions d'expression étaient de 50% pour le mutant P11 et de 70% pour le mutant G4 (voir figure 10.25-B).

Nous avons réitéré la même manipulation environ 8 semaines après l'obtention des mutants. Cette nouvelle expérience a montré que les deux mutants présentaient alors une perte totale de l'expression de *NDA2*. Cette inactivation est stable depuis lors, ce qui montre que le phénomène de RNAi peut évoluer au cours du temps (voir figure 10.25-C).



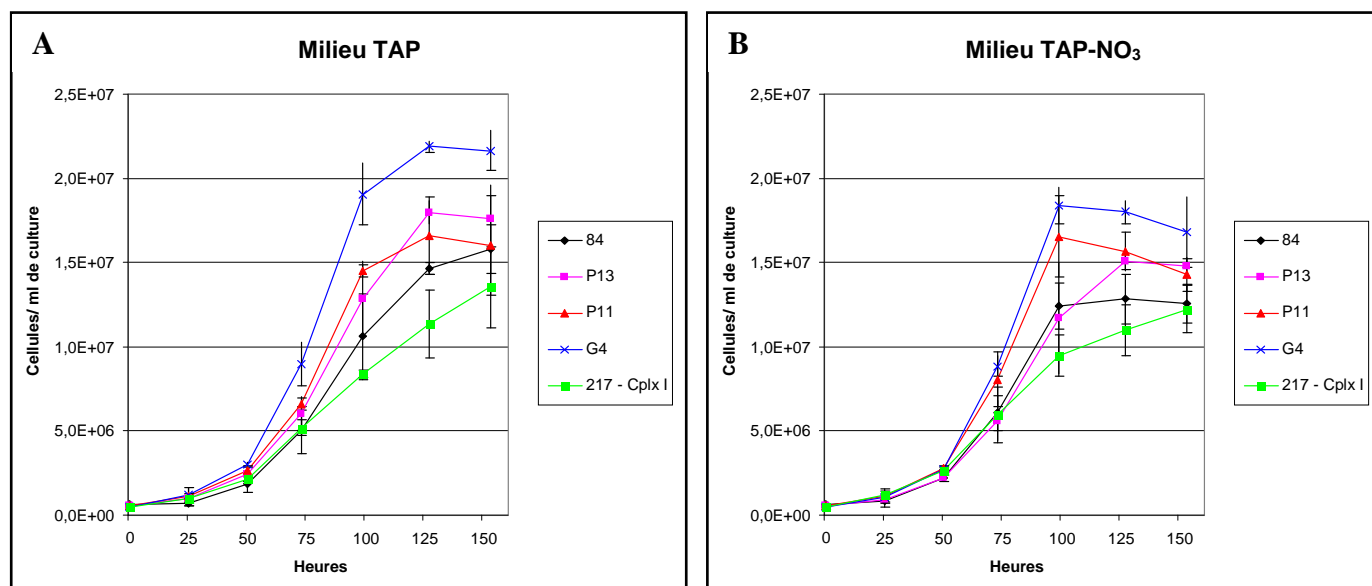
**Figure 10.25 :** Analyse des mutants ayant intégré la construction *NDA2*-RNAi. **A :** Northern blot avec les sondes *NDA2* et *COX3* sur une série de mutants (P11, P20, G11, G2, P13, G4) et deux extraits de la souche sauvage n° 84. **B :** Quantification du signal pour le mutant P11 et du sauvage 84 par le programme Image Master VDS. **C :** Northern blot réalisé 8 semaines après obtention des mutants avec les sondes *NDA2* et *COX3* sur les mutants P11, G4 et sur le sauvage 84.

## 10.6. Caractérisation des mutants *NDA2*-RNAi obtenus

### 10.6.1. Courbes de croissance

Les courbes de croissance représentent de bons indicateurs de l'état général du métabolisme de mutants. Ainsi, des mutants affectés dans la chaîne de transport d'électrons mitochondriale présentent un temps de génération très nettement allongé par rapport à une souche sauvage. 50 ml de milieu de culture TAP (Tris-acétate-phosphate) ont étéensemencés à une concentration algale calibrée à  $5.10^5$  cellules/ml par comptage automatique (Coulter Counter Model ZF de Coulter Electronics limited, Angleterre). Le milieu a été agité sous une lumière modérée de  $\sim 50\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ . Nous avons analysé les mutants G4 et P11, la souche sauvage 84, un clone (P13) ayant intégré la construction *NDA2*-RNAi mais ne présentant pas d'inactivation, et la souche 217 dépourvue de complexe I mitochondrial. Chaque culture a été réalisée en triple exemplaire.

Alternativement, la source d'azote du milieu de culture a été modifiée en remplaçant l'ammonium par du nitrate (TAP- $\text{NO}_3$ ), et l'intensité lumineuse a été portée à  $\sim 450\mu\text{E}/\text{m}^2\text{s}$ . Chez *A. thaliana*, la présence d'ammonium induit l'expression de plusieurs *NDH-II* mitochondriales, alors que le nitrate inhibe l'expression d'autres gènes de cette famille. (Svensson et Rasmusson, 2001, Escobar *et al.*, 2006). La culture en lumière forte pourrait potentiellement stimuler l'action de la ou les protéines Nda chloroplastiques. Les résultats obtenus sont repris dans les graphes de la figure 10.26.



**Figure 10.26 :** Courbes de croissance des mutants P11, G4, 217 (dépourvu de complexe I mitochondrial) du clone P13 et de la souche sauvage 84.



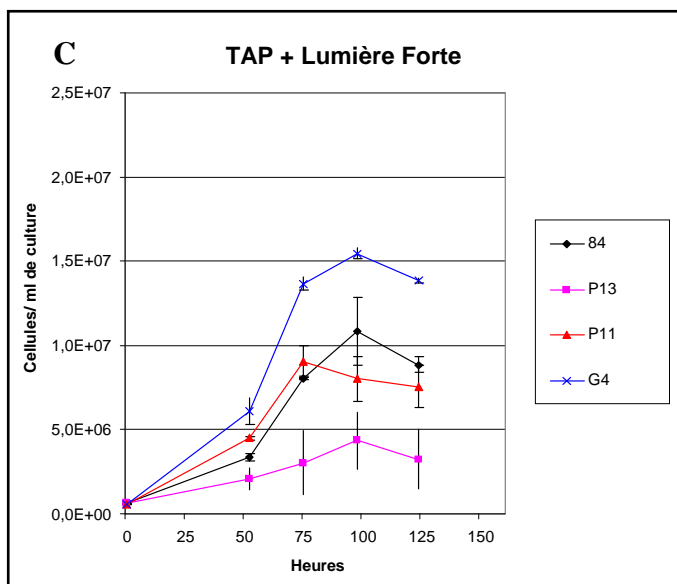


Figure 10.26, suite.

Les résultats obtenus montrent que quelles que soient les conditions de culture, le mutant G4 présente une biomasse finale plus importante que le témoin sauvage. La croissance initiale du mutant P11 semble également plus importante, mais ne s'accompagne pas d'une augmentation de la biomasse finale obtenue. Les temps de doublement mesurés pendant la phase de croissance exponentielle ne montrent cependant pas de différence importante (voir tableau 10.4).

Souche	Milieu		
	TAP	TAP-NO3	TAP Lumière forte
84	18h54 ± 1h48	19h06 ± 1h00	17h54 ± 0h54
P13	20h12 ± 0h48	20h06 ± 3h12	NA
P11	19h24 ± 0h12	18h24 ± 0h00	22h42 ± 4h18
G4	18h00 ± 0h54	16h54 ± 1h18	19h36 ± 3h48

**Tableau 10.4 :** Temps de doublement de la souche 84 et des mutants P13, P11 et G4 dans différents milieux de culture. NA : Non applicable, nous n'avons pas observé de phase de croissance exponentielle.

### **10.6.2. Analyse détaillée du phénotype des mutants**

Plusieurs analyses ont ensuite été réalisées pour déterminer des aspects plus spécifiques du phénotype des mutants *NDA2-RNAi*. Ces analyses ont été menées conjointement avec le laboratoire de bioénergétique et biotechnologie des bactéries et microalgues du professeur Gilles Peltier (Cadarache, France). Celles-ci sont présentées en détail dans l'article « *A type II NAD(P)H dehydrogenase mediates light-independent plastoquinone reduction in the chloroplast of Chlamydomonas* » publié dans la revue scientifique PNAS (*Proceedings of the National Academy of Sciences, USA*). Cet article est présenté de la page 95 à 100. Les mutants P11 et G4 sont respectivement nommés *Nda2-RNAi* (1) et *Nda2-RNAi* (2) dans l'article.

Succinctement, l'inactivation du gène *NDA2* ne semble pas avoir d'impact sur la respiration cellulaire à l'obscurité, la composition en pigments des cellules, le rendement du photosystème II de cellules adaptées à l'obscurité, ou la production d'oxygène à la lumière (voir table 1, page 96).

Nous avons ensuite voulu tester l'activité de la réduction non-photochimique du pool de plastoquinones. Comme dit dans l'introduction (page 30), la réduction non-photochimique du pool de plastoquinones peut être observée par mesure de la fluorescence chlorophyllienne : l'intensité de la fluorescence varie en fonction de l'état rédox du pool de plastoquinones. Des cellules adaptées à l'obscurité ont été éclairées pendant 5 minutes à raison de 500  $\mu\text{mol}/\text{m}^2.\text{s}$  de photons en présence de propyl-gallate (inhibiteur de l'oxydase terminale plastidiale, Ptox). A la fin de la période lumineuse, la fluorescence de la culture chute rapidement du fait de la réoxydation rapide de Qa (voir figure 2, page 97). Pour une souche sauvage, un sursaut de l'intensité de la fluorescence peut ensuite être observé dans ces conditions. Ce sursaut correspond à la réduction non-photochimique du pool de plastoquinones par des équivalents réducteurs précédemment accumulés à la lumière.

La figure 2 de la page 97 montre bien que ce sursaut de fluorescence est absent pour les deux mutants P11 et G4. Cela montre que la réduction non-photochimique des plastoquinones dépend de la présence de la protéine Nda2. Il est donc vraisemblable, sur cette base, que Nda2 soit localisée dans le chloroplaste, contrairement à ce qui était attendu sur base de l'analyse de la séquence de cette protéine.

Un autre moyen pour tester la capacité de réduction non photochimique du pool de plastoquinones consiste à suivre la transition de l'état 1 à l'état 2 qui se produit lorsqu'on inhibe la respiration mitochondriale (Bulté et *al.*, 1990). Suite au blocage de la respiration mitochondriale (provoqué par l'anoxie ou par l'agent inhibiteur), la baisse du niveau d'ATP va induire une stimulation de la glycolyse qui se traduit par une augmentation du potentiel réducteur cellulaire (NADH et NADPH) (Rebeille et Gans, 1988). Cette augmentation va conduire à une réduction accrue du pool de plastoquinones par le biais de la déshydrogénase chloroplastique, ce qui va provoquer la migration des antennes périphériques collectrices de lumière du PSII vers le PSI. Pour visualiser cette transition, la distribution de l'énergie d'excitation entre les deux photosystèmes a été évaluée en enregistrant le spectre d'émission de fluorescence d'un échantillon d'algues à basse température (77 °K). Le rapport des intensités mesurées à 715 et 685 nm renseigne sur la distribution des antennes périphériques entre les deux photosystèmes  $\left( \frac{F_{715}}{F_{685}} = \frac{F(PSI)}{F(PSII)} \right)$ . Nous avons testé la capacité des mutants à

atteindre l'état 2 sous anaérobiose ou en présence d'un inhibiteur du complexe III mitochondrial (myxothiazol). La figure 3.A de la page 97 montre que le passage à l'état 2 provoque une augmentation du rapport de fluorescence pour la souche sauvage, due à la migration des Lhc-II du PSII vers le PSI. Cette augmentation est nettement plus faible pour le mutant P11 (voir figure 3.A page 97). Le rapport de fluorescence a été mesuré pour les deux mutants par rapport à une souche sauvage dans différentes conditions (voir figure 3.B page 97). Les résultats montrent que l'absence de Nda2 compromet le passage à l'état 2, que la respiration soit seulement diminuée (en présence de myxothiazol), ou totalement inhibée (par anaérobiose).

Nous avons ensuite déterminé l'implication de la protéine Nda2 dans la production d'hydrogène. Comme dit dans l'introduction, la production d'hydrogène par *Chlamydomonas* résulte, en partie, d'une voie de réduction non-photochimique du pool de plastoquinones. On peut donc s'attendre à une baisse de la vitesse de production d'hydrogène chez les mutants dépourvus de la protéine Nda2. Pour le vérifier, nous avons appliqué le protocole de Melis *et al* de production d'hydrogène basé sur l'application d'une carence en soufre pour établir l'anaérobiose. Les mesures de la quantité d'hydrogène produite sont rapportées à la figure 4 page 98. Les résultats montrent bien que le mutant P11 présente une production réduite à 50% par rapport à la souche sauvage 84. Il en va de même pour le mutant G4 (résultat non montré).

### **10.6.3. Localisation de la protéine Nda2 par western blot**

Les résultats obtenus ci-dessus nous ont permis de conclure à une localisation chloroplastique de la protéine Nda2. L'hypothèse d'une double localisation chloroplastique / mitochondriale n'était cependant pas à écarter. Dans les derniers mois de la thèse, la mise à notre disposition par le professeur Gilles Peltier d'un anticorps anti-Nda2 nous a permis d'établir par western blotting la localisation de cette protéine.

Des extraits purifiés de protéines mitochondriales et chloroplastiques ont été réalisés à partir de la souche 84. Les extraits mitochondriaux ont été obtenus par lyse des cellules par de la digitonine, suivie d'une purification des mitochondries en fonction de leur densité par passage sur un gradient de percoll (voir méthodes, page 51). Les protéines totales dans l'extrait ont ensuite été dosées par la méthode de Bradford (voir méthode page 52). Les extraits chloroplastiques ont eux été obtenus par passage des cellules dans un nébulisateur. La technique de nébulisation (voir méthode page 51) consiste à déstabiliser les cellules par une dépression rapide et injection à haute pression (1,2 bar) contre une paroi. L'extrait est ensuite

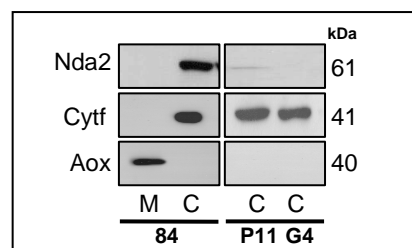
déposé sur un gradient en Percoll pour séparer les chloroplastes libérés en fonction de leur densité. Les protéines totales ont également été dosées par la méthode de Bradford.

10 µg de protéines de chaque extrait ont ensuite été dénaturés par un passage de 10 minutes à 100 °C et ajout de β-mercaptoéthanol. Ces échantillons ont ensuite été utilisés pour réaliser une immunodétection par western blotting en présence de l'anticorps anti-Nda2. Parallèlement aux westerns blots utilisant l'anticorps anti-Nda2, des anticorps spécifiques de protéines mitochondriales et chloroplastiques ont été utilisés pour confirmer l'absence de contaminant dans nos extraits. Ainsi, un anticorps dirigé contre le cytochrome f (Cytf) a servi de témoin chloroplastique, et un anticorps dirigé contre l'oxydase terminale plastidiale (Aox) a servi de témoin mitochondrial.

L'ensemble des résultats obtenus sont présentés à la figure 10.27. Après détection de l'anticorps, il apparaît clairement que la protéine Nda2 est bien présente dans l'extrait chloroplastique, et est absente de l'extrait mitochondrial. Les anticorps anti-Cytf et anti-Aox confirment bien la pureté de nos échantillons de départ. L'utilisation d'un marqueur de poids moléculaire a permis d'estimer la masse apparente des protéines détectées. La protéine Nda2 dénaturée présente un poids moléculaire apparent de ~61kDa. Cette valeur est proche des 59 kDa théoriques calculés sur base de la séquence peptidique complète de la protéine.

L'étape finale du travail a consisté à réaliser les mêmes expériences à partir des mutants *NDA2*-RNAi P11 et G4. Les extraits ont été obtenus d'une manière identique aux extraits de la souche 84. Au cours de l'expérience, il est apparu qu'une concentration identique en protéines ne correspondait pas forcément à un signal identique de l'anticorps anti-Cytf. Nous avons donc réalisé un étalonnage empirique sur base du signal de cet anticorps avant de réaliser le western blot avec les anticorps anti-Nda2 et anti-Aox. Les résultats obtenus sont présentés à la figure 10.27.

Le résultat obtenu montre clairement que la protéine Nda2 est absente du mutant G4 et est présente uniquement sous forme de trace dans le mutant P11. Des expériences réalisées avec des quantités supérieures de protéines (25 µg) ont confirmé ces résultats.



**Figure 10.27 :** Résultats obtenus par Western blotting avec les mutants P11 et G4, et la souche sauvage 84 à partir d'extraits de protéines chloroplastiques (C) et mitochondriales (M). Trois anticorps ont été utilisés : anti-Nda2, anti-cytf et anti-Aox.

# A type II NAD(P)H dehydrogenase mediates light-independent plastoquinone reduction in the chloroplast of *Chlamydomonas*

Frédéric Jans<sup>a,b</sup>, Emmanuel Mignolet<sup>a</sup>, Pierre-Alain Houyoux<sup>a</sup>, Pierre Cardol<sup>a,b</sup>, Bart Ghysels<sup>a</sup>, Stéphan Cuiné<sup>c,d,e</sup>, Laurent Cournac<sup>c,d,e</sup>, Gilles Peltier<sup>c,d,e</sup>, Claire Remacle<sup>b,1</sup>, and Fabrice Franck<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup>Laboratories of Plant Biochemistry and Photobiology and <sup>b</sup>Genetics of Microorganisms, Department of Life Sciences, Institute of Plant Biology, B22, University of Liège, 27 Boulevard du Rectorat, 4000-Liège, Belgium; and <sup>c</sup>Direction des Sciences du Vivant, <sup>d</sup>Centre National de la Recherche Scientifique, and <sup>e</sup>Université Aix Marseille II, Laboratoire de Bioénergétique et Biotechnologie des Bactéries et Microalgues, Institut de Biologie Environnementale et de Biotechnologie, Commissariat à l'Énergie Atomique Cadarache, Saint-Paul-lez-Durance, F-13108 France

Edited by Krishna K. Niyogi, University of California, Berkeley, CA, and accepted by the Editorial Board October 24, 2008 (received for review July 18, 2008)

In photosynthetic eukaryotes, nonphotochemical plastoquinone (PQ) reduction is important for the regulation of photosynthetic electron flow. In green microalgae where this process has been demonstrated, the chloroplastic enzyme that catalyses nonphotochemical PQ reduction has not been identified yet. Here, we show by an RNA interference (RNAi) approach that the *NDA2* gene, belonging to a type II NAD(P)H dehydrogenases family in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, encodes a chloroplastic dehydrogenase that functions to reduce PQ nonphotochemically in this alga. Using a specific antibody, we show that the Nda2 protein is localized in chloroplasts of wild-type cells and is absent in two Nda2-RNAi cell lines. In both mutant cell lines, nonphotochemical PQ reduction is severely affected, as indicated by altered chlorophyll fluorescence transients after saturating illumination. Compared with wild type, change in light excitation distribution between photosystems ('state transition') upon inhibition of mitochondrial electron transport is strongly impaired in transformed cells because of inefficient PQ reduction. Furthermore, the amount of hydrogen produced by Nda2-RNAi cells under sulfur deprivation is substantially decreased compared with wild type, which supports previous assumptions that endogenous substrates serve as source of electrons for hydrogen formation. These results demonstrate the importance of Nda2 for nonphotochemical PQ reduction and associated processes in *C. reinhardtii*.

hydrogen | photosynthesis

Chloroplasts of algae and higher plants originate from a cyanobacterial endosymbiont, which was originally competent for both photosynthesis and respiration, whereas mitochondria have evolved from an endosymbiotic, nonphotosynthetic bacteria. With oxidative phosphorylation being efficiently operated in the mitochondrial inner membrane, the chloroplast thylakoid has specialized in photosynthetic NADP reduction and ADP photophosphorylation to drive reductive processes necessary for photoautotrophic growth. However, chloroplasts have not entirely lost competence for oxidizing NAD(P)H at the expense of oxygen. Twenty-five years ago, Bennoun first suggested that a chloroplast-localized respiratory chain, or chlororespiration, occurs in green microalgae such as *Chlamydomonas reinhardtii* and *Chlorella vulgaris*. This was primarily based on observations that the plastoquinones (PQs) of the electron transport chain could be reduced by NAD(P)H in open-cell preparations or in isolated chloroplasts (1, 2). Chlororespiration was defined as a thylakoid electron transport pathway involving NAD(P)H:plastoquinone oxidoreductase and plastoquinol oxidase activities (1, 3).

The identification of thylakoid-bound enzymes involved in light-independent PQ reduction and oxidation awaited the development of molecular biology approaches. As it turned out, the physiological functions of these enzymes were not, or not only,

related to a respiratory activity *per se*. Genes encoding for several subunits of a NADPH-dehydrogenase (Ndh) complex homologous to mitochondrial complex I were found in the chloroplast genome of higher plants (4, 5). This type I, chloroplastic Ndh complex is involved in nonphotochemical (PSII-independent) PQ reduction, and is part of the PSI-driven cyclic electron transport pathways together with the Cyt b6/f complex (6, 7). The chloroplastic Ndh complex is suggested to be important for the adaptation of higher plant to conditions that lead to increased ATP demand or in stress conditions (8). In the plastoquinol (PQH<sub>2</sub>)-oxidizing side of the chlororespiratory pathway, different enzymes have been suspected. The best characterized of these was first discovered in *Arabidopsis thaliana* and shows homology to the mitochondrial alternative oxidase (AOX) (9). This plastid terminal oxidase (PTOX) was detected also in the green microalgae *C. reinhardtii* in which it was suggested to function as overflow device for excess PQH<sub>2</sub> (10).

Although the function of type I Ndh in nonphotochemical PQ reduction is well-established in higher plants, Ndh1 genes are absent from the chloroplastic genome of many green algae (11). However, the ability of green microalgae to reduce PQ nonphotochemically is well-documented. Biochemical analysis of light-independent PQ reduction activity in isolated thylakoids of *C. reinhardtii* (12) points to its chloroplastic Ndh belonging to a family of type II dehydrogenases. Type II NAD(P)H dehydrogenases are present in a large variety of organisms (e.g., plants, fungi, and protists) but not in animals (13). These monomeric enzymes usually contain one noncovalently bound FAD as prosthetic group and have been located on the outer side or inner side of the mitochondrial inner membrane (13). They may form multiple gene families like in higher plants where seven type II NAD(P)H dehydrogenases are present in *A. thaliana* (14). Six of them are exclusively targeted to mitochondria (14, 15) whereas one of them would be dually targeted, to both mitochondria and chloroplasts (13).

In green microalga, nonphotochemical PQ reduction is suggested to be involved in a variety of functionally important processes such as state transitions, cyclic electron flow and anaerobic hydrogen photoproduction.

Author contributions: L.C., G.P., C.R., and F.F. designed research; F.J., E.M., P.-A.H., P.C., B.G., S.C., C.R., and F.F. performed research; F.J., E.M., P.-A.H., P.C., B.G., S.C., C.R., and F.F. analyzed data; and C.R. and F.F. wrote the paper.

The authors declare no conflict of interest.

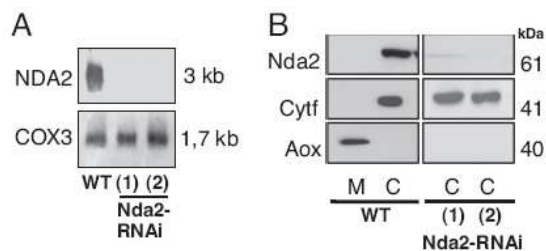
This article is a PNAS Direct Submission. K.K.N. is a guest editor invited by the Editorial Board.

<sup>1</sup>To whom correspondence may be addressed. E-mail: c.remacle@ulg.ac.be or f.franck@ulg.ac.be.

This article contains supporting information online at [www.pnas.org/cgi/content/full/0806896105/DCSupplemental](http://www.pnas.org/cgi/content/full/0806896105/DCSupplemental).

© 2008 by The National Academy of Sciences of the USA





**Fig. 1.** Expression and localization of *NDA2* in wild-type and *Nda2*-RNAi transformants. (A) RNA blot analysis. Hybridization patterns were obtained with *NDA2* and *COX3* probes on RNA blots from wild type (WT) and *Nda2*-RNAi (1) and *Nda2*-RNAi (2) transformants. (B) Western blot analysis. Immunodetection patterns were obtained with antisera against *Nda2*, cytochrome *f* (Cyt*f*) and alternative oxidase (Aox) from *C. reinhardtii* on proteins from the mitochondrial (M) and chloroplastic (C) fractions from wild-type and *Nda2*-RNAi transformant (35  $\mu$ g per lane).

In the process of state transitions (16), PQ reduction triggers activation of a thylakoid-associated kinase that catalyses phosphorylation of a mobile LHCII pool and of minor antenna polypeptides of PSII in appressed thylakoids (17). This weakens their association to PSII and allows their lateral diffusion to nonappressed regions of the thylakoids, where LHCII-PSI supercomplexes are then assembled. This defines the transition from state I to state II, which can be reversed in a phosphatase-dependent manner upon PQH<sub>2</sub> reoxidation. By this process, the distribution of light-excitation energy between the two photosystems can be regulated. In green microalgae, the transition to state II is thought to favor photophosphorylation by PSI-driven cyclic electron flow at the expense of the generation of reducing power (NADPH) by PSII-dependent linear electron flow (16, 18). State transitions therefore represent a mechanism by which chloroplasts can respond to the energy status of the cell by modulating the ratio of ATP and NADPH produced in the light (19). In this regard, the putative type II chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase represents the chloroplastic sensor of the cell energy status by its ability to modulate nonphotochemically the redox state of the PQ pool.

*C. reinhardtii*, like other green microalgae, evolves molecular hydrogen when illuminated under anaerobiosis (20). This is due to the anaerobiosis-induced expression of [FeFe]-hydrogenase, which catalyses proton reduction with electrons donated by ferredoxin in the chloroplast (21). In recent years, a protocol allowing sustained H<sub>2</sub> evolution by sulfur-deprived *C. reinhardtii* has been developed (22). Sulfur deficiency causes a partial inhibition of PSII activity, which allows anaerobiosis to be maintained in the light because of continuous respiration. Rapid inhibition of hydrogenase by oxygen (23) is then avoided. In this condition, both photochemical (PSII-dependent) and nonphotochemical PQ reduction are thought to provide electrons for proton reduction via Cyt b6/f, PSI and hydrogenase (24, 25). Identification of the chloroplastic Ndh involved in this process is

therefore important for further understanding and manipulation of the hydrogen metabolism of *C. reinhardtii*.

In the nuclear genome of *Chlamydomonas*, six sequences (*NDA1*, 2, 3, 5, 6, and 7) sharing similarity with type II NAD(P)H dehydrogenases have been identified (26). In this article, we identify *Nda2* as a chloroplastic type II dehydrogenase responsible for nonphotochemical PQ reduction in this microalga. Furthermore, we show that inactivation of the *NDA2* gene by RNA-interference leads to impairment of processes that were earlier suggested to depend on nonphotochemical PQ reduction.

## Results

***NDA2* Is Expressed in Mixotrophic Conditions and Knock-Down Transformants Can Be Isolated by RNAi.** We first looked at the expression of the six NAD(P)H dehydrogenase genes (*NDA1*, 2, 3, 5, 6, and 7). RNA blots from wild-type cells cultivated under mixotrophic conditions (light + acetate as organic carbon source) were hybridized with probes specific to each transcript. A strong signal was detected at 3.0 kb for *NDA2* (Fig. 1A and Fig. S1). The size of the transcript is in good agreement with that predicted in GenBank (XM\_001703591). For *NDA6*, a faint signal was detected at 3.8 kb, a size that is one kb larger than the size of the putative cDNA in GenBank (XM\_001703003) (Fig. S1). No other signal could be seen. Because *NDA2* seems well expressed in the conditions tested, we decided to suppress its expression by RNA interference to study its role. For that purpose, the *cw15 mt-* strain was cotransformed with pHyg3 conferring resistance to hygromycin b and pRNAi-*NDA2* as described in *Materials and Methods*. Of 43 transformants resistant to the drug and bearing the pRNAi-*NDA2* construct, two clones, *Nda2*-RNAi (1) and *Nda2*-RNAi (2), showed a complete lack of the *NDA2* transcript (Fig. 1A) while the amount of *COX3* transcript is shown as control of loading.

***Nda2* Protein Is Located in the Chloroplast of Wild Type and Its Amount Is Strongly Reduced or Absent in *Nda2*-RNAi Strains.** Immunodetection of the *Nda2* protein in isolated mitochondria or chloroplast fractions was performed by using a specific antibody raised against the recombinant protein expressed in *E. coli*. The level of cross-contamination between the organellar fractions was assessed by using antibodies specific to each compartment (cytochrome *f* for chloroplast and alternative oxidase for mitochondria) and was shown to be null (Fig. 1B). In wild type, the *Nda2* protein was only detected in chloroplasts. Immunodetection performed on chloroplastic fractions of *Nda2*-RNAi strains shows that the protein was absent or present in traces in the mutants.

Low levels or absence of detectable *Nda2* protein in transformed strains had no significant effects on respiration rates in darkness. Cell pigmentation, photosystem II efficiency of dark-adapted samples, and O<sub>2</sub> evolution in light-limited or light-saturated conditions were not affected in any significant way (Table 1). To determine the functional role of *Nda2*, a series of experiments were performed on the *Nda2*-RNAi strains comparatively to wild type.

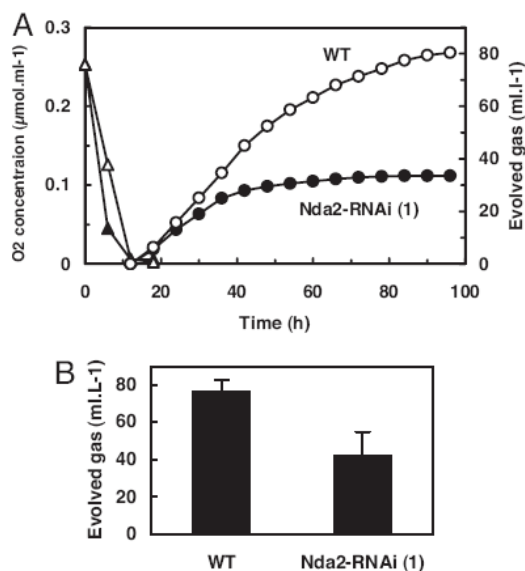
**Table 1.** Respiratory O<sub>2</sub> uptake in the dark, chlorophyll content, and photosynthetic parameters in wild-type and *Nda2*-RNAi strains of *C. reinhardtii* grown in mixotrophic conditions

Strain	Dark O <sub>2</sub> uptake, $\mu$ mol O <sub>2</sub> :mg Chl <sup>-1</sup> :min <sup>-1</sup>	Chl (a+b), pg:cell <sup>-1</sup>	Chl a/b	F <sub>v</sub> /F <sub>m</sub>	O <sub>2</sub> evolution (light limited), $\mu$ mol O <sub>2</sub> :mg Chl <sup>-1</sup> :min <sup>-1</sup>	O <sub>2</sub> evolution (light saturated), $\mu$ mol O <sub>2</sub> :mg Chl <sup>-1</sup> :min <sup>-1</sup>
Wild type	1.1 ± 0.1	2.7 ± 0.1	2.2 ± 0.2	0.70 ± 0.01	1.4 ± 0.14	2.5 ± 0.21
<i>Nda2</i> -RNAi (1)	1.3 ± 0.1	2.3 ± 0.5	2.2 ± 0.2	0.70 ± 0.00	1.3 ± 0.03	2.2 ± 0.05
<i>Nda2</i> -RNAi (2)	1.2 ± 0.1	2.2 ± 0.0	2.2 ± 0.1	0.71 ± 0.00	1.3 ± 0.08	2.9 ± 0.39

The chlorophyll fluorescence ratio F<sub>v</sub>/F<sub>m</sub> is the maximal yield of PSII photochemistry in dark-adapted cells. Photosynthetic oxygen evolution (after subtraction of the dark respiratory uptake) was measured in light-limited (60  $\mu$ mol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> PAR) or light-saturated (400  $\mu$ mol·m<sup>-2</sup>·s<sup>-1</sup> PAR) conditions.







**Fig. 4.** Hydrogen evolution by sulfur-deprived cells. (A) Typical time-courses of dissolved oxygen concentration (triangles) and of the amount of gas (circles) evolved during incubation of sulfur-deprived wild-type (open symbols) and Nda-RNAi (1) cells (closed symbols) in closed photobioreactors illuminated by white light of  $200 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{s}$ . Gas chromatography analysis showed that  $\text{H}_2$  made at least 80% of the evolved gas volume in both strains. (B) Total amounts of evolved gas measured at time 120 h (averages of four experiments).

inhibition of state transition in transformed cells was due to their inability to reduce PQ in the dark when oxidative phosphorylation was inhibited by myxothiazol (Fig. 3 C and D). In dark-adapted, untreated cells, the fluorescence rise shows a rapid phase because of primary  $\text{Q}_\text{A}$  reduction in PSII followed by a slower phase because of secondary reduction of the PQ pool as a result of multiple reaction center turnover. In wild-type cells, a 30-min incubation with  $10 \mu\text{M}$  myxothiazol caused a marked increase of the relative amplitude of fast fluorescence rise phase (Fig. 3C). This shows that the PQ pool was largely reduced in the dark after myxothiazol addition. In Nda2-RNAi cells, this effect of myxothiazol was not observed: The relative amplitude of the fast phase of the fluorescence rise was only slightly increased compared with untreated cells (Fig. 3D). These results show that Nda2 is involved in nonphotochemical PQ reduction under restricted oxidative phosphorylation, which explains the inhibition of state transition in Nda2-RNAi cells in these conditions.

**Sustained Hydrogen Photoevolution Under Sulfur Deficiency Is Largely Dependent on Nda2.** Sulfur-deprivation has been shown to limit PSII activity while keeping respiration unaffected in *C. reinhardtii* cultures. As a result, sealed cultures become anaerobic within approximately one day in the light and then start to generate hydrogen gas in a sustained manner (22). Under these conditions, electrons for proton reduction are thought to be supplied by a combination of two pathways: water photolysis because of the remaining PSII activity and nonphotochemical PQ reduction by a putative NAD(P)H dehydrogenase (24). Because Nda2-RNAi transformants showed decreased ability for nonphotochemical PQ reduction, it was of interest to check whether the transformed cells were also affected in their ability to generate hydrogen under standard sulfur-deprivation protocol. As Fig. 4 shows, sulfur-deprived Nda2-RNAi or wild-type cultures became anaerobic ( $\text{O}_2$  concentrations lower than the sensitivity limit of the electrode) after  $\approx 12$  h when placed in a closed photobioreactor. This was due to a strong decrease of PSII

efficiency, which was observed in both cell lines [maximal PSII efficiency dropped to  $\approx 0.3$  (data not shown)]. In wild type,  $\text{H}_2$  gas evolution started shortly after anaerobiosis and maintained a high steady-state rate of  $1.5\text{--}1.6 \text{ ml}/\text{h}$  during  $\approx 30$  h, then the evolution rate progressively declined. In Nda2-RNAi 1 cultures, the rate of  $\text{H}_2$  evolution showed maximal values similar to that of wild type shortly after anaerobiosis, but declined much faster than in wild type. As a result, the total amount of  $\text{H}_2$  gas produced was in average 50% lower in transformed cells. Similar results were obtained with Nda2-RNAi 2 cultures (data not shown).

## Discussion

Previous studies on *C. reinhardtii* and other green microalgae have strongly suggested the occurrence of a thylakoid-bound NAD(P)H:PQ oxidoreductase in these organisms. Yet, while such enzyme was discovered in higher plants, the microalgal enzyme remained unidentified up to now. In this work, we have shown that *C. reinhardtii* transformants with undetectable expression of the nuclear *NDA2* gene by Northern blot are strongly impaired in their ability to reduce PQ nonphotochemically.

*NDA* genes code for membrane-bound, flavin-containing type II dehydrogenases, which in higher plants have been localized in mitochondria where they act as NAD(P)H:ubiquinone oxidoreductases. The *NDA2* gene is predicted to have a size of 12,347 bp with 17 exons and 16 introns (26). Alignments of Nda2 from *Chlamydomonas* with type II NAD(P)H dehydrogenases of fungi and higher plants reveal conserved domains, for example, dual motifs for dinucleotide binding (32) (Fig. S2). These regions may form the binding for the noncovalently attached FAD cofactor or the substrate [NAD(P)H] (33). In addition, a region that could correspond to an EF-hand motif involved in calcium binding is present (32) (Fig. S2). Plant type II NAD(P)H dehydrogenases can be grouped into three classes upon phylogenetic analyses: The *NDA* and *NDB* families are closely related to fungal homologues, the *NDB* family possessing an inserted domain with more or less degenerate EF-hand motif and the *NDC* family, which clusters together with cyanobacterial proteins (14). The Nda2 protein is clearly related to fungal homologues and groups into the *NDB* family because of the presence of the EF-hand motif (Fig. S3). The *NDA2* gene is therefore suggested to have entered the cell through the mitochondrial progenitor and later moved to the nucleus, by intracellular gene transfer (34) where it acquired a presequence specifying chloroplastic targeting. The C-terminal part of the sequence is also rather well conserved between the organisms (Fig. S2) and could form a membrane attachment domain (33).

The consequences of low Nda2 activity in RNAi mutants are in line with previous studies in which nonphotochemical PQ reduction was suggested to be part of various processes. The fluorescence transient after strong illumination is interpreted as an after-effect of cyclic electron flow, as excess NADPH generated in the light at the reducing side of PSI is used to reduce the PQ pool. Therefore, the acceleration of the postillumination fluorescence decrease in Nda2-RNAi cells suggests that the Nda2 protein is involved in cyclic electron flow.

State transitions are initiated by changes in the PQ pool redox state (16, 17). In *C. reinhardtii*, the latter strongly varies depending on the energy status of the cell (29). In agreement with earlier findings (18, 29) wild-type cells were found here to undergo partial state II transition after myxothiazol addition, and a complete transition under anaerobiosis. In both cases, this transition was strongly inhibited in Nda2-RNAi cells. Fluorescence induction analysis demonstrated that the failure of Nda2-RNAi cells to perform complete state transition was due to their decreased ability for nonphotochemical PQ reduction. This study shows therefore that Nda2 is essential for the PQ pool to function as sensor of the cell energy status.



Recent work on anaerobic hydrogen photoproduction by sulfur-deprived *C. reinhardtii* cultures has suggested that sustained  $H_2$  production results partly from the degradation of starch, which accumulates under sulfur deficiency. Under anaerobiosis, reducing equivalents arising from starch catabolism would be redirected to the photosynthetic electron transport chain where they would be used for ATP generation coupled to  $H_2$ -producing electron transport (24). Consistent with this idea, mutants with a disrupted isoamylase gene display attenuated  $H_2$  photoproduction (35). Electron donation from NAD(P)H to PQ is regarded as the link between carbohydrate catabolism through glycolysis and the electron transport chain leading to  $H_2$  formation in the chloroplast. In this context, our results provide the first direct evidence that nonphotochemical PQ reduction, catalyzed by the NDA2-gene product, is important for  $H_2$  generation in sulfur-deprived *C. reinhardtii* cultures. Over-expressing the NDA2 gene might be promising in efforts aimed at increasing  $H_2$ -photoproduction yields by microalgae in view of using this process to produce renewable fuel (36).

In conclusion, our study on Nda2-RNAi cells of *C. reinhardtii* demonstrates that several processes, suspected earlier to depend on nonphotochemical PQ reduction, rely strongly on the expression of the sole NDA2 gene. We therefore propose that the Nda2 protein is the chloroplastic type II dehydrogenase that catalyzes electron donation from NAD(P)H to plastoquinone in green microalgae, which lack the chloroplastic type I dehydrogenase.

## Materials and Methods

**Strains and Growth Conditions.** Strains are derived from strain 137c of *C. reinhardtii*. Reference strains are *cw15 mt+* (reference number 25 in our stock collection) and *cw15 mt-* (reference number 84), both deficient for the cell wall. Cells were routinely grown in liquid or solid agar medium under mixotrophic conditions, that is, under moderate light ( $70 \mu E/m^2/s$ ) on Tris-acetate phosphate (TAP) medium (37). When required, cells were grown under phototrophic conditions (light + minimal medium) (37). For transformation experiments, selection was performed on TAP agar medium containing 10 mg/l hygromycin B.

**Construction of Plasmid for RNAi (pRNAi-NDA2).** The pPN10 plasmid (4,422 bp) used to express double-stranded RNA contains the 1.1-kb promoter of nitrate reductase (38) cloned in the *ApaI* and *SalI* restriction sites of pBCKS(+). The two cDNA fragments of NDA2 were cloned in opposite orientation following the strategy described below and sequenced. One fragment (1,859 bp) was amplified with primers NDA2-5F-EcoRV and NDA2-6R (Table S1) and digested by *EcoRV* and *PstI* (internal restriction site of the cDNA fragment). The 1,015-bp *EcoRV*-*PstI* fragment was cloned in pPN10 at the same restriction sites (pPN10-NDA2S). The other fragment (841 bp) was amplified with primers NDA2-7F-SpeI and NDA2-8R-PstI (Table S1). The pPN10-NDA2S was then digested by *PstI* and *SpeI* and the 841-bp fragment digested by the same enzymes was ligated, giving plasmid pRNAi-NDA2.

**Transformation of *C. reinhardtii* and Selection of RNAi Clones.** Transformation of the *cw15 mt-* strain was made by electroporation (39) with 1  $\mu g$  of pHyg3 (40) and 3  $\mu g$  of pRNAi-NDA2. Transformants selected on TAP + hygromycin b were then analyzed by PCR for the presence of the 841-bp cDNA fragment of pRNAi-NDA2 with primers NDA2-5F-EcoRV and NDA2-8R-PstI. This PCR is discriminative because the genomic fragment amplified with these primers contains a 5,917-bp intron. The percentage of cotransformation was estimated to be 25%.

**PCR, DNA, and RNA Analyses.** *C. reinhardtii* total nucleic acids were prepared as described in ref. 41. PCR fragments were amplified from total DNA, a cDNA library or directly on *Chlamydomonas* colonies as described in ref. 41. Sequencing of amplified products or cloned fragments was performed by Genome Express. RNA blot analyses were performed according standard protocols. Digoxigenin-labeled PCR products were used as gene probes and detected with anti-digoxigenin-AP conjugates and CPD-Star as substrate (Roche). List of primers used to synthesize probes are listed in Table S1.

**Mitochondria and Chloroplast Isolation.** Crude mitochondrial fraction was obtained according to (42) and loaded on a discontinuous 13%/21%/45% Percoll gradient in MET Buffer (Mannitol 280 mM, Tris-HCl pH 7.10 mM, EDTA 0.5 mM, and 0.1% BSA). Purified mitochondria were recovered at the 21/45 interface and washed two times in MET buffer by 10-min centrifugation at

11,000  $\times g$ . Final pellet was suspended in 20 mM Hepes-KOH (pH 7.2), 150 mM mannitol, 0.8 mM EDTA, and 4 mM MgCl<sub>2</sub>. Percoll-purified chloroplasts were isolated as described in ref. 43 except that a nebulizer (BioNeb, Cell disruption System, Glas-Col) was used for cell disruption.

**Protein Analyses.** The protein content was determined by the Bradford method. Equal amounts (35  $\mu g$ ) of mitochondria and chloroplasts were loaded on 10% SDS-gels and electroblotted according to standard protocols on PVDF membranes (Amersham GE Healthcare). Immunodetection was performed by using the BM Chemiluminescence Western blotting kit (Roche) with anti-rabbit peroxidase-conjugated antibodies. The following antisera raised in rabbits were used: polyclonal antibodies raised against *C. reinhardtii* Aox1, Nda2, or cytochrome F proteins at dilution 1:54,000, 1:10,000, and 1:1,000, respectively.

**Production of an Antibody Against the Nda2 Protein.** Total RNA was isolated from TAP cultures of *C. reinhardtii* with the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen). First-strand cDNA synthesis was performed by using Omniscript<sup>TM</sup> Reverse Transcriptase system (Qiagen). cDNAs were amplified by PCR with Turbo *Pfu* polymerase enzyme (Stratagene) using primers NDA2-1A and NDA2-1B. For cloning purpose, *EcoRI* and *SmaI* sites were respectively inserted upstream and downstream the start and the stop codons and a (His)<sub>6</sub>-tag coding sequence was added right upstream the start codon by using primers NDA2-1A-*EcoRI* and NDA2-1B-*SmaI* (Table S1) for amplification of NDA2 cDNA. The amplified fragment was digested by *EcoRI* and *SmaI*, and ligated into a digested pSD80 plasmid (44). After transformation of *E. coli* (strain DH10i<sup>2</sup>) by the resultant plasmid (pSD80-NDA2) and selection on ampicillin (100  $\mu g/ml$ ), bacterial strains were screened by PCR by using NDA2-1A and NDA2-1B primers. Bacterial cells expressing His-tagged Nda2 were grown at 37°C in a LB medium supplemented with ampicillin to an OD<sub>600</sub> of 0.5. After induction by 100  $\mu M$  IPTG and overnight culture at room temperature, bacteria were pelleted by centrifugation and lysed by using a French press (16,000 p.s.i.) in a buffer containing 25 mM imidazole (pH 7.5), 20 mM amine-triethanol, 500 mM NaCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride, and 1 mM benzimidazole. The supernatant was recovered by centrifugation (12,000  $\times g$  for 20 min) and used for further purification of His-tagged Nda2 by metal-chelating chromatography. A rabbit serum was raised against the purified Nda2 protein (Agro-Bio).

**Chlorophyll Fluorescence and Photosynthesis Measurements.** Post-illumination fluorescence transients were monitored by using a MFMS pulse-modulated fluorimeter (Hansatech Instruments). Analytical light was provided by light-emitting diodes at 580 nm (0.5  $\mu mol/m^2/s$ ). Actinic light at 650 nm was provided by light-emitting diodes (25-nm half band-width). Cell suspensions were dark-adapted aerobically in minimal medium for 2 h before measurements.

Oxygen evolution was measured with a Hansatech Oxygen Electrode System using the same actinic light as above.

Low temperature (77 K) emission spectra were measured with a LS50B luminescence spectrometer (Perkin-Elmer) under 440-nm excitation light, using a Chl (a+b) concentration of  $5 \pm 1 \mu g/ml$ . Spectra were corrected for wavelength-dependent variations of photomultiplier sensitivity and were normalized to 685 nm. For anaerobic treatment, 40 units/ml glucose oxidase, 40 units/ml catalase and 6 mM glucose were added to the suspension.

Fast fluorescence rise kinetics associated with PQ photoreduction were recorded by using a home-made equipment. Fluorescence was measured at 685 nm under actinic excitation light at 633 nm (200  $\mu mol/m^2/s$ ). Time resolution at the onset of light was 1 ms.

**Hydrogen Evolution Measurements.** Cells were grown in TAP medium supplemented with 10 mM NaHCO<sub>3</sub> under 250  $\mu mol/m^2/s$  white light, until a cell density of  $9 \times 10^6$  cells per ml was reached. Cells were then washed and resuspended in sulfur-deplete TAP medium. After a further 24-h aerobic incubation in light, cell suspensions were transferred to a photobioreactor set-up, in which simultaneous monitoring of  $H_2$  photoproduction by wild-type and transformed cells (each in duplicate) was performed. The experimental set-up included four parallel tubular reactors, in which algal suspensions (640 ml per reactor) were continuously stirred by a moving glass ball. For this purpose, the reactors were fixed on an oscillating table. Each reactor was equipped with a home-made Clark-type electrode for continuous O<sub>2</sub> concentration monitoring, and with a home-made gasometer for measurements of evolved gas volumes at atmospheric pressure. White light intensity was 200  $\mu mol/m^2/s$  and temperature was 24°C. Analysis of evolved gas samples was performed with a HP 5890 Series II chromatograph.

**ACKNOWLEDGMENTS.** We thank M. Radoux and F. Magnette for expert technical assistance, Dr. S. Hilligsmann for gas chromatography measurements, Dr. R. Matagne for critical reading of the manuscript, and Dr. S. Merchant

(University of California, Los Angeles) for the kind gift of antibodies. This work was supported by Fonds National de la Recherche Scientifique (FNRS) Grants 2.4582.05 (to F.F. and C.R.), 1.5.255.08 and 2.4638.05 (to C.R.), 1.5.204.06.F (to F.F.), Fonds Spéciaux ULG (to C.R.), and Action de Recherche Concertée ARC07/12-04 (to F.F., C.R., and E.M.). The French Agence Nationale pour la Recherche

(PHOTOBIOH2 project) and the European FP7-Energy-RTD program (SOLARH2 project no. 212508) are acknowledged for financial support (S.C., L.C., and G.P.). F.J. and P.A.H. are supported by Fonds pour la formation à la Recherche dans l'Industrie et dans l'Agriculture. P.C. and F.F. are research associate and senior research associate of the FNRS, respectively.

1. Bennoun P (1982) Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proc Natl Acad Sci USA* 79:4352–4356.
2. Godde D, Trebst A (1980) NADH as electron donor for the photosynthetic membrane of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Arch Microbiol* 127:245–252.
3. Peltier G, Courmac L (2002) Chlororespiration. *Annu Rev Plant Biol* 53:523–550.
4. Shimada H, Ugiura M (1991) Fine structural features of the chloroplast genome: Comparison of the sequenced chloroplast genomes. *Nucleic Acids Res* 19:983–995.
5. Shinozaki K, et al. (1986) The complete nucleotide sequence of the tobacco chloroplast genome: Its gene organization and expression. *EMBO J* 5:2043–2049.
6. Munekage Y, et al. (2004) Cyclic electron flow around photosystem I is essential for photosynthesis. *Nature* 429:579–582.
7. Sazanov LA, Burrows PA, Nixon PJ (1998) The chloroplast Ndh complex mediates the dark reduction of the plastoquinone pool in response to heat stress in tobacco leaves. *FEBS Lett* 429:115–118.
8. Rumeau D, Peltier G, Courmac L (2007) Chlororespiration and cyclic electron flow around PSI during photosynthesis and plant stress response. *Plant Cell Environ* 30:1041–1051.
9. Carol P, et al. (1999) Mutations in the Arabidopsis gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell* 11:57–68.
10. Courmac L, et al. (2000) Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *J Biol Chem* 275:17256–17262.
11. Robbens S, Derelle E, Ferraz C, Wuyts J, Moreau H, Van de Peer Y (2007) The complete chloroplast and mitochondrial DNA sequence of *Ostreococcus tauri*: Organelle genomes of the smallest eukaryote are examples of compaction. *Mol Biol Evol* 24:956–968.
12. Mus F, Courmac L, Cardellini V, Caruana A, Peltier G (2005) Inhibitor studies on non-photochemical plastoquinone reduction and H<sub>2</sub> photoproduction in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 1708:322–332.
13. Rasmusson AG, Geisler DA, Moller IM (2008) The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. *Mitochondrion* 8:47–60.
14. Michalecka AM, et al. (2003) Arabidopsis genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light. *Plant Physiol* 133:642–652.
15. Elhafez D, Murcha MW, Clifton R, Soole KL, Day DA, Whelan J (2006) Characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in Arabidopsis: Intraorganelle location and expression. *Plant Cell Physiol* 47:43–54.
16. Wollman FA (2001) State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *EMBO J* 20:3623–3630.
17. Rochaix JD (2007) Role of thylakoid protein kinases in photosynthetic acclimation. *FEBS Lett* 581:2768–2775.
18. Finazzi G, Furia A, Barbagallo RP, Forti G (1999) State transitions, cyclic and linear electron transport and photophosphorylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 1413:117–129.
19. Cardol P, Gloire G, Havaux M, Remacle C, Matagne R, Franck F (2003) Photosynthesis and state transitions in mitochondrial mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* affected in respiration. *Plant Physiol* 133:2010–2020.
20. Gaffron H, Rubin J (1942) Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *J Gen Physiol* 26:219–240.
21. Happe T, Naber JD (1993) Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem* 214:475–481.
22. Melis A, Zhang L, Forestier M, Ghirardi ML, Seibert M (2000) Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol* 122:127–136.
23. Ghirardi ML, Togasaki RK, Seibert M (1997) Oxygen sensitivity of algal H<sub>2</sub>-production. *Appl Biochem Biotech* 63:141–151.
24. Melis A (2007) Photosynthetic H<sub>2</sub> metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* (unicellular green algae). *Planta* 226:1075–1086.
25. Zhang L, Happe T, Melis A (2002) Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and H<sub>2</sub>-producing *Chlamydomonas reinhardtii* (green alga). *Planta* 214:552–561.
26. Merchant SS, et al. (2007) The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science* 318:245–250.
27. Bennoun P (2001) Chlororespiration and the process of carotenoid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* 1506:133–142.
28. Joet T, Genty B, Josse EM, Kuntz M, Courmac L, Peltier G (2002) Involvement of a plastid terminal oxidase in plastoquinone oxidation as evidenced by expression of the Arabidopsis thaliana enzyme in tobacco. *J Biol Chem* 277:31623–31630.
29. Bulté L, Gans P, Rebeillé F, Wollman FA (1990) ATP control on state transitions in vivo in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* 1020:72–80.
30. Rebeillé F, Gans P (1988) Interaction between Chloroplasts and Mitochondria in Microalgae: Role of Glycolysis. *Plant Physiol* 88:973–975.
31. Wollman FA, Delepelaire P (1984) Correlation between changes in light energy distribution and changes in thylakoid membrane polypeptide phosphorylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* 98:1–7.
32. Rasmusson AG, Svensson AS, Knoop V, Grohmann L, Brennicke A (1999) Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive NADH dehydrogenases in higher eukaryotes: Two enzymes are present in potato mitochondria. *Plant J* 20:79–87.
33. Kerscher SJ (2000) Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta* 1459:274–283.
34. Martin W, Herrmann RG (1998) Gene transfer from organelles to the nucleus: How much, what happens, and Why? *Plant Physiol* 118:9–17.
35. Posewitz MC, Smolinski SL, Kanakagiri S, Melis A, Seibert M, Ghirardi ML (2004) Hydrogen photoproduction is attenuated by disruption of an isomylase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* 16:2151–2163.
36. Melis A, Happe T (2001) Hydrogen production. Green algae as a source of energy. *Plant Physiol* 127:740–748.
37. Harris E (1989) *The Chlamydomonas sourcebook* (Academic, San Diego, California).
38. Loppes R, Radoux M (2001) Identification of short promoter regions involved in the transcriptional expression of the nitrate reductase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol* 45:215–227.
39. Shimogawara K, Fujiwara S, Grossman A, Usuda H (1998) High-efficiency transformation of *Chlamydomonas reinhardtii* by electroporation. *Genetics* 148:1821–1828.
40. Berthold P, Schmitt R, Mages W (2002) An engineered *Streptomyces hygrosopicus* aph 7" gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist* 153:401–412.
41. Remacle C, Cardol P, Coosemans N, Gaisne M, Bonnefoy N (2006) High-efficiency biolistic transformation of *Chlamydomonas* mitochondria can be used to insert mutations in complex I genes. *Proc Natl Acad Sci USA* 103:4771–4776.
42. Cardol P, Matagne RF, Remacle C (2002) Impact of mutations affecting ND mitochondrial-encoded subunits on the activity and assembly of complex I in *Chlamydomonas*. Implication for the structural organization of the enzyme. *J Mol Biol* 319:1211–1221.
43. Goldschmidt-Clermont M, Malnoë P, Rochaix JD (1989) Preparation of *Chlamydomonas* chloroplasts for the in vitro import of polypeptide precursors. *Plant Physiol* 89:15–18.
44. Patel AM, Dunn SD (1995) Degradation of *Escherichia coli* uncB mRNA by multiple endonucleolytic cleavages. *J Bacteriol* 177:3917–3922.

## **11. Discussion**

### **11.1. Etude de la famille génétique des NAD(P)H déshydrogénases de type II chez l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii***

Les NAD(P)H déshydrogénases de type II sont des enzymes de faible poids moléculaire (40 à 65 kDa) capables d'oxyder le NAD(P)H et de transférer les électrons à un groupement quinone (plastoquinone ou ubiquinone) (Jaworowski *et al.*, 1981-a ; 1981-b ; de Vries et Grivell 1988, Michalecka *et al.*, 2003, Melo 1999). On les appelle « de type II » par opposition aux déshydrogénases de type I qui correspondent au complexe I mitochondrial. Ces enzymes ont été mises en évidence dans des organismes procaryotes, des levures (de Vries et Grivell, 1988 ; Melo *et al.*, 2001), des plantes supérieures (Menz et Day, 1996 ; Ohyanagi *et al.*, 2006 ; Rasmusson *et al.* 1999 ; Michalecka *et al.*, 2003), mais pas chez les animaux. Chez *Arabidopsis thaliana*, des protéines Ndh-II ont été identifiées sur les faces interne et externe de la membrane interne mitochondriale (Michalecka *et al.*, 2003 ; Elhafez *et al.*, 2006), sur la membrane des peroxysomes, et au niveau de la membrane interne du chloroplaste (Carrie *et al.*, 2008). Il a également été mis en évidence qu'une co-localisation était possible pour certaines protéines Ndh-II (mitochondrie / peroxysome ou mitochondrie / chloroplaste) (Carrie *et al.*, 2008).

En 2005, une activé NAD(P)H déshydrogénase de type II a été mise en évidence au sein du chloroplaste de *Chlamydomonas* par méthode biochimique (Mus *et al.*, 2005). Cette même année, le docteur Pierre Cardol a publié les séquences de 7 gènes encodant des NAD(P)H déshydrogénases de type II chez *Chlamydomonas* (*NDA1* à 7) (Cardol *et al.*, 2005). Les séquences proposées pour ces gènes étaient cependant incomplètes du fait de lacunes dans la deuxième version du séquençage du génome de l'algue.

Les données récoltées au cours de ce travail a) par analyses des EST disponibles, b) par séquençage de fragments de PCR obtenus au laboratoire, c) par alignement avec des gènes *NDH-II* d'autres espèces et d) par comparaison avec la troisième version du séquençage du génome de *Chlamydomonas* publiée en 2007, ont permis l'obtention d'une version complète de la séquence codante des gènes *NDA* de *Chlamydomonas*. Ces analyses ont par ailleurs démontré que le gène putatif *NDA4* correspondait, en fait, à des régions internes non attribuées au gène *NDA2*.



Une figure reprenant la structure des gènes *NDA* est donnée à la page 66 de cet ouvrage. A l'inverse des gènes *NDH-II* de plantes supérieures, les gènes *NDA* de *Chlamydomonas* ne semblent pas organisés suivant une structure conservée. Seuls les gènes *NDA6* et *NDA7* présentent une organisation en partie voisine ; les quatre premiers exons de ces gènes présentent une taille identique ou proche (voir figure 10.8, page 66). Il apparaît également que les protéines encodées par *NDA6* et 7 sont relativement proches (71,5% d'homologie et 57% d'identité). Les deux gènes étant positionnés l'un à côté de l'autre dans le génome de l'algue, il est probable que l'un résulte d'une duplication récente de l'autre. Nos analyses ont par ailleurs montré que la taille de la séquence codante du gène *NDA7* est plus petite que celle des autres gènes *NDA* et que celle de *NDA6* en particulier, ce qui pourrait suggérer que c'est *NDA7* qui serait la copie la plus récente. De plus, nous avons pu mettre l'expression du gène *NDA6* en évidence au cours de notre travail, mais pas celle de *NDA7*. L'expression du gène *NDA7* a cependant été mise en évidence en 2008 par Nguyen *et al.*, dans le transcriptome d'une souche de *Chlamydomonas* soumise à une carence en soufre et en anaérobiose stricte (Nguyen *et al.*, 2008), suggérant que l'expression de *NDA7* est restreinte à certaines conditions.

#### **11.1.1. Classification des gènes *NDA* de *Chlamydomonas***

Chez *Arabidopsis thaliana*, Michalecka *et al.* ont proposé une corrélation entre le positionnement phylogénétique des gènes *NDH-II* et la localisation subcellulaire de la protéine correspondante (Michalecka *et al.*, 2003). Les analyses phylogénétiques réalisées sur les gènes *NDH-II* jusqu'à présent ont mis en évidence l'existence de plusieurs catégories phylogénétiques (Michalecka *et al.*, 2003 ; Bernard *et al.*, 2006 ; Desplats *et al.*, 2009). Les protéines Ndh-II identifiées au niveau de la membrane interne mitochondriale se positionnent dans un seul clade. Celui-ci peut se subdiviser en trois sous-clades : NDA, NDB et levure (voir figure 10.16, page 76). Les clades NDA et NDB comprennent majoritairement des protéines identifiées chez des plantes supérieures, ainsi que quelques protéines de levures. Chez les plantes, les protéines de la famille NDB se différencient des protéines du clade NDA par la présence dans leur séquence d'un motif EF-Hand impliqué dans la fixation du calcium. La présence de ce motif semble déterminer la localisation de la protéine. Les enzymes de la famille NDA étudiées ont été localisées sur la face interne de la membrane mitochondriale, tandis que celles de la famille NDB ont été localisées sur la face externe (Rasmusson et Agius, 2001 ; Rasmusson *et al.*, 1999 ; Michalecka *et al.*, 2003 ; Elhafez *et al.*, 2006 ; Vidi *et al.*, 2006 ; Ytterberg *et al.*, 2006 ; Carrie *et al.*, 2008). Le troisième sous-clade « levure »

comporte uniquement des protéines de levures qui se positionnent sur les faces interne ou externe de la membrane mitochondriale. Les autres protéines se positionnent dans un autre clade dit procaryotique. Celui-ci se subdivise également en trois sous-clades : famille A, B et C. La famille A regroupe la plupart des eubactéries connues, tandis que la famille C comprend des protéines de cyanobactéries et des protéines chloroplastiques de plantes supérieures. La famille B comprend un mélange d'eubactéries et de cyanobactéries (voir page 76).

L'analyse phylogénétique des séquences des protéines Nda confirme que cette organisation différente reflète bien une évolution distincte. Il apparaît que les protéines nda1, 2 et 3 se positionnent toutes trois dans le clade eucaryote. Plus précisément, la protéine Nda2 présente une appartenance à la famille NDB et la protéine Nda1 à la famille NDA. La protéine Nda3 se positionne quant à elle dans le sous-clade levure. Par comparaison avec les plantes supérieures, ces données suggéreraient que ces protéines devaient être mitochondriales. La protéine Nda5 se positionne dans la famille procaryotiques C, ce qui ferait de cet enzyme un bon candidat pour une localisation chloroplastique.

Enfin, l'analyse positionne les protéines Nda6 et 7 à l'extérieur des familles proposées par Michalecka *et al.*, et Bernard *et al.*, (voir figure 3.16, page 76). Cette région de l'arbre comprend cependant une série de protéines d'organismes procaryotiques pouvant former un nouveau clade. La technique utilisée pour la réalisation de notre arbre ne permet pas de proposer une classification dans le temps des différentes familles, mais nous renseigne sur le positionnement des clades les uns par rapport aux autres. Ce positionnement indique que le clade comprenant Nda6 et 7 présente une localisation intermédiaire entre le clade eucaryotique et le clade procaryotique. Les organismes dont proviennent les enzymes de ce clade (*A. ambivalens*, *C. Hutchinsonii*, *R. sphaeroides*, *Halobacterium*, *B. subtilis* et *D. radiodupans*) indiquent que ce clade est à classer dans la famille procaryotique. Cependant, la proximité de ce clade avec le clade eucaryotique suggère qu'il pourrait représenter

- soit l'ancêtre commun aux deux clades procaryote et eucaryote,
- soit la famille procaryotique dont est directement originaire le clade eucaryotique.

Quoi qu'il en soit, ces données nous permettent de proposer l'existence d'une nouvelle famille phylogénétique, directement antérieure à la création du clade eucaryotique. Etant donné qu'aucune protéine de ce clade n'a été identifiée chez les plantes supérieures, il est difficile de proposer une localisation subcellulaire pour les enzymes de ce clade. Une localisation mitochondriale est cependant plus probable puisque ce sont des procaryotes non photosynthétiques qui composent ce clade.



L'analyse de ce motif chez les protéines Nda de *Chlamydomonas* suggère que les protéines Nda1 et Nda2 seraient spécifiques au NADH, tandis que Nda3 serait spécifique au NADPH. La spécificité de Nda2 pour le NADH récemment a été confirmée expérimentalement par Desplats *et al.* (2009). Pour ce faire, Desplats *et al.* ont fait produire Nda2 par *E. coli* et ont mesuré la cinétique d'oxydation du NADH ou du NADPH en présence de Nda2 purifiée.

Les protéines Nda5, 6 et 7 de *Chlamydomonas* semblent bien posséder le motif de fixation du dinucléotide (deux feuilletts  $\beta$  encadrant une hélice  $\alpha$ ), mais on n'y retrouve pas les deux acides aminés de spécificité (voir figure 11.1, page précédente). Cette différence confirme que ces protéines appartiennent à un clade particulier comme évoqué au point 11.1.2 page 103.

- Fixation du groupement FAD

Le site de fixation du groupement FAD répertorié par Michalecka *et al.* (2003) au niveau des protéines Nda de plantes supérieures, est présent dans toutes les protéines Nda de *Chlamydomonas*. Cependant, Desplats *et al.* (2009) ont pu montrer par analyse HPLC d'une protéine Nda2 purifiée, qu'elle comprendrait non pas un cofacteur FAD, mais bien un cofacteur FMN. Jusqu'à présent, la présence d'un groupement FMN dans une enzyme Ndh-II n'a été rapportée que pour quelques organismes (*Sulfolobus metallicus*, Bandejas *et al.*, 2002, *A. ambivalens*, Brito *et al.*, 2006 ; *T. brucei*, Fang et Beattie, 2002). Etant donné le motif de fixation d'un groupement FAD identifié dans la séquence de la protéine Nda2, la découverte d'un cofacteur FMN est étonnante. Desplats *et al.* indiquent cependant que les motifs de fixation d'un groupement FMN ou FAD pourraient être très proches du point de vue de la séquence, mais pourraient différer structurellement (Wang *et al.*, 1997).

- Fixation du calcium

Le site de fixation du calcium, spécifique du clade phylogénétique NDB, se retrouve de manière claire uniquement pour la protéine Nda2. Cette donnée confirme l'analyse phylogénétique effectuée.

- Fixation de la quinone

L'interaction des protéines Ndh-II avec le groupement quinone n'a jusqu'à présent pas été citée dans la littérature. Cependant, Fisher et Rich ont mis en évidence en 2000 un motif présent chez plusieurs protéines interagissant avec des quinones. Ce motif se retrouve de manière claire pour les protéines Nda2 et Nda5 de *Chlamydomonas*, et de manière moins

conservée pour les protéines Nda1 et 3. Il est par contre totalement absent des protéines Nda6 et 7, bien que la région protéique correspondante soit relativement conservée pour toutes les protéines Nda de *Chlamydomonas* (voir figure 10.9 page 67).

- Interaction avec la membrane

Il a été suggéré que la région C-terminale des protéines Ndh-II servirait d'ancrage dans la membrane, du fait de son caractère hydrophobe (Rapisarda *et al.*, 2002 ; Bernard *et al.*, 2006 ; Kerscher *et al.*, 2000). Les régions C-terminales des protéines Nda de *Chlamydomonas* présentent bien une hydrophobicité importante, ce qui tendrait à confirmer la fonction de cette région protéique.

### **11.1.3. Etude d'expression des gènes NDA de *Chlamydomonas***

La consultation des banques d'EST disponibles de *Chlamydomonas* nous apprend tout d'abord que tous gènes de NAD(P)H déshydrogénases identifiées sont tous effectivement exprimés. Des analyses réalisées par northern blotting ont par ailleurs permis l'obtention d'un signal net pour le gène *NDA2* et d'un signal très faible pour le gène *NDA6*. La littérature ne contient cependant aucun exemple où cette technique a fonctionné sur les gènes *NDH-II*, probablement du fait de la difficulté de la technique à mettre en évidence les très faibles expressions de ces gènes (Ma *et al.*, 2001 ; Tepperman *et al.*, 2001).

Nous avons ensuite testé l'expression de ces gènes par RT-PCR. Cette technique a permis la mise en évidence de l'expression des gènes *NDA1*, 2, 3 et 6. L'expression du gène *NDA5* a par ailleurs été obtenue par amplification d'un fragment interne à partir d'une banque de cDNA phagique disponible au laboratoire. Seule l'expression du gène *NDA7* n'a pas pu être détectée, ni par RT-PCR, ni par PCR sur banque de cDNA phagique. Comme dit précédemment, l'expression de *NDA7* a cependant été détectée par RT-PCR en condition de carence en soufre et en anaérobiose stricte (Nguyen *et al.*, 2008)..

En résumé, nos données témoignent de l'expression apparemment majoritaire du gène *NDA2*. Le gène *NDA6* semble également présenter une expression plus importante que les autres gènes de cette famille. A l'inverse, l'expression du gène *NDA5* semble plus difficile à mettre en évidence. Il n'est cependant pas certain que cette difficulté témoigne d'une expression plus faible du gène, ou d'une impossibilité technique du fait du haut pourcentage en GC de la séquence codante du gène. Un haut pourcentage en GC peut en effet rendre inopérantes les polymérase et reverse transcriptase qui permettent l'amplification des brins d'ADN et d'ARN.



#### **11.1.4. Localisation des protéines Nda de *Chlamydomonas***

Par analogie avec la situation observée chez les plantes supérieures, où une bonne corrélation existe entre le positionnement phylogénétique et la localisation subcellulaire, il était probable que la protéine Nda2 présente une localisation mitochondriale. Suivant cette même logique, la protéine Nda5 pourrait présenter une localisation chloroplastique ou une double localisation chloroplastique et mitochondriale.

Pour confirmer ces hypothèses, nous avons envisagé une localisation des protéines Nda2, Nda5 par fusion de leur séquence codante avec une séquence encodant une protéine fluorescente. Une telle stratégie a déjà permis de déterminer la localisation subcellulaire de diverses protéines de *Chlamydomonas* (Fuhrmann *et al.*, 1999; Lechtreck *et al.*, 2002), notamment chloroplastiques (Nishiyama *et al.*, 2002; Komine *et al.*, 2002). Cette stratégie n'a cependant fourni aucun résultat. Malgré l'obtention de plusieurs transformants ayant inclus des constructions chimériques *NDA2-GFP* et *NDA5-GFP*, ceux-ci n'exprimaient pas la protéine correspondante. Plusieurs raisons peuvent expliquer l'absence d'une Gfp dans les transformants : problème de repliement de la protéine chimérique, problème au niveau de l'expression du transcript, ou encore une dégradation rapide suite à un défaut d'adressage. Ce genre de stratégie reste cependant aléatoire. Seul ~1/3 des constructions réalisées par le professeur Lechtreck (Université du Massachusetts) ont donné des résultats probants (K. F. Lechtreck, communication personnelle).

Nous avons dès lors décidé d'utiliser une autre stratégie. Nous avons envisagé de déterminer la localisation des protéines Nda en modifiant leur expression par RNA interférence. L'analyse du phénotype des mutants déficients obtenus pourrait nous donner une indication de la localisation des protéines. La technique de RNA interférence a tout d'abord été utilisée sur le gène *NDA2*. Ce gène a été choisi sur base de son expression aisément détectable. Deux transformants qui présentaient une disparition totale de l'expression de *NDA2* furent identifiés. L'analyse du phénotype de ces mutants a clairement montré une localisation chloroplastique pour la protéine Nda2 (voir pages 90 à 95). Cette localisation chloroplastique a récemment été confirmée par Desplats *et al.*, (2009) par western blotting.

Cette localisation peut sembler tout à fait étonnante si l'on considère les données obtenues précédemment. Les analyses phylogénétiques, et l'analyse du signal d'adressage suggéraient une protéine mitochondriale. On peut supposer que les caractéristiques « mitochondriales » du gène peuvent s'expliquer par son introduction dans la cellule via l'organisme précurseur de la mitochondrie. Le gène pourrait ensuite s'être déplacé depuis le génome mitochondrial vers le génome nucléaire par un mécanisme de transfert nucléaire

(Martin et Herrmann, 1998). Lors de ce transfert, le gène *NDA2* pourrait avoir acquis une préséquence d'adressage chloroplastique. Cette suite d'évènements expliquerait les caractéristiques du gène *NDA2*, ainsi que la localisation subcellulaire de la protéine Nda2.

Fait très intéressant, le doctorant Renaud Lecler a récemment démontré par analyse d'un mutant obtenu par RNA interférence que la protéine Nda3 est également chloroplastique (communication personnelle Renaud Lecler ; Terashima *et al.*, 2010), tandis que la protéine Nda1 est mitochondriale. Les trois gènes *NDA1*, *NDA2* et *NDA3* sont proches phylogénétiquement, mais ne présentent pas d'homologie particulière. Deux scénarii sont possibles pour expliquer les localisations des protéines Nda1 et 3 :

- Soit les gènes *NDA1* et *NDA3* ont également été introduits dans la cellule par l'intermédiaire du précurseur mitochondrial. Le gène *NDA3* aurait subi la même suite d'évènements que le gène *NDA2* tandis que le gène *NDA1* aurait uniquement été transféré dans le noyau sans modification de son « adressage » mitochondrial.
- Soit les gènes *NDA1*, *NDA2* et *NDA3* sont des duplications très anciennes d'un seul ancêtre commun introduit dans la cellule. La duplication de *NDA2* et 3 serait donc postérieure à l'acquisition d'une préséquence chloroplastique pour ces gènes.

Quel que soit le scénario réel, ces découvertes indiquent clairement que le lien entre l'origine phylogénétique et la localisation subcellulaire observée pour les plantes supérieures n'est pas applicable à *Chlamydomonas*. Cette divergence peut provenir d'une pression évolutive différente. Les plantes supérieures possèdent un complexe Ndh, homologue du complexe I mitochondrial, dans leur chloroplaste (voir point 5.4, page 30). La fonction des Ndh-II est donc probablement redondante avec ce complexe. Par contre, *Chlamydomonas* est dépourvu du complexe Ndh. Il est possible que l'apport des protéines Nda au sein du chloroplaste ait rempli une fonction dont *Chlamydomonas* ne disposait pas. Cet apport a pu présenter un atout évolutif qui a stabilisé cette mutation. La fonction NAD(P)H déshydrogénase mitochondriale est assurée par la protéine Nda1 et éventuellement Nda6 et 7.

En conclusion pour cette partie du travail, nous avons pu confirmer l'existence de 6 gènes encodant des protéines ayant toutes les caractéristiques de NAD(P)H déshydrogénases et les séquences de ces gènes sont désormais complètes. Le travail réalisé au cours de cette thèse a directement permis la localisation chloroplastique de la protéine Nda2. Nous avons également pu proposer l'existence d'un nouveau clade phylogénétique intermédiaire entre les clades eucaryotique et procaryotique proposés par Michalecka *et al.* (2003) et Bernard *et al.* (2006).

## **11.2. Etude de la fonction d'une déshydrogénase chloroplastique**

L'existence d'une activité NAD(P)H déshydrogénase dans le chloroplaste de *Chlamydomonas* a été démontrée en 2005 par des mesures de flux d'électrons photosynthétiques en présence d'inhibiteurs du photosystème II, de la chaîne respiratoire et des Ndh-II (Mus *et al.*, 2005). Au cours de ce travail, deux mutants présentant une forte réduction de l'expression du gène *NDA2* ont été obtenus. L'étude des variations de la fluorescence chlorophyllienne des deux mutants montre que la capacité de ces mutants à réduire de manière non-photochimique le pool de plastoquinones est largement diminuée (voir point 10.6.2, page 92). Le suivi des modifications de la distribution de l'énergie d'excitation entre les deux photosystèmes à la suite d'une inhibition de la respiration montre également que la capacité des deux mutants à passer de l'état 1 à l'état 2 photosynthétique (voir point 5.2.2, page 25) est également diminuée. Les transitions d'états sont initiés par des changements de l'état rédox du pool de plastoquinones (Wollman, 2001 ; Rochaix, 2007), lui-même en équilibre avec l'état rédox de la cellule (Bulté *et al.*, 1990). Dans ce cadre, la protéine Nda2 pourrait servir de « senseur » du métabolisme de l'algue et permettrait d'adapter les flux de transport d'électrons chloroplastiques en fonction des besoins. En cas de libération suffisante d'ATP par la mitochondrie, le potentiel rédox de la cellule reste faible. Le NADH libéré par le cycle de Krebs étant consommé dans la phosphorylation oxydative. Si le rendement de la phosphorylation oxydative diminue, en condition anaérobie par exemple, le NADH s'accumule dans la cellule. Dans ces conditions, la protéine Nda2, ainsi que peut-être la protéine Nda3, permettraient l'oxydation du NADH en excès en injectant les électrons dans la chaîne photosynthétique. Le passage à l'état 2 consécutif à la réduction du pool de plastoquinones par les protéines Nda pourrait participer à l'établissement d'une voie cyclique majoritaire de transport d'électrons autour du photosystème I et du cytochrome b6/f (Wollman *et al.*, 2001 ; Finazzi *et al.*, 1999), ce qui est favorable à la synthèse d'ATP.

Ces dernières années, plusieurs études ont mis en évidence le rôle de l'amidon comme l'une des sources d'électrons pour la production d'hydrogène par *Chlamydomonas* (voir introduction, page 34). L'amidon, par l'intermédiaire de la glycolyse, permet la synthèse de NADH. Ce NADH doit ensuite être réduit et les électrons transférés à la chaîne de transport d'électrons photosynthétique. La nette diminution de production d'hydrogène par les mutants Nda2-RNAi confirme la fonction de cette protéine au sein de la cellule. Le fait que la diminution de production d'hydrogène observée pour les mutants ne soit pas totale indique que d'autres sources d'électrons sont présentes dans le chloroplaste. On peut suggérer que la protéine Nda3 complète l'action de la protéine Nda2. L'obtention de mutant Nda3 déficient,

et de double mutant Nda2/3 déficient permettrait d'avancer dans l'appréciation quantitative des flux d'électrons vers le pool de plastoquinones. De tels mutants permettraient aussi de mettre en évidence différentes voies de réduction non-photochimique des plastoquinones. Ce travail est actuellement réalisé par le doctorant Renaud Lecler dans les services des professeurs Claire Remacle et Fabrice Franck.

Par extension, la surexpression des protéines Nda2 et 3 pourrait permettre d'augmenter le flux d'électrons non-photochimiques permettant la production d'hydrogène et donc d'augmenter cette production. Cette hypothèse est actuellement testée au laboratoire de bioénergétique et biotechnologie des bactéries et microalgues de Cadarache (G. Peltier, communication personnelle). Les résultats obtenus seront, à n'en pas douter, passionnants.

## 11. Bibliographie

- ADAMS, E. & FRANK, L. 1980. Metabolism of proline and the hydroxyprolines. *Annu Rev Biochem*, 49, 1005-61.
- ALBERTSSON, P. Å., ANDREASSON, E., PERSSON, A. & SVENSSON, P. 1990. Organization of the thylakoid membranes with respect to the four photosystems, PS I  $\alpha$ , PS I  $\beta$ , PS II  $\alpha$  and PS II  $\beta$ . In: *Baltscheffsky M (ed) Current Research in Photosynthesis*. Dordrecht: Kluwer Academic Publishers.
- ALLEN, J. F. 1992. Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta*, 1098, 275-335.
- AMATI, B. B., GOLDSCHMIDT-CLERMONT, M., WALLACE, C. J. & ROCHAIX, J. D. 1988. cDNA and deduced amino acid sequences of cytochrome c from *Chlamydomonas reinhardtii*: unexpected functional and phylogenetic implications. *J Mol Evol*, 28, 151-60.
- ANDERSEN, B., SCHELLER, H. & MØLLER, B. 1992. The PSI-E subunit of photosystem I binds ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase. *FEBS Lett*, 311, 169-73.
- ARNON, D. I. & CHAIN, R. K. 1975. Regulation of ferredoxin-catalyzed photosynthetic phosphorylations. *Proc Natl Acad Sci*, 72, 4961-5.
- ASADA, K. 1999. The water-water cycle in chloroplasts: Scavenging of Active Oxygens and Dissipation of Excess Photons. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50, 601-639.
- ATLANTE, A., DE BARI, L., VALENTI, D., PIZZUTO, R., PAVENTI, G. & PASSARELLA, S. 2005. Transport and metabolism of D-lactate in Jerusalem artichoke mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1708, 13-22.
- ATTEIA, A., VAN LIS, R., WETTERSKOG, D., GUTIÉRREZ-CIRLOS, E., ONGAY-LARIOS, L., FRANZÉN, L. & GONZÁLEZ-HALPHEN, D. 2003. Structure, organization and expression of the genes encoding mitochondrial cytochrome c(1) and the Rieske iron-sulfur protein in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Genet Genomics*, 268, 637-44.
- BALL, S. G., DIRICK, L., DECQ, A., MARTIAT, J. C. & MATAGNE, R. F. 1990. Physiology of starch storage in the monocellular alga *chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Science*, 66, 1-9.
- BANDEIRAS, T., SALGUEIRO, C., KLETZIN, A., GOMES, C. & TEIXEIRA, M. 2002. Acidianus ambivalens type-II NADH dehydrogenase: genetic characterisation and identification of the flavin moiety as FMN. *FEBS Lett*, 531, 273-7.
- BARTOLI, C., PASTORI, G. & FOYER, C. 2000. Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiol*, 123, 335-44.
- BAURAIN, D., DINANT, M., COOSEMANS, N. & MATAGNE, R. 2003. Regulation of the alternative oxidase Aox1 gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. Role of the nitrogen source on the expression of a reporter gene under the control of the Aox1 promoter. *Plant Physiol*, 131, 1418-30.
- BELLAFFIORE, S., BARNECHE, F., PELTIER, G. & ROCHAIX, J. 2005. State transitions and light adaptation require chloroplast thylakoid protein kinase STN7. *Nature*, 433, 892-5.
- BEN-SHEM, A., FROLOW, F. & NELSON, N. 2003. Crystal structure of plant photosystem I. *Nature*, 426, 630-5.
- BENDALL, D. S. & MANASSE, R. S. 1995. Cyclic photophosphorylation and electron-transport. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1229, 23-38.
- BENNETT, J., SHAW, E. & MICHEL, H. 1988. Cytochrome b6/f complex is required for phosphorylation of light-harvesting chlorophyll a/b complex II in chloroplast photosynthetic membranes. *Eur J Biochem*, 171, 95-100.
- BENNOUN, P. 1982. Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 79, 4352-4356.
- BENNOUN, P. 1983. Effects of mutations and of ionophore on chlororespiration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett.*, 156, 363-65.
- BERNARD, L., DESPLATS, C., MUS, F., CUINÉ, S., COURNAC, L. & PELTIER, G. 2006. *Agrobacterium tumefaciens* type II NADH dehydrogenase. Characterization and interactions with bacterial and thylakoid membranes. *FEBS J*, 273, 3625-37.
- BERNSTEIN, E., CAUDY, A., HAMMOND, S. & HANNON, G. 2001. Role for a bidentate ribonuclease in the initiation step of RNA interference. *Nature*, 409, 363-6.
- BERTHOLD, D. A. 1998. Isolation of mutants of the *Arabidopsis thaliana* alternative oxidase (ubiquinol : oxygen oxidoreductase) resistant to salicylhydroxamic acid. *Biochimica Et Biophysica Acta-Bioenergetics*, 1364, 73-83.
- BERTHOLD, P., SCHMITT, R. & MAGES, W. 2002. An engineered *Streptomyces hygrosopicus* aph 7" gene mediates dominant resistance against hygromycin B in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Protist*, 153, 401-12.
- BISHOP, N. I. 1978. Alternate fates of the photochemical reducing power generated in photosynthesis: hydrogen production and nitrogen fixation. In: JONES, L. W. (ed.). *Curr. Top. Bioeng.*
- BOEKEMA, E. J. 2006. Association of photosystem I and light-harvesting complex II during state transitions. In: KOURIL, R., DEKKER, J.P., JENSEN, P.E. (ed.) *In: Photosystem I (Goldbeck, JH), chap 5. Adv Photosynth Respir.*
- BRAND, M. & ESTEVES, T. 2005. Physiological functions of the mitochondrial uncoupling proteins UCP2 and UCP3. *Cell Metab*, 2, 85-93.
- BRAUN, H. & SCHMITZ, U. 1995a. Are the 'core' proteins of the mitochondrial bc1 complex evolutionary relics of a processing protease? *Trends Biochem Sci*, 20, 171-5.
- BRAUN, H. & SCHMITZ, U. 1995b. The bifunctional cytochrome c reductase/processing peptidase complex from plant mitochondria. *J Bioenerg Biomembr*, 27, 423-36.

- BRITO, J., BANDEIRAS, T., TEIXEIRA, M., VONRHEIN, C. & ARCHER, M. 2006. Crystallisation and preliminary structure determination of a NADH: quinone oxidoreductase from the extremophile *Acidianus ambivalens*. *Biochim Biophys Acta*, 1764, 842-5.
- BROUERS, M., JEANFILS, J. & COLLARD, F. 1984. Photoproduction of hydrogen by immobilized "adapted" algae. In: *Sybersma, C (ed.), Advances in photosynthesis research, Vol II., 2, 773-775.*
- BULTÉ, L., GANS, P., REBEILLÉ, F. & WOLLMAN, F. 1990. ATP control on state transitions in vivo in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biophys Acta*, 1020, 72-80.
- BURROWS, P. A., SAZANOV, L. A., SVAB, Z., MALIGA, P. & NIXON, P. J. 1998. Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *Embo Journal*, 17, 868-876.
- CARDOL, P., BOUTAFFALA, L., MEMMI, S., DEVREESE, B., MATAGNE, R. & REMACLE, C. 2008. In *Chlamydomonas*, the loss of ND5 subunit prevents the assembly of whole mitochondrial complex I and leads to the formation of a low abundant 700 kDa subcomplex. *Biochim Biophys Acta*, 1777, 388-96.
- CARDOL, P., GLOIRE, G., HAVAUX, M., REMACLE, C., MATAGNE, R. & FRANCK, F. 2003. Photosynthesis and state transitions in mitochondrial mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* affected in respiration. *Plant Physiol*, 133, 2010-20.
- CARDOL, P., GONZÁLEZ-HALPHEN, D., REYES-PRIETO, A., BAURAIN, D., MATAGNE, R. & REMACLE, C. 2005. The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of *Chlamydomonas reinhardtii* deduced from the Genome Sequencing Project. *Plant Physiol*, 137, 447-59.
- CARDOL, P., LAPAILLE, M., MINET, P., FRANCK, F., MATAGNE, R. & REMACLE, C. 2006. ND3 and ND4L subunits of mitochondrial complex I, both nucleus encoded in *Chlamydomonas reinhardtii*, are required for activity and assembly of the enzyme. *Eukaryot Cell*, 5, 1460-7.
- CARDOL, P., MATAGNE, R. & REMACLE, C. 2002. Impact of mutations affecting ND mitochondria-encoded subunits on the activity and assembly of complex I in *Chlamydomonas*. Implication for the structural organization of the enzyme. *J Mol Biol*, 319, 1211-21.
- CARDOL, P., VANROBAEYS, F., DEVREESE, B., VAN BEEUMEN, J., MATAGNE, R. & REMACLE, C. 2004. Higher plant-like subunit composition of mitochondrial complex I from *Chlamydomonas reinhardtii*: 31 conserved components among eukaryotes. *Biochim Biophys Acta*, 1658, 212-24.
- CAROL, P., STEVENSON, D., BISANZ, C., BREITENBACH, J., SANDMANN, G., MACHE, R., COUPLAND, G. & KUNTZ, M. 1999. Mutations in the Arabidopsis gene IMMUTANS cause a variegated phenotype by inactivating a chloroplast terminal oxidase associated with phytoene desaturation. *Plant Cell*, 11, 57-68.
- CARRIE, C., MURCHA, M., KUEHN, K., DUNCAN, O., BARTHET, M., SMITH, P., EUBEL, H., MEYER, E., DAY, D., MILLAR, A. & WHELAN, J. 2008. Type II NAD(P)H dehydrogenases are targeted to mitochondria and chloroplasts or peroxisomes in Arabidopsis thaliana. *FEBS Lett*, 582, 3073-9.
- CASANO, L. M., ZAPATA, J. M., MARTIN, M. & SABATER, B. 2000. Chlororespiration and poisoning of cyclic electron transport - Plastoquinone as electron transporter between thylakoid NADH dehydrogenase and peroxidase. *Journal of Biological Chemistry*, 275, 942-948.
- CASTELLETTI, S., MOROSINOTTO, T., ROBERT, B., CAFFARRI, S., BASSI, R. & CROCE, R. 2003. Recombinant Lhca2 and Lhca3 subunits of the photosystem I antenna system. *Biochemistry*, 42, 4226-34.
- CHACINSKA, A., PFANNER, N. & MEISINGER, C. 2002. How mitochondria import hydrophilic and hydrophobic proteins. *Trends Cell Biol*, 12, 299-303.
- CHAUMONT, F. & BOUTRY, M. 1995. Protein import into plant mitochondria. In: *The molecular biology of plant mitochondria. Eds Dordrecht, Kluwer*, 207-235.
- CHEN, C. G. & GIBBS, M. 1991. Glucose respiration in the intact chloroplast of *chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 95, 82-87.
- CHOCHOIS, V., DAUVILLÉE, D., BEYLY, A., TOLLETER, D., CUINÉ, S., TIMPANO, H., BALL, S., COURNAC, L. & PELTIER, G. 2009. Hydrogen production in *Chlamydomonas*: photosystem II-dependent and -independent pathways differ in their requirement for starch metabolism. *Plant Physiol*, 151, 631-40.
- CLIFTON, R., LISTER, R., PARKER, K., SAPPL, P., ELHAFEZ, D., MILLAR, A., DAY, D. & WHELAN, J. 2005. Stress-induced co-expression of alternative respiratory chain components in Arabidopsis thaliana. *Plant Mol Biol*, 58, 193-212.
- CLINE, K. 2000. Gateway to the chloroplast. *Nature*, 403, 148-9.
- CONSIDINE, M., GOODMAN, M., ECHTAY, K., LALOI, M., WHELAN, J., BRAND, M. & SWEETLOVE, L. 2003. Superoxide stimulates a proton leak in potato mitochondria that is related to the activity of uncoupling protein. *J Biol Chem*, 278, 22298-302.
- COOLEY, J. & VERMAAS, W. 2001. Succinate dehydrogenase and other respiratory pathways in thylakoid membranes of *Synechocystis* sp. strain PCC 6803: capacity comparisons and physiological function. *J Bacteriol*, 183, 4251-8.
- COURNAC, L., GUEDENEY, G., JOËT, T., RUMEAU, D., LATOUCHE, G., CEROVIC, Z., REDDING, K., HORVATH, E., P, M. & PELTIER, G. 1998. Non-photochemical reduction of intersystem electron carriers in chloroplasts of higher plants and algae. In: *Photosynthesis: mechanisms and effects, vol III. ed. G Garab. Dordrecht, The Netherlands: Kluwer*, 1877-1882.
- COURNAC, L., LATOUCHE, G., CEROVIC, Z., REDDING, K., RAVENEL, J. & PELTIER, G. 2002. In vivo interactions between photosynthesis, mitorespiration, and chlororespiration in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 129, 1921-8.

- COURNAC, L., REDDING, K., BENNOUN, P. & PELTIER, G. 1997. Limited photosynthetic electron flow but no CO<sub>2</sub> fixation in *Chlamydomonas* mutants lacking photosystem I. *FEBS Lett*, 416, 65-8.
- COURNAC, L., REDDING, K., RAVENEL, J., RUMEAU, D., JOSSE, E., KUNTZ, M. & PELTIER, G. 2000. Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem I-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *J Biol Chem*, 275, 17256-62.
- CROCE, R., ZUCHELLI, G., GARLASCHI, F. & JENNINGS, R. 1998. A thermal broadening study of the antenna chlorophylls in PSI-200, LHCI, and PSI core. *Biochemistry*, 37, 17355-60.
- DE VRIES, S. & GRIVELL, L. 1988. Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH:Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 176, 377-84.
- DE VRIES, S., VAN WITZENBURG, R., GRIVELL, L. & MARRES, C. 1992. Primary structure and import pathway of the rotenone-insensitive NADH-ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 203, 587-92.
- DEKKER, J. & BOEKEMA, E. 2005. Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta*, 1706, 12-39.
- DELOSME, R., OLIVE, J. & WOLLMAN, F. A. 1996. Changes in light energy distribution upon state transitions: an in vivo photoacoustic study of the wild and photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta*, 150-158.
- DEPÈGE, N., BELLAFFIORE, S. & ROCHAIX, J. 2003. Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHCI phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science*, 299, 1572-5.
- DESPLATS, C., BEYLY, A., CUINÉ, S., BERNARD, L., COURNAC, L. & PELTIER, G. 2007. Modification of substrate specificity in single point mutants of *Agrobacterium tumefaciens* type II NADH dehydrogenase. *FEBS Lett*, 581, 4017-22.
- DESPLATS, C., MUS, F., CUINÉ, S., BILLON, E., COURNAC, L. & PELTIER, G. 2009. Characterization of Nda2, a plastoquinone-reducing type II NAD(P)H dehydrogenase in *Chlamydomonas* chloroplasts. *J Biol Chem*, 284, 4148-57.
- DRY, I. & WISKICH, J. 1985. Inhibition of 2-oxoglutarate oxidation in plant mitochondria by pyruvate. *Biochem Biophys Res Commun*, 133, 397-403.
- DUCOS, E., TOUZET, P. & BOUTRY, M. 2001. The male sterile G cytoplasm of wild beet displays modified mitochondrial respiratory complexes. *Plant J*, 26, 171-80.
- DUPUIS, A., DARROUZET, E., DUBORJAL, H., PIERRARD, B., CHEVALLET, M., VAN BELZEN, R., ALBRACHT, S. & LUNARDI, J. 1998. Distal genes of the nuo operon of *Rhodobacter capsulatus* equivalent to the mitochondrial ND subunits are all essential for the biogenesis of the respiratory NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Mol Microbiol*, 28, 531-41.
- DYM, O., PRATT, E., HO, C. & EISENBERG, D. 2000. The crystal structure of D-lactate dehydrogenase, a peripheral membrane respiratory enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 9413-8.
- EBBIGHAUSEN, H., CHEN, J. & HELDT, H. W. 1985. Oxaloacetate translocator in plant mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, 810, 184-199.
- EHARA, T., OSAFUNE, T. & HASE, E. 1995. Behavior of mitochondria in synchronized cells of *Chlamydomonas reinhardtii* (Chlorophyta). *J Cell Sci*, 108 ( Pt 2), 499-507.
- EIJCKELHOFF, C., VAN ROON, H., GROOT, M., VAN GRONDELLE, R. & DEKKER, J. 1996. Purification and spectroscopic characterization of photosystem II reaction center complexes isolated with or without Triton X-100. *Biochemistry*, 35, 12864-72.
- ELBASHIR, S., LENDECKEL, W. & TUSCHL, T. 2001. RNA interference is mediated by 21- and 22-nucleotide RNAs. *Genes Dev*, 15, 188-200.
- ELHAFEZ, D., MURCHA, M., CLIFTON, R., SOOLE, K., DAY, D. & WHELAN, J. 2006. Characterization of mitochondrial alternative NAD(P)H dehydrogenases in *Arabidopsis*: intraorganelle location and expression. *Plant Cell Physiol*, 47, 43-54.
- ENDO, T. & ASADA, K. 1996. Dark induction of the non-photochemical quenching of chlorophyll fluorescence by acetate in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant and Cell Physiology*, 37, 551-555.
- ENDO, T., MI, H. L., SHIKANAI, T. & ASADA, K. 1997. Donation of electrons to plastoquinone by NAD(P)H dehydrogenase and by ferredoxin-quinone reductase in spinach chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 38, 1272-1277.
- ENDO, T., SHIKANAI, T., SATO, F. & ASADA, K. 1998. NAD(P)H dehydrogenase-dependent, antimycin A-sensitive electron donation to plastoquinone in tobacco chloroplasts. *Plant and Cell Physiology*, 39, 1226-1231.
- ESCOBAR, M., GEISLER, D. & RASMUSSEN, A. 2006. Reorganization of the alternative pathways of the *Arabidopsis* respiratory chain by nitrogen supply: opposing effects of ammonium and nitrate. *Plant J*, 45, 775-88.
- EUBEL, H., JÄNSCH, L. & BRAUN, H. 2003. New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol*, 133, 274-86.
- FANG, J. & BEATTIE, D. S. 2002. Novel FMN-containing rotenone-insensitive NADH dehydrogenase from *Trypanosoma brucei* mitochondria: Isolation and characterization. *BIOCHEMISTRY*, 41 3065-3072
- FEARNLEY, I. & WALKER, J. 1992. Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1140, 105-34.

- FELITTI, S., CHAN, R., SIERRA, M. & GONZALEZ, D. 2000. The cytochrome c gene from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Structure and expression in wild-type cells and in obligate photoautotrophic (dk) mutants. *Plant Cell Physiol*, 41, 1149-56.
- FINAZZI, G., FURIA, A., BARBAGALLO, R. & FORTI, G. 1999. State transitions, cyclic and linear electron transport and photophosphorylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta*, 1413, 117-29.
- FINNEGAN, E., SHELDON, C., JARDINAUD, F., PEACOCK, W. & DENNIS, E. 2004. A cluster of Arabidopsis genes with a coordinate response to an environmental stimulus. *Curr Biol*, 14, 911-6.
- FINNEGAN, P., WHELAN, J., MILLAR, A., ZHANG, Q., SMITH, M., WISKICH, J. & DAY, D. 1997. Differential expression of the multigene family encoding the soybean mitochondrial alternative oxidase. *Plant Physiol*, 114, 455-66.
- FISHER, N. & RICH, P. 2000. A motif for quinone binding sites in respiratory and photosynthetic systems. *J Mol Biol*, 296, 1153-62.
- FLÜGGE, U. I. & HELDT, H. W. 1991. Metabolite translocator of the chloroplast envelope. *Annu. Rev. Plant. Physiol. Plant Mol. Biol.*, 42, 129-144.
- FORESTIER, M., KING, P., ZHANG, L., POSEWITZ, M., SCHWARZER, S., HAPPE, T., GHIRARDI, M. & SEIBERT, M. 2003. Expression of two [Fe]-hydrogenases in *Chlamydomonas reinhardtii* under anaerobic conditions. *Eur J Biochem*, 270, 2750-8.
- FOUCHARD, S., HEMSCHEMEIER, A., CARUANA, A., PRUVOST, J., LEGRAND, J., HAPPE, T., PELTIER, G. & COURNAC, L. 2005. Autotrophic and mixotrophic hydrogen photoproduction in sulfur-deprived *Chlamydomonas* cells. *Appl Environ Microbiol*, 71, 6199-205.
- FRANZÉN, L. & FALK, G. 1992. Nucleotide sequence of cDNA clones encoding the beta subunit of mitochondrial ATP synthase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*: the precursor protein encoded by the cDNA contains both an N-terminal presequence and a C-terminal extension. *Plant Mol Biol*, 19, 771-80.
- FREY, T. & MANNELLA, C. 2000. The internal structure of mitochondria. *Trends Biochem Sci*, 25, 319-24.
- FRIEDRICH, T. 1998. The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. *Biochim Biophys Acta*, 1364, 134-46.
- FUHRMANN, M., OERTEL, W. & HEGEMANN, P. 1999. A synthetic gene coding for the green fluorescent protein (GFP) is a versatile reporter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J*, 19, 353-61.
- FUNES, S., DAVIDSON, E., CLAROS, M., VAN LIS, R., PÉREZ-MARTÍNEZ, X., VÁZQUEZ-ACEVEDO, M., KING, M. & GONZÁLEZ-HALPHEN, D. 2002. The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F1F0-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem*, 277, 6051-8.
- GAFFRON, H. & RUBIN, J. 1942. Fermentative and photochemical production of hydrogen in algae. *J Gen Physiol*, 26, 219-240.
- GAIMAN, N. 2004. Pas de panique! Douglas Adams et Le guide galactique, Gallimard.
- GAL, A., SHAHAK, Y., SCHUSTER, G. & OHAD, I. 1987. Specific loss of LHC II phosphorylation in the *Lemna* mutant 1073 lacking the cytochrome b6/f complex. *FEBS Lett*, 221, 205-210.
- GAL, A., ZER, H. & OHAD, I. 1997. Redox-controlled thylakoid protein phosphorylation. *Physiol Plant*, 100, 869-885.
- GEISLER, D., BROSELID, C., HEDERSTEDT, L. & RASMUSSEN, A. 2007. Ca<sup>2+</sup>-binding and Ca<sup>2+</sup>-independent respiratory NADH and NADPH dehydrogenases of *Arabidopsis thaliana*. *J Biol Chem*, 282, 28455-64.
- GERMANO, M., YAKUSHEVSKA, A., KEEGSTRA, W., VAN GORKOM, H., DEKKER, J. & BOEKEMA, E. 2002. Supramolecular organization of photosystem I and light-harvesting complex I in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett*, 525, 121-5.
- GFELLER, R. & GIBBS, M. 1985. Fermentative Metabolism of *Chlamydomonas reinhardtii*: II. Role of Plastoquinone. *Plant Physiol*, 77, 509-11.
- GHIRARDI, M., TOGASAKI, R. & SEIBERT, M. 1997. Oxygen sensitivity of algal H<sub>2</sub>- production. *Appl Biochem Biotechnol*, 63-65, 141-51.
- GHIRARDI, M. L. & SEIBERT, M. 2003. Algal systems for hydrogen photoproduction. In: *Hydrogen, fuel cells and infrastructure technologies. FY 2003 Progress Report*.
- GOBETS, B., KENNIS, J. T. M., IHALAINEN, J. A., BRAZZOLI, M., CROCE, R., VAN STOKKUM, I. H. M., BASSI, R., DEKKER, J. P., VAN AMERONGEN, H., FLEMING, G. R. & VAN GRONDELLE, R. 2001. Excitation energy transfer in dimeric light-harvesting complex I: a combined streak-camera/fluorescence upconversion study. *Chem*, 10132-10139.
- GODDE, D. & TREBST, A. 1980. NADH as electron donor for the photosynthetic membrane of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Microbiol*, 127, 245-252.
- GOLDEN, T. & PEDERSEN, P. 1998. The oligomycin sensitivity conferring protein of rat liver mitochondrial ATP synthase: arginine 94 is important for the binding of OSCP to F1. *Biochemistry*, 37, 13871-81.
- GOYAL, A. 2002. Glycolate metabolism in algal chloroplasts: inhibition by salicylhydroxamic acid (SHAM). *Physiol Plant*, 116, 264-270.
- GOYAL, A. & TOLBERT, N. 1996. Association of glycolate oxidation with photosynthetic electron transport in plant and algal chloroplasts. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93, 3319-24.
- GRANDIER-VAZEILLE, X., BATHANY, K., CHAIGNEPAIN, S., CAMOUGRAND, N., MANON, S. & SCHMITTER, J. 2001. Yeast mitochondrial dehydrogenases are associated in a supramolecular complex. *Biochemistry*, 40, 9758-69.
- GREENBAUM, E. 1982. Photosynthetic Hydrogen and Oxygen Production: Kinetic Studies. *Science*, 215, 291-293.



- GUEDENEY, G., CORNEILLE, S., CUINÉ, S. & PELTIER, G. 1996. Evidence for an association of ndh B, ndh J gene products and ferredoxin-NADP-reductase as components of a chloroplastic NAD(P)H dehydrogenase complex. *FEBS Lett*, 378, 277-80.
- GUTIERRES, S., SABAR, M., LELANDAIS, C., CHETRIT, P., DIOLEZ, P., DEGAND, H., BOUTRY, M., VEDEL, F., DE KOUCHKOVSKY, Y. & DE PAEPE, R. 1997. Lack of mitochondrial and nuclear-encoded subunits of complex I and alteration of the respiratory chain in *Nicotiana sylvestris* mitochondrial deletion mutants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 3436-41.
- GUÉNEBAUT, V., SCHLITT, A., WEISS, H., LEONARD, K. & FRIEDRICH, T. 1998. Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Mol Biol*, 276, 105-12.
- HAMANAKA, S., OHTSU, K., KADOWAKI, K., NAKAZONO, M. & HIRAI, A. 1999. Identification of cDNA encoding cytochrome c oxidase subunit 5c (COX5c) from rice: comparison of its expression with nuclear-encoded and mitochondrial-encoded COX genes. *Genes Genet Syst*, 74, 71-5.
- HAMMOND, S., BERNSTEIN, E., BEACH, D. & HANNON, G. 2000. An RNA-directed nuclease mediates post-transcriptional gene silencing in *Drosophila* cells. *Nature*, 404, 293-6.
- HAMMOND, S., BOETTCHER, S., CAUDY, A., KOBAYASHI, R. & HANNON, G. 2001. Argonaute2, a link between genetic and biochemical analyses of RNAi. *Science*, 293, 1146-50.
- HANNING, I. & HELDT, H. 1993. On the Function of Mitochondrial Metabolism during Photosynthesis in Spinach (*Spinacia oleracea* L.) Leaves (Partitioning between Respiration and Export of Redox Equivalents and Precursors for Nitrate Assimilation Products). *Plant Physiol*, 103, 1147-1154.
- HAPPE, T. & KAMINSKI, A. 2002. Differential regulation of the Fe-hydrogenase during anaerobic adaptation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem*, 269, 1022-32.
- HAPPE, T., MOSLER, B. & NABER, J. 1994. Induction, localization and metal content of hydrogenase in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem*, 222, 769-74.
- HAPPE, T. & NABER, J. 1993. Isolation, characterization and N-terminal amino acid sequence of hydrogenase from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eur J Biochem*, 214, 475-81.
- HEAZLEWOOD, J., HOWELL, K. & MILLAR, A. 2003. Mitochondrial complex I from *Arabidopsis* and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits. *Biochim Biophys Acta*, 1604, 159-69.
- HEIMPEL, S., BASSET, G., ODOY, S. & KLINGENBERG, M. 2001. Expression of the mitochondrial ADP/ATP carrier in *Escherichia coli*. Renaturation, reconstitution, and the effect of mutations on 10 positive residues. *J Biol Chem*, 276, 11499-506.
- HEMSCHMEIER, A., FOUCHARD, S., COURNAC, L., PELTIER, G. & HAPPE, T. 2008. Hydrogen production by *Chlamydomonas reinhardtii*: an elaborate interplay of electron sources and sinks. *Planta*, 227, 397-407.
- HENNIG, J. & HERRMANN, R. G. 1986. Chloroplast ATP synthase of spinach contains 9 nonidentical subunit species, 6 of which are encoded by plastid chromosomes in 2 operons in a phylogenetically conserved arrangement. *Mol Gen Genet*, 203, 117-128.
- HINCHLIFFE, P. & SAZANOV, L. 2005. Organization of iron-sulfur clusters in respiratory complex I. *Science*, 309, 771-4.
- HODGES, M. 2002. Enzyme redundancy and the importance of 2-oxoglutarate in plant ammonium assimilation. *J Exp Bot*, 53, 905-16.
- HORVÁTH, E., PETER, S., JOËT, T., RUMEAU, D., COURNAC, L., HORVÁTH, G., KAVANAGH, T., SCHÄFER, C., PELTIER, G. & MEDGYESY, P. 2000. Targeted inactivation of the plastid ndhB gene in tobacco results in an enhanced sensitivity of photosynthesis to moderate stomatal closure. *Plant Physiol*, 123, 1337-50.
- HOURTON-CABASSA, C., RITA MATOS, A., ZACHOWSKI, A. & MOREAU, F. 2004. The plant uncoupling protein homologues: a new family of energy-dissipating proteins in plant mitochondria. *Plant Physiol Biochem*, 42, 283-90.
- HOWITT, C. A., UDALL, P. K. & VERMAAS, W. F. J. 1999. Type 2 NADH dehydrogenases in the cyanobacterium *Synechocystis* sp strain PCC 6803 are involved in regulation rather than respiration. *Journal of Bacteriology*, 181, 3994-4003.
- HUH, W. & KANG, S. 2001. Characterization of the gene family encoding alternative oxidase from *Candida albicans*. *Biochem J*, 356, 595-604.
- HUSIC, D. & TOLBERT, N. 1987. Inhibition of glycolate and D-lactate metabolism in a *Chlamydomonas reinhardtii* mutant deficient in mitochondrial respiration. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 84, 1555-1559.
- HUTNER, S. H., PROVASOLI, L., SCHAT, A. & HASKINS, C. P. 1950. Some approaches of the study of the role of metal in the metabolism of microorganisms. *Proc. Am. Phil. Soc.*, 94, 152-170.
- IGAMBERDIEV, A., BYKOVA, N. & GARDESTRÖM, P. 1997. Involvement of cyanide-resistant and rotenone-insensitive pathways of mitochondrial electron transport during oxidation of glycine in higher plants. *FEBS Lett*, 412, 265-9.
- IGAMBERDIEV, A. & GARDESTRÖM, P. 2003. Regulation of NAD- and NADP-dependent isocitrate dehydrogenases by reduction levels of pyridine nucleotides in mitochondria and cytosol of pea leaves. *Biochim Biophys Acta*, 1606, 117-25.
- ISHIZAKI, K., LARSON, T., SCHAUER, N., FERNIE, A., GRAHAM, I. & LEAVER, C. 2005. The critical role of *Arabidopsis* electron-transfer flavoprotein:ubiquinone oxidoreductase during dark-induced starvation. *Plant Cell*, 17, 2587-600.

- ISHIZAKI, K., SCHAUER, N., LARSON, T., GRAHAM, I., FERNIE, A. & LEAVER, C. 2006. The mitochondrial electron transfer flavoprotein complex is essential for survival of *Arabidopsis* in extended darkness. *Plant J*, 47, 751-60.
- ITO, H., TAKAHASHI, A., ADACHI, K., NOJI, H., YASUDA, R., YOSHIDA, M. & KINOSHITA, K. 2004. Mechanically driven ATP synthesis by F1-ATPase. *Nature*, 427, 465-8.
- IWATA, S., LEE, J., OKADA, K., LEE, J., IWATA, M., RASMUSSEN, B., LINK, T., RAMASWAMY, S. & JAP, B. 1998. Complete structure of the 11-subunit bovine mitochondrial cytochrome bc1 complex. *Science*, 281, 64-71.
- JANS, F., MIGNOLET, E., HOYOUX, P., CARDOL, P., GHYSELS, B., CUINÉ, S., COURNAC, L., PELTIER, G., REMACLE, C. & FRANCK, F. 2008. A type II NAD(P)H dehydrogenase mediates light-independent plastoquinone reduction in the chloroplast of *Chlamydomonas*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105, 20546-51.
- JAWOROWSKI, A., CAMPBELL, H., POULIS, M. & YOUNG, I. 1981a. Genetic identification and purification of the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli*. *Biochemistry*, 20, 2041-7.
- JAWOROWSKI, A., MAYO, G., SHAW, D., CAMPBELL, H. & YOUNG, I. 1981b. Characterization of the respiratory NADH dehydrogenase of *Escherichia coli* and reconstitution of NADH oxidase in *ndh* mutant membrane vesicles. *Biochemistry*, 20, 3621-8.
- JENSEN, P., BASSI, R., BOEKEMA, E., DEKKER, J., JANSSON, S., LEISTER, D., ROBINSON, C. & SCHELLER, H. 2007. Structure, function and regulation of plant photosystem I. *Biochim Biophys Acta*, 1767, 335-52.
- JOHNSON, G. 2005. Cyclic electron transport in C3 plants: fact or artefact? *J Exp Bot*, 56, 407-16.
- JORDAN, P., FROMME, P., WITT, H., KLUKAS, O., SAENGER, W. & KRAUSS, N. 2001. Three-dimensional structure of cyanobacterial photosystem I at 2.5 Å resolution. *Nature*, 411, 909-17.
- JOSSE, E. M., SIMKIN, A. J., GAFFE, J., LABOURE, A. M., KUNTZ, M. & CAROL, P. 2000. A plastid terminal oxidase associated with carotenoid desaturation during chromoplast differentiation. *Plant Physiology*, 123, 1427-1436.
- JOËT, T., COURNAC, L., HORVATH, E., MEDGYESY, P. & PELTIER, G. 2001. Increased sensitivity of photosynthesis to antimycin A induced by inactivation of the chloroplast *ndhB* gene. Evidence for a participation of the NADH-dehydrogenase complex to cyclic electron flow around photosystem I. *Plant Physiol*, 125, 1919-29.
- JOËT, T., COURNAC, L., PELTIER, G. & HAVAUX, M. 2002. Cyclic electron flow around photosystem I in C(3) plants. In vivo control by the redox state of chloroplasts and involvement of the NADH-dehydrogenase complex. *Plant Physiol*, 128, 760-9.
- JÄNSCH, L., KRUF, V., SCHMITZ, U. & BRAUN, H. 1996. New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant J*, 9, 357-68.
- KALAPOUS, M. 1999. Methylglyoxal in living organisms: chemistry, biochemistry, toxicology and biological implications. *Toxicol Lett*, 110, 145-75.
- KANERVO, E., SUORSA, M. & ARO, E. 2005. Functional flexibility and acclimation of the thylakoid membrane. *Photochem Photobiol Sci*, 4, 1072-80.
- KARAPETYAN, N. V., SCHLODDER, E., VAN GRONDELLE, R. & DEKKER, J. P. 2006. The long wavelength chlorophylls of photosystem I. In *Photosystem I: The Light-Driven Plastocyanin: Ferredoxin Oxidoreductase* (Golbeck J.H., ed.) in series *Advances in Photosynthesis and Respiration*. Springer, 25, 177-192.
- KARGUL, J., NIELD, J. & BARBER, J. 2003. Three-dimensional reconstruction of a light-harvesting complex I-photosystem I (LHCI-PSI) supercomplex from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. Insights into light harvesting for PSI. *J Biol Chem*, 278, 16135-41.
- KE, B. 2002. P430: a retrospective, 1971 - 2001. *Photosynth Res*, 73, 207-14.
- KERSCHER, S. 2000. Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochim Biophys Acta*, 1459, 274-83.
- KESSLER, E. 1973. Effect of anaerobiosis on photosynthetic reactions and nitrogen metabolism of algae with and without hydrogenase. *Arch Mikrobiol*, 93, 91-100.
- KESSLER, E. 1974. Hydrogenase, photoreduction and anaerobic growth of algae. In: *Stewart WDP (ed) Algal physiology and biochemistry*. Blackwell, Oxford, 456-473.
- KLÖCK, G. & KREUZBERG, K. 1989. Kinetic properties of a sn-glycerol-3-phosphate dehydrogenase purified from the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta*, 991, 347-52.
- KO, Y., HULLIHEN, J., HONG, S. & PEDERSEN, P. 2000. Mitochondrial F(0)F(1) ATP synthase. Subunit regions on the F1 motor shielded by F(0), Functional significance, and evidence for an involvement of the unique F(0) subunit F(6). *J Biol Chem*, 275, 32931-9.
- KOBAYASHI, M., MAEDA, H., WATANABE, T., NAKANE, H. & SATOH, K. 1990. Chlorophyll *a* and  $\beta$ -carotene content in the D<sub>1</sub>/D<sub>2</sub>/cytochrome *b*-559 reaction center complex from spinach. *FEB*, 260, 138-140.
- KOFER, W., KOOP, H. U., WANNER, G. & STEINMÜLLER, K. 1998. Mutagenesis of the genes encoding subunits A, C, H, I, J and K of the plastid NAD(P)H-plastoquinone-oxidoreductase in tobacco by polyethylene glycol-mediated plasmate transformation. 258, 166-73.
- KOMINE, Y., KIKIS, E., SCHUSTER, G. & STERN, D. 2002. Evidence for in vivo modulation of chloroplast RNA stability by 3'-UTR homopolymeric tails in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 4085-90.
- KRAUSS, S., ZHANG, C. & LOWELL, B. 2005. The mitochondrial uncoupling-protein homologues. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 248-61.
- KRÄMER, R. & PALMIERI, F. 1989. Molecular aspects of isolated and reconstituted carrier proteins from animal mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 974, 1-23.

- KRÖMER, S. & HELDT, H. 1991. On the Role of Mitochondrial Oxidative Phosphorylation in Photosynthesis Metabolism as Studied by the Effect of Oligomycin on Photosynthesis in Protoplasts and Leaves of Barley (*Hordeum vulgare*). *Plant Physiol*, 95, 1270-1276.
- LALOI, M. 1999. Plant mitochondrial carriers: an overview. *Cell Mol Life Sci*, 56, 918-44.
- LALOI, M., KLEIN, M., RIESMEIER, J., MÜLLER-RÖBER, B., FLEURY, C., BOUILLAUD, F. & RICQUIER, D. 1997. A plant cold-induced uncoupling protein. *Nature*, 389, 135-6.
- LAMBERS, H. 1982. Cyanide-resistant respiration: a non-phosphorylating electron transport pathway acting as an energy overflow. *Physiol. Plant.*, 55, 478-485.
- LECHTRECK, K., ROSTMANN, J. & GRUNOW, A. 2002. Analysis of Chlamydomonas SF-assemblin by GFP tagging and expression of antisense constructs. *J Cell Sci*, 115, 1511-22.
- LENNON, A., NEUENSCHWANDER, U., RIBAS-CARBO, M., GILES, L., RYALS, J. & SIEDOW, J. 1997. The Effects of Salicylic Acid and Tobacco Mosaic Virus Infection on the Alternative Oxidase of Tobacco. *Plant Physiol*, 115, 783-791.
- LICHTENTHALER, H. K. 1987. Chlorophylls and carotenoids: Pigments of photosynthetic biomembrane. *Methods Enzymol*, 148, 350-382.
- LISTER, R., MURCHA, M. & WHELAN, J. 2003. The Mitochondrial Protein Import Machinery of Plants (MPIMP) database. *Nucleic Acids Res*, 31, 325-7.
- LUTTIK, M., OVERKAMP, K., KÖTTER, P., DE VRIES, S., VAN DIJKEN, J. & PRONK, J. 1998. The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J Biol Chem*, 273, 24529-34.
- MA, L., LI, J., QU, L., HAGER, J., CHEN, Z., ZHAO, H. & DENG, X. 2001. Light control of Arabidopsis development entails coordinated regulation of genome expression and cellular pathways. *Plant Cell*, 13, 2589-607.
- MAIONE, T. & GIBBS, M. 1986. Hydrogenase-Mediated Activities in Isolated Chloroplasts of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 80, 360-363.
- MARTIN, W. & HERRMANN, R. 1998. Gene transfer from organelles to the nucleus: how much, what happens, and Why? *Plant Physiol*, 118, 9-17.
- MCBRIDE, A. C., LIEN, S., TOGASAKI, R. K. & SAN PIETRO, A. 1977. Mutational analysis of *Chlamydomonas reinhardtii* - Application to biological solar energy conversion. In: *Biological solar energy conversion; Proceedings of the Conference*. New York, Academic Press, Inc., 77-86.
- MCCONNELL, M., KOOP, R., VASIL'EV, S. & BRUCE, D. 2002. Regulation of the distribution of chlorophyll and phycobilin-absorbed excitation energy in cyanobacteria. A structure-based model for the light state transition. *Plant Physiol*, 130, 1201-12.
- MEHLER, A. 1951a. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. I. Mechanism of the reduction of oxygen and other Hill reagents. *Arch Biochem*, 33, 65-77.
- MEHLER, A. 1951b. Studies on reactions of illuminated chloroplasts. II. Stimulation and inhibition of the reaction with molecular oxygen. *Arch Biochem*, 34, 339-51.
- MELIS, A. & HAPPE, T. 2001. Hydrogen production. Green algae as a source of energy. *Plant Physiol*, 127, 740-8.
- MELIS, A., ZHANG, L., FORESTIER, M., GHIRARDI, M. & SEIBERT, M. 2000. Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 122, 127-36.
- MELO, A., BANDEIRAS, T. & TEIXEIRA, M. 2004. New insights into type II NAD(P)H:quinone oxidoreductases. *Microbiol Mol Biol Rev*, 68, 603-16.
- MELO, A., DUARTE, M., MØLLER, I., PROKISCH, H., DOLAN, P., PINTO, L., NELSON, M. & VIDEIRA, A. 2001. The external calcium-dependent NADPH dehydrogenase from *Neurospora crassa* mitochondria. *J Biol Chem*, 276, 3947-51.
- MELO, A., DUARTE, M. & VIDEIRA, A. 1999. Primary structure and characterisation of a 64 kDa NADH dehydrogenase from the inner membrane of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1412, 282-7.
- MENZ, R. & DAY, D. 1996. Purification and characterization of a 43-kDa rotenone-insensitive NADH dehydrogenase from plant mitochondria. *J Biol Chem*, 271, 23117-20.
- MERCHANT, S., PROCHNIK, S., VALLON, O., HARRIS, E., KARPOWICZ, S., WITMAN, G., TERRY, A., SALAMOV, A., FRITZ-LAYLIN, L., MARÉCHAL-DROUARD, L., MARSHALL, W., QU, L., NELSON, D., SANDERFOOT, A., SPALDING, M., KAPITONOV, V., REN, Q., FERRIS, P., LINDQUIST, E., SHAPIRO, H., LUCAS, S., GRIMWOOD, J., SCHMUTZ, J., CARDOL, P., CERUTTI, H., CHANFREAU, G., CHEN, C., COGNAT, V., CROFT, M., DENT, R., DUTCHER, S., FERNÁNDEZ, E., FUKUZAWA, H., GONZÁLEZ-BALLESTER, D., GONZÁLEZ-HALPHEN, D., HALLMANN, A., HANIKENNE, M., HIPPLER, M., INWOOD, W., JABBARI, K., KALANON, M., KURAS, R., LEFEBVRE, P., LEMAIRE, S., LOBANOV, A., LOHR, M., MANUELL, A., MEIER, I., METS, L., MITTAG, M., MITTELMEIER, T., MORONEY, J., MOSELEY, J., NAPOLI, C., NEDELCO, A., NIYOGI, K., NOVOSELOV, S., PAULSEN, I., PAZOUR, G., PURTON, S., RAL, J., RIAÑO-PACHÓN, D., RIEKHOF, W., RYMARQUIS, L., SCHRODA, M., STERN, D., UMEN, J., WILLOWS, R., WILSON, N., ZIMMER, S., ALLMER, J., BALK, J., BISOVA, K., CHEN, C., ELIAS, M., GENDLER, K., HAUSER, C., LAMB, M., LEDFORD, H., LONG, J., MINAGAWA, J., PAGE, M., PAN, J., POOTAKHAM, W., ROJE, S., ROSE, A., STAHLBERG, E., TERAUCHI, A., YANG, P., BALL, S., BOWLER, C., DIECKMANN, C., GLADYSHEV, V., GREEN, P., JORGENSEN, R., MAYFIELD, S.,

- MUELLER-ROEBER, B., RAJAMANI, S., SAYRE, R., BROKSTEIN, P., et al. 2007. The *Chlamydomonas* genome reveals the evolution of key animal and plant functions. *Science*, 318, 245-50.
- MICHALECKA, A., AGIUS, S., MØLLER, I. & RASMUSSEN, A. 2004. Identification of a mitochondrial external NADPH dehydrogenase by overexpression in transgenic *Nicotiana sylvestris*. *Plant J*, 37, 415-25.
- MICHALECKA, A., SVENSSON, A., JOHANSSON, F., AGIUS, S., JOHANSON, U., BRENNICKE, A., BINDER, S. & RASMUSSEN, A. 2003. Arabidopsis genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light. *Plant Physiol*, 133, 642-52.
- MILLAR, A., MITTOVA, V., KIDDLE, G., HEAZLEWOOD, J., BARTOLI, C., THEODOULOU, F. & FOYER, C. 2003. Control of ascorbate synthesis by respiration and its implications for stress responses. *Plant Physiol*, 133, 443-7.
- MILLS, J. D., CROWTHER, D., SLOVACEK, R. E., HIND, G. & MCCARTY, R. E. 1979. Electron transport pathways in spinach chloroplasts. Reduction of the primary acceptor of photosystem II by reduced nicotinamide adenine dinucleotide phosphate in the dark. *Biochim. Biophys. Acta*, 547, 127-37.
- MOORE, A. & SIEDOW, J. 1991. The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochim Biophys Acta*, 1059, 121-40.
- MULLINEAUX, C. & EMLYN-JONES, D. 2005. State transitions: an example of acclimation to low-light stress. *J Exp Bot*, 56, 389-93.
- MURATA, N. 1969a. Control of excitation transfer in photosynthesis. I. Light-induced change of chlorophyll a fluorescence in *Porphyridium cruentum*. *Biochim Biophys Acta*, 172, 242-51.
- MURATA, N. 1969b. Control of excitation transfer in photosynthesis. II. Magnesium ion-dependent distribution of excitation energy between two pigment systems in spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*, 189, 171-81.
- MURATA, N. & SUGAHARA, K. 1969. Control of excitation transfer in photosynthesis. 3. Light-induced decrease of chlorophyll a fluorescence related to photophosphorylation system in spinach chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*, 189, 182-92.
- MUS, F., COURNAC, L., CARDETTINI, V., CARUANA, A. & PELTIER, G. 2005. Inhibitor studies on non-photochemical plastoquinone reduction and H(2) photoproduction in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta*, 1708, 322-32.
- MØLLER, I. 1997. The oxidation of cytosolic NAD(P)H by external NAD(P)H dehydrogenases in the respiratory chain of plant mitochondria. *Physiol. Plant.*, 100, 85-90.
- MØLLER, I. 2001. PLANT MITOCHONDRIA AND OXIDATIVE STRESS: Electron Transport, NADPH Turnover, and Metabolism of Reactive Oxygen Species. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 52, 561-591.
- MØLLER, I. M. & PALMER, J. M. 1982. Direct evidence for the presence of a rotenone-resistant NADH dehydrogenase on the inner surface of the inner membrane of plant mitochondria. *Physiol. Plant.*, 54, 267-274.
- NASH, D. & WISKICH, J. 1983. Properties of substantially chlorophyll-free pea leaf mitochondria prepared by sucrose density gradient separation. *Plant Physiol*, 71, 627-34.
- NELSON, N. & YOCUM, C. 2006. Structure and function of photosystems I and II. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 521-65.
- NEWMAN, S., BOYNTON, J., GILLHAM, N., RANDOLPH-ANDERSON, B., JOHNSON, A. & HARRIS, E. 1990. Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: molecular and genetic characterization of integration events. *Genetics*, 126, 875-88.
- NGUYEN, A., THOMAS-HALL, S., MALNOË, A., TIMMINS, M., MUSSGUG, J., RUPPRECHT, J., KRUSE, O., HANKAMER, B. & SCHENK, P. 2008. Transcriptome for photobiological hydrogen production induced by sulfur deprivation in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell*, 7, 1965-79.
- NICHOLLS, D. & FERGUSON, S. 2002. *Bioenergetics 3*, London, UK, Academic Press.
- NISHIYAMA, R., ITO, M., YAMAGUCHI, Y., KOIZUMI, N. & SANO, H. 2002. A chloroplast-resident DNA methyltransferase is responsible for hypermethylation of chloroplast genes in *Chlamydomonas* maternal gametes. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 5925-30.
- NIXON, P. 2000. Chlororespiration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 355, 1541-7.
- NIYOGI, K. 1999. Photoprotection revisited: Genetic and Molecular Approaches. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 50, 333-359.
- NIYOGI, K. 2000. Safety valves for photosynthesis. *Curr Opin Plant Biol*, 3, 455-60.
- NURANI, G. & FRANZÉN, L. 1996. Isolation and characterization of the mitochondrial ATP synthase from *Chlamydomonas reinhardtii*. cDNA sequence and deduced protein sequence of the alpha subunit. *Plant Mol Biol*, 31, 1105-16.
- NYKÄNEN, A., HALEY, B. & ZAMORE, P. 2001. ATP requirements and small interfering RNA structure in the RNA interference pathway. *Cell*, 107, 309-21.
- OHRESSER, M., MATAGNE, R. & LOPPESS, R. 1997. Expression of the arylsulphatase reporter gene under the control of the *nit1* promoter in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet*, 31, 264-71.
- OHYANAGI, H., TANAKA, T., SAKAI, H., SHIGEMOTO, Y., YAMAGUCHI, K., HABARA, T., FUJII, Y., ANTONIO, B., NAGAMURA, Y., IMANISHI, T., IKEO, K., ITOH, T., GOJOBORI, T. & SASAKI, T. 2006. The Rice Annotation Project Database (RAP-DB): hub for *Oryza sativa* ssp. *japonica* genome information. *Nucleic Acids Res*, 34, D741-4.
- OKUTANI, S., HANKE, G., SATOMI, Y., TAKAO, T., KURISU, G., SUZUKI, A. & HASE, T. 2005. Three maize leaf ferredoxin:NADPH oxidoreductases vary in subchloroplast location, expression, and interaction with ferredoxin. *Plant Physiol*, 139, 1451-9.

- OROSA, M., FRANQUEIRA, D., CID, A. & ABALDE, J. 2005. Analysis and enhancement of astaxanthin accumulation in *Haematococcus pluvialis*. *Bioresour Technol*, 96, 373-8.
- PEARCE, J., LEACH, C. & CARR, N. 1969. The incomplete tricarboxylic acid cycle in the blue-green alga *Anabaena variabilis*. *J Gen Microbiol*, 55, 371-8.
- PEAVEY, D. G., STEUP, M. & GIBBS, M. 1977. Characterization of starch breakdown in intact spinach chloroplast. *Plant Physiol.*, 60, 305-8.
- PELTIER, G. & COURNAC, L. 2002. Chlororespiration. *Annu Rev Plant Biol*, 53, 523-50.
- PLASTERK, R. 2002. RNA silencing: the genome's immune system. *Science*, 296, 1263-5.
- PLAXTON, W. C. & PODESTA, F. E. 2006. The functional organization and control of plant respiration. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 25, 159-198.
- POTTER, F. J., BENNETT, E. & WISKICH, J. T. 2000. Effects of ageing and salicylate on beetroot mitochondria. *Aust. J. Plant. Physiol.*, 27, 445-450.
- PÉREZ-MARTÍNEZ, X., ANTARAMIAN, A., VAZQUEZ-ACEVEDO, M., FUNES, S., TOLKUNOVA, E., D'ALAYER, J., CLAROS, M., DAVIDSON, E., KING, M. & GONZÁLEZ-HALPHEN, D. 2001. Subunit II of cytochrome c oxidase in Chlamydomonas algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes. *J Biol Chem*, 276, 11302-9.
- QUILES, M. J., GARCIA, A. & CUELLO, J. 2000. Separation by blue-native PAGE and identification of the whole NAD(P)H dehydrogenase complex from barley stroma thylakoid. *Plant Physiol Biochem*, 38, 225-232.
- RADERMACHER, M., RUIZ, T., CLASON, T., BENJAMIN, S., BRANDT, U. & ZICKERMANN, V. 2006. The three-dimensional structure of complex I from *Yarrowia lipolytica*: a highly dynamic enzyme. *J Struct Biol*, 154, 269-79.
- RAPISARDA, V., CHEHÍN, R., DE LAS RIVAS, J., RODRÍGUEZ-MONTELONGO, L., FARIÁS, R. & MASSA, E. 2002. Evidence for Cu(I)-thiolate ligation and prediction of a putative copper-binding site in the *Escherichia coli* NADH dehydrogenase-2. *Arch Biochem Biophys*, 405, 87-94.
- RASMUSSEN, A., GEISLER, D. & MØLLER, I. 2008. The multiplicity of dehydrogenases in the electron transport chain of plant mitochondria. *Mitochondrion*, 8, 47-60.
- RASMUSSEN, A., SOOLE, K. & ELTHON, T. 2004. Alternative NAD(P)H dehydrogenases of plant mitochondria. *Annu Rev Plant Biol*, 55, 23-39.
- RASMUSSEN, A., SVENSSON, A., KNOOP, V., GROHMANN, L. & BRENNICKE, A. 1999. Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive NADH dehydrogenases in higher eukaryotes: two enzymes are present in potato mitochondria. *Plant J*, 20, 79-87.
- RASMUSSEN, A. G. 2007. Light and diurnal regulation of plant respiratory gene expression. In: MA, E. (ed.). *Physiologia Plantarum*.
- RASMUSSEN, A. G. & AGIUS, S. C. 2001. Rotenone-insensitive NAD(P)H dehydrogenase in plants: Immunodetection and distribution of native proteins in mitochondria. *Plant. Physiol. Biochem.*, 39, 1057-1066.
- RASMUSSEN, A. G. & ESCOBAR, M. A. 2007. Light and diurnal regulation of plant respiratory gene expression. *Physiologica Plantarum*, 129, 57-67.
- RASMUSSEN, A. G. & MØLLER, I. A. 1991. NAD(P)H dehydrogenases on the inner surface of the inner mitochondria membrane studied using inside-out submitochondrial particles. *Physiol. Plantarum*, 83, 357-365.
- REBEILLE, F. & GANS, P. 1988. Interaction between Chloroplasts and Mitochondria in Microalgae: Role of Glycolysis. *Plant Physiol*, 88, 973-975.
- REDDING, K., COURNAC, L., VASSILIEV, I., GOLBECK, J., PELTIER, G. & ROCHAIX, J. 1999. Photosystem I is indispensable for photoautotrophic growth, CO<sub>2</sub> fixation, and H<sub>2</sub> photoproduction in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem*, 274, 10466-73.
- REMACLE, C., BAURAIN, D., CARDOL, P. & MATAGNE, R. 2001. Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in mitochondrial complex I: characterization of two mutations affecting the nd1 coding sequence. *Genetics*, 158, 1051-60.
- REMACLE, C. & MATAGNE, R. F. 1998. Mitochondrial genetics. In *Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*. Rochaix, J. D., Goldschmidt-Clermont, M. and Merchant, S., eds. Kluwer Academic Publishers, Dordrecht, 661-674.
- RICH, P. R., FISHER, N., LENNON, A., PROMMEENATE, P. & PURTON, S. 2001. An assessment of the pathways of dark reduction and oxidation of the plastoquinone pool in thylakoid membranes of higher plants and green algae. *Proc. Int. Congr. Photosynth., 12th, Brisbane, Aust. Victoria, Aust.: CSIRO*.
- RICH, P. R., HOEFNAGEL, M. H. N. & WISKICH, J. T. 1998. Possible chlororespiratory reactions of thylakoid membranes. In *Plant mitochondria: from gene to function*. ed. I.M. Moller, P. Gadeström, K Glimelius, E. Glaser. Leiden, The Netherlands: Backhuys, 17-23.
- RICHTER, M., SAMRA, H., HE, F., GIESSEL, A. & KUCZERA, K. 2005. Coupling proton movement to ATP synthesis in the chloroplast ATP synthase. *J Bioenerg Biomembr*, 37, 467-73.
- RICQUIER, D. & BOUILLAUD, F. 2000. Mitochondrial uncoupling proteins: from mitochondria to the regulation of energy balance. *J Physiol*, 529 Pt 1, 3-10.
- RIGOLET, M., AGUILANIU, H., AVÉRET, N., BUNOUST, O., CAMOUGRAND, N., GRANDIER-VAZEILLE, X., LARSSON, C., PAHLMAN, I., MANON, S. & GUSTAFSSON, L. 2004. Organization and regulation of the cytosolic NADH metabolism in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biochem*, 256-257, 73-81.

- ROCHAIX, J. 2007. Role of thylakoid protein kinases in photosynthetic acclimation. *FEBS Lett*, 581, 2768-75.
- ROESSLER, P. & LIEN, S. 1984. Activation and De Novo Synthesis of Hydrogenase in *Chlamydomonas*. *Plant Physiol*, 76, 1086-1089.
- RUMEAU, D., BÉCUWE-LINKA, N., BEYLY, A., LOUWAGIE, M., GARIN, J. & PELTIER, G. 2005. New subunits NDH-M, -N, and -O, encoded by nuclear genes, are essential for plastid Ndh complex functioning in higher plants. *Plant Cell*, 17, 219-32.
- SAGER, R. & PALADE, G. 1957. Structure and development of the chloroplast in *Chlamydomonas*. I. The normal green cell. *J Biophys Biochem Cytol*, 3, 463-88.
- SAISHO, D., NAMBARA, E., NAITO, S., TSUTSUMI, N., HIRAI, A. & NAKAZONO, M. 1997. Characterization of the gene family for alternative oxidase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol*, 35, 585-96.
- SAZANOV, L., BURROWS, P. & NIXON, P. 1998. The chloroplast Ndh complex mediates the dark reduction of the plastoquinone pool in response to heat stress in tobacco leaves. *FEBS Lett*, 429, 115-8.
- SAZANOV, L., CARROLL, J., HOLT, P., TOIME, L. & FEARNLEY, I. 2003. A role for native lipids in the stabilization and two-dimensional crystallization of the *Escherichia coli* NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J Biol Chem*, 278, 19483-91.
- SCHNACKENBERG, J., SCHULZ, R. & SENGER, H. 1993. Characterization and purification of a hydrogenase from the eukaryotic green alga *Scenedesmus obliquus*. *FEBS Lett*, 327, 21-4.
- SCHOPPEMEIER, J., MAGES, W. & LECHTRECK, K. 2005. GFP as a tool for the analysis of proteins in the flagellar basal apparatus of *Chlamydomonas*. *Cell Motil Cytoskeleton*, 61, 189-200.
- SCHULZ, R. 1996. Hydrogenases and hydrogen production in eukaryotic organisms and cyanobacteria. *J Mar Biotechnol*, 16-22.
- SHEN, W., WEI, Y., DAUK, M., TAN, Y., TAYLOR, D., SELVARAJ, G. & ZOU, J. 2006. Involvement of a glycerol-3-phosphate dehydrogenase in modulating the NADH/NAD<sup>+</sup> ratio provides evidence of a mitochondrial glycerol-3-phosphate shuttle in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 18, 422-41.
- SHEN, W., WEI, Y., DAUK, M., ZHENG, Z. & ZOU, J. 2003. Identification of a mitochondrial glycerol-3-phosphate dehydrogenase from *Arabidopsis thaliana*: evidence for a mitochondrial glycerol-3-phosphate shuttle in plants. *FEBS Lett*, 536, 92-6.
- SHIKANAI, T., ENDO, T., HASHIMOTO, T., YAMADA, Y., ASADA, K. & YOKOTA, A. 1998. Directed disruption of the tobacco *ndhB* gene impairs cyclic electron flow around photosystem I. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 9705-9.
- SILFLOW, C. 1998. Organisation of the nuclear genome. *Rochaix, JD, Goldschmidt-Clermont, M, Merchant, S. eds. The molecular biology of chloroplast and mitochondria in Chlamydomonas*.
- SILVA, J. 2006. Thermogenic mechanisms and their hormonal regulation. *Physiol Rev*, 86, 435-64.
- SINGLA-PAREEK, S., REDDY, M. & SOPORY, S. 2003. Genetic engineering of the glyoxalase pathway in tobacco leads to enhanced salinity tolerance. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 14672-7.
- SINGLA-PAREEK, S., YADAV, S., PAREEK, A., REDDY, M. & SOPORY, S. 2006. Transgenic tobacco overexpressing glyoxalase pathway enzymes grow and set viable seeds in zinc-spiked soils. *Plant Physiol*, 140, 613-23.
- SLUSE, F., JARMUSZKIEWICZ, W., NAVET, R., DOUETTE, P., MATHY, G. & SLUSE-GOFFART, C. 2006. Mitochondrial UCPs: new insights into regulation and impact. *Biochim Biophys Acta*, 1757, 480-5.
- SMALL, W. & MCALISTER-HENN, L. 1998. Identification of a cytosolically directed NADH dehydrogenase in mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol*, 180, 4051-5.
- SMITH, A., RATCLIFFE, R. & SWEETLOVE, L. 2004. Activation and function of mitochondrial uncoupling protein in plants. *J Biol Chem*, 279, 51944-52.
- SNYDERS, S. & KOHORN, B. 2001. Disruption of thylakoid-associated kinase 1 leads to alteration of light harvesting in *Arabidopsis*. *J Biol Chem*, 276, 32169-76.
- STAEHELIN, L., ARMOND, P. & MILLER, K. 1976. Chloroplast membrane organization at the supramolecular level and its functional implications. *Brookhaven Symp Biol*, 278-315.
- STITT, M. 1980. Carbohydrate breakdown by chloroplasts of *Pisum sativum*. In: REES, T. (ed.). *Biochim. Biophys. Acta*.
- STUART, T. & GAFFRON, H. 1972. The Gas Exchange of Hydrogen-adapted Algae as Followed by Mass Spectrometry. *Plant Physiol*, 50, 136-140.
- SVENSSON, A., JOHANSSON, F., MØLLER, I. & RASMUSSEN, A. 2002. Cold stress decreases the capacity for respiratory NADH oxidation in potato leaves. *FEBS Lett*, 517, 79-82.
- SVENSSON, A. & RASMUSSEN, A. 2001. Light-dependent gene expression for proteins in the respiratory chain of potato leaves. *Plant J*, 28, 73-82.
- SWEETLOVE, L. J., FAIT, A., NUNES-NESE, A., WILLIAMS, T. & FERNIE, A. R. 2007. The mitochondrion: an integration point of cellular metabolism and signalling. *Crit. Rev. Plant Sci.*, 26, 17-43.
- TAANMAN, J. & CAPALDI, R. 1992. Purification of yeast cytochrome c oxidase with a subunit composition resembling the mammalian enzyme. *J Biol Chem*, 267, 22481-5.
- TAKAHASHI, Y., YASUI, T., STAUBER, E. & HIPPLER, M. 2004. Comparison of the subunit compositions of the PSI-LHCI supercomplex and the LHCI in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry*, 43, 7816-23.
- TANAKA, Y., KATADA, S., ISHIKAWA, H., OGAWA, T. & TAKABE, T. B. S. 1997. Electron flow from NAD(P)H dehydrogenase to photosystem I is regulated for adaptation to salt shock in the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803. *Plant and Cell Physiology*, 38, 1311-1318.
- TANUDJI, M., SJÖLING, S., GLASER, E. & WHELAN, J. 1999. Signals required for the import and processing of the alternative oxidase into mitochondria. *J Biol Chem*, 274, 1286-93.

- TEPPERMAN, J., ZHU, T., CHANG, H., WANG, X. & QUAIL, P. 2001. Multiple transcription-factor genes are early targets of phytochrome A signaling. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 9437-42.
- TERASHIMA, M., SPECHT, M., NAUMANN, B. & HIPPLER, M. 2010. Characterizing the anaerobic response of *Chlamydomonas reinhardtii* by quantitative proteomics. *Mol Cell Proteomics*, 9, 1514-32.
- TURUNEN, M., OLSSON, J. & DALLNER, G. 2004. Metabolism and function of coenzyme Q. *Biochim Biophys Acta*, 1660, 171-99.
- VALPUESTA, V. & BOTELLA, M. 2004. Biosynthesis of L-ascorbic acid in plants: new pathways for an old antioxidant. *Trends Plant Sci*, 9, 573-7.
- VAN LIS, R., ATTEIA, A., MENDOZA-HERNÁNDEZ, G. & GONZÁLEZ-HALPHEN, D. 2003. Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach. *Plant Physiol*, 132, 318-30.
- VAN LIS, R., GONZÁLEZ-HALPHEN, D. & ATTEIA, A. 2005. Divergence of the mitochondrial electron transport chains from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* and its colorless close relative *Polytomella* sp. *Biochim Biophys Acta*, 1708, 23-34.
- VANLERBERGHE, G. & MCINTOSH, L. 1997. Alternative oxidase: From Gene to Function. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 48, 703-734.
- VANLERBERGHE, G. & MCLINTOSH, L. 1996. Signals Regulating the Expression of the Nuclear Gene Encoding Alternative Oxidase of Plant Mitochondria. *Plant Physiol*, 111, 589-595.
- VENER, A., OHAD, I. & ANDERSSON, B. 1998. Protein phosphorylation and redox sensing in chloroplast thylakoids. *Curr Opin Plant Biol*, 1, 217-23.
- VERCESI, A., BORECKÝ, J., MAIA, I. G., ARRUDA, P., CUCCOVIA, I. & CHAIMOVICH, H. 2006. Plant uncoupling mitochondrial proteins. *Annu Rev Plant Biol*, 57, 383-404.
- VIDI, P., KANWISCHER, M., BAGINSKY, S., AUSTIN, J., CSUCS, G., DÖRMANN, P., KESSLER, F. & BRÉHÉLIN, C. 2006. Tocopherol cyclase (VTE1) localization and vitamin E accumulation in chloroplast plastoglobule lipoprotein particles. *J Biol Chem*, 281, 11225-34.
- VOLLMAR, M., SCHLIEPER, D., WINN, M., BÜCHNER, C. & GROTH, G. 2009. Structure of the c14 rotor ring of the proton translocating chloroplast ATP synthase. *J Biol Chem*, 284, 18228-35.
- VON HEIJNE, G., STEPPUHN, J. & HERRMANN, R. 1989. Domain structure of mitochondrial and chloroplast targeting peptides. *Eur J Biochem*, 180, 535-45.
- VÁZQUEZ-ACEVEDO, M., CARDOL, P., CANO-ESTRADA, A., LAPAILLE, M., REMACLE, C. & GONZÁLEZ-HALPHEN, D. 2006. The mitochondrial ATP synthase of chlorophycean algae contains eight subunits of unknown origin involved in the formation of an atypical stator-stalk and in the dimerization of the complex. *J Bioenerg Biomembr*, 38, 271-82.
- WAGNER, A. & WAGNER, M. 1997. Changes in Mitochondrial Respiratory Chain Components of *Petunia* Cells during Culture in the Presence of Antimycin A. *Plant Physiol*, 115, 617-622.
- WAGNER, A. M. 1995. A role for active oxygen species as second messengers in the induction of alternative oxidase gene expression in *Petunia hybrida* cells. *FEBS Lett.*, 368, 339-342.
- WAGNER, A. M. & KRABS, K. 1995. The alternative respiration pathway in plants: role and regulation. *Plant Physiol*, 115.
- WALKER, J. & DICKSON, V. 2006. The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta*, 1757, 286-96.
- WANG, M., ROBERTS, D. L., PASCHKE, R., SHEA, T. M., MASTERS, B. S. S. & KIM, J. J. P. 1997. Three-dimensional structure of NADPH-cytochrome P450 reductase: Prototype for FMN- and FAD-containing enzymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.*, 94 8411-8416.
- WHELAN, J. & GLASER, E. 1997. Protein import into plant mitochondria. *Plant Mol Biol*, 33, 771-89.
- WIERENGA, R. K., TERPSTRA, P. & HOL, W. G. J. 1986. Prediction of the occurrence of the ADP-binding bab-fold in proteins, using an amino acid sequence fingerprint. *J Mol Biol*, 187, 101-107.
- WILLEFORD, K. O., GOMBOS, Z. & GIBBS, M. 1989. Evidence for chloroplastic succinate-dehydrogenase participating in the chloroplastic respiratory and photosynthetic electron-transport chains of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology*, 90, 1084-1087.
- WOLLMAN, F. 2001. State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *EMBO J*, 20, 3623-30.
- WOLLMAN, F. A. & LEMAIRE, C. 1988. Studies on kinase-controlled state transitions in photosystem II and *b<sub>6</sub>f* mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* which lack quinone-binding proteins. *Biochim Biophys Acta*, 85, 85-94.
- WU, M., NIE, Z. Q. & YANG, J. 1989. The 18-kD protein that binds to the chloroplast DNA replicative origin is an iron-sulfur protein related to a subunit of NADH dehydrogenase. *Plant Cell*, 1, 551-557.
- WYKOFF, D., DAVIES, J., MELIS, A. & GROSSMAN, A. 1998. The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiol*, 117, 129-39.
- YANAMURA, W., ZHANG, Y., TAKAMIYA, S. & CAPALDI, R. 1988. Tissue-specific differences between heart and liver cytochrome c oxidase. *Biochemistry*, 27, 4909-14.
- YANKOVSKAYA, V., HORSEFIELD, R., TÖRNROTH, S., LUNA-CHAVEZ, C., MIYOSHI, H., LÉGER, C., BYRNE, B., CECCHINI, G. & IWATA, S. 2003. Architecture of succinate dehydrogenase and reactive oxygen species generation. *Science*, 299, 700-4.

- YTTERBERG, A., PELTIER, J. & VAN WIJK, K. 2006. Protein profiling of plastoglobules in chloroplasts and chromoplasts. A surprising site for differential accumulation of metabolic enzymes. *Plant Physiol*, 140, 984-97.
- YUKIOKA, H., INAGAKI, S., TANAKA, R., KATOH, K., MIKI, N., MIZUTANI, A. & MASUKO, M. 1998. Transcriptional activation of the alternative oxidase gene of the fungus *Magnaporthe grisea* by a respiratory-inhibiting fungicide and hydrogen peroxide. *Biochim Biophys Acta*, 1442, 161-9.
- ZAMORE, P., TUSCHL, T., SHARP, P. & BARTEL, D. 2000. RNAi: double-stranded RNA directs the ATP-dependent cleavage of mRNA at 21 to 23 nucleotide intervals. *Cell*, 101, 25-33.
- ZHANG, H., WHITELEGGE, J. & CRAMER, W. 2001. Ferredoxin:NADP<sup>+</sup> oxidoreductase is a subunit of the chloroplast cytochrome b6f complex. *J Biol Chem*, 276, 38159-65.
- ZHANG, Q. 1996. Respiratory responses of pea and wheat seedling to chloramphenicol treatment. *Aust J Plant Physiol*.
- ZHELEVA, D., SHARMA, J., PANICO, M., MORRIS, H. & BARBER, J. 1998. Isolation and characterization of monomeric and dimeric CP47-reaction center photosystem II complexes. *J Biol Chem*, 273, 16122-7.
- ZITO, F., FINAZZI, G., DELOSME, R., NITSCHKE, W., PICOT, D. & WOLLMAN, F. 1999. The Qo site of cytochrome b6f complexes controls the activation of the LHCII kinase. *EMBO J*, 18, 2961-9.
- ZOTTINI, M., MANDOLINO, G. & ZANNONI, D. 1993. Oxidation of external NAD(P)H by mitochondria from taproots and tissue cultures of sugar beet (*Beta vulgaris*). *Plant Physiol*, 102, 579-585.



# Annexe 1: Séquences des gènes *NDA*

**NDA1:** cDNA : 3107 - Codant : 1653 - Protéine : 550 - DNA : 7274

## >NDA1cDNA

```
TGTTCCACAGCCCTCGCTGTCATGAGAGAGGACAGCTGGCCATTGTTACGGCTAATTGGGGTTTCGCCCTTAGGAAGCTGCTCTCGAAACCCGG
CCAACCTTTGACAGAGCGCATTGTTGCCGGAACAACCCCTGTGAAAGGGCCTTAGCTCTAAAGATTTTGGCATGGCTGCTTCGGCGCTTCTTGCCA
CGGTTGCTCGAGCTACATAAGAAGATCAAGCGGCGTGGGGACCTCCCTCCTCGGCGCCTTCAGCAACGACCATCGTCCCTGCGGCACAGCAGT
CTATCAACACCTGCGCAGACTAGCTGCACAGGCTCAGGCCAGCAAGAAGACCGCGAGCTCCGACCAACTGCCCTAAAAACGGGGCGCCAGAGA
CTCGTTGTTCTCGGCTCCGGCTGGGCAGCGCGGAGGCTTCTTCATGATATTGACCCCAACCTTACGACCTGACGGTTCATCAGCCCCCAAAACC
ACATGGTGTTTACTCCGCTACTGGCTTCCACCCTGTGGGCACCTGGAGCCCCGAGTGTGGCAGTGCACCTGCACGAGATACAGCCCTGCCT
CAGCCCGGCCCTCAGTTCCTGTTCATTGCCGATGCCATGCGGTGACGCGGGCTCCCGCACCGTGACGTGCCCTCCGTCGACGGACTGGAC
TTCAGTGTGCAGTACGACAACTGGCCATATGCACCGGAGCCAGGGCAGCACCTTTGGTATTTCCCGTGTGTGGAGAACCGGCACCTTCTGCT
GTGATGTCAAACAGGCAGACCGCATCCGTCAAAGCTGATTGAGAACATCGCGCTGGCGGGAGTCCCGGGTGGCCAGCCGCGCAGCAGGACGA
GTTCTCGCGGCTGCTGCATATCGTGATAGTGGGTGGCGGCCACGGGGTGGAGGTGGCGGGAGAGCTCACCGACTTCATCAGCCACGAGGTG
TCCGTGGACCTGATGCGCATGTACCCGAGCGCGCCAAAGCCATGAGGGTACGCTGGTGGAGGCGCGTGAGCTGCTGGGGTTCGTTCGACGCT
CGTTGCGGAGTACGACAGCAGCAACTCATCCAGGGGGGCGTCTTTCGCAAGGGCATTGTGCACAGGTTGACGCGCGCGGAGGTGGTGTGCT
CAAGGACGACAGCGTGGCTATCGGCTACGGCTATCGGCTGAGGACCTGGAGCCGCGTGCAGCAACCTGATGCCCTGCGGAGCTTGCAGCTTACGTTGG
GCCGTGGGCGCATTGACAGTGGACAAGTACATGCGGCTGTGGCGCCGCTCCCAACCGCCACCAGCACCAGTGCAGCCAAACCAGCGCCGG
CCACGTCGACGCCACAGCAATCAGAGCCGACTAGCCAAACGCCAGCCGTTCAACGGGCAAGGTTCCGGGCTGTGGCCGATGAGAGCGACAG
GCCCTCCACCGCGCCCTGGCCCCGGTCCGCGACGTGTACGCGTGGGGGACGTGTGCGCCAACCCGACAAGCCCTGCCCGCTGGCGCAG
GTTGTGAGCAGCAGGGCCGCTATCTGGCCAGAGTGTCTGAACAGACTGGCGGAGGGCCGCCCCAGGCGTCCCGCAGCACACCGGATTCGTGT
ATCGGCAGCTGGGCGCCATGGCCACTGTGGGCGCCACAGCGCGTGTGGAGTGGGAGACGCGCGCCGCGCCACCTCAGCTGGCGGGCTT
CCTGTCTGGGTGGCTGGCGTCCGCTACCTCACACGCTGGGCTCCATCCCAAGCGCTGGCGGTAGCTTCGACTGGAGTATTACCATG
ATCTTCGGCCGCGACTCAGCCGCTGGTAGCCCTGGACTAGGGCGGCTGTAGCCGTGTGGCGGGCGCGCGGCCACAGCAGGGATGTAGGAA
AGTGAGCAGCGCACCGCTGGGTTATCGACGCCATTGAGGACCGCGTGCAGTGCAGCAACCTGATGCCCTGCGGAGCTTGCAGCTTACGTTGG
TGGGGAGCAAGCATCTTCGCCCTCCGGGAGCTGAGGCAGACGTGCGTGCCTGTACTCTGTGACCCGGGCGCGGAGTGTGATGGTTAATT
GGTGTAGTGCCTGTCAATTCATCAGCTGTATATGGTCAAGTATTGATTGCTAGTGTGCGTAGGCTGCGCCAGGGGAATCCCTGGA
CTGCACGGATGTTTGGGACGCATGTGGCCAAACAGCAAGGCGCAGCAGCCGTAATGAACAAGTGAACATAGTGTGGACAGCGCTGCACCTAC
GGGTGAGCCGTAGAGCGCACCCGGGGCCATGGGCCATGAGCAAAACCGCAACCGGTTACATCGATGGCATTAAAGTGGCCCCCGCTGTGGG
CCGTAACCAGTTTCGAGTTTCGCATACAGTCTAAGACCTCAGCCTCTCAAACGGGGGGTAGAAAGCTCAGGTTCTTACCCCATGCTCAATATT
ACAGAGCTTTAGGAGAGCATCATGCACCTACTTCTAGTPTTTTTAAGGGGGTGTCTGGTGGAGGAGTCTGGGCGCCAAAGTTGGGGGGCGGA
CCTCGTCCCTGGGGTCCGTCGGGTTTCGGGAGCTCATCTGGCGGATTTCCGGGAAGCGCCCCACAAGCAGAAGTAGGGGCCAAACGCAGCAGT
ACGAGGCTCATATGTGACCTTATGACGTAGTAAGCACAAACAAAGCGCTGAGGGGCTAAGTTGCGCGTCCGGGCGTGACATGGCCATGTCT
CCACATTAACACACGCGCAGTGCACCTGCTGGGCTCTGAAGCGCTGGTGCAGTGTGACGTTACGTTAACAAGGCTGCCGATGCACATTTGCCA
TTGCTGCGCGCGGAGAGAGTTGAGCGCGGGTTACGGGGTGGTCTGGGTCGAGGGGATTTCCATGGATAGGATCCCGCTGTGACCGAAGTCCC
AGAACAGGACCGCTGATGGCAGGGAGTGTAGTGTCTGCAAGAGGAGTCAATTGACACCCTTTGGTACTAAATGGAGGGGTTTTAACCCTG
AACAAACAAGTTTGTCCGTGGGGGGCGGTCGTCCTCAAGGGGGTCCCGGGGATTTCCGGGCATGGGGTCTGGCATTGTTTCCGAC
CCCC
```

**NDA1:** cDNA : 3015 - Codant : 1857 - Protéine : 618 DNA : > 9852

## >NDA2cDNA

```
CAACGCTGCAAAATGAACATGTTGCTTCAACAACAGAAGCTCGCTGCGGGCTGCAAGCAGCGCAGCGTTGCGCAGCCCTCGCGGGATGCGT
CGTGTCCACACCGGCTGCGCTTGGGCGCGTTGCTTCCCGTCAACGATCAGTGACGACTGCGGTTCATGACACCAGCGCGGAAGTTCGGAGTCT
TCGAGCCCGGTATATACCACCATGAGCCTGATGGCCAAAACCTCAAGACTGTAAAGCCTCGCCTGGTTGTGCTGGGTTCCGGCTGGGGCGCCA
TGTCGTTCTGAAGGCGTGCAGCAGCAGCATCAGCTCGACCTATGAGCTCATCGTCTGCTCGCCTCGCAACTACTTCCCTGTACAGCCCGTGTCT
GCCGGCTGTGGGACCGGAACCATGGAGGAGCGTTCATTTGTGGAGCCCGTGCACAACTTCATCGTGGGCAAGGGCGAGTTCACGAGGCTGAG
TGCAAGGACATTCACCGGTGCGCAAGGAGCTGGTGTGCTGCTTCCCGGAGGACGCGGGGCTGGACAGCGCTTCAAGATGAGCTCAGCAG
TGCTGGTTCATGGCGGTCGGTTCAGTGAACAACACGTTTGGCATCAAGGAGTGGACCAGTACTGCTTCTACTTCAAGTCCATTGAGGACGCCAA
CAGGCTGCGCTCGCGCGTTCGGAGTGTCTTGGAGCGCGCCCTGCCTGCCACACCCAGGAGGAGCGCAAGAAGCTGTGACGTTTGTGGTGTG
GTGGGCGCGGCCCAACGGGCTGGAGGTGGCGCGGAGCTGTACGACATGATCGAGGAGGACCTCTCCAAGCTCTACCCCAACCTGGTCAAGG
ACGTGTCCATCCAGTGGTGGAGCTGATGGACACGCTGTGTCACCTACGACCGCCATTAGCCTGTACACCAGCGGAGCAGTTCAGCGCGC
GGCATCAAGCTGGTCTCAACAGTCTGTGGCGTCCGTGGAGACCGCGTGGTGGCGGTTGGTGAACAAGCCAGCGGCTGACACATCAAG
TTTGGCGGTGTGTGTGGGCCACTGGCATGCCATGAACCCGCTGGTGGCGCAGTGCAGGAGAAGCTGCCGGGCGAGAGCCACTTCAGTGTGTG
TGCTGACAGATGACTGCATGCGGTCAGGGGACGCGAGCGCTCCATCTGGGCGTGGGCGACCGCCACCATGACAGCCCAAGGCGCTGGA
CTATGCGGAGCAGCTGTTTGGAGCAGCGACCAACCCGCTAGCCGCTAAGCTTGGAGGAGTGGCGGCTGCTCAACACCGCATCAAG
GAGTTCAAGCCACTGGAGGAGCAGCGCGCTTCCGAGCAGCCAAACCGCGCTCAAGCGCTTCGGCGGCTGGTCCGCAAGTCTCAGTCCCGG
CGGATGCGGCGCGCGCGGCCAGCAACAGCAGCCAGCCCTTTCGGTGTGCTGTGGACGGCAATACGGAGATCTCCAAGGAGCAGTTCAGGA
CATTCTTGGCAAGGTGGACAAGGGCTTCGCGCGCTGCTGCCAGGGCGAGGTGGCCAAACAGCAGGGCAAGTACCTGGCGGGCTGTTTGGC
TGGGACGCAAGCCGCTGTTCCAGCTGCCAAGTTCCGGCCCTCACGGGACGGGCGCGGGCTTTGTGGGAAGAGCTACGAGACGATGTC
GCAGTTCTCTCCGCAACAGTGTCTGGTCCCGCGGACTGGCTGCGCACCAAGATCTTTGGCCGCGACATCTCGGAGTGTGATTTGTAAATC
TTATTACCGATTTTGGCAGCTGGCTAGCGCTGTGCGTGTATTTGTTATGTTTGTGTGCGTGTGTGTATGCGCGTATGTGCTTGGCTGG
CGTGAAGCCATGCTCGAGATGTTTGGTTGAAGCGCCGAGTGTGCGTGGCGTGGTGTGGCGGAGGAGGAGGAGTGGCGCGCCACAT
CTCGAAAGCTGTGCTGGGCGCTTTGAAGCAGGAGGACAGCAGCAGCAAGCTCCGCGTGACTTCTTTATGTGTGAAACCGCGCTG
TGCGCGCTGCGCGTGTGTGTGTGTGCGCGCCCTCGCCGGATTGGTTCGTATGGAAGTGGTGGTGTGATGCGCTGCGCGGGGCC
GCGTACGTGGATCAAACAGCGCATTGTGGGCGCTAGAAAGCAAAAGCTGTATCGAGTGGAGCGCAAGCCGAGGGGTTATCTGGATTCGGGG
AGAGAGATTCGTGATTTGCGTGGACACAAGCGACTGATCCGTAACGTCAGCTGACATTGACGACTAACCTGACTAATCGCATTGACGACT
ACGTGCATTAATCGTATTTAAACACAGAAAGGGTTGGTGGCATTGAGTGCAGAGACTTGCCCTGGAAGGGGACCTGATGACCGCGGC
CGTCTGTGTGTGTGTTGGAGGGGTGTGGGTGTGGGTGTTCAGCGCCAGCCAGCCAGGTGGCGATGGCGTTACGACAATGGGAGCGGC
CGAGCGGAGGATGAGGAGGAGGGCGTAGCCTGTGTGGGTGTGTTTGCACGCGACTGCCGTTCCGTAGCTGTGGTTCCTGTTCCGG
GGACGAAGTACGAGCGCGCTGGACTGTTGTACGAATCACCGCTAGCAGTGGCGGTAATGCGAATGAGTCCGCGCTCCCGCGCTGCCCAA
GGAATCGTCCCAACCTCGCTCAGGGGAGGCGGGAGGGGATTTTCATCCAGCTGTGGCTGTGATGGGACAGGTTTAGGACAGGTTGG
CGAGGTCTCGTGTGGTGCAGTGCACCCATACCCAGCAGTGGCTAGGTGAAGGAGCCTGGCGCGGAGGCACAGCTGCGCTGACATAAGTA
ACGCTGC
```

**NDA3:** cDNA : 3407 - Codant : 2202 - Protéine : 734 - DNA : 7038

**>NDA3cDNA**

ACAACCTCACTTACAATACAATAGAACCATTCAAACGCCAGAAGAATGAGGACGAGTATTCCTGTGCGAGGTGGAAGGGTTTCTTCTCGAAATG  
CTGCCACACAGCGGCTTGTCTGCGCCAGCTGGTTCGGAATTGCCCGCGCGCCAGCCAGTTCGCGTGGGGCTGAGGCACCCCGTGATGG  
ATCGCCCACTGCTTTGAAGGAGCCCGGACCAAGGCCCGGCGAGCCGCTGGCGCAGCCGCTGGCGCCGCCAGCCCGCGCCCGCGCC  
GGTCCCAAGTACTTTCCAAAGCCCGGCGACCCGCAATGGCCGCCAGCGCCCTTTGCCGCCATCGCGCTGGACAACCTCTTGATAGCGTGG  
TGGACGTGGGGGCCCATCTGGTTCGCATGAACGTGGAGGCAGACAAGCTGGCGATGCGGCAGCAGGAGCAGTGGTGGCGGGCGACAACGGGCG  
CATGCGGCTGCGCGCTCCACCAAGCCGGTGGTGTGGTGTGGCGGCTGGGGCGCACTCGCTGATCAAGGTCAATGACACGGACAG  
TAGGACGTGGTGGTGTGTGTCCCCCGCAACCACTTCTGTTACGCGCCATGCTGCCCTCCACGGCGGTTGGCACGGTGGAGTTCGGCTCCCTGC  
TGGAGCCCATCCGCACCTCCAACCCCTGCGTCACTACCTGGAGGCCGAGTGGACAGCCTGGACCCGCACACCAAGGTGGCGGTGTGCACGTC  
TCTCTTGCCTACGACGACGGGGCGGCGCGAGTTCGAGATCAGTACGACAAGGCTGTGGTGGCGGTGGGCGAGCAGCCCGCACCTTGGC  
GTCAAAGGCGTCAAGGAGCACTCTTTTTTCATGAAGGAGGTGACGCGACCGGTGGCCCTGCGCAAGCGCATCGCCGAGAAGTTCGAGCTGGCCA  
GCCTGCCCGGCACCGAGGAGGACCGGAAGGCGCGCTGCCTTTGTGGTGGTGGGCGGGCCGACCGCGTGGAGTTCGACGGCACGCT  
GAGCGACTTCGTCGTGAGGACTGAAGAAGAAGTACCGGCGCTCATGAAGTACGTCAAGGTACGCTGCTGCAGAGTGCAGCAGATCCTG  
ACCCAGTTCGACGCGGGCTGGGCCACGCGCCACGGAGGCTGGAGAGCAGTGGCGTGGAGGTTTCGACCCGGCGTGGCGGTGGTGGAGATCA  
CAATCAACAAGGTGCTTGTGTTCGAGCGCGCAGGTGTCTCAAGGGTGGCGAGGACTGCGGTACCGGTGCGGTGCGCGCCGCA  
CGCGCCCGCGCGCTGGTGAACAGATCGCCAGCCAGTGGCGGAGCAGGCGCGCGGCGGAGGCGCCGCAACGCAAGCTGTGCGTGGAC  
TCGTTCTGCGTGTGGTGGGCGCCACCGACTGATGGCGCTGGCGACTGCAGCTGGTGTGGGCAACAGGCTGCCATCCACGGCGCAGGTGG  
CGGGCAGCAGGCGCCTACCTGGCCACCTCATCAACAGCCAGTACCAGTAGGCGTGGGGGCTACACGACGCGCCGCTTCCAGATCGT  
CAAGCGCAACAAGCTGAGGTGAGTGGGAGCGCGCGGCGGTACTGACCGGCGCTTGTGAGTTCGTGCGTGGGCGCATATGGCTGCGCAACGACA  
AGGCTCTGACGCGAGTGGAGGCGTTCGACGCTCATCAATCTCAAGCTGTACGGCAGCGTGGCGTTCCTGCTGTGGAAGTCCGTGTACATCAACAA  
GCAAGTGTGCTTCGCAACCGTGTGCTTATCTGTTTCGACTGGATGAAGACTCGCGTGTTCGGGCGCGACATCTCGCTGTCTAAATCTCGGAGC  
GCTGGAGCAGCTGTTCTAATCGCGGAGCGCTGGAGCAGCTGTTCTAATCGCGGAGCGCTGGAGCAGAAGCACCAGTTCGTCGGCGTGGTGGCC  
CGCGGCTGTACAGGATGAGCGTGAAGGAGCAGCGCGCAGCGCGCTCATACCGCCAGTACAGCTGTGACATTCGCGCGCATACAGATGG  
CGACGGGCTGGCATGCGATGCGGTGCTTCTGGGTCTTACCATTGAGGGGACCCCGTCCCGGGCAGAGTGTGTGGTGTTCGGAGCTCT  
GCTCTGCTGTGTCGCGAGGCACGGCAGGCGAGCAGTGCATTGGCATTGGAGCGGAGCACGAGAAGTACATCGTTGCACACCGTGGGGGCGAGGAC  
CAAAGAAGAGTGTGGGGTACAGAATGCTTTTCTGCGGCAATAATCTTTTACTGAATCCATGGGGTGTTCCTTATCTTAGCTCAAAGTCT  
GTACATGTTGTGACGCTGCTGAAACCGGCTGTGCGGTTGCGCGGCTGAGAGGCGCGGTGCTGAGTGTGCAACGCGCGGCTGTGTGCGTGC  
AGGTTGCTGTGTTTGGCGCACATGCATGGCGCGTATCTTATATCTGTGCGCTGTGAGACGCAAGGCTCTGTCGTTCTGTAGGCTTACTTC  
TGGCATTCAATCGTGGGAGGCGAGCGCTTTCCTACCAGTGTGCATGCTGATGGCTGCTTGCAGATGTACCATTGGCCCGCGGCGGCTGCT  
GCTGCCAGTGTGAGCCTCATACATGGCGCTCCGCATCACTAGACGCGGAACCTATCTATACATCTATACCACGCGTGTGTGGGGTGTGCGAGCA  
GGCCTGGAGTGAAGTAGAGCGTGAAGCAAGTTTGGGTGCTGTGGGTGAGAGGCGCGGTGCGTGGTGGTGTGCAACGCGCGGCTGTGTGCGTGC  
GTGAAGTGAAGAGTGAAGTGTGATAAACTTTGTTGGCAATTAACGCTGGTTCGCCAGCGGGGACACTACCACCTCGTGTATTGCTAGCAA  
TGACGTAAGCGTGGTGGTGGGCTGCGCCTCCATGCGCACGCATGGGCGCGCTTGGCGGACCCAGACAACATGCACCTGCTGTGGCGCT  
CTTGTGTAATAATATCGTGCTTG

**NDA5:** cDNA : 1834 - Codant : 1821 - Protéine : 606 - DNA : 6047

**>NDA5cDNA**

TTCAAGTTTCTTCGATGCTTGCCTTCAACTCTTTGGCAGCGAGCCAGCCTGCGACGAGCGCTAGGAACGCTGCGGCGAGCGACCCCTGTATACTCC  
AACATGACGCTAGCGTCTCGCATGACGCGCTTGGCCTTTCAAGCGTTCGCGCGGACTGGAGCGGGCAGCGCGCTGATGGGCTTCC  
GTGCGGGCGGGTCAACAGCTCCGCACGGCGCGCGGGCTTGTGCGACGACAGGCCACAGGCTCCCGCGCTTCGGCCCGGACCTCTCCGGCCA  
CACTCGCCGCTGTGGTGGTGTGGGCGCGGCTTCGGCGGCTGTACGCGCGGTGCGGCTGGAGCAGCTGATGTGGCCGCGCGCAACAAG  
CCGCGAGTACAGCTGGTGGACAGGCGGACCGCTTCGTTTCAAGCGCTGCTGTACGAGCTCATCAAGGCGCGCCACCGCGACGAGGTGT  
CGCCAGCTTCGAGCAGCTGCTGGCGCCTACCCATCCGCTTCGTGACGAGCCAGGTGGCCTCCGTGTCGCCCGCGCGCCACGCGGAGCG  
GCCGACCCCGGACCGCCGACCGCGGGTGGGTGACGCTGTGCGACGGCACCCAGCTGCGGTACGACTTCTGTTGGTGGCGCTGGGGGG  
CAGCCGACAGCCGGGGGTGCCGGGGTGAAGGAGTGGGCGTCCGTTTCGCGGGTATGAGGACGCGCTGAGGGTGAAGGGCACGCTGGACC  
TGCTGTCTGACGCGCGCGCGGGCGGCTGTGTGGTGGTGGGCGCGGGCTACGCGGGTGGAGCTGGCGGCCACAGTGGCGGAGCGGCTGAG  
GGCGGGGGGAGGCGCGCGGTGGCGGTCAAGTTCCTACTCCCGCTCCACATTCGAGGGCTGTCCGAGGGCCAGGGCAGGGCCGCG  
AGCAAGGCGCTGGCGGACTAGCGTGGAGGTGCTCACAGGCGCAGTGTGCTGGGCTGGACCCGCGCTGGCCCTCCGACCGCGGCGAGC  
AGTCCCTGCGCGCGCACCTCCGCGCGCGCTGCCACCGCTGCCGCTCAGCTACAGCTGGCTTCGACCGCGCTCCGCGCGGGCGG  
TGGCGCGCGCAGCCACTGGGTGCGGACTGGTGGTGGACGGCCGGCACAGCCCCGCCACCGCGAGGCGCGCGCAGGCTTCCCGTTCCCG  
GTCAACGCGCGCGGCCCTCGAGACGGAGCCACGCTGCGTGTGTCGGCAGTGACAACGTGTTGCACTGGGTGACGTGGCTGTGGCGGCGC  
CCAGCCCGCGGCCACACCAACCAAGCCCTGCCCGCACAGCGAGTGGCTTCCAAACAGGCGACTACCGCGCTGGAACGTGTGGGCG  
CGCCATCAACGGCGCGCGCTGCTGCCCTTCAAGTACCAGCAGCTGGGCTCCATGATGGCACTGGGGCAGACCAACCGCGAGTGGCTCTGCC  
ATCCCGTGGCCACCGCACTCGCGACGAGTGCCTCCTACCCCTGGGGCCCTGCTTCCCGCGCGCGGCTGCGCGTGGCGGAGCCGGG  
CCGAGGCGGAGCCCGGTGGCGGGCGCGCTGCGCGGAGGGCAAGAGCTCGGCGTGGGCGACAGCGCGTACTGTGGAAGGGCCGCTGGC  
GCAGCTGATGCGCGCGCGCTACCTGTACCGGACGCCACGAATGACAGCGGCTTAACGTGGCAACGAGCTGGTGAAGCTGGGGCTGGAG  
GCGGCGCGGCACTGGCGGGCGGAGCCCGGAGGACTACGCTGTAA

**NDA6:** cDNA : 3909 - Codant : 1506 - Protéine : 502 - DNA : 6176

**>NDA6cDNA**

CGCCGCGGACTCCATTGAACGGTTTTGTGAATCCATTTCGTCCTTTAACTGAGCCGCCCTTCGCGTACAAGCCCTGCCTGCGCAAAGATAGC  
GTGGATTAGTTTCGCTCTAGAGATAACAGCACTGCGACAACAGTCATATAGTACTAAGCGCTGGGTTCTATCTTTGGCGCCACCGCTCGGACC  
GTGGTTTTCTGTCTGACGCTCGGAGCTTACACCGCGTGTTCCTACTGCCTCTGCGAGCCTACAGCCATATCGAGACATTTTCCGCAAAGCAGG  
GCGCATAAAGCTCGCGTCTGAACAGAGCGAGTAGCGGTGTGTTGGGCTCAAGCATTTTCGACCAGCTGGCAGCAGCGCAGATTATAGCT  
GCATAGTCACGGAGGCTGCTCCGCGATAAACACCACTGCTTATCTTTGGTGGCGGACCCGCTGGAGTCACTTGTCTCAGCGCTGCTGTTCA  
AGCTTCGTAGTACCTCGTACCTAAGGAGTACTTTGAGATCACATGGGCCACGCCACGCGGCTGATGGACCCCGGGTGGCGCGCAGCGG  
CTGCCATCAACTACTGGGACATTCCGGACTAGGGCGGCTCATCAAGCACGTGTACACAGCTGACATCCCAGTCGGCGCTGCTCAGTAGCGG  
CGACAGATCTCATTGACTTCGCGGGCGGTGTGCTCCGGCTCTCCACCTCGGAGCTGTTCAAGTCGGCGGCGCCACCAGCCGGGGCAGCGC  
CTGGCGGAGATGAAGGGCGAGATCCGCTCCGCCAAGTCCGTTGCTGGTGTGGGCGGCGGGCCAGCGGCTGGAGATGGCGGCGGAGATTGTGG  
ACGCTTCGCGGGCAAGCGCTCACACTGTTGACCGGCAAGAGGCTGCTGGCGAGCTGCGCGCGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGGG  
CTGGAGGCACACCACTCAAGTTCATGCTGGTGGTGGCGCGTGGAAATCAAGCCCCCGGACGACCCGCTCCCTCGGTGCCACTCCGCCACC  
GGCACCACCGCCACCGGACCCACAGCGGCGAGCGTACACCGCGCTGGCGGGCGGCTGGCGGCGGCTGTGCCTGATGAGCGGTCTGTGTCG  
GGCCGGAAAGCTACGCCACTCCACGCGCGCGCGCTCCACCCCGACGGCGGGCATCACACGCCACCAGCCCAACCCCACTGCTGGACAG  
CGCGGGGGCGCGCGCGCGCTCCGCTCGGTGGTGGCGGCTGAGCGACGGCTCTCACTGGCGGCTGACGTGGTGTGTTGGTGCACGGGCGC  
CGCGCGCGCGCGCATTCATGGCGGGCGGAGCTGGCGGGCTGCTGGACGACGCGCGGCTCAAGGTGCTGCCAGCCTGCAGTTGGAGG  
GCCACCCGCACATGTTCCGCTGGGGGACGTCAACAACGTGCCGAGACCAAGCTGGGCTTCTGGCGGCAAGCAGCGGAGCTGGCGGCGC  
CAGCCTGCAGGCGCTGGCGCGGCAAGGCGAGCGGGCGGGCGCGGCCAAGCTGCAGCGCTGGAAGCCCAACGGCGGCACTGGCGGCTGATG  
ATGTTGACGCTGGGCGAGATGACCGGCTCATGCGCGCGCGGCTCGTGTTCAGCGGCTGCTGCGGCACTGATCAAGTCCGAGGGCTGT  
TCGTCGAGAAGTATCGAAACTGCTCAAGGTGAACCGCGCGGGCCAGCGCTGCTGGTGGCTGGTGGCGGCTGGTGGCGGCTGGTGGCGGCTGG  
CGCGTGGGCTGGCGGCGTGGCGGCGCGCGGCTGGCGCGGCTGACGGCGCGGCGGAGGTGGCGAGGCGGTGGCGGCGGCTGGCGGCGGCTGG  
GGCAGCGGCGAGGCTGATCGGCGGCTGGCGGAGCACTGCTGCGGCGCGGATGGCTATATCGTATACCGTGCCTTGTACCTACCGCAATC  
GGCATAACATGGATTGCTATACGCTATTTGGAAGCAAAGCAGATTAGTATGAACTCGCAAAGCAGGAGCACACAAGGCACTGCTGCATTAA  
ATACGCAACACGAAAGCTGAGCTGAGGCGGCGGCTGCGGCAACGCGCTGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGGCGG  
CAGTAATAGCCAGTAGGTGGGGCAAAAGTAATAGAGTGAAGAAAGCTTGAATGTGAGTCTCGTGTGGTGTGGCATTTCGTTGGTCTTGAT  
CCGCTCTGGTGTGATGAGGGTTGGCGCGGCTTCATGTTTTTTGTTGGGAGGGCACTTGTGTTGCAACTACGTTACTAGGGTATGATTTCT  
GGTGCATTTGGCAAGGGGATGGCGATGGGTGGAGCGGGAGCGTTATTTCTACCCCGCTGCACCGGGGCGCTGAAGGCGACCGGTTGTGCAC  
AAGCGCTGTTCACTCGAGCGAGGCTTCGAGTGTGTTGAGAGGAGACACTGCGTGCAGCAGCTAGAGCTTCTGTTGATACCGCAACTCACATGGC  
CTCCTTTTTAGGAGTTTGTGAGTTGGTAGGGAGGGCAGTGAGGATGCGTCCGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT  
GAGGAGTTGTGGCGGCGTGCACGGTATGCTACTGCGGGGCGTGCACCCGAGGGGTTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGTGGT  
TGTGCGGTGTCAAGGCTATGCGGACCTAAGTGTGTGACAGTGTGCTTTGCAATTTGCCAGTTTGCATTAAAGCAAGGAGTATGTCGCCG  
CTATGTGAGACTTTGCAACAGTTTGAATGCTCCAGTCCGGTGGCAGTCTGAGGGAGTTGAACATTGCGCAAGGAATGTGGCGCAAGTTCTT  
TTGTCATGTTGGCTTTGGGCCACAGACTTGTGATGTGCGGTCGGCCATGGAGCCTACCGGCTGGCATGTGTTCTCTAGCGCCCA  
AAGGAGCAGACGCTCGTGTGCTGCTGAGTGTGTTGCGGTACTACGGACGAAACCGGCGACGCGGGTGGCAGCAGAGGCTAGACGTGGCTA  
GATGTTTGCACACTGTTGGGCTGAGTGAACCTGCGCTGCGGCTGTGTCGCGCAGGATGTGAGTTAAGAAATATAAAGCAAGGCGCTGAGG  
GTGGCACCGGAGTCCCGGAGGGGGCATGTGGTCCACCCGCGCGCCGAGCCCGGGCTGCACCGCAGAACTTAGGGGACCCCGCCCGC  
GTTTTGGGCTGGTGTGACACACACACGACATTTCCACCGTCCGTTGCATGGAGAAGGTGACGGTGGTGGTATGGAGCTATAGCTCTCT  
GCATCTTTGGCAATGGCAATAACGGCGGCGGCTGTGCCCGCGGATGATCTGTGTGGCTGTGTGGAACAGAGGTGCCGCGGCTGGTGGT  
TACGGAGTGGCTCAGGGGTTGGTGTGTTTCGCTCGGTTGTTGCAAGGTTGGTGGCGAGCGCCGAAAGGAATCAACAGGCGCTGAGGG  
CCGTGAATAATTTGATTATGTGTGTTCTCGTGCAGGTGAAGCCTAATGGCGTGTGGAAGACTGGGTGAATTAACAAGAAAGGATGGCTCTC  
CTCTCGCGGGCGAAGTGGCAGCCACGTTGGTGCATGTCTGAGGTGCAAGTTCCAAACTACCCATCTCGCGGGCATTGCCGGGTCGAT  
TCGGACGGGACCCCGGCTATGCGTCCGGCGGCTCCCGTGTCAAGTACAAGC

**NDA7:** cDNA : 1695 - Codant : 1101 - Protéine : 366 - DNA : 3392

**>NDA7cDNA**

CTCGTCCGACAGCCCAACATGGCGCCTAAGCCTCGGGTTTTAATTATCGCGGTTGGCTTCGCGGTTGTCACCCTAGCAAAGAAGGCCAGCGCT  
TCGCCGATGTACCCTGTTGACTCGAAAAGCTATTTGCAACTGACATGGACCACCGTCCGCGGCAATTGTGGACCCGAAAGTTGCATCGCGGAG  
TGCCATCAGCTACAAGGACATTCGCGCATGGGCGAATTCGTTCCAGGCCAGTACACAAGCCTCTCCCGCAAGTCTGCTGTGAGCAATGGA  
GAAACGCTGTCTGCTGACTACGCGCCCTGGCCACCGGCTCTCTACAGCGACACCGCATTCAAATCCACCGCTCCTCCAGCCGCGAGCAGC  
GACTGGCGGAGCTGAAGGCGCTCACGGAGGACATCAAGGCTCCAAAGTCCATTGTGGTGGTGGCGGCGGCGCCCGCGGGTGTGGAGGTGGCGGC  
CGAGATTGTTGAGGCGCACCGGCAAGCAGGTGACGCTGGTGCATCCGGGGCGCAGCTGCTGAACGGCACGCGCCCAAGGCCGGCGCGCC  
GCCAAGAAGTGGCTGGAGTCGACCGCGCTCACGGTGTGCTCAACACCTCGGTGCAGGGCAAAACCGAGGGCGCGGCGCCCGTCAAGCCTGACC  
TGGACGGCAAGGAGGTCGACGCTGGCGGCGGACGTGGTGTGTTGGTGGCGGCGCGCCCGCCCAACACCGCTTCTGCAGGGCGGCGAGCT  
GGCGGGCTGCTGGACGAGCGCGGCGCGCTCAAGGTGCTGCCAGCTGCAGGTGGAGGGCCACCCGACATGTTCCGCGTGGGGGACGTTCAAC  
AACGTGCCGAGGCAAGCTGGGCTATCTGGCCAGGAGCATGGCAAGCTGGTGGCAGTGAAGCTCAAGGCCCTGATCTCCGCAAGCCCGGTG  
CTCCCCCAAGCTGGGCGCATGGAAGCCCGGATGGCAACCAAGTGTGATTGTGCTGCTGGCGCGGCGGCGAGCGGCTGTGCCGATGAACGG  
CAACGTGTGGCGGCTGCTGCCCGCCAGCATCAAGTCCAAGGGCTGTTGCTAGACGACTACCGCAAGCAGCTGGGCGTGTGAGGATAACGA  
CGGGCGGAGGCGCGGGCGCGTGTGAGGATGATGCGGGCGGTTGGAGGGGCTGGAGGGGCTGAGCGGCGGGTGTGCTGTGGCCGTGGA  
TGTGGGACGCGCTATGGCAGTATCTATGGGCTGCACCTCTGCTGACTGGGCTGTACATACGCTGACTCGAACAACATACTTATTATTAGAT  
TTATGAATGCGGCTTACGTGGCGTGGCGTGGCCGATTTGCGTGGCGGTGCGATGATGGACAGCGGGGACAGGTGGTGGGGGGAGGGAT  
CGAAGTCATACTTCTGTGCCAAACATGAATATGTGTGTCATGGAAACCTGTTGCTGTAAGCTCGTTGCACACTGTGCTCGGAGGTTCCAGGA  
GGAGGTGCGTGGGCGTGGAGCTTATCTTCCGGTGAATACCGGTAGCTAGACACGATACTCGTCCACGAGATAACTCAGCGGCTGTGACGT  
TATGCAATAAAAGGTAGTGTGGCAGTGGGGTGGCGGACCGGCACTTGTCTGAGTCCGCTGCGGCTCAGCCTGTAACACTACGGTACCGG  
GCA

**Légende:**  
Région non codante en bleu.  
Région codante en rouge.  
3'UTR supplémentaire putative en vert.

## Annexe 2: Séquences des protéines Nda

### >NDA1prot

MAASALLATVASSYIRRSSVGTSLLGAFSNDHRPCGTAVYQHLRRLAAQAQASKKTASSDQLPLKTGRQRLVVLGSGWAAARLLHDIDPNLYD  
LTVISPRNHMVFTPLLASTTVGTLEPRSVAVHLHEIQCLSRPSSSVFIADAHAVDAASRTVTCSRVDGLDFSVQYDKLAICTGSGSTFGIPG  
VLENAHFLRDVKQADAIKQKLIENIALAGVPGEPSPRQQDEFSLRHIVIVGGGPTGVEVAGELTDFISHEVCVDLMRMYPERAKAMRVTLVEAR  
ELLGSDASLREYAARKLIQGGVLLRKGIVHEVTPREVVLKDGTVLPYGLCIWSTGVGPTPFSLSLPFAKTAVGR IAVDKYMRVLAPPSPTATS  
TSAANPAPATSPQSQSEPTSPAGSTGKVPGLLADESPTSTAGLAPVPHVYALGDVCANPDKPLPALAQVAEQQGRYLARVLNELARGPPHG  
VPQHTFVYRQLGAMATVGGHSAVLELGDAGRRLSLAGFLSWVAWRSAYLTRLGSIKRLAVAFDWSITMIFGRDLRSW\*

### >NDA2prot

MNMLLQQQKLAAGCKQRSVAQPSRGCVAHAHTGLRSRGRVSRQRSVTTAVMTTPAKSESSSPVYTTMSLDGQNLKTAKPRLVVLGSGWGAMSF  
ALPTSISSTYELIVVSPRNYFLYTPLLPAVATGTMEERSIVEPVRNFIIVGKGEFYEALCKDIDPVAKELVCCFPEDAGLDSACFKMSYDVLVMA  
VGSVNNTFGIKGVDQYCFYFKSIEDANRLRSRVSECFERAALPATPEERKLLTFVVVGGGPTGVEVAEALYDMEEDLSKLYPNLVKDVSIQ  
VVLEMDHVLSTYDRAISLYTAEQFKRAGIKLVLSRVASVEDGVVVRVVKANESVDIKFGACVWATGIAMNPLVRQLQEKLPQQSHFRSVLTDD  
CMRVKGSDDGSIWALGDAATIDQPKALDYAEQLFEQADTNRDGRLSLEELRVLLNTASKEFSLHEEHARFLDSQTGVKRFGLLVAKSLSPADAAA  
AAASNSSQPFVALLDGNTEISKEQFKDILGKVDKGLRALPATAQVANQQGKYLAAVFAGNRVTGAPELDAALADKIKPFRYFHKGSAAAYVGS  
AVFDLPKFGPLTGTGAGFVWKS YETMSQFSFRNQCLVAADWLRTKIFGRDISRV\*

### >NDA3prot

MRTSIPCRGGRVSSRNAATQRLAVAPAGRNCPRGRTAVRVRAEAPRDGSPALKEPPTKAPATAPARTPLAPPSAPAPAGPQYFPKPGDPQWPP  
QRPFAAIALDNLNLDVVDVGRHLGRMNVEADKLAMRQQEQQLVPGDNGRMRLRASTKPVVVLVGLSGWGAHSLIKVIDTDTYDVVVVSPRNFHFLT  
PMLPSTAVGTVEFRSLLEPIRTSNPCVTYLEAECDSLDPHTKVAVCTSSFAIDDGRRPQFEIQYDKAVVAVGEQPATFVGVKVEHCFFMKEVS  
DAVALRKR IAEKFE LASLPGTSEDRKAALHFVVVGGGPTGVEFAGTLDSDFVREDLKKKYPALMKYVKVTLQLQSAQQIILTQFDAGLGQRATEAL  
ESSGVEVRTGVRVVEITINKVMVLVSDAQVLLKGGEEELPYGVCVWSAGNAPRPLVTQIASQVAEQAAAAEAPPNAKLCVDSFLRVVGGATDLMALG  
DCSLVLGNRLPSTAQVAGQQGAYLAHLINSQYQLGVGGYTQPPPFQIVKRNKLQVWAGAGGTGAYALQAAAEENAVLSWLTAMMGKTRIQAS  
KEVADAMFRMDAPPVVRVHSESLTKATPLDKEAPPGGAKAVCDISAVMAAAAAAGGADPVAVARASADCLRSLEEEELKAREGAEATEVRYDR  
PFEFSLGIMAYVGNKALQTVEAFDVINLKLYGSVAFLLWKS VYITKQVSRNRVLIILFDWMKTRVFGRDISLF\*

### >NDA5prot

MLAFNSLAASQPATSARNAAAAATPVYSNMQRSVSRMQRRLGLSSVAFAGDWSGAARLMGFRAAGSQAPHGARAVATQATGSPAFGPGTSSGHH  
VVVLGGFGGLYAAVRLQMLMWRGNKQITLVDQADRFVFKPLLYELINGAATADEVSPSFEQLLAPYP IRFVQAQVAVSVSPAAPHADAPDD  
APDAAGAVTLDSTGQLPYDFLVALGGQPDSPRGVPGVKEWAVPFAGYEDALRVKGTLDLSDAGAGGCVVVVGAGYAGVELAATVAERLRARGA  
GGAVAVKVLTPGSHILEGCEPQGEAAASKALADLGVVLTGARVLGLDPLAASDAGEQSPAAGTSAALPTACRVSYSLASDAGSAAGGAARS  
HLGADLVVWTAGTSPATREARAGFPFPVNARGALETEPTLRVSGSDNVFALGDVAVAAPSPADPHHTQALPATAQVAFQQAADYAAWNVWAAING  
RPLLPFKYQHLGSMALGQTNAAVALPIPVPTALADAVRSSPLGPLLSAAGVVRVGGAGPEAAEAVAGAAAAEGKSAVAGDSGVTVEGPLAQLMR  
RGAYLYRQPTNEQRLNVATSWVKLGLAAAAALAGGSRRGATL\*

### >NDA6prot

MPADKPRLLILGGGPAGVILAQRCCSSVVTLLVDPKEYFEITWATPRGLMDPRVAAAAAINYWDIPDLGRVIQARVTQLTSQSALLSSGDTISF  
DFAAVCSGSSTSELFKSAATSRGQRLAEMKGEIRSAKSVLVVGGGPGVEMAAEIVDAFAGKAVTLVHGGKRLLAELPPRAGAAAQRWLEAHH  
VKVMLGRRVRESKPPDDPSLGATSATGTATGTGTHSGSAHTAVGGAVAAVPDERSWSGAGSYAHSHAAAASHPDGGHHTHHAHNPLLDLSAGAAA  
AGLPSVVRVLDGSSLAADVLLWCTGSRPAAAFMAGGELAGCLDERGAVKVLPSLQVEGHPHMFALGDVNNVPETKLGFLLAAKQAE LAAASLQAL  
ARAKAAGGPAPKLRWKPNGGTLAVMMVTLGRDDGVMRAGGLVFGVCPALIKSRGLFVQYKRYKLLKVNAPGPAPGAAGAAGASGLGRGAVGVA  
AVAGAPVAVQAEEVAQVAAGCDGGSGSR\*

### >NDA7prot

MAPKPRVLIIGGGFAGVTLAKKASAFADVTLVDSKSYFELTWTTVRGIVDPEVASRS AISYKDIIPGMGRFVQATVTSLSAKSAVLSNGETLSFD  
YAALATGSSYSDTAFKSTASSREQRLAELKALTEDIKASKSIVVVGGPAGVEVAEIVEAHAGKQVTLVHPGAQLLNGTTPKAGAAKKWLE  
SHRVTVLLNTSVQKPEGRGPVSLTLDGKEGRTLAAADVLLWCAGARPNTAFLLQGGELAGCLDERGAVKVLPSLQVEGHPHMFALGDVNNVPEAK  
LGYLATEHGKLVAVSLKALISAKPGASPKLGAWKPGMNQVMI VSLGRGDGVCRMNGNVCGGCLPASIKSKGLFVDDYRQLGV\*  
\*

Les préséquences d'adressage putatives sont surlignées en jaune.

### **Annexe 3: Aligement des protéines Nda ayant servi à l'analyse phylogénétique** (uniquement version informatique)

Légende :

A_t_NDA1	A.thaliana_NDA1
A_T_NDA2	A.thaliana_[NDA2]
S_T_NDA1	S.tuberosum_[NDA1]
O_S_NDA456	O.sativa_NDA456
O_S_NDA562	O.sativa_NDA562
C_R_NDA1	C.reinhardtii_NDA1
A_T_NDC1	A.thaliana_[NDC1]
N_SP_BAB75793	Nostoc_sp.[BAB75793]
N_P_NDA	N.punctiforme_NDA
Th_NDA	Thermosynechococcus_NDA
Syn_SLR1743	Synechocystis_[SLR1743]
Syn_NDA390	Synechococcus_NDA390
C_R_NDA5	C.reinhardtii_NDA5
C_R_NDA6	C.reinhardtii_NDA6
C_R_NDA7	C.reinhardtii_NDA7
T_B_NDH2	T.brucei_NDH2
C_R_NDA3	C.reinhardtii_NDA3
R_S	R.Sphaeroides
Halo	Halobacterium
B_S	B.subtilis
D_R	D.radiodupans
N_S_BAB73083	Nostoc_sp.[BAB73083]
N_S_BAB77919	Nostoc_sp.[BAB77919]
N_S_BAB73084	Nostoc_sp.[BAB73084]
Syne_SLR0851	Synechocystis_[SLR0851]
B_M	B.melilotis
S_M	S.meliloti
M_L	M.lotii
B_J_1	B.japonicum_1
X_A	X.axonopodis
C_T	C.tepidum
C_G	C.glutamicum
M_S	M.smegmatis
L_I	L.interrogans
G_M	G.metallireducens
N_S_BAB74663	Nostoc_sp.[BAB74663]
C_A	C.auriantiacus
D_D	D.desulfuriacans
B_T	B.thetaiotaomicron
C_H	C.hutchinsonii
E_C_1	E.coli-1
B_J_2	B.japonicum_2
R_P	R.palustris
B_V_2	B.vietnamiensis_2
A_V	A.vinelandi
P_F	P.fluorescens
H_I	H.influenzae
Z_M	Z.mobilis
B_V_1	B.vietnamiensis_1
C_R_NDA2	C.reinhardtii_NDA2
A_T_NDB1	A.thaliana_[NDB1]
S_T_NDB1	S.tuberosum_[NDB1]
A_T_NDB2	A.thaliana_[NDB2]
A_T_NDB3	A.thaliana_[NDB3]
A_T_NDB4	A.thaliana_[NDB4]
N_C_U08980	N.crassa_[U08980]
Y_L_NDH2	Y.lipolytica_Y1NDH2
S_C_NDE1	S.cerevisiae_[NDE1]
S_C_NDI2	S.cerevisiae_[NDI2]
C_A	C.albicans
S_C_NDI1	S.cerevisiae_[NDI1]
S_P_NDH2_1	S.pombe_NDH2.1
S_P_NDH2_2	S.pombe_NDH2.2
D_D	D.discoideum
N_S_BAB76910	Nostoc_sp.[BAB76910]
Syne_SLR1484	Synechocystis_[SLR1484]
N_C_NDE1	N.crassa_[NDE1]
N_C_NDI1	N.crassa_[NDI1]
P_F	P.falciparum
P_Y	P.yoelii
E_C_LpdA	E.coli-LpdA
A_A	A.ambivalens

```

A_t_NDA1      1 MLWIKNLA--RISQTTSSSVGNVFRNPE---SYTLSSRFCTALQKQVTDT-----
A_T_NDA2      1 MFMIKNLT--RISPNTSSIIITR-FRNSGSSSLSYTLASRFCTAQETQ-----
S_T_NDA1      1 MPWFKNLI--KISKTITNQSSS-YKSITPLASPLL--TQFLQFTKQY-----
O_S_NDA456    1 MAASSLLR--SLSRISRRGCVG-GAGPSPFHHSRLPYSPFSTAAADA-----
O_S_NDA562    1 MAWSRIARGSQLTQPLSRILAEGNAAATPAAYALRNAAALGQRASSASASSSFHSLALAG
C_R_NDA1      1 MAASALLA--TVASSYIRRSSG-----VGTSLLGAFSNDH-----
A_T_NDC1      1 M-----AVLSSVSSLIPFSYGATRLTSKASLASRTSGF-----
N_SP_BAB75793 1 M-----TEQT-----
N_P_NDA       1 M-----TQON-----
Th_NDA        1 M-----IRESAV-----
Syn_SLR1743   1 M-----TDAR-----
Syn_NDA390    1 M-----SQ-----
C_R_NDA5      1 MLAFNSLA--ASQPATSARNAAAATPVYSNMQRSVSRMQRGLGLSSVF-----
C_R_NDA6      1 M-----
C_R_NDA7      1 M-----
T_B_NDH2     1 MICRTSFL-----
C_R_NDA3      1 MRTSIPCRGGRVSSRNAATQRLAVAPAGRNCPGRGTAVRVRAEAPRDGSPALTALKEPPTKA
R_S           1 M-----
Halo          1 M-----
B_S           1 M-----
D_R           1 M-----
N_S_BAB73083  1 M-----
N_S_BAB77919  1 M-----
N_S_BAB73084  1 M-----
Syne_SLR0851  1 M-----
B_M           1 M-----
S_M           1 M-----
M_L           1 M-----
B_J_1        1 M-----
X_A           1 M-----
C_T           1 M-----
C_G           1 M-----
M_S           1 M-----
L_I           1 M-----
G_M           1 M-----
N_S_BAB74663  1 M-----
C_A           1 M-----
D_D           1 M-----
B_T           1 M-----
C_H           1 M-----
E_C_1        1 M-----
B_J_2        1 M-----
R_P           1 M-----
B_V_2        1 M-----
A_V           1 M-----
P_F           1 M-----
H_I           1 M-----
Z_M           1 M-----
B_V_1        1 M-----
C_R_NDA2     1 M-----
A_T_NDB1     1 M-----TLLSSL---GRASRSAPL
S_T_NDB1     1 M-----RGFTYL---SKVLHSHSS
A_T_NDB2     1 M-----RNFVFERFSKAFKDHP
A_T_NDB3     1 M-----AVLDMFCSNYFFLFH--
A_T_NDB4     1 M-----SFHSFYQRASSLPKAYPS
N_C_U08980   1 MASTSRALGRLS-APSMGVAR---LQTQAVSRLLSSAPRRALISESRQVAVTQQIRRAHT
Y_L_NDH2     1 MLRLRPVAVRAVSVALTRSLHVSVAKFNKIEGTAP-AGLPKEVKQTAGHQ---GHH
S_C_NDE1     1 M-----IRQSLMKTWANSRRFSLQSKSGLVKYAKNRSFHAA
S_C_NDI2     1 M-----LPRLGFARTARSIHRFKMTQIS-----KPFHST
C_A          1 M-----FTRSLIKGGRLATTRSLVNNSTSLVLKNQFKKYST
S_C_NDI1     1 M-----LSKNLYSN-----KRLLTSTNTLVRFASRSTGVE
S_P_NDH2_1   1 ML-----FRSIILRG---MPKAGIPKSPALASARNLRLANS
S_P_NDH2_2   1 MS-----VSKARLQS-----VVRLSRTVPYSKT
D_D          1 MISRAFSK-----VNKNQLIKTVSTNRIVACKNNQTQFIQRFSTSTDNS
N_S_BAB76910 1 M-----
Syne_SLR1484 1 M-----
N_C_NDE1     1 M-----LRTYRVARASGLATAPRTLTLTSTTATRHLFTLPKSLQLRRPEKLSLISQRO
N_C_NDI1     1 M-----
P_F          1 -----
P_Y          1 Y-----
E_C_LpdA     1 M-----
A_A          1 M-----

```

```

A_t_NDA1      47 -----VQAKEDVVNALEP-----
A_T_NDA2     45 -----IQSPAKIPNDVDR-----
S_T_NDA1     43 -----STN-----
O_S_NDA456   45 -----VER-----
O_S_NDA562   61 LADKYAAGAAGRLQPSRGI STTSPALRPAAEAAARVVECSDAADEAAAA-----
C_R_NDA1     34 -----RPCGTAVYQHLRRLAAQAQASKK-----
A_T_NDC1     34 -----NLSSRWNSTRNSPMLYLSRAVTNNSGTTEISDN-----
N_SP_BAB75793 6 -----
N_P_NDA      6 -----
Th_NDA       8 -----
Syn_SLR1743  6 -----
Syn_NDA390   4 -----
C_R_NDA5     46 -----AGDWSGAARLMGFRAAGSQAPHGARAVATQATG-----
C_R_NDA6     2 -----
C_R_NDA7     2 -----
T_B_NDH2     9 -----
C_R_NDA3     61 PATAPARTPLAPSPAPAPGPQYFPKPGDPQWPPQRPFAAIALDNLDSVVDVGRHLGRM
R_S          2 -----
Halo         2 -----
B_S          2 -----
D_R          2 -----
N_S_BAB73083 2 -----
N_S_BAB77919 2 -----
N_S_BAB73084 2 -----
Syne_SLR0851 2 -----
B_M          2 -----
S_M          2 -----
M_L          2 -----
B_J_1        2 -----
X_A          2 -----
C_T          2 -----
C_G          2 -----
M_S          2 -----
L_I          2 -----
G_M          2 -----
N_S_BAB74663 2 -----
C_A          2 -----
D_D          2 -----
B_T          2 -----
C_H          2 -----
E_C_1        2 -----
B_J_2        2 -----
R_P          2 -----
B_V_2        2 -----
A_V          2 -----
P_F          2 -----
H_I          2 -----
Z_M          2 -----
B_V_1        2 -----
C_R_NDA2     2 -----NMLLQQQKLAAGCKQRSVAQPSRGCVAHTGLRSGRVASRQRSVTT
A_T_NDB1     17 A-----SKLLLLGTLG- GGSIVA-----
S_T_NDB1     17 Y-----SKLLVLCVS- TGGLLV-----
A_T_NDB2     20 L-----TRILVVSTIS- GGGLIA-----
A_T_NDB3     18 -----S- GGGLIV-----
A_T_NDB4     20 T-----SKILLSTFSGGGVIV-----
N_C_U08980   57 E----TTPLEPPPKERR-RFRKLRWLWR-----APLFVSLAGIAYVGWGV-----
Y_L_NDH2     56 Q----EIPKPDENHPRRKKFHFWRSLWR-----LTYLSAIASLGYIGYRI-----
S_C_NDE1     38 RNLLLEDKKVILQKVAPT TGVVAKQSFFKRTGKFTLKALLYSALAGTAYVSYSL-----
S_C_NDI2     31 E---VGKPGPQQKLSKSYTAVFKKWFVR----GLKLTFTYTTLAGTLYVSYEL-----
C_A          38 S---TPPKVAKSKSSTIGKIFRYTFYT-----AVISVIGSAGLIGYKI-----
S_C_NDI1     32 N-----SGAGPTSFKT-----
S_P_NDH2_1   35 VRFASDAASSPKSTTSKWKILKR TTLGL-----FATAVVLYGANV-----
S_P_NDH2_2   24 MVRSFHVSCAVKNSGNVPTPRNKSF SRALEMAEVTSSLSMLGAVALFQSLRR-----
D_D          45 NNNEQNQQQQQKEQEPEKMKMNF AFWG-----GLAVAGLGGFWIIDMVVND
N_S_BAB76910 2 -----
Syne_SLR1484 2 -----GFQFPGNWPH
N_C_NDE1     54 LSGRPLPRTQSRLLNFGYRTAAWFGSS IAFVGLSFVAFFLYDASTYSSHATNQGDITVPK
N_C_NDI1     2 -----PPLRRDINASRLKSQDGFH
P_F          1 -----MLVKFR
P_Y          2 -----ITNTLFLYRQTMILSVK
E_C_LpdA     2 -----
A_A          2 -----

```

```

A_t_NDA1      60 -----QRYDGLAPTKEGEPRLVVLVLSGWAGCRVLKGIIDTTSIY--
A_T_NDA2     58 -----SQYSGLPPTREGEKPRVVVLVLSGWAGCRLMKGIIDTNTLY--
S_T_NDA1     46 -----DHVVGLEATKSDQKPRIVVLVLSGWAGCRLMKGIIDTNIY--
O_S_NDA456   48 -----RGFAGLGPTAKGEKARVVVLVLTGWAGSRLMKGIIDTTGY--
O_S_NDA562   110 -----AAVPDLGPTRPGEKPRVVVLVLTGWAA CRFLKGDVDTRAY--
C_R_NDA1     57 -----TASSDQLPLKTGRQRLVVLVLSGWAAARLLKGIIDDPNLY--
A_T_NDC1     67 -----ETAPRTYSWPDNKPRVVICILGGGFGGLYALRLLESLVW--
N_SP_BAB75793 6 -----KRIVILGGGFGGLYALRLVLSQLPW--
N_P_NDA      6 -----SRICILGGGFGGLYALRLVLSQLPW--
Th_NDA       8 -----RSQICILGGGFGGLYALRLVLSQLPW--
Syn_SLR1743  6 -----PRICILGGGFGGLYALRLVLSQLPW--
Syn_NDA390   4 -----PHIVILGGGFGGLYALRLVLSQLPW--
C_R_NDA5     79 -----SPAFGPGTSSGHHSPRVVVLVLSGWAGCRVLKGIIDTTSIY--
C_R_NDA6     2 -----PADKPRLLILGGGFGGLYALRLVLSQLPW--
C_R_NDA7     2 -----APKPRVLIILGGGFGGLYALRLVLSQLPW--
T_B_NDH2     9 -----RKPKVVVVLVLTGWAGCYFVSDTKPQLA--
C_R_NDA3     121 NVEADKLAMRQEQ---LVPGDNGRMRLRASTKPRVVVLVLSGWAGHSLIKGIIDTDTY--
R_S          2 -----VGPATGRIVVTSRIVVLVLSGWAGCRVLKGIIDTTSIY--
Halo         2 -----TTRVVVLVLTGWAGCYFVSDTKPQLA--
B_S          2 -----SKRIVILVLTGWAGCYFVSDTKPQLA--
D_R          2 -----KTLILVLTGWAGCYFVSDTKPQLA--
N_S_BAB73083 2 -----VAS--LENHQPHVVIVGGGFGGLYALRLVLSQLPW--
N_S_BAB77919 2 -----VDA--HEKKAPHQVVIILGGGFGGLYALRLVLSQLPW--
N_S_BAB73084 2 -----VEA--LDNPPHVVIVGGGFGGLYALRLVLSQLPW--
Syne_SLR0851 2 -----NSP--TSPRRPHVVIVGGGFGGLYALRLVLSQLPW--
B_M          2 -----VTPENISG---ISKAAIFQ--MDAANSPIVVVVGAGFGGLQLIIRLDLQAK--
S_M          2 -----QERHVVVVGAGFGGLQLVNDLKGAP--
M_L          2 -----NE-----MNQASHVVVVGAGFGGLQLIIRLDLQAK--
B_J_1        2 -----KQ-----RSSKSRGR--IMTTTPHVVIVGAGFGGLEATYRLAGTP--
X_A          2 -----TS--LPSQAPLILVVVVGAGFGGLQLIIRLDLQAK--
C_T          2 -----KKKVVIVGGGFGGLQLIIRLDLQAK--
C_G          2 -----SVNPT--RPEGGRHVVVVGAGFGGLQLIIRLDLQAK--
M_S          2 -----S--HPG--ATASDRHVVIVGAGFGGLEATYRLAGTP--
L_I          2 -----GEFNQKVVVVGAGFGGLQLIIRLDLQAK--
G_M          2 -----KRVVILGMGFGGIRAAVLAGKG--
N_S_BAB74663 2 -----M-----RNRRVVIVGAGFGGLQAAQSLAH--SG--
C_A          2 -----ISLERRQI---VSSPHIISNQPAQSRPRVVIVGAGFGGLAAVRLTAQ--AP--
D_D          2 -----TG-----STGNSRTRVVVVGAGFGGLQLIIRLDLQAK--
B_T          2 -----SLNIAKDSKRVVIVGAGFGGLEATYRLAGTP--
C_H          2 -----IM---ENKKNVVVVGAGFGGLQLIIRLDLQAK--
E_C_1        2 -----TT-----PLKKIIVIVGGGAGGLEMATQLGHKLG--
B_J_2        2 -----SEA-----QAGKP--RVVIVGGGAGGLELATALGNKYG--
R_P          2 -----SD-----KPHRIVIVGGGAGGLELATALGNKYG--
B_V_2        2 -----H-----RIIVGGGAGGLELATALGNKYG--
A_V          2 -----TH-----RIVIVGGGAGGLELATALGNKYG--
P_F          2 -----TH-----RIVIVGGGAGGLELATALGNKYG--
H_I          2 -----KN-----VIVGGGAGGLELATALGNKYG--
Z_M          2 -----SK-----NGRPDRIVVVGAGFGGLQLIIRLDLQAK--
B_V_1        2 -----NHNTHVATDRAPPTPRIVIVGGGAGGLELATALGNKYG--
C_R_NDA2     48 AVMTTPAKSESSSP---VYTMSLDGQNLKTAKPRLVVLVLSGWAGSFLKALPTSIS--
A_T_NDB1     34 -----YADANE---EANK-----KEEHKKKVVVLTGWAGSFLKALPTSIS--
S_T_NDB1     34 -----YAESNV---ESGQVVEQNQPESKKRVVVLTGWAGSFLKALPTSIS--
A_T_NDB2     37 -----YSEANA---SYGANGAVVETGTKKVVVLTGWAGSFLKALPTSIS--
A_T_NDB3     25 -----YSEANP---SYSNNG---VETKTRKVVVLTGWAGSFLKALPTSIS--
A_T_NDB4     38 -----YSDSNPLKRIILHADATLSDGNPIRKKVVVLSGWAGSFLKALPTSIS--
N_C_U08980   97 -----YEERNP---GPQVEPDP-----SKKTLVVLVLTGWAGSFLKALPTSIS--
Y_L_NDH2     97 -----YVIRNP---SDQLPADP-----SKKTLVVLVLTGWAGSFLKALPTSIS--
S_C_NDE1     91 -----YREANP---STQVPQSDTFPNGSKRKTLLVILVLSGWAGSFLKALPTSIS--
S_C_NDI2     76 -----YKESNP---PKQVPQSTAFANGLKKKELVILVLTGWAGSFLKALPTSIS--
C_A          78 -----YEESQP---VDQVKQTPFPNGEKKKTLVILVLSGWAGSFLKALPTSIS--
S_C_NDI1     43 -----MKVIDP---QHS-----DKPNVILVLSGWAGSFLKALPTSIS--
S_P_NDH2_1   75 -----YRFRHP---DPHQPLPDP-----SKKTLVVLVLTGWAGSFLKALPTSIS--
S_P_NDH2_2   77 -----LNNSSP---KGG-----SGVPPKKNIVVLSGWAGSFLKALPTSIS--
D_D          92 DFDSVTDKFRTRLP---ESERK-----KRPKVVVLTGWAGSFLKALPTSIS--
N_S_BAB76910 2 -----QQASHPTVILGGGFGGLYALRLVLSQLPW--
Syne_SLR1484 12 FLLACYLYRGSASGHSETCSGVGWKTVAINSSDSATTVIILGGGFGGLYALRLVLSQLPW--
N_C_NDE1     114 LALNPRRGPKNLPILFIFLDDDDSEKKKKHEKPRLVVLVLSGWAGSFLKALPTSIS--
N_C_NDI1     21 YTLREDLFLFPPGVHPVSTTLDGEEKFFHHKDRKERVVILVLSGWAGSFLKALPTSIS--
P_F          7 KCGQANIFRSISNVRKIYNVAKNNLKNNDIERKPKIILVLSGWAGSFLKALPTSIS--
P_Y          19 NSKIKGIYRSVSNFCNLNLIKVNVIYINK---REKVVVILVLSGWAGSFLKALPTSIS--
E_C_LpdA     2 -----TAGDKYIEVMMSTEIKTQVVVLTGWAGSFLKALPTSIS--
A_A          2 -----TKVVLVLSGWAGSFLKALPTSIS--

```



A_t_NDA1	98	-----DVVCVSPRNHMVFTPLLAST--CVGTLFRSVABPISR-----
A_T_NDA2	96	-----DVVCVSPRNHMVFTPLLAST--CVGTLFRSVABPISR-----
S_T_NDA1	84	-----DVVCVSPRNHMVFTPLLAST--CVGTLFRSVABPIGR-----
O_S_NDA456	86	-----DVVCVSPRNHMVFTPLLAST--CVGTLFRSVABPIAR-----
O_S_NDA562	148	-----DVVCTSPRNHMVFTPLLAST--CVGTLFRSVABPISR-----
C_R_NDA1	94	-----DITVISP RNHMVFTPLLAST--TVGTLFRSVAVHHE-----
A_T_NDC1	105	-----PEDKKPQVVLVDQSERFVFKPMLYEL--LSGEVDVWELAPRFSDLTN-----
N_SP_BAB75793	30	-----ETQOKPEIVLVDQSDRFVLSPLLYEL--LTGELQSWETAPPFIELEG-----
N_P_NDA	30	-----ESTQKPEIVLVDQSDRFVLSPLLYEL--LTGELQSWETAPPFIELEG-----
Th_NDA	33	-----SS--PPEITLVDHSDRFVFTPLLYEL--ITGELQSWETAPPFIELEG-----
Syn_SLR1743	30	-----EGHTPPEIVLVDQSDRFVLSPLLYEL--VTEEMQWELAPPFVETLAE-----
Syn_NDA390	28	-----ETSQRPDITLDRQNHVFSPLLYEL--ITEEMQWELAPPFVETLAE-----
C_R_NDA5	117	-----PRGNKPEITLVDQADRFFVFKPMLYEL--INGAATADEVSPSFEQLLAP-----
C_R_NDA6	29	-----VVTLVDPKNEYFELTWTATPRG--LMDPRVAAAAAINYWDTPDL-----
C_R_NDA7	28	-----DVTLVDSKSYFELTWTATPRG--IVDPEVASRSASISYKDPGPM-----
T_B_NDH2	35	-----ELHVLSTRNHHVLTPLLPQT--TGTLEFRSVABPISR-----
C_R_NDA3	175	-----DVVVVSPRNHVFETPLLPST--AVGTVFRSVABPISR-----
R_S	37	-----RAA--EITLVNAENYFVQPLPEV--CAGSTPAHAVSPLRFLRD-----
Halo	27	-----PDA--ELVWVADTDYHVLHEAHRV--IRDPGVQEKITTPVEDIKS-----
B_S	27	-----EQQA--RVTVVNKYPHQIITELHRL--AAGNVSEKAVAMPELKFVKG-----
D_R	25	-----L-----ESLLIEQAYHTFETRLHEA--AAHNA---RITLPLIPPLRG-----
N_S_BAB73083	34	-----V-----NVTLIDKRNHFHFQPLLYQV--ATGTLSPADIASPLRSVLSKS-----
N_S_BAB77919	34	-----V-----SVTLIDKRNHFHFQPLLYQV--ATGTLSPGDISSPLRAVFSKS-----
N_S_BAB73084	34	-----V-----DVTLIDKRNHFHFQPLLYQV--ATGTLSPADIASPLRAVLSKS-----
Syne_SLR0851	33	-----V-----DITLIDKRNHFHFQPLLYQV--ATGSLSPADIASPLRGVLLKQ-----
B_M	47	-----V-----RITLIDQRNHHVLFQPLLYQV--ATTILSTSEIAPIRNFRDR-----
S_M	28	-----V-----KVTLIDRNHHVLFQPLLYQV--ATTVLTSEIAPIRNFRDR-----
M_L	32	-----V-----RTMIDKRNHHVLFQPLLYQV--ATTALATSEVAPIRNFRDR-----
B_J_1	41	-----V-----DITLIDRNHHVLFQPLLYQV--ATASLATSEIAPVRRHMRDR-----
X_A	33	-----I-----RITLVDQRNHHVLFQPLLYQV--ATAGLSAPDIAPLRHLLREQ-----
C_T	27	-----V-----EVTLIDRNKHYHVFQPLLYQV--AMAALGEGDIATPLRNLAGY-----
C_G	36	-----V-----DVTLIDRNHHVLFQPLLYQV--ATGILSSGEIAPSTRQLLGSQ-----
M_S	35	-----V-----DVKLIARTTHHVFQPLLYQV--ATGILSEGEIAPATRVLLRKQ-----
L_I	31	-----L-----DITVIDKRNHHVLFQPLLYQV--ATAVLSPADIASPLRSVLSKS-----
G_M	25	-----L-----DVVLVDRNHYHVFQPLLYQV--GTAGLEQESIAYPVRAMAREW-----
N_S_BAB74663	28	-----A-----DVLLIDRNHYHVFQPLLYQV--ATGQIEPEIAYPIRITLRRRFSFNRYRQHHK-----
C_A	49	-----V-----DVLLINRTNYHGFQPLLYQV--ATAGLEPEIAYPVRALRRY-----
D_D	34	-----L-----DITLVDRNHYHVFQPLLYQV--AAAELEPGQIAYPLRAFRRKY-----
B_T	34	-----F-----QVVLIDKRNHYHVFQPLLYQV--ASAGMEPTSIISFPFRKIFQHR-----
C_H	30	-----F-----NVTLIDKRNHYHVFQPLLYQV--ATSQLEPSSISFPFRKIFQEN-----
E_C_1	30	-----RKKKAKITLVDNRNHSVWPKPLHEV--ATGSLDEGVDALSYLEAHARN-----
B_J_2	33	-----RKGRLDVTLEIRNRTYHVKPKLHEI--AAGSMDIAAHEVDYLAQSYW-----
R_P	30	-----KSDAVRITLVDNRSTHIVKPKLHAI--AAGSLRRSQHELNYLAQAHW-----
B_V_2	28	-----GNRPARALITLVDNRNPTHVWPKPLHEV--AAGSMDPFTQLELYAAQARW-----
A_V	27	-----RNFQAKITLVDANMTHVWPKPLHEV--AAGSLNSTGDELNYVAQAKW-----
P_F	27	-----KRGTASVMLVDANLTHVWPKPLHEV--AAGSLNSSEDELNYVAQAKW-----
H_I	26	-----RQKQAKITLVDNRNATHVWPKPLHEI--ATGVMDDGVDLSYRAHGKN-----
Z_M	32	-----KEADVILVDRSPTHVWPKPLHEV--ATGALDADLDEVSYRYHGKH-----
B_V_1	41	-----RRGQAEVVLVDRYPTHVWPKPLHEA--ASGHRDPATHTIYVQAQKR-----
C_R_NDA2	102	-----STYELIVVSPRNHYFLFTPLPAV--ATGTMERSIVBEPVRFIV-----
A_T_NDB1	74	-----DVQVSPQNYFAFTPLLPST--TCGTVBARSIVBEPVRFIV-----
S_T_NDB1	80	-----DVQVSPRNHYFAFTPLLPST--TCGTVBARSIVBEPVRFIV-----
A_T_NDB2	83	-----EVQVISP RNHYFAFTPLLPST--TCGTVBARSIVBEPVRFIV-----
A_T_NDB3	68	-----EVQVISP RNHYFAFTPLLPST--TCGTVBARSIVBEPVRFIV-----
A_T_NDB4	88	-----DVQVSPRNFFLFTPLLPST--TNGTVBARSIVBEPVRFIV-----
N_C_U08980	137	-----NVIVISP RNHYFLFTPLLPSC--TGTLEBHSIMBPIRITLRRHKA-----
Y_L_NDH2	137	-----NVIVISP RNHYFLFTPLLPSC--PTGTIEBHSIMBPIRITLRRHKA-----
S_C_NDE1	137	-----NVVVISP RNHYFLFTPLLPST--PVGTIELKSIIVBEPVRFIV-----
S_C_NDI2	122	-----NVIVISP RNHYFLFTPLLPST--PVGTIELKSIIVBEPVRFIV-----
C_A	124	-----NVVVISP RNHYFLFTPLLPST--PTGTIELRSIIEBEPVRFIV-----
S_C_NDI1	78	-----NVVISP RNHYFLFTPLLPST--PVGTIEKSIIEBEPVRFIV-----
S_P_NDH2_1	116	-----NVIVISP RNHYFLFTPLLPST--ATGSVHTRSIVQPIRYMLRHKSC-----
S_P_NDH2_2	115	-----NITLISP RNHYFLFTPLLPSC--TVGTLRLPSTIEPIVAFKGGID-----
D_D	137	-----DVTLISP RNHYFLFTPLLVGG--TGTVEVRSIMBPIRITLRRHKA-----
N_S_BAB76910	30	-----SYPILIEQDRFSEKPLLYEL--LSGELHSQQVYPRYQELLAG-----
Syne_SLR1484	70	-----AGPILVLEPQANFVFKPMLYEL--LIEELPESVVCPSYEKLLAD-----
N_C_NDE1	172	-----HVTIVSPANHYFLFTPLLPST--TVGTLRLPSTIEPIVAFKGGID-----
N_C_NDI1	79	-----ERIFISP RNHYFLFTPLLPST--AVGTLFRSVABPISR-----
P_F	65	-----DVTLISP RNHYFLFTPLLPCL--CSGTLNVNCTESIRNFRKKNK-----
P_Y	73	-----DVTLISP RNHYFLFTPLLPCL--CSGTLNVNCTESIRNFRKKNK-----
E_C_LpdA	42	-----ETVIVRYNTLGGVCIIVGVCIPSKALLHVAKVIEEAKALAEHGIVFGPEKTDI-----
A_A	26	-----SKADVIVNKSRSFYSERPALPHV--AICVRLVDEIKVDLSEALPE-----

A_t_NDA1	135	-----QPAISREPGSYFFLANCSK	IDA	-----DNREVV	--H-----
A_T_NDA2	133	-----QPAISREPGSFFFANCSRI	IDA	-----DAREVV	--H-----
S_T_NDA1	121	-----QPAVSTQPASYFFLANCNA	IDF	-----DNEMII	--E-----
O_S_NDA456	123	-----QPAVSKSPGSYFLLARCTA	VDP	-----DAETII	--D-----
O_S_NDA562	185	-----QSAIATRPGSYFFLASCTG	IDT	-----GRREVV	--H-----
C_R_NDA1	131	-----QPCISR-PSSSVFIADAHAV	VDA	-----ASRETV	--T-----
A_T_NDC1	151	TGIRQLRDRVKTLLPCDHLGVNGSE	ISV	-----TGGTVV	--L-----
N_SP_BAB75793	76	TGIRREYQAVVSG	IDI	-----DQQRVV	--H-----
N_P_NDA	76	TGIRREYQAVVSG	IDI	-----EQQRVV	--D-----
Th_NDA	77	TPVVEHQCAVTT	IDL	-----QEETVV	--H-----
Syn_SLR1743	76	SGVIRRQAEVTA	IDF	-----DHQKVV	--L-----
Syn_NDA390	74	GPVKREYQTOVQT	VDP	-----EQKINV	--V-----
C_R_NDA5	163	YPIREYVQAVQVAVS	VSPAAPHADAPDPDAPDAAGAV	---	T-----
C_R_NDA6	69	G--RVIQARVTQL	---	-----TSQSA	--L-----
C_R_NDA7	68	G--REYQATVITSL	---	-----SARSA	--V-----
T_B_NDH2	72	-----QPAIAHLPNRFSRCFVYD	INF	-----EQKRVV	--D-----
C_R_NDA3	210	-----TSNPCVTYLEAECDS	IDP	-----HTKVA	--V-----
R_S	80	VFVR--KATVDS	VDF	-----DRRLV	--T-----
Halo	69	RTTEEIEDSVTD	IDT	-----DEKRV	--S-----
B_S	71	KDIDLKIIEVSS	FSV	-----DKREV	--A-----
D_R	63	TGVHLEQAKVDY	VDL	-----DEREV	--G-----
N_S_BAB73083	76	KNTKVLLCEVND	IDP	-----NLQQT	--I-----
N_S_BAB77919	76	KNTQVLLCEVKD	INP	-----KAQQV	--I-----
N_S_BAB73084	76	KNTQVLLCEVND	IDP	-----EAQEI	--V-----
Syne_SLR0851	75	KNIRVLMDKVID	IDP	-----DKQKVV	--V-----
B_M	89	AEVTTLLCEVID	VDT	-----ARKSV	--F-----
S_M	70	QEVTTLLCEVAVG	VDM	-----IAREV	--T-----
M_L	74	KDVTTLLANVTG	VDR	-----AGKRV	--L-----
B_J_1	83	REVTTLFATVSG	VDA	-----TRRCV	--L-----
X_A	75	RNVVLLCDVTD	IAP	-----SRREV	--V-----
C_T	69	DNVTVFKENVCN	VDL	-----EQKVV	--K-----
C_G	78	ENNVVIKCEVTD	INV	-----ESQVVTASL	-----
M_S	77	KNAQVLLCEVTH	IDL	-----ENKTVDSVL	-----
L_I	73	KNVTVVLCBATK	IDL	-----KTKTV	--Y-----
G_M	67	RGTRFHLAEVAVG	VDF	-----PAREV	--V-----
N_S_BAB74663	80	PQVQFLMAEVEQ	IDF	-----SQQIV	-----
C_A	91	RNVNELLAEVHS	VDF	-----TRQLV	-----
D_D	76	PNVHFVICDVRS	IDM	-----KNKVI	-----
B_T	76	KDFYERMAEVRA	VFP	-----EKNMI	-----
C_H	72	ENVQIRLAEVTVG	INP	-----QANTV	-----
E_C_1	75	HGFQFQLGSVID	IDR	-----EAKTITIAE	-----
B_J_2	78	HGFRVRICEMIG	IDR	-----ERQQLVAP	-----
R_P	75	HGFHYRLCEMNG	IDR	-----ARKVTKLAP	-----
B_V_2	75	HGFEEQQCEETA	IDR	-----TAKRIALAP	-----
A_V	72	NNFEEQYGERMCG	IDR	-----ANKRIRLAA	-----
P_F	72	NHFEEQLGERMSG	IDR	-----ERKRIQLAA	-----
H_I	71	HFFSEEQGSLIR	INR	-----EQKYVELAP	-----
Z_M	75	WGYHYVRCILEP	IDR	-----KNHEHILEP	-----
B_V_1	86	HGFRFVQCALQA	IDR	-----ATRTVTIAA	-----
C_R_NDA2	144	GKGEFYEALCKD	IDP	-----VAKEEVCCF	-----
A_T_NDB1	117	E--HELWEADCFC	IDH	-----VNQKVHCRPVF	-----
S_T_NDB1	123	E--IQFWEAECKL	IDP	-----VNRIVVSCRSGI	-----
A_T_NDB2	125	D--TSYLEAEFCFK	IDP	-----ASKVYCRSKQ	-----
A_T_NDB3	111	E--MSYLEAEFCFK	IDP	-----GSKVYCRSKQ	-----
A_T_NDB4	131	E--YKEAEVCVK	IDA	-----SNKIHCRSKE	-----
N_C_U08980	180	N--VKFYEAEASS	VDP	-----ERKVVVRVLD	--T-----
Y_L_NDH2	180	E--CQLEADATK	IDH	-----EKRIVTIRSAV	-----
S_C_NDE1	180	E--VHYEAEAYD	VDP	-----ENKTIKVK	-----
S_C_NDI2	165	E--VHYIEAEALD	VDP	-----KAKKVMVQ	-----
C_A	167	Q--VIMLEAEATN	INP	-----KTNETLQSTTVVSGHS	-----
S_C_NDI1	121	N--VTIYEAEATS	INP	-----DRNTVTIKSLSAV	-----
S_P_NDH2_1	159	Y--VKFYEAECTD	VDA	-----DKKVVHIKK	-----
S_P_NDH2_2	158	P--SNIHQAECTA	IDT	-----SAKVTIRG	-----
D_D	180	EDATFYEAECLS	VDP	-----VSKKVKCYDN	-----
N_S_BAB76910	72	SKVREYVQDTVQS	IDI	-----HQQRVD	-----
Syne_SLR1484	112	SGIDIVQARVAD	VQL	-----KEKRVV	-----
N_C_NDE1	212	VKGHYIRAAED	VDF	-----SSRLVEVSQ	-----
N_C_NDI1	117	YGI--GHQWAQD	IDF	-----ANKTIRVEANANADSASK	-----
P_F	108	YCGNYLQLECTD	VFY	-----EDKYINCID	-----
P_Y	115	ISGKMLKLECTD	IVY	-----KDKYIKCKD	-----
E_C_LpdA	95	DKIRTWKEVINQLTGGLAGMA	---	-----KGRKVVVNGL	-----
A_A	69	KGIQFQECVTEK	IDA	-----KSSMYYVTK	-----

A_t_NDA1	163	----	CETVTEG-SSTLKPWK-FK	AYDKLVLAACGAEEASTFGINGVLENAIFLREVHHAQE
A_T_NDA2	161	----	CETLTDG-LNLTLPWK-FK	AYDKLVLIASGAEEASTFGIHGMENAIIFLREVHHAQE
S_T_NDA1	149	----	CETVTEG-VETLEAWK-FNV	SYDKLVLIASGAHALTFGIKGVNEHATFLREVHHAQE
O_S_NDA456	151	----	CETVTEGEKDTLKPWK-FK	AYDKLVLAACGAEEASTFGIRGVTDHAIIFLREVHHAQE
O_S_NDA562	213	----	C-TAADGDGLPANPYN-FKV	SYDKLVLIASGSEPLTFGIKGVNAENAIIFLREVSHAQE
C_R_NDA1	158	----	CRSV-DG-----LD-FS	QYDKLALCTGSGGSTFCIPGVLENAHFLRDVKQADA
A_T_NDC1	185	----	LESGFK-----	EYDWLVLAALGAESKLDVVPGAMELAFPFYTEDAIR
N_SP_BAB75793	97	----	LQDGPE-----	IPYDRLVLAALGGETPLDLVPGALSYAYPFRTLDATYR
N_P_NDA	97	----	IHEGPE-----	IPYDRLVLAALGGETPLDLVPGAAAYCYPFRITLSDAYR
Th_NDA	98	----	LKGKDP-----	FTEYKLVLAALGGETPKSTIPGVAADALTRFTLSDAYR
Syn_SLR1743	97	----	LNDQDKG-----T-ES	ADQLVLAALGGETPLNLPGLKDYGLGFRTLEDAYK
Syn_NDA390	95	----	CGDRQ-----	ITYDYLVLAAAGCTTKFVNLPGKEYALPFKTLNDALH
C_R_NDA5	198	----	LSDGTQ-----	IPYDFLVVALGCGPDSRCVPGVKEWAVPFAGYEDALR
C_R_NDA6	86	----	LSSGDT-----	IFDFAAVCSGSSTSE-L-----FKSAAATSR
C_R_NDA7	85	----	LSNGET-----	IFDYAALATGSSYSDTA-----FKSTASSR
T_B_NDH2	99	----	CISVDNTSVGPHALVNTFD	QYDKLVLAHGAQPNTFNVPGAVERACFLREVNEART
C_R_NDA3	234	----	CTSSFAYDDGRRPQFE--	QYDKAVVAVGEQPATFCVKGKVEHCFMKEVSDAVA
R_S	99	----	VFQGVQ-----RRPTE	ICYDHLVLAALGQAADLSKMPGLEEHALTRMTLEDARR
Halo	90	----	LADGDD-----	VAYDYLVVVGIGSETATYGTGEGVAEHPLTLKSLDDAME
B_S	92	----	LADGST-----	ITYDALVVGLGCVTAYFGTIPGLEENSMVLKSAADANK
D_R	84	----	LKDGTV-----	LMYDILVVGLGCVTNFVRIPGLAENATELKOISDADD
N_S_BAB73083	97	----	VGDKV-----	VPYDILVAVTAKHSYFGKDNWQELAPGLKTVBDAIE
N_S_BAB77919	97	----	LDDKV-----	VPYDILVAVTGANHSYFGKDNHWKDVAPGLKTVBDAIE
N_S_BAB73084	97	----	MGDEK-----	VPYDILVAVTAKHSYFGKDNWEEFAPGLKTVBDAIE
Syne_SLR0851	96	----	LEDHAP-----	IAYDWLVVAVTGVSHHYFGNDHWAALAPGLKTVBDALT
B_M	110	----	LENGDE-----	VSYDMLVLAATGARHAYFGNDQWEKLAPGLKALBDATT
S_M	91	----	LAHGQS-----	IPYDILVLAATGATHAYFGHDEWAAVAPGLKTVBDATT
M_L	95	----	LDDGSA-----	VAYDILVLAATGARHAYFGHDEWEFPAPGLKTVBDATT
B_J_1	104	----	IDDGSE-----	VPYDILVLAATGARHAYFGHDEWEQFAPGLKTVBDATT
X_A	96	----	LADGGT-----	ICYDMLLVAATGATHAYFGNDQWAEHAPGLKTVYDALV
C_T	90	----	TDFGD-----	IFDYDYLVAACGAQHYYFGKNDWEEHAPGLKTVLAQASE
C_G	102	----	GEFTRV-----	FBYDSLVAAGAGQSYFGNDHFAEFAPGMKSLDDALE
M_S	101	----	LGHTYS-----	TPYDSLVAAGAGQSYFGNDHFAEFAPGMKSLDDALE
L_I	94	----	YQNTS-----	TNYDYLLVLAAGARSSYFGNDHWEKYTIGLKNLKDALK
G_M	88	----	TGNGR-----	IPYDYLLVLAAGSVTNYFGLESVERHAFDLKEIVDGER
N_S_BAB74663	100	----	KTAKGA-----	IDYDFLVLAATGSRRTQFCVNGABEYAFPMRSLBEAVA
C_A	111	----	HTNTGS-----	VQYDYLLVAAGSTTNFCNERLARHTLGMKDLNEAQR
D_D	96	----	HTDGP-----	IFEDKLVVAVGSAFTAFVGVPGADKHCFLKLEQAAIT
B_T	96	----	QTSIGK-----	ABYDYLVAAGTTTNFCNKHLEEEAMPKKNVSEAMG
C_H	92	----	HTSIGD-----	FNYDYVLAAGCKTNFCNKNVLEENSYTLKSTSDSIA
E_C_1	99	----	LRDEKCELLVPERK----	IAYDILVLAALGSTSNDFNTPGVKENCIFLDNPHQARR
B_J_2	102	----	YLDAEGREVTPKRS----	FDYDVLVLAAGSQNDFGTPGVAEHAIKLESQADAKR
R_P	99	----	VIDDEGREINPESE----	IAYDILVLAAGSVTNDFCPTPGARDHAVPLETPEQASR
B_V_2	99	----	VNDSGAELLPARN----	LYDILVLAAGSTTHFFGVQGAENAIADLVGEAER
A_V	96	----	QPAQEDRAPLPERE----	LYDILVLSVSGSTTNDFGTPGAAENCIFLEGRDQAER
P_F	96	----	TYDETVGVELLPARE----	LYDILVLAAGSTTNDFGTEGAQHCLFLDTRKQAER
H_I	95	----	VYQEGDMLVIARR----	IPYDYLVAAGSKNDFNTKGVADNCFILDSKQALR
Z_M	99	----	LVDEEGHKISDQER----	LYDYLVLAALGSVANDFNTPGVRENCLFLDSRAQDR
B_V_1	110	----	VHDADGTEILPQRE----	ICYDDLVAAGSVTNNFNVPGAARHALPLENLDQAED
C_R_NDA2	168	----	PEDAGLDSACFK-----	MSYDVLVAVGAVSVNNTFCIKGVQCYCFYFKSLBDANR
A_T_NDB1	142	----	KDDPE-----ASQEF	SLCYDYLVAAGAVQVNTFCPTPGVLENCHFLKEVBDAGR
S_T_NDB1	148	----	NDNLA-----GHNDF	SLQYDYLVAAGAVQVNTFNTPGVMEHCHFLKEVBDAGR
A_T_NDB2	150	----	GLSSN-----GKKEF	SDYDYLVAATGAQSNFNTPGVLEENCHFLKEVBDAGR
A_T_NDB3	136	----	GVNSK-----GKKEF	VDYDYLVAATGAQSNFNTPGVLEENCHFLKEVBDAGR
A_T_NDB4	154	----	GSSLK-----GTTEF	DDYDILVLAAGAKPNTFNTPGVLEHAHFLKEABDALN
N_C_U08980	204	----	SEIRG-----DVVETE	IPYDMLVVGVAENATFCIPGVREHTCFLKEVBDAGR
Y_L_NDH2	205	----	SENSK-----EEVIKE	IPEDYLVVGVGAMSTFCIPGVQENACFLKEVBDAAQQ
S_C_NDE1	202	----	SSAKN-----NDYDL	DLKYDYLVAAGAVQVNTFCPTPGVVEYSSFLKEVSDAQE
S_C_NDI2	187	----	SVSED-----EYFVSS	LSYDYLVAAGVAKTTFNTPGVGNANFLKEVBDAAQN
C_A	199	----	GKDTSSSKSTVAEYTGVEEIT	TLLNYDYLVAAGAVQVNTFCIPGVLENSTFLKEVSDASA
S_C_NDI1	148	----	SQLYQPENHLGLHQAEPAE	LKYDYLLVAAGAVQVNTFCIPGVTDYCHFLKEVPSNLE
S_P_NDH2_1	182	----	TTTDG-----VDLEQ	EIKYDYLVAAGAVQVNTFCIPGVLEAECFLKEVWDAQK
S_P_NDH2_2	181	----	TTEAN-----EGKEAV	IPYDILVLAAGAVQVNTFCIPGVLDHCHFLKEAGDAKK
D_D	205	----	SAVKG-----EVSEFE	LEBYDHLVVGVAADNQTFCIPGVKENACFLKEVNDTRN
N_S_BAB76910	93	----	TVSGQA-----	FHYSNLVAALGSKTTYFATPGAAEYAMPFTSGEQAIA
Syne_SLR1484	133	----	LDSGQE-----	QHYDYLVLAAGSVQGYLGAQGAENAFAPRSQTEAIA
N_C_NDE1	236	----	KDPRGNEVRFY-----	IPYDKLVLAAGSTTNPHGVKGLLEENCHFLKDLNDARQ
N_C_NDI1	150	----	AVVPIGQGGQLNQASARGAL	-FDVYDYLVAACGAYSQTFCEGVREHANFLRDVGDARR
P_F	132	----	IENNKV-----	IFDYDYLVAAGAKTNTFNINGVDKYAYFVKDLDDALK
P_Y	139	----	NVNNNEIK-----	INNYDYLVAAGAKTNSFNINIKGVDKYAFYIKDLIDALK
E_C_LpdA	128	----	GKFTGANTLEVEGENKTV	LNEDNALVAAGSRP--IQLPFPHEDPRVWDSQDALE
A_A	93	----	-----	PDGSMAEEDYVIVGIGAHLATELVKGVNDKYCYSCPEPEFATK

A_t_NDA1	217	IRRKLLNLMLSEV-PG---IGE-----D---EKK
A_T_NDA2	215	IRRKLLNLMLSDT-PG---ISK-----E---EKR
S_T_NDA1	203	IRRKLLNLMLSDV-PG---VSE-----E---EKR
O_S_NDA456	206	IRRKLLNLMLSDV-PG---ISE-----E---EKR
O_S_NDA562	267	IRRKLLTNMLSEN-PG---LSE-----E---EKK
C_R_NDA1	205	IRQKLIENIALAGV-PGEP SRQQ-----D---EFS
A_T_NDC1	228	VNEKLS-----KLE-----RKNFKDG
N_SP_BAB75793	140	LEERLR-----VLE-----E---SDA
N_P_NDA	140	LEERLR-----FLE-----E---SDA
Th_NDA	141	LEEARQ-----RCE-----H---SDR
Syn_SLR1743	144	LKQKIK-----SLE-----Q---ADA
Syn_NDA390	137	LKEKLR-----ALE-----T---SVA
C_R_NDA5	241	VKGTLD-----LLS-----D---AGA
C_R_NDA6	118	-GQRDA-----EMK-----G---EIR
C_R_NDA7	118	-EQRDA-----ELK-----ALTEDIK
T_B_NDH2	155	IRKRLVQNIMTANL-PV---TSV-----E---EKK
C_R_NDA3	287	LRKRIAEKFLASL-PG---TSE-----E---DRK
R_S	147	LRAHVIQLEHAQI-T---RLP-----E---VKR
Halo	133	IHEQVREA-----AQD-----A---TRD
B_S	135	VFQHWEDR-----VRE-----YSKTKNE
D_R	127	IFNFVNR-----TFD-----N---GYQ
N_S_BAB73083	139	MRRRIFGAFBAA-----EKE-----TDLEKRR
N_S_BAB77919	139	MRRRIFGAFBAA-----ESE-----TDPEKRR
N_S_BAB73084	139	MRRRIFTAFBAA-----EKE-----KDPKRR
Syne_SLR0851	139	IRQRIFAAFBAA-----EKE-----SNPERQQ
B_M	153	IRRRLLAFBAA-----ERE-----PDMARRQ
S_M	134	IRRRVLAFBAA-----EVE-----EDTARRD
M_L	138	IRRRLLAFBAA-----ERE-----TDPAKRE
B_J_1	147	LRRHILVAFBAA-----ERE-----TDPAKRA
X_A	139	LRRKLLAFBAA-----EAE-----SDPAARA
C_T	132	IRRRVMEAYBAA-----ERT-----NDMKERK
C_G	145	IRARLIGAFBAA-----EIC-----EDPAERE
M_S	144	LRGRILGAFBAA-----ERS-----SDPVRRA
L_I	136	IRHKLILSFBAA-----ELS-----GDPEVVK
G_M	130	LRNHILVAFBAA-----VVE-----PDPAKRR
N_S_BAB74663	143	LRNHIFSCFBAA-----IQE-----SDAAKRQ
C_A	154	LRNHVLLCCEBAA-----AAE-----SDPDKRM
D_D	139	LRNHIVSCEBAA-----THE-----RNPDRKD
B_T	139	LRNALLANLEBAA-----VTC-----SNKQEQQ
C_H	135	LRNHVILNFBAA-----IS-----APKEEQE
E_C_1	150	FHQEMLNLFKLYSA-----NLG---AN
B_J_2	153	FHERMVNACIRAHAA-----QSSPLGE
R_P	150	FNKRMVNACLRAQH-----QHAPIEP
B_V_2	150	FRKRLIAACMRAEH-Q----APAEP-----APGAAAE
A_V	147	FRRLLSHYLRAH-----ASNDD-G
P_F	147	FHQQLLHHYLRAH-----AGQTDIV
H_I	146	FQKLLLEFLKFSE-NRALDDIGEEFF-----KQKLVDE
Z_M	150	FRHFLFDACASASR-TM-----IAQFGME
B_V_1	161	FRRFLLAACTRANH-AAE-----QHPARRA
C_R_NDA2	217	LRSRVSECFERAAAL-PA-----TPEERK
A_T_NDB1	190	IRRGVIDCFEKAIL-PG-----LTEEQRR
S_T_NDB1	196	IRRTVIDCFEKSVI-PG-----LSEBERR
A_T_NDB2	198	IRKTVIDSEFKASL-PE-----LSDERK
A_T_NDB3	184	IRSTVIDSEFKASL-PG-----LNEQERK
A_T_NDB4	202	IRHSVIDCFERASL-PN-----LTEERK
N_C_U08980	252	IRKIMDCVETAFAF-KG-----QSQEEID
Y_L_NDH2	253	IRRTLMDCTEKAQF-E-----KDPVVRK
S_C_NDE1	250	IRKIMSSIEKAAS-LS-----PKDPERA
S_C_NDI2	235	IRMKLMKTIEQASS-FP-----VNDPERK
C_A	259	IRKLMDVIEAANI-LP-----KDDPERK
S_C_NDI1	204	IRRTFAANLEKANL-LP-----KGDPERR
S_P_NDH2_1	230	IRARILHCLBQAQF-KD-----LPAETRR
S_P_NDH2_2	229	VFNRIFEILEQVRFNKD-----LSPEERA
D_D	253	IRDKIIDCLETASY-PG-----QPEKEID
N_S_BAB76910	136	LRQHILRHKLYQAIQT-----SDSERRR
Syne_SLR1484	176	LRDHLKACLEKSLTT-----ADQAEKE
N_C_NDE1	283	IRNKIIONLELSCLPT-----TSDEERK
N_C_NDI1	209	IRLRVLSLEFLCAYPKGVDN-----LTDEDRA
P_F	176	IRKFLDILEKCC-----TLPN-----ISNEEK
P_Y	184	IRKFLSNLEACIKGKAGAVTNTITNDSSSSISDSSSSIGDSSSSIGDSSSSISDDLAK
E_C_LpdA	182	LK-----E
A_A	137	LRKLESFQGGN-----E

A_t_NDA1	240	RLLCVAVVGGGP	-----	TGVEFSGELSDFFIMK	---DVRQRYSHVK-
A_T_NDA2	238	RLLCVAVVGGGP	-----	TGVEFSGELSDFFIMK	---DVRQRYAHVK-
S_T_NDA1	226	RLLCVAVVGGGP	-----	TGVEFSGELSDFFILK	---DVHQRYAHVK-
O_S_NDA456	229	RLLCVAVVGGGP	-----	TGVEFSGELSDFFIIR	---DVKQRYSHVK-
O_S_NDA562	290	RLLCVAVVGGGP	-----	TGVEFSGELSDFFITR	---DVRERYAHVK-
C_R_NDA1	231	RLLHVIVVGGGP	-----	TGVEVAGELTDFISHEVCVDLMRMPERA	
A_T_NDC1	244	SALKVAVVGGGY	-----	AGVELAATLSELRQD	-----RG---
N_SP_BAB75793	153	EKLRVAVVGGGY	-----	SGVELACKLADRIGE	-----RG---
N_P_NDA	153	DKLRVAVVGGGY	-----	SGVELACKLADRIGE	-----RG---
Th_NDA	154	DRLRVAVVGGGY	-----	SGVELACKLADRIGS	-----RG---
Syn_SLR1743	157	EKLRVAVVGGGY	-----	SGVELACKLADRIGE	-----RG---
Syn_NDA390	150	EKLRVAVVGGGY	-----	SGVELACKLADRIGD	-----RG---
C_R_NDA5	254	GGC-VVVVGGGY	-----	AGVELAATVAERLRA	-----RGAG-
C_R_NDA6	130	SAKSVLVVGGGP	-----	SGVEVAAELVDAFAG	-----K----
C_R_NDA7	133	ASKSIVVVGGGP	-----	AGVEVAAELVDAHAG	-----K----
T_B_NDH2	178	RLLHTVVVGGGP	-----	TGVEFSADLAEFFLRD	---DVKNINPELV-
C_R_NDA3	310	AALHFVVVGGGP	-----	TGVEFAGTLDFFVRE	---DLKKKYPALM-
R_S	169	GALTFVGVGGGF	-----	SGIEFAGEMKDLIDR	---SLKFFVDPIDP-
Halo	148	DPANVVVGGAGL	-----	SGIQSAGEVAEFRDR	-----HN---
B_S	153	ADATLIVVGGGL	-----	TGVELVCELADIMPN	-----LAKKYGVGDH-
D_R	141	GNRDIVVGGAGL	-----	TGVELVTELAQRAEL	-----LSKERGL-
N_S_BAB73083	161	ALLTFVIVVGGGP	-----	TGVELAGATAELAYK	---TLQEDFRNIDT-
N_S_BAB77919	161	AWLTFVIVVGGGP	-----	TGVELAGATAELAYK	---TKEDFRSIDT-
N_S_BAB73084	161	AWLTFVIVVGGGP	-----	TGVELAGATAELAYK	---TKEDFRNIDT-
Syne_SLR0851	161	AWLTFVIVVGGGP	-----	TGVELAGATAELIHS	---SKDNFHRIDT-
B_M	175	ALLTFVIVVGGGP	-----	TGVELAGITAEFLARR	---TWPEFRNIDT-
S_M	156	ALLTFTIIVGAGP	-----	TGVELAGITAEFMAHR	---TWPEFRNIDT-
M_L	160	ALLTIAIVVGGGP	-----	TGVELAGTIVELAHD	---TWPEFRNIDT-
B_J_1	169	ARLTFVIVVGGGP	-----	TGVELAGTAEFMAHH	---TWPEFRNIDT-
X_A	161	AWLSFVAVVGGGP	-----	TGVELAGTAEFIARH	---TKNEFRHIDP-
C_T	154	KQLTFVIVVGGGP	-----	TGVELAGSIEGMSRY	---TKSFYRHIDP-
C_G	167	RLLTFVIVVGGGP	-----	TGVELAGQLEFMAHR	---TWAGEYKNFNT-
M_S	166	KLLTFTVIVGAGP	-----	TGVELAGQLEFMAHD	---TWAGEYKNFNT-
L_I	158	SLLNVIIVGGGP	-----	TGVELAGSIAELSHQ	---IRDEFHTIDP-
G_M	152	ALMTFVIVVGGGP	-----	TGVEFAGALMELVRY	---VAKDYPELSV-
N_S_BAB74663	165	QLLTFVIVVGGGA	-----	TGVELAGALVEMLRG	---CLRDCPTIDF-
C_A	176	ALLTFVAVVGGGP	-----	TGVELAGAFVELLRH	---VLRHDYPMIDV-
D_D	161	RLLYTYVIVVGGGP	-----	TGVELAGALAEFLIRQ	---PLTKDFPTINT-
B_T	161	ELLNIVVIVGGGA	-----	TGVELAGVLSMCKKF	---VLPNDYPMIDP-
C_H	156	ALFNIVVIVGGGP	-----	TGVELAGAFAEIKRN	---IIPKDYPCIDF-
E_C_1	169	GKVNIAIVGGGA	-----	TGVELSAELHNAVVKQ	---LHSYGYKGLTNE-
B_J_2	174	HQLKVAIVGAGA	-----	TGVELAAELHRTTRE	---VVAHGLDQVDPQ
R_P	171	GQLHVAIVGAGA	-----	TGVELAAELHHTARE	---IIVAHGLDKIDPE
B_V_2	177	PLIQVIVVGGGA	-----	TGVELSAELRNTAQV	---LSVYGLHKIDPR
A_V	166	HQVKVAIVGAGA	-----	TGVELAAELRHASKE	---LVAYGLERIDP-
P_F	167	ERLSVAIVGAGA	-----	TGVELAAELHNAAHE	---LHAYGLDRIDKP-
H_I	179	NKVNIAIVGGGA	-----	TGVELTAELYHAAED	---LSSYGYKGLIDS-
Z_M	173	KPVRVTVIGAGA	-----	TGVELSAELYNATAIE	---LGNFGLKFGA-
B_V_1	185	APVCISVIGAGA	-----	TGVELAAALRHAVQQ	---LTTYRFKALVST
C_R_NDA2	240	KLLTFVIVVGGGP	-----	TGVEVAAELYDMIEE	---DLTKLYPNIV--
A_T_NDB1	213	RKLLHFVIVVGGGP	-----	TGVEFAAELHDFIIE	---DLTKIYPSVK--
S_T_NDB1	219	TNLLHFVIVVGGGP	-----	TGVEFAAELHDFVYE	---DLVKIYPSVK--
A_T_NDB2	221	RLLHFVIVVGGGP	-----	TGVEFAAELHDFVTE	---DLVSLYPRAK--
A_T_NDB3	207	RMLHFVIVVGGGP	-----	TGVEFASELHDFVNE	---DLVKLYPKAK--
A_T_NDB4	225	KLLHFVIVVGGGP	-----	TGVEFASELHDFLVQ	---DLVAKIYPKVQ--
N_C_U08980	275	RLLHMVVVGGGP	-----	TGVEFAGELQDFFEE	---DLKLLIPDIA--
Y_L_NDH2	275	RLLHTVVVGGGP	-----	TGVEFAAELQDFFED	---DLRKWIPDIR--
S_C_NDE1	273	RLLSFVVVGGGP	-----	TGVEFAAELRDYVDQ	---DLRKWMPDLS--
S_C_NDI2	258	RLLTFVVVGGGP	-----	TGVEFAAELQDYINQ	---DLRKWMPDLS--
C_A	282	RLLSIVVGGGP	-----	TGVEAAGEIQDYIDQ	---DLKWKVPEVA--
S_C_NDI1	227	RLLSIVVGGGP	-----	TGVEAAGEIQDYVHQ	---DLRKFLPALA--
S_P_NDH2_1	253	RYVHTVVVGGGP	-----	TGMEFAGEMADFLIED	---DLKSWYPELA--
S_P_NDH2_2	253	RLLHTIVVGGGP	-----	TGMEFAAEMQDFIDN	---DLVKDMFPELQ--
D_D	276	RLLNIVVIVGGGP	-----	SGVEFTAELNDFLQS	---DLKLTYPILA--
N_S_BAB76910	158	LLLTVAIVGAGP	-----	SGIELACTLADLLPWIYDE	GGDG-----
Syne_SLR1484	198	RLLTVAIVGAGP	-----	AGVELAATLADLLPSWYVPMGGNI	-----
N_C_NDE1	306	RLLSFVVVGGGP	-----	TGVEFAAELFDLLENE	---DLTLHFPRILR--
N_C_NDI1	236	NLLHFAIVVGGGP	-----	TGIEVASELHDLIHD	---DLKSKMYPDL--
P_F	199	KMLHVAVVGGGP	-----	TGVELTAEFADFINK	---EYKINYKDIIF--
P_Y	244	KMLHTVVVGGGP	-----	TGVEVAAELADFVNK	---DLKKNYKEIY--
E_C_LpdA	185	VPERLIVVGGGI	-----	ICIEVCTIVYHALGSQ	-----
A_A	149	-----LALCSGPFYQGHNP	PKVPENFVPNADSACEGPFVMSLM	-----LHGYK	KKKGML

A\_t\_NDA1 277 DDIRVTLLE-ARDILSSFDPR---IRHYAIKQLNKS-GVKIVRGI-VKEVKPQKILIDD-  
A\_T\_NDA2 275 DDIRVTLLE-ARDILSSFDPR---IRRYAIKQLNKS-GVRFVIRGI-VKDVQSQKILIDD-  
S\_T\_NDA1 263 DYIHVTLLE-ANEILSSFDPR---IRVYATNQLTKS-GVRIIVRGL-VQHVQPDNIIILSD-  
O\_S\_NDA456 266 DYIHVTLLE-ANEILSSFDVR---IRQYATNQLTKS-GVRIIVRGI-VKDVQPNKILLDN-  
O\_S\_NDA562 327 DYVKVTLLE-ANEILSSFDVG---IRQYATDHLKSY-GVNIIVRGV-VKEVKPREIELSD-  
C\_R\_NDA1 272 KAMRVTLVE-AREILGSFDAS---IREYAAARKLIQG-GVLRKGI-VHEVTPREVVLKD-  
A\_T\_NDC1 273 ---IVQSNVSKNILLTSAPDG---NREAAKMKVLTSR-KVQVLLGY-IVQS---IKRASN  
N\_SP\_BAB75793 182 ---IFRRLVEISDQILRTSPDF---NREAAKALDAK-GVFDLET-KVES---IGQNT-  
N\_P\_NDA 182 ---RFRIVEIADQILRTSPEF---NREAAKALDAR-GVFDLET-KVE---IEQNS-  
Th\_NDA 183 ---RIRLVDRNPEILKSSPEF---NRKAAALRALEDR-GVFDLET-TPVA---ITRDR-  
Syn\_SLR1743 186 ---RIRIIRERCKEILLAMSEF---NRQQAQASLSAK-GVWVDTET-TVTA---ITATD-  
Syn\_NDA390 179 ---RIRIIRDRGDEILKNAPK---NQLAAKEALEAR-GVWVDYAT-EVTE---ITADS-  
C\_R\_NDA5 284 GAVAVKVLTPGSHILEGCEP---QGEAASKALADL-GVEVLTGA-RVLGLDPPAAASD-  
C\_R\_NDA6 158 ---AVTLVHGCKRILLAEPLPR---AGAAAQRWLEAH-HVKVMLGR-RVESKPPDDPSLG-  
C\_R\_NDA7 161 ---QVTLVHPGAQLLNGTPPK---AGAAAKKWLESH-RVIVLLNT-SVQGKP---EGRG-  
T\_B\_NDH2 215 QFCRIVTLLE-AGEVFTFDLR---VREWKRRILDAL-GVRIIVKGN-VVAVQEKVITKS-  
C\_R\_NDA3 347 KYVKVTLLEQSAQQLTQFDAG---IGQRATEALESS-GVEVRTGVRVVEITINKVMLVS-  
R\_S 206 SEVRMIVVEAFDRILLGEMSQG---LADYARTTLRER-GIEVKLGTGVASATGTQVTTT-  
Halo 177 APIDVTLVEALPEIFPPGDSE---IQGALRHRLEDA-GVTLTDDPITAASEDAEFDE-  
B\_S 189 KEIKLKLVEAGPKILPVLDD---LIERATASLER-GVEFLTGLPVTNVEGNIILKD-  
D\_R 175 PPFNIVLVEAGPKILPILDEA---IRAKAQQTLEDY-GIKIMVGHRI MQATADSVTVQT-  
N\_S\_BAB73083 199 SETRILLIQGGDRILLPHIAPE---LSQAATTSIREF-GVVVQTKTRVTSIENDIVTFKQ-  
N\_S\_BAB77919 199 SETKILLIQGGDRILLPHIAPE---ISQVAESLQKIL-GAIIQTKTRVTNIENDIVTFKQ-  
N\_S\_BAB73084 199 TETQVILLIEGLDRILLPFAPK---ISQEAELSLKQL-GVIVQTKTLVTNIENDIVTLKQ-  
Syne\_SLR0851 199 RQAKILLIEGVDRVLPYKPK---ISARAQDLEDL-GVIVLTERMVTDINPEQVTVHN-  
B\_M 213 RQARVLLIEVGPRIILSAFPEP---ISAYARRALEKL-GVEVRLGIPVKDIITQEGVTVGD-  
S\_M 194 RLARVVLVEAGPRILPAFSEE---ISAYASRELEKL-GVEVLTGTPVTDCTDEGVITIGE-  
M\_L 198 RQTRVVLIEAGDRILLNPFAPK---ISDYASKALEKL-GVIVELGRAVTRCDAEGVVFGD-  
B\_J\_1 207 TKARVVLIEAGPRVLGAFDE---ISAYAQASLEKI-GVEVVLGQPVTEIDRDGVVYGG-  
X\_A 199 RQARVRLVEAGPRVLPSEFPEP---ITAKARKQLERL-GVEVHTGTPVTDIDALGYQLGD-  
C\_T 192 KLTRIFIVEAAERILGTFSPE---ISSKATRELEKL-GVQVWTSMSVSDVDADGVIQGR-  
C\_G 205 NSAKIILLDCAPQVLPPEGKR---LGRNAQRTLEKM-GVNVRLNAMVTNVDATSVYKKT-  
M\_S 204 TEARVILLDAAPVLPPEGKE---IGKKARARLEKM-GVEVQLGAMVTDVDRNGITVKD-  
L\_I 196 ALSKITLIEASPRILMTFDPDS---IGFTKKRLEER-GVEVLTGTRVIDINERGVQLEG-  
G\_M 190 QAARVVLVEAFDRILLAMPQE---IQVYTLKLRAM-GVEVLFNARVVDAPERVILHD-  
N\_S\_BAB74663 203 GEVKIILLVQSGDRILVEFPK---LGNYYTKKHLQL-GVEVYLQTRVSQLTEGFVILDN-  
C\_A 214 RQARVVLIEATDRILLASFDS---IQQAALHRLQRM-GVEVRLNTPVADADTNGRFRD-  
D\_D 199 GQARVVLIEAGDGLLAGFDPH---IRRYAFERLITM-GVDVRLNAKVTAITPDSVELEG-  
B\_T 199 SLMHTYLIEAGSRILLAGMSDE---SSSHAEQFLREM-GVNIILLNKRVTDYRDHKITLED-  
C\_H 194 TKLRIMLIEGSKNTINMSSEL---AHKASRMYLEKM-GVEITQLEFVKNYDGKIAELSN-  
E\_C\_1 208 A-INVTLVEACERTILPALPPR---ISAAAHNELTKL-GVRIVLTQTMVTSADEGGHTKD-  
B\_J\_2 213 KDIRITLIEAADRILPALPER---VSKETEKLIVRL-GVNVLVGAKVSVVGSDDHVS LTD-  
R\_P 210 HDLKITLIEAAPRILPALPPR---ISDATLKLILLDL-GVEVRTGARVAEVLDAVRLAD-  
B\_V\_2 216 HDVGIIVLIEGCPRIILPALPER---VSSATAELLEKL-GVRIILAEERVTEVAPGFHTAS-  
A\_V 204 ENLSITLIESSPRVLAALPER---ISRSAHATLESL-GVRIIVLVSTAVSEVTAEGVTKD-  
P\_F 205 ENMHTLIEAGPRVLPALPER---IGGPVHKTLEKL-GVNVMTNAAVSQVTADSLITAD-  
H\_I 217 SCLQVTLVEACTRILLPALPEN---ISAAVLDELKEM-GTNVQLNTMITEAQNTIITKD-  
Z\_M 211 NCMQVTLVEAAPRIILAPLPEF---MAEDAHTVLOQL-GVDIKTNTMVEAGGFKTKD-  
B\_V\_1 224 RDVHTRLIEGCARILPALDER---ISARMHAQLRTL-SVDVLTDRVAQVDADAVTTAT-  
C\_R\_NDA2 277 KDVSIIQVVELMDHVLSTYDRA---ISLYTAEQFKRA-GIKIVLNSRVASVEDGVVRVVN-  
A\_T\_NDB1 250 ELVKITLTIQSGDHILNTFDER---ISSFAEQKFTED-GIDVQTMGRVMSVTDKDIITVKV-  
S\_T\_NDB1 256 DDFKIVTLIEAGDHILNTFDER---ISSFAEQKFOR-D-GIEVSTGCRVTSVSDHFINMKV-  
A\_T\_NDB2 258 GSVRIITLIEAADHILTMFDKR---ITEFAEEKFSD-GIDVVKLGSMTKVNKESAKT-  
A\_T\_NDB3 244 NLVQITLIEAADHILTMFDKR---ITEFAEEKFTRD-GIDVVKLGSMTVKNKESAKT-  
A\_T\_NDB4 262 EFTKITLIEAGDHILNMFDKR---ITAFAEKFOR-D-GIDVKTGSMVGVTADEISTKE-  
N\_C\_U08980 312 DRFRVTLIEALPNVLPSEFK---LIEYTESTFKEE-KIDIMTKTMKRVTEKTVAEAI-  
Y\_L\_NDH2 312 DDFKIVTLIEALPNVLPSEFK---LIDYTEKTFSD-KISLTLTKTMVKSVDENFVRAEQ-  
S\_C\_NDE1 310 KEIKVTLVEALPNILNMFDKY---LVDYAQDLFKEE-KIDIRLKTVMKKVDATTTAK--  
S\_C\_NDI2 295 KEMKIVLIEALPNILNMFDKT---LIKYAEEDLFAED-ETDQVNTAVKVVPEPTYRTL--  
C\_A 319 DELKIVSLVEALPNVLTENK---LIDYTEKVFKDT-NINIMTNTMVKVNDKSLIANH-  
S\_C\_NDI1 264 EEVQIHLVEALPIVILNMFEEK---LIDYQSHLENT-SIKVHLRTAVAKVEEKQLAKT-  
S\_P\_NDH2\_1 290 DDFAVTLVEALPSVLPMEFAK---LRDYTQSLFDSS-HIKIRNTALKKVTAENHVEV-  
S\_P\_NDH2\_2 290 KDIRVTLIEAAPVLPMEFTKS---LITYTENLFLKNL-NIKUMTKTVVKDVNEKNLIVQK-  
D\_D 312 KRINVTLVEALPHILTIPEDK---IDHVEKRLQSSNNTK-VWTKTAVVGVREKEITVKN-  
N\_S\_BAB76910 194 SEIHVVVLNRSREILKGDVNSHL-RCTVERAMKNLIPVDFLFDAAVTKITPDGVECR-  
Syne\_SLR1484 234 NDLKIYLVNHAPGILAGDANSGLKRCALAE-LQARTIPVITKLGVCVKSVPESIQFVE-  
N\_C\_NDE1 344 NEISVHLIQSRDHILNTYDEA---VSKYAEDRFSD-QVDVLVNSRVAEVRPESLFTQ-  
N\_C\_NDI1 273 KFRVITVYVSPKVLPMFDQA---ISKYAMDAFKRQ-KIEIRTQHNIEVRPADGKLG-  
P\_F 236 NFRISISIEGNNILPTFTQN---ISDFTKENFHN-LNINVLNTYVYVIEDVKHSFHIQS-  
P\_Y 281 KYISISIEGNNILPTFTQN---ISKFTEKIFKNKLNINVTYNYHVEIDENNFYIKS-  
E\_C\_LpdA 212 ---IDVVMFDQVIPAADKD---IVKVFTRKISIKFNMLMETKVAVEAKEDGYVYTM-  
A\_A 200 DKVHVTVFSPG-EYLSDSLSPN---SRKAVASIYNQL-GIKIVHNFKIKEREHEVDEK-

A_t_NDA1	330	-----
A_T_NDA2	328	-----
S_T_NDA1	316	-----
O_S_NDA456	319	-----
O_S_NDA562	380	-----
C_R_NDA1	325	-----
A_T_NDC1	321	LEEDEGYFLELQPAERG-----
N_SP_BAB75793	229	-----ISLEYKN-----
N_P_NDA	229	-----ITLEYKN-----
Th_NDA	230	-----ISLQYKD-----
Syn_SLR1743	233	-----VTLQFRE-----
Syn_NDA390	226	-----LSLRYKG-----
C_R_NDA5	338	-----AGEQSPAAG-----
C_R_NDA6	210	ATSATGTTATGTHSGSAHTAVGGAVAAAVPDERWSGAGSYAHSHAAAAASHPDGGHHTHH
C_R_NDA7	209	PVSLT-----
T_B_NDH2	268	-----
C_R_NDA3	402	-----
R_S	261	-----
Halo	232	-----
B_S	244	-----
D_R	230	-----
N_S_BAB73083	254	-----
N_S_BAB77919	254	-----
N_S_BAB73084	254	-----
Syne_SLR0851	254	-----
B_M	268	-----
S_M	249	-----
M_L	253	-----
B_J_1	262	-----
X_A	254	-----
C_T	247	-----
C_G	260	-----
M_S	259	-----
L_I	251	-----
G_M	245	-----
N_S_BAB74663	258	-----
C_A	269	-----
D_D	254	-----
B_T	254	-----
C_H	249	-----
E_C_1	262	-----
B_J_2	268	-----
R_P	265	-----
B_V_2	271	-----
A_V	259	-----
P_F	260	-----
H_I	272	-----
Z_M	266	-----
B_V_1	279	-----
C_R_NDA2	332	-----
A_T_NDB1	305	-----
S_T_NDB1	311	-----
A_T_NDB2	313	-----
A_T_NDB3	299	-----
A_T_NDB4	317	-----
N_C_U08980	367	-----
Y_L_NDH2	367	-----
S_C_NDE1	364	-----
S_C_NDI2	349	-----
C_A	374	-----
S_C_NDI1	319	-----
S_P_NDH2_1	345	-----
S_P_NDH2_2	345	-----
D_D	368	-----
N_S_BAB76910	252	-----
Syne_SLR1484	292	-----
N_C_NDE1	399	-----
N_C_NDI1	328	-----
P_F	291	-----
P_Y	337	-----
E_C_LpdA	264	-----
A_A	254	-----

A_t_NDA1	330	-----GTEVP-----	YGPLV
A_T_NDA2	328	-----GTEVP-----	YGLLV
S_T_NDA1	316	-----GTNVP-----	YGLLV
O_S_NDA456	319	-----GEEVP-----	YGLLV
O_S_NDA562	380	-----GSRVP-----	YGVLV
C_R_NDA1	325	-----GTVLP-----	YGLCI
A_T_NDC1	338	-----LESQIE-----	ADIVL
N_SP_BAB75793	236	-----QVDTIP-----	VDLVI
N_P_NDA	236	-----QLDTIP-----	VDLVI
Th_NDA	237	-----RVDEIP-----	VDIVL
Syn_SLR1743	240	-----QEDVIP-----	VDLVL
Syn_NDA390	233	-----EVDVIP-----	ADLVV
C_R_NDA5	347	-----TSAAALPTACRVSYSLASDAGSAAGGAARSHLGADLVV	
C_R_NDA6	270	AHNPLLDGAGAAAAGLPSVVRLSDGSSIA	ADVVL
C_R_NDA7	214	-----LDG-----KEGRTIA	ADVVL
T_B_NDH2	268	-----GEVFS-----	TGLVV
C_R_NDA3	402	-----DAQVLLKGGEEIP-----	YGVCV
R_S	261	-----GEVID-----	TRTIV
Halo	232	-----RDSLID-----	YDVVV
B_S	244	-----GSKVV-----	ANTFV
D_R	230	-----ADGEQKVIK-----	AGKTI
N_S_BAB73083	254	-----GD-ELQTIIT-----	SKTIL
N_S_BAB77919	254	-----GD-EVKEIIP-----	SKTIL
N_S_BAB73084	254	-----GE-EVKEITA-----	SKTVL
Syne_SLR0851	254	-----NG-QTETIV-----	TKTVL
B_M	268	-----EFIIP-----	CHTTV
S_M	249	-----SFVVP-----	SRTLIV
M_L	253	-----KQLA-----	ARTIL
B_J_1	262	-----TRLD-----	AKTKI
X_A	254	-----TFVVP-----	ARTVV
C_T	247	-----ERIE-----	AATVL
C_G	260	-----KDGEHTIE-----	SFCKI
M_S	259	-----SDGTIRRIE-----	SACKV
L_I	251	-----KMIP-----	TQTVI
G_M	245	-----G---AIIP-----	AHTLF
N_S_BAB74663	258	-----A---EIIIP-----	CASVI
C_A	269	-----G---SSIA-----	AKTVV
D_D	254	-----S---SPLR-----	TETVV
B_T	254	-----G---SEIA-----	TRTFI
C_H	249	-----G---ERIP-----	TASLI
E_C_1	262	-----GEYIE-----	ADLMV
B_J_2	268	-----GRTIP-----	AELIV
R_P	265	-----GEVIP-----	SELVV
B_V_2	271	-----GKAVR-----	ADLTV
A_V	259	-----DQFIP-----	ADLMV
P_F	260	-----GKVID-----	ASLKV
H_I	272	-----GGEIK-----	ADLTV
Z_M	266	-----GQIE-----	SDIQL
B_V_1	279	-----GERIA-----	SDITI
C_R_NDA2	332	-----KANESVDIK-----	FGACV
A_T_NDB1	305	-----KS---SGELVSIIP-----	HGLLI
S_T_NDB1	311	-----KS---TGKHVEVP-----	YGMVV
A_T_NDB2	313	-----KG---GEVSSIIP-----	YGMIV
A_T_NDB3	299	-----KA---GEVSTIIP-----	YGMIV
A_T_NDB4	317	-----RE---TGKIVSEP-----	YGMVV
N_C_U08980	367	-----SKPDGTREKITIP-----	YGLLV
Y_L_NDH2	367	-----TKGDGTKETLEMP-----	YGLTV
S_C_NDE1	364	-----TGDGDIENIP-----	YGVLV
S_C_NDI2	349	-----QNGQNTDIE-----	YGMIV
C_A	374	-----KNPDGSTESIEIP-----	YGLLI
S_C_NDI1	319	-----KHEDGKITEETIP-----	YGLTI
S_P_NDH2_1	345	-----KNPDGSKQEEVIP-----	YGLLV
S_P_NDH2_2	345	-----TNPDGSKAMQEIIP-----	YGMIV
D_D	368	-----TT---TKEESIHP-----	YGLLV
N_S_BAB76910	252	-----HG--QIQMLQ-----	AGTIA
Syne_SLR1484	292	-----TGEELRHLD-----	TGTTI
N_C_NDE1	399	-----RGPDGKTTVTKECP-----	MGFCL
N_C_NDI1	328	-----EYGELKLIKQYGDKEVG-----	AGLVV
P_F	291	-----SLNKNEK-KKLS-----	YGLLI
P_Y	337	-----SINKNEEHKKIIP-----	YGLII
E_C_LpdA	264	-----EGKKAPEPQR-----	YDAVL
A_A	254	-----GNTIIP-----	ADLTI



A_t_NDA1	340	WSTGVGPPSFVRSI	----	D----	FPKD	--PG	-----	GRIGIDEWMR
A_T_NDA2	338	WSTGVGPSFVRSI	----	G----	LPKD	--PT	-----	GRIGIDEWMR
S_T_NDA1	326	WSTGVGPSFVNSI	----	D----	LPKA	--K	-----	GRIGIDEWLR
O_S_NDA456	329	WSTGVGPSFVKSL	----	P----	FPKS	--PG	-----	GRIGIDEWLR
O_S_NDA562	390	WSTGVGPSEFVRSI	----	P----	LPKS	--PG	-----	GRIGIDEWLR
C_R_NDA1	335	WSTGVGPTDFSLI	----	P----	FAKT	--AV	-----	GRIAVDKYMR
A_T_NDC1	350	WTVCAK--PLITKI	----	----	EPSPNV	PLN	--AR	QOETDETLR
N_SP_BAB75793	247	WTVCTRVTNVVKS	----	P----	FKQN	--QR	-----	QOITNTPTLQ
N_P_NDA	247	WTVGNKVAVVVKSL	----	P----	LKQN	--QR	-----	QOINTTSNLQ
Th_NDA	248	WTVGTAVSPVIAAL	----	D----	LPKT	--AS	-----	GRLOVTPTLQ
Syn_SLR1743	251	WTVGTTVSPILRN	----	A----	LPHN	--DQ	-----	QOLRTNAQLQ
Syn_NDA390	244	WTGCTAIAIPVKDL	----	A----	LPHA	--GN	-----	QKIDVNAQLQ
C_R_NDA5	385	WTACTS--PATREA	----	----	RAGFP	FPVN	--AR	GALETDEPTLR
C_R_NDA6	304	WCTGSR--PAAAFV	----	A----	GGELAGCLD	----	ER	GAVKVLPSLQ
C_R_NDA7	229	WCAGAR--PNTAFI	----	Q----	GGELAGCLD	----	ER	GAVKVLPSLQ
T_B_NDH2	278	WSTGVGPSPTTKEL	----	K----	VDRT	--RQ	-----	GRISVDEHLQ
C_R_NDA3	420	WSAGNAPRPLVTOI	----	----	ASQVAEQAAAAEAPPN	----	----	AKLCVDSFLR
R_S	271	ATIENAPSPVRRM	----	G----	LPSE	--R	-----	GRISVDRTLA
Halo	242	WTGCVTGPSELSDV	----	E----	MDAE	----	H	NRLQASSTLQ
B_S	254	WTGCVQGNPLVGES	----	G----	LEVN	--R	-----	GRATVNDLFLQ
D_R	244	WTGGTQARDVVRGO	----	K----	IEKG	--PG	-----	GRVVVDEFLR
N_S_BAB73083	267	WAAGVKASPMGKVLAE	----	G----	VECD	--RA	-----	GRAIVBPDLI
N_S_BAB77919	267	WAAGVKASPMGQVLAERT	----	G----	VECD	--HA	-----	GRVIVBPDLT
N_S_BAB73084	267	WAAGVKASAMGKVLAEKT	----	G----	VECD	--RA	-----	GRVIVBSDLI
Syne_SLR0851	267	WGAGVRASSLGGKILGDRT	----	G----	AELD	--RA	-----	GRVVVNPDLI
B_M	277	WAAGVAASPAALWL	----	D----	AESD	--RA	-----	GRVKVLSNLI
S_M	258	WAAGVQASPAARWV	----	G----	ADAD	--RA	-----	GRVKVGPDLT
M_L	262	WAAGVAASPAAEWL	----	G----	AKAD	--RA	-----	GRVIVBPDLG
B_J_1	271	WAAGVRASPAAEWL	----	G----	VPAD	--RA	-----	GRVQVADLT
X_A	263	WAAGVAASPLARTL	----	G----	VPLD	--RA	-----	GRVIVBADLI
C_T	256	WAAGVKASELQGNM	----	G----	VQTD	--RS	-----	GRIMVADLS
C_G	274	WSAGVAASPLGKLVAEQT	----	G----	VETD	--RA	-----	GRVMVNDLIS
M_S	273	WSAGVSASPLGKDLAEQS	----	G----	VELD	--RA	-----	GRVKVQPDLT
L_I	260	WAAGVQANSIAATL	----	G----	VTLD	--RG	-----	GRVIVDFCN
G_M	255	WSAGVKAAPLAATL	----	G----	VTPK	--PG	-----	GRIPVBPDLT
N_S_BAB74663	268	WTAGLEANLPGVSE	----	E----	LPVA	--HK	-----	GKIVVHPTLQ
C_A	279	WAAGVRGAPLADAL	----	G----	VTLG	--RG	-----	ARVVVTPQLT
D_D	264	WTAGVQGHALAGQM	----	G----	LPTG	--RG	-----	GRVPLPTLQ
B_T	264	WVSGVTGVSFQNMN	----	T----	SVIG	--RG	-----	GRIKVDAFNR
C_H	259	WAAGVTTNTDFGLE	----	D----	SVYG	--PA	-----	KRIKVDRTSL
E_C_1	272	WAAGTKAPDFLKDID	----	G----	LETN	--RI	-----	NQLVVRPTLQ
B_J_2	278	WAAGVKAPDSLKEIA	----	G----	LETN	--RI	-----	NQLVVRPTLQ
R_P	275	WAAGVRAPDFLEGID	----	G----	LDTN	--RI	-----	NQLVVRPTLQ
B_V_2	281	WAAGTKAPAVLQGLD	----	G----	LQVN	--KL	-----	QOLVRRPTLQ
A_V	269	WAAGVRAPAFLLKELD	----	G----	LETN	--RI	-----	NQLVVRPTLQ
P_F	270	WAAGTRAPDFLKDID	----	G----	LETN	--RI	-----	NQLVVRPTLQ
H_I	282	WAAGVRASTVTTQFD	----	G----	LEIN	--RI	-----	NQLVVRPTLQ
Z_M	276	WAAGVKAPDFLSKVE	----	G----	LEVA	--RS	-----	NQIVVPTLQ
B_V_1	289	WAAGVAGPALRELG	----	G----	IALN	--RS	-----	NQIVVPTLQ
C_R_NDA2	346	WATGIANPLVVRQL	----	Q----	EKLPGQSHF	----	----	RSVLTDDCMR
A_T_NDB1	320	WSTGVGTRPVISDFMEQV	----	----	GQG	--GR	-----	RAVATNEWLQ
S_T_NDB1	326	WSTGVGTRPFRKDFMEQV	----	----	GQE	--KR	-----	RILATDEWLR
A_T_NDB2	327	WSTGLGTRPVIKDFMKQI	----	----	GQG	--NR	-----	RALATDEWLR
A_T_NDB3	313	WSTGLGTRPVIKDFMKQI	----	----	GQG	--NR	-----	RALATDEWLR
A_T_NDB4	332	WSTGLGSRPVIKDFMQOI	----	----	GQG	--QR	-----	RVLATDEWLR
N_C_U08980	385	WATGNVAVRPVVKDFLMERI	----	P----	AQKD	--SR	-----	RGLAVNEYLV
Y_L_NDH2	385	WATCNTVVRPVVRELMSKI	----	P----	AQKG	--SR	-----	RGLVNEYLV
S_C_NDE1	379	WATGNAPREVSKNLMTKL	----	E----	EQDS	--R	-----	RGLLINDKILQ
S_C_NDI2	364	WATGNEPIDFSKTLMSRI	----	P----	EQTN	--R	-----	RGLLINDKILE
C_A	392	WATGNAPRDFTRDLIAKV	----	D----	EQKN	--AR	-----	RGLLVDERLK
S_C_NDI1	337	WATGNKARPVITDLFKKI	----	P----	EQNS	--SK	-----	RGLAVNDFLQ
S_P_NDH2_1	363	WAGGNRAREPTKMLMEGS	----	E----	EQNN	--R	-----	RGLVDEYLYK
S_P_NDH2_2	363	WAGGLTARPLTRITLMSI	----	P----	EQSG	--AR	-----	KGLIVDEFFR
D_D	383	WATGNTPRKITTOIMQSIGP	----	----	NIQN	--NR	-----	RGLVVDYFR
N_S_BAB76910	265	WTACTAPHPLLMEL	----	PV----	SQ	--NR	-----	GRLLVKPTLQ
Syne_SLR1484	307	WTACTAVNPLLKILKEQIPA	----	----	EELD	--RH	-----	COPLVSTLQ
N_C_NDE1	418	WSTGVSAEFCKRISRLGFP	----	----	AQTN	--R	-----	HALETDTLHR
N_C_NDI1	351	WSTGLMANPLIKQASKDFA	----	----	VPI	SPEDRAEARRPKAKLATDART	----	CGLLVDEHFR
P_F	307	WASGLAQTTLIKQFLKTI	----	PV----	QANN	----	----	ALIKVDEKLR
P_Y	354	WASGLAQTTLINNFIKPIE	----	----	QENN	----	----	KNLKVNOYLQ
E_C_LpdA	280	VATGRV--PENGKNDAGKAG	----	----	VEVD	--DR	-----	CFIRVQQLR
A_A	264	LLPPYTGNPALKNSTPDLVD	----	----	----	--DG	-----	CFIPTDLNIV

A_t_NDA1	371	V	-----PS-----V
A_T_NDA2	369	V	-----PS-----V
S_T_NDA1	356	V	-----PS-----V
O_S_NDA456	360	V	-----PS-----A
O_S_NDA562	421	V	-----PS-----V
C_R_NDA1	366	V	VLAPPSPTATSTSAANPAPATSQPQQSEPTSQTPAGSTGKVPGLLADESDFSTAGLAPV
A_T_NDC1	385	V	-----KG-----H
N_SP_BAB75793	278	V	-----LD-----H
N_P_NDA	278	V	-----ID-----H
Th_NDA	279	V	-----VD-----H
Syn_SLR1743	282	V	-----EG-----K
Syn_NDA390	275	I	-----QN-----H
C_R_NDA5	418	V	-----SG-----S
C_R_NDA6	338	V	-----EG-----H
C_R_NDA7	263	V	-----EG-----H
T_B_NDH2	309	V	VLRDGVP-----I
C_R_NDA3	460	V	-----VG-----A
R_S	301	V	-----KG-----R
Halo	272	A	-----DD-----
B_S	284	S	-----TS-----H
D_R	275	A	-----KG-----Y
N_S_BAB73083	302	I	-----KG-----H
N_S_BAB77919	302	I	-----RD-----Y
N_S_BAB73084	302	I	-----KG-----H
Syne_SLR0851	302	V	-----AS-----F
B_M	308	V	-----PG-----H
S_M	289	A	-----PH-----H
M_L	293	V	-----PG-----S
B_J_1	302	I	-----PG-----H
X_A	294	V	-----PG-----H
C_T	287	L	-----PG-----H
C_G	309	V	-----GD-----Q
M_S	308	L	-----PG-----H
L_I	291	I	-----EG-----H
G_M	286	L	-----AG-----H
N_S_BAB74663	299	V	-----LE-----H
C_A	310	L	-----PD-----D
D_D	295	V	-----EG-----H
B_T	295	V	-----EG-----T
C_H	290	V	-----SG-----Y
E_C_1	304	T	-----TR-----D
B_J_2	310	A	-----TR-----D
R_P	307	T	-----TR-----D
B_V_2	313	T	-----VI-----D
A_V	301	T	-----TL-----D
P_F	302	T	-----TR-----D
H_I	314	T	-----TV-----D
Z_M	308	S	-----TT-----D
B_V_1	321	T	-----PD-----D
C_R_NDA2	380	V	-----KGS-----D
A_T_NDB1	353	V	-----TC-----C
S_T_NDB1	359	V	-----KG-----C
A_T_NDB2	360	V	-----EG-----T
A_T_NDB3	346	V	-----EG-----C
A_T_NDB4	365	V	-----EG-----C
N_C_U08980	420	V	-----QG-----T
Y_L_NDH2	420	V	-----EG-----T
S_C_NDE1	413	L	-----LG-----A
S_C_NDI2	398	L	-----LG-----S
C_A	427	V	-----DG-----T
S_C_NDI1	372	V	-----KG-----S
S_P_NDH2_1	397	L	-----KG-----Y
S_P_NDH2_2	398	V	-----KG-----V
D_D	419	V	-----AC-----T
N_S_BAB76910	295	I	-----SN-----F
Syne_SLR1484	343	L	-----PS-----F
N_C_NDE1	453	L	-----NGTP-----L
N_C_NDI1	405	V	VRLETQTTDAAKGSEIV-----PTSSSNLL
P_F	341	V	-----IGI-----P
P_Y	388	I	-----IGI-----K
E_C_LpdA	314	T	-----N-----N
A_A	296	S	-----IK-----Y

A_t_NDA1	375	QD-VFALGDCSGYLES---TGK-----
A_T_NDA2	373	QD-VFALGDCSGYLET---TGK-----
S_T_NDA1	360	QD-VYSIGDCSGFLES---TGR-----
O_S_NDA456	364	RD-VFALGDCSGFLES---TGK-----
O_S_NDA562	425	ED-VFALGDCAGFLEG---TGR-----
C_R_NDA1	426	PH-VYALGDVC---A---NPD-----
A_T_NDC1	389	PR-IFALGDSSSLRDS---NG-----
N_SP_BAB75793	282	PD-IFALGDLADCIDA---EG-----
N_P_NDA	282	PE-IFALGDLADCHDV---EG-----
Th_NDA	283	PD-IFALGDAADAVDE---QG-----
Syn_SLR1743	286	TN-IFALGDGAEGRDA---SG-----
Syn_NDA390	279	PN-IFALGDVAQAEDN-----
C_R_NDA5	422	DN-VFALGDVVAAPSPADPHHT-----
C_R_NDA6	342	PH-VFALGDVNNVPET-----
C_R_NDA7	267	PH-VFALGDVNNVPEA-----
T_B_NDH2	317	PD-VYALGDCATNESN-----
C_R_NDA3	464	TD-IFALGDCSLVLGN-----
R_S	305	SD-VFALGDCALIALKDAPQGPR-----
Halo	275	ER-VFVAGDCSMISQG---ND-----
B_S	288	ED-VFVAGDSAVYFGP---DG-----
D_R	279	PD-VFIIIGDMCLALNQ---QG-----
N_S_BAB73083	306	QN-IFVVGDLANFESHQ---NG-----
N_S_BAB77919	306	KN-IFVVGDLANFESHQ---NG-----
N_S_BAB73084	306	SN-IFVVGDLANFESHQ---NG-----
Syne_SLR0851	306	DN-IFVVGDLANYSHQ---GD-----
B_M	312	ED-IFALGDTAWVEGD---DG-----
S_M	293	PD-IFVIGDTASVIQE---DG-----
M_L	297	PE-IFVIGDAALVLRP---DG-----
B_J_1	306	PE-IFALGDTVTISAW---EG-----
X_A	298	PE-IFVGGDLASV---QG---DG-----
C_T	291	PE-VFVGGDQACYTLE---NG-----
C_G	313	KN-VFVVGDMMN---DG-----
M_S	312	PN-VFVVGDMMAV---DG-----
L_I	295	SE-VFVIGDIASYSKG---LE-----
G_M	290	PE-VYVIGDMAHL---EQ---DG-----
N_S_BAB74663	303	PN-VYALGDLAYV---EK---NG-----
C_A	314	DR-VFVIGDMAYL---EG---YR-----
D_D	299	PD-VFVAGDMALP---QG---DS-----
B_T	299	NN-VFALGDLCILSGD---ED-----
C_H	294	AN-VYAVGDIAYMETP---K-----
E_C_1	308	PD-IFALGDCASCPR---PEG-----
B_J_2	314	DN-IFALGDCSACSW---GDR-----
R_P	311	DN-VFVGMGCAACAIP---GYE-----
B_V_2	317	DN-VFALGDCAACAWP---GHE-----
A_V	305	DD-IFAFGDCASCQP---GTD-----
P_F	306	EN-IFAFGDCAACQP---GSE-----
H_I	318	DS-IFALGDCALIQ---SNG-----
Z_M	312	DR-IFAMGDCSCSLP---EAE-----
B_V_1	325	AH-VYAFGDCAACPSA---DAL-----
C_R_NDA2	385	GS-IFWALGDAATIDQPKALDYAEQLFEQADTNRDGRSLSEELRVLLNTASKEFSLHEEHA
A_T_NDB1	357	EN-VYAVGDCASIAQRKILGDIANIFKAADADNSGTLTMEEELEGVVDDIIVRYPQVELYL
S_T_NDB1	363	SN-VYALGDCASVDQHKVMEDISTIFEAADKDDSGTLSVEEFRDVLDDIIRYPQVELYL
A_T_NDB2	364	DN-IFALGDCATINQRKVMEDVSAIFSKADKDKSGTLTLKEFQEAAMDDICVRYPPVELYL
A_T_NDB3	350	DN-IFALGDCATINQRKVMEDIAAIFKKADKENSGLTLMKEFHEVMSDICDRYPQVELYL
A_T_NDB4	369	DG-VYALGDCATINQRRVMEDIAAIFNKADKNGTGLTKKKDFNSVVKDICQRYPPVELYL
N_C_U08980	424	RD-IFWAVGDCAV---AG-----
Y_L_NDH2	424	EG-IFWALGDCSA---TK-----
S_C_NDE1	417	KGS-IFALGDCCTFHGP-----
S_C_NDI2	402	ENSI-YALGDCCTAHTG-----
C_A	431	DN-IFALGDCCTF---TK-----
S_C_NDI1	376	NN-IFALGDNAF---AG-----
S_P_NDH2_1	401	KD-IFALGDCCTH---TA-----
S_P_NDH2_2	402	PE-MYAVGDCAF---SG-----
D_D	423	DG-IFVSI GDASINPS-----
N_S_BAB76910	299	PE-IFVAGDCATDS-----
Syne_SLR1484	347	PQ-VFAAGDCVTVKD-----
N_C_NDE1	459	GD-VYALGDCSTIQNN-----VADHIITFLRNLAWKHGKD
N_C_NDI1	431	RD-VFVVGDAAVIESQ-----
P_F	346	SNN-IFVYALGDCCKKIQPKLLHEHTNEI IKILGTGNKLTSEALKLQSELTKTFPQLSISKWDY
P_Y	393	PNN-IFVYALGDCCKQISPINSHEHVNEI INCLGNSKITSDVLKQKSKELSNIFPQLSDTKWDY
E_C_LpdA	316	VPH-IFALGDIVGQ-----
A_A	300	DN-VYAVGDCANSMTV-----

A_t_NDA1	393	-----
A_T_NDA2	391	-----
S_T_NDA1	378	-----
O_S_NDA456	382	-----
O_S_NDA562	443	-----
C_R_NDA1	440	-----
A_T_NDC1	406	-----
N_SP_BAB75793	299	-----
N_P_NDA	299	-----
Th_NDA	300	-----
Syn_SLR1743	303	-----
Syn_NDA390	294	-----
C_R_NDA5	444	-----
C_R_NDA6	357	-----
C_R_NDA7	282	-----
T_B_NDH2	332	-----
C_R_NDA3	479	-----
R_S	327	-----
Halo	292	-----
B_S	305	-----
D_R	296	-----
N_S_BAB73083	323	-----
N_S_BAB77919	323	-----
N_S_BAB73084	323	-----
Syne_SLR0851	323	-----
B_M	329	-----
S_M	310	-----
M_L	314	-----
B_J_1	323	-----
X_A	314	-----
C_T	308	-----
C_G	325	-----
M_S	324	-----
L_I	312	-----
G_M	306	-----
N_S_BAB74663	319	-----
C_A	330	-----
D_D	315	-----
B_T	316	-----
C_H	310	-----
E_C_1	325	-----
B_J_2	331	-----
R_P	329	-----
B_V_2	335	-----
A_V	323	-----
P_F	324	-----
H_I	335	-----
Z_M	330	-----
B_V_1	343	-----
C_R_NDA2	444	RFLDSQTGVRFGGLVAKSLSPADAAAAAASNSSQPFVLLDGNTEISKEQFKDILGKVD
A_T_NDB1	416	KSKHMRHINDLLADSE----GNARKEVDIEAFKLALSEADSQM-----
S_T_NDB1	422	KNKHLLEAKDLFRDSE----GNEREVDIEGFKLALSHVDSQM-----
A_T_NDB2	423	KSKRMGIADLLKEAETDDVSKNNIELKIEEFKSALSQVDSQV-----
A_T_NDB3	409	KSKGMHGITDLLKQAQAENGSNKSVELDIEELKSALCQVDSQV-----
A_T_NDB4	428	KKNKLNKNIANLLKSAN----GEDTQVNIKFKQALSEVDSQM-----
N_C_U08980	437	-----
Y_L_NDH2	437	-----
S_C_NDE1	432	-----
S_C_NDI2	417	-----
C_A	444	-----
S_C_NDI1	389	-----
S_P_NDH2_1	414	-----
S_P_NDH2_2	415	-----
D_D	437	-----
N_S_BAB76910	313	-----
Syne_SLR1484	361	-----
N_C_NDE1	493	PESLELHFSDWRDVAQQIKRFPQATAHLKRLDKLFEFYDKDQNGTLDFGELRELLKQID
N_C_NDI1	446	-----
P_F	406	EKNKKGEMTPQQFHDYLFIDKNY-----
P_Y	453	NKNKSEMSIKELQEYLFMIDKNY-----
E_C_LpdA	329	-----
A_A	314	-----

A_t_NDA1	393	---STL---	PALAQVAEREKGYLANLFNV-----
A_T_NDA2	391	---PTL---	PALAQVAEREKGYLANLINA-----
S_T_NDA1	378	---QVL---	PALAQVAERQKGYLASLTK-----
O_S_NDA456	382	---DVL---	PALAQVAERQKGYLAHLIN-----
O_S_NDA562	443	---AVL---	PALAQVAEREGRYLARVMSR-----
C_R_NDA1	440	---KPL---	PALAQVAEQCGRYLARVLINE-----
A_T_NDC1	406	---KIL---	PTTAQVAFQEGADFTGWNLWA-----
N_SP_BAB75793	299	---QQV---	PATAQAAFQOQADYAAWNLWA-----
N_P_NDA	299	---QQV---	PATAQAAFQOQADYTAWNlWA-----
Th_NDA	300	---QPL---	PHTAQAAFQOQADYVAVNLWA-----
Syn_SLR1743	303	---QLL---	PTTAQCAFQOQTDYCAWNlWA-----
Syn_NDA390	294	-----	PMTAQVAIQOQADVCAWNlRG-----
C_R_NDA5	444	---QAL---	PATAQVAFQOQADYAAWNVWA-----
C_R_NDA6	357	-----	KLGFLLAAKQELAAASLQA-----
C_R_NDA7	282	-----	KLGYLATEHGKLVAVSLKA-----
T_B_NDH2	332	---PTL---	PTLAAVASRQGVYLAKLINA-----
C_R_NDA3	479	---RL---	PSTAQVAGQOQAYLAHLINSQYQLGVGGYTQPPPFQIVKRNKLQVWAGAGGT
R_S	327	---DYA---	PPTAQFAVREAEQLAENLIAS-----
Halo	292	---DVA---	PPTAQAAWQAAADVVARNVAR-----
B_S	305	---RPY---	PPTAQLAWQMGELICYNLFA-----
D_R	296	---KPV---	PTTAQHAGQOQGRITAKNlMN-----
N_S_BAB73083	323	---QPL---	PSVAPVAIQEGBYVAKLTKK-----
N_S_BAB77919	323	---KPL---	PGVAPVAIQOQEGBYVAKLTKK-----
N_S_BAB73084	323	---KPL---	PGVAPVAQOQEGBYVAALVQK-----
Syne_SLR0851	323	---QPL---	PGVAPVAMQEAAYLSKLIIPA-----
B_M	329	---RPV---	PGIAPAAKQOQAYVAKVIRS-----
S_M	310	---KPV---	PGIAPAAKQOQAYVAQVIRG-----
M_L	314	---RPV---	PGVAPSAKQOQGRHVAATKA-----
B_J_1	323	---KPV---	PGIAPAAKQOQGRHVAETVKA-----
X_A	314	---RPV---	PGVAPAAKQOQKHIKAKTRA-----
C_T	308	---STL---	PGMAPVAMQEKATGRMLLD-----
C_G	325	---NNL---	PGVAQVAIQOQEGBYVAEQTEA-----
M_S	324	---EGV---	PGVAQCAIQOQGRYAAKLIKRR-----
L_I	312	---RPL---	PGVSPVAMQOQGRYVASLIQN-----
G_M	306	---AAL---	PMVAPVAMQMGTYACEATVA-----
N_S_BAB74663	319	---KSL---	SGVAPBALQOQGVAVARNlQQ-----
C_A	330	---PGVAY---	PMVAPVAIQMGEGQAARNLILA-----
D_D	315	---PA---	PLIAPNAIQOQALAADNlTRA-----
B_T	316	---YPNGHP---	QLAQVAIQOQEGLLAKNlIR-----
C_H	310	---YPKGGHP---	QLANVAIQOQKLNASNLKA-----
E_C_1	325	---GFV---	PPRAQAAHQMATCAMNNLILA-----
B_J_2	331	---GNV---	PPRAQAAHQQAHLIYSQlPR-----
R_P	329	---NGV---	PPRAQAAHQQAHLIYSQlPR-----
B_V_2	335	---RNV---	PPRAQAAHQQAHLIYSQlPR-----
A_V	323	---RPV---	PPRAQAAHQQAHLIYSQlPR-----
P_F	324	---RNV---	PPRAQAAHQQAHLIYSQlPR-----
H_I	335	---KLV---	PPRAQAAHQMAKACAKNlFA-----
Z_M	330	---RPV---	PPRAQAAHQMAKACAKNlFA-----
B_V_1	343	---SVL---	PPRAQVAHQQAHLIYSQlPR-----
C_R_NDA2	504	KGLRAL---	PATAQVANQOQKRYLAQVAFAGN-----
A_T_NDB1	455	---KTL---	PATAQVAAQOQAYLAKCFNR-----
S_T_NDB1	461	---KSL---	PATAQVAAQOQGYLAKCFNR-----
A_T_NDB2	466	---KFL---	PATAQVAAQOQAYLAKCFDR-----
A_T_NDB3	452	---KLL---	PATGOVAAQOQGYLAKCFDR-----
A_T_NDB4	466	---KNL---	PATAQVASQOQKRYLAKCFNK-----
N_C_U08980	437	---Y---	APTAQVASQEGNHLAGLFNN-----
Y_L_NDH2	437	---Y---	APTAQVASQEGSYLANLlNG-----
S_C_NDE1	432	---F---	FPTAQVAHQEGBYLAQYFKK-----
S_C_NDI2	417	---F---	FPTAQVAHQEGBYLAKI lDK-----
C_A	444	---Y---	PPTAQVAFQEGBYLANlYFDK-----
S_C_NDI1	389	---F---	FPTAQVAHQEGBYLAKNlFDK-----
S_P_NDH2_1	414	---Y---	APTAQVASQOQAYLQGLFNK-----
S_P_NDH2_2	415	---F---	FPTAQVANQOQAWLAKNlNV-----
D_D	437	---KPL---	AQTAQVASQOQGRYLGRlFNQ-----
N_S_BAB76910	313	---HPQ---	PPTAQVAYQOQIATAQNIQR-----
Syne_SLR1484	361	---NPK---	PALAQIAYOQCAALAKNlMA-----
N_C_NDE1	553	SKLTS---	PATAQRAHQOQGYLAKHFNK-----
N_C_NDI1	446	---RTL---	PKTAQVAAQOQATYLAKVlNK-----
P_F	430	---KSP---	TPTAQNAHQEGBYLSNlFNN-----
P_Y	477	---KSP---	PPTAQNAHQEGBYLSNlFNN-----
E_C_LpdA	329	-----	PMLAHKCVHEGHVAAEVlAG-----
A_A	314	-----	PKLGYLAVMTGRlAAQHLAN-----

A_t_NDA1	416	-----
A_T_NDA2	414	-----
S_T_NDA1	401	-----
O_S_NDA456	405	-----
O_S_NDA562	466	-----
C_R_NDA1	463	-----
A_T_NDC1	429	-----
N_SP_BAB75793	322	-----
N_P_NDA	322	-----
Th_NDA	323	-----
Syn_SLR1743	326	-----
Syn_NDA390	315	-----
C_R_NDA5	467	-----
C_R_NDA6	376	-----
C_R_NDA7	301	-----
T_B_NDH2	354	-----
C_R_NDA3	533	GAYALQAAAEENAVLSWLT'TTAMGGKTRIQASKEVADAMFRMDAPPWVRVHSESLTKATP
R_S	350	-----
Halo	315	-----
B_S	328	-----
D_R	319	-----
N_S_BAB73083	346	-----
N_S_BAB77919	346	-----
N_S_BAB73084	346	-----
Syne_SLR0851	346	-----
B_M	352	-----
S_M	333	-----
M_L	337	-----
B_J_1	346	-----
X_A	337	-----
C_T	331	-----
C_G	348	-----
M_S	347	-----
L_I	335	-----
G_M	329	-----
N_S_BAB74663	342	-----
C_A	355	-----
D_D	337	-----
B_T	341	-----
C_H	335	-----
E_C_1	348	-----
B_J_2	354	-----
R_P	352	-----
B_V_2	358	-----
A_V	346	-----
P_F	347	-----
H_I	358	-----
Z_M	353	-----
B_V_1	366	-----
C_R_NDA2	531	-----
A_T_NDB1	478	-----
S_T_NDB1	484	-----
A_T_NDB2	489	-----
A_T_NDB3	475	-----
A_T_NDB4	489	-----
N_C_U08980	458	-----
Y_L_NDH2	458	-----
S_C_NDE1	453	-----
S_C_NDI2	438	-----
C_A	465	-----
S_C_NDI1	410	-----
S_P_NDH2_1	435	-----
S_P_NDH2_2	436	-----
D_D	460	-----
N_S_BAB76910	336	-----
Syne_SLR1484	384	-----
N_C_NDE1	579	-----
N_C_NDI1	469	-----
P_F	453	-----
P_Y	500	-----
E_C_LpdA	349	-----
A_A	334	-----

A_t_NDA1	416	-----MG---KAGGGRANSAK-EMELGE-----
A_T_NDA2	414	-----IG---KCNNGGRANSAK-EIELGV-----
S_T_NDA1	401	-----VG---KQGGGHANCAQ-NINLGD-----
O_S_NDA456	405	-----VM---KAGGGHANCEI-DVDLGP-----
O_S_NDA562	466	-----IA---AQDGGRAGRAVGSaelGE-----
C_R_NDA1	463	-----LA---RCPPH-----GVPQHT-----
A_T_NDC1	429	-----AI---NNR-----PL-----L-----
N_SP_BAB75793	322	-----SI---TQR-----PL-----L-----
N_P_NDA	322	-----SI---TNR-----PL-----L-----
Th_NDA	323	-----SI---SDR-----PL-----L-----
Syn_SLR1743	326	-----NI---TCR-----PL-----L-----
Syn_NDA390	315	-----LI---TNK-----PL-----L-----
C_R_NDA5	467	-----AI---NCR-----PL-----L-----
C_R_NDA6	376	-----LA---RAKAAGGPAPK-----L-----
C_R_NDA7	301	-----LI---SAKP--GASPK-----L-----
T_B_NDH2	354	-----EI---ACK-----PF-----AA-----
C_R_NDA3	593	LDKEAPPGGAKAVCDISAVMA---AAAAAGGADPVAVARASADCLRSLEEELKAREGA
R_S	350	-----TI---TCGT-----PQ-----
Halo	315	-----AM---ECR-----PL-----E-----
B_S	328	-----YI---ECKTLETfKPV-----
D_R	319	-----MI---QNK-----PL-----V-----
N_S_BAB73083	346	-----RI---QCKTLP-----
N_S_BAB77919	346	-----RI---KCQTLP-----
N_S_BAB73084	346	-----RI---QCQTLP-----
Syne_SLR0851	346	-----RIAE--KEQIMV-----
B_M	352	-----RV---ENKTPLL-----
S_M	333	-----RI---TGSPAPG-----
M_L	337	-----RI---GCDNTAR-----
B_J_1	346	-----RI---RCE-TKG-----
X_A	337	-----RQ---RCQTAP-----
C_T	331	-----DI---KCKPRK-----
C_G	348	-----EVEG--RSNTERE-----
M_S	347	-----EVSg--TSPKIRT-----
L_I	335	-----DI---KNKKRK-----
G_M	329	-----RE---KGETPK-----
N_S_BAB74663	342	-----QI---RCKSPK-----
C_A	355	-----QI---DGRPMQ-----
D_D	337	-----AI---ACRPLR-----
B_T	341	-----LE---KCKEMK-----
C_H	335	-----IQ---KNKTLT-----
E_C_1	348	-----QM---NGKPLK-----
B_J_2	354	-----HI---RCEALK-----
R_P	352	-----RI---KCEPLG-----
B_V_2	358	-----RI---DCRPLP-----
A_V	346	-----KI---QEDSLCW-----
P_F	347	-----RI---ECKALP-----
H_I	358	-----LF---ENKPLK-----
Z_M	353	-----LR---KCEPLK-----
B_V_1	366	-----RI---ACKRVA-----
C_R_NDA2	531	-----RV---TCAPELDAALADKIK-----
A_T_NDB1	478	-----MEQC--KELPEGPKRFRTGGHHQFRP-----
S_T_NDB1	484	-----WDQC--KSNPEGPRRFKSSGRHEFLP-----
A_T_NDB2	489	-----MEEC--EKSPGPIRMREGRRHRFRP-----
A_T_NDB3	475	-----MEVC--EKNPEGPIRIRGEGRRHRFRP-----
A_T_NDB4	489	-----MEKC--EKKPEGPLRFRGEGRRHFQP-----
N_C_U08980	458	-----MART--EVLEQVRVREL--SGSLNLPAGNAAEISKEIEEHER
Y_L_NDH2	458	-----IAKT--EDLNNEITNLEKQSEHTFDEQERKNIFAQLESKSR
S_C_NDE1	453	-----AYKI--DQLNWKMTHA-----KDDSEVARLKNQIVKTQS
S_C_NDI2	438	-----KI--EQLEWMLNS-----TDETEVSRLQKEVNLRS
C_A	465	-----LHAV--ESLKYTIANP-----TPKDNVEKLSRKLARLEK
S_C_NDI1	410	-----MAQI--PNFQKNLSSRKDKIDLLFEENNFK-----
S_P_NDH2_1	435	-----LGSL--NFEKPSDRHIALGDEMDSSTLISLANEKHASTK
S_P_NDH2_2	436	-----EGKK--FALHERIQALEKQLGEKEAPSQVAGLKQQVEQLKL
D_D	460	-----LAEEMNNDLIKKRENPDahKEEKEKQqEKLNLfNSITGSNK
N_S_BAB76910	336	-----IS---QNKPTI-----
Syne_SLR1484	384	-----VH---NCKPLV-----
N_C_NDE1	579	-----LA---RAAPGLSANEIHEGDLDAAVYK-----
N_C_NDI1	469	-----ANEGVIDVKDAP-----
P_F	453	-----FI---HTNQK--FNIP-----
P_Y	500	-----YI---YNSNSNGNTIP-----
E_C_LpdA	349	----------KKHYFDPKVIPSIAYTEPEVAWVGLTEKEAKEKGI
A_A	334	-----RI--GVPTKVDKYYPTIMCVA-----

A_t_NDA1	435	-----PFVYKHLGS-----MATIGRYKALV-----
A_T_NDA2	433	-----PFVYKHLGS-----MATIGRYKALV-----
S_T_NDA1	420	-----PFVYKHLGS-----MATIGRYKALV-----
O_S_NDA456	424	-----AFVYKHLGS-----MATVGRYKALV-----
O_S_NDA562	486	-----PFVYKHIGS-----MASVGRYKALV-----
C_R_NDA1	476	-----EFVYRQLCA-----MATVGGHSAVL-----
A_T_NDC1	437	-----PFRFQNLGE-----MPTLGRYDAAI-----
N_SP_BAB75793	330	-----PFRYQQLGE-----MMALGTDNATL-----
N_P_NDA	330	-----PFHYQQLGE-----MPTLGKNNATL-----
Th_NDA	331	-----PCRYSHLGE-----MLTLGRDRAAL-----
Syn_SLR1743	334	-----PCRYQPLGE-----MLALGTDGAVL-----
Syn_NDA390	323	-----PFKGFNLGE-----MLTLGENNATL-----
C_R_NDA5	475	-----PFKYQHLGS-----MMALGQTNAVALPIPVPALADAVRSSPLGPLLSAA
C_R_NDA6	390	-----QRWKPNGGLAVMIVTLGRDDGVM-----
C_R_NDA7	313	-----GAWKPGMGN-QVMIVSLGRGDGVC-----
T_B_NDH2	363	-----PFKYESLGS-----VVSIGTSSAVV-----
C_R_NDA3	649	EATEVRYDRPFELSLGI-----MAYVGNDKALT-----
R_S	358	-----PFDYRSKCA-----LASLGARKCVA-----
Halo	323	-----TWIYEDQGT-----IVSVGETAIAH-----
B_S	341	-----NSGIT-----LASLGRKDAVA-----
D_R	327	-----PYEPTTLE-----FVSLGGLMAVG-----
N_S_BAB73083	354	-----AFKYNDHGS-----LAMIGQNAAVV-----
N_S_BAB77919	354	-----QFRYNDVGS-----LAMIGQNLAVV-----
N_S_BAB73084	354	-----AFNYTDKGS-----LAMIGQNAAVV-----
Syne_SLR0851	356	-----PFRYIDYGS-----LAVIGQNKAVV-----
B_M	361	-----PFRYKHQGN-----LATIGKGAVV-----
S_M	342	-----PFRYRHQGS-----LATIGKRAAII-----
M_L	346	-----PFHYKHAGD-----LATIGKRAAAI-----
B_J_1	354	-----AFRYKHSGS-----LAQIGKRLAVI-----
X_A	345	-----AFRYQDYGN-----LATIGRMAAIV-----
C_T	339	-----PFKYRDKGQ-----MATIGRNRAIV-----
C_G	359	-----AFDYFDKGS-----MATISRFSAVV-----
M_S	358	-----PFHYFDKGS-----MATVSRFSAVA-----
L_I	343	-----PFHYLDKGS-----MATIGRTDAVA-----
G_M	337	-----PFRYRDRGS-----MATIGRSAAVA-----
N_S_BAB74663	350	-----PFSYFNKGR-----LALIGCYSCVG-----
C_A	363	-----PFQYHDKGQ-----MATIGRSAAVL-----
D_D	345	-----AFRYRDKGS-----MATIGRAAAV-----
B_T	349	-----PFHYRNLGS-----MATVGRNRAVA-----
C_H	343	-----EFEYKDLGS-----MATIGKNKAVV-----
E_C_1	356	-----NYQYKDHGS-----IVSLSNFSTVG-----
B_J_2	362	-----DYRYRDFGS-----IVSLGFEFSTVG-----
R_P	360	-----EFRYRDLGS-----IVSLGKYSAVG-----
B_V_2	366	-----EFTYRDFGS-----IVSLGHFSAVG-----
A_V	355	-----SIATANHGS-----LISLSSFSAIG-----
P_F	355	-----EYKYTDYGS-----LISLSRFSAVG-----
H_I	366	-----SFKYNDKGT-----IVSLSNFTAIG-----
Z_M	361	-----
B_V_1	374	-----RFAIRDAGT-----VVSLSHTGAVY-----
C_R_NDA2	548	-----PFRYFHKGS-----AAYVGSDKAVF-----
A_T_NDB1	502	-----FOYKHFQ-----FAPLGGDQAAA-----
S_T_NDB1	508	-----FEYRHLGQ-----FAPLGGDQAAA-----
A_T_NDB2	513	-----FRYRHLGQ-----FAPLGGEQTAA-----
A_T_NDB3	499	-----FRYRHLGQ-----FAPLGGEQTAA-----
A_T_NDB4	513	-----FRYRHFGS-----FAPLGGEQTAA-----
N_C_U08980	495	QLRRIKDIKP-FHYSHQGS-----LAYIGSEKAVA-----
Y_L_NDH2	497	KLRRSRMLP-FEYSHQGS-----LAYIGSDRAVA-----
S_C_NDE1	485	QIED-----FKYNHKGA-----LAYIGSDKAIA-----
S_C_NDI2	470	KLDK-----FNYKHMCA-----LAYIGSETAIA-----
C_A	497	NLPH-----FIYNYQGS-----LAYIGSEKAVA-----
S_C_NDI1	438	-----P-FKYNDLCA-----LAYLGSERATA-----
S_P_NDH2_1	473	VF-----LP-FKYSHQGS-----LAYVGHEKAIA-----
S_P_NDH2_2	475	E-----P-FKYHHQCA-----LAYVGDEKAIA-----
D_D	501	SFEEAVKEKPLFKYKHMGT-----LAYVGDHQAVA-----
N_S_BAB76910	344	-----PVQQLRGT-----IMKLGLNEGVA-----
Syne_SLR1484	392	-----SPDPQLRGT-----IMKLGLNNGVA-----
N_C_NDE1	603	-----AFEYRHLGS-----LAYIGNSAVFD-----
N_C_NDI1	481	-----GFKERNWGV-----MYYLGSWKAIAH-----
P_F	464	-----SFIKWKGS-----LAYIGNHQVVA-----
P_Y	513	-----PFIEKWKGS-----LAYVGNHQVVA-----
E_C_LpdA	384	SYETA-----TFPVAASCRAIASDCADGMTKLI-----
A_A	353	-----DNPVEGYAVSVKDDTWYCGTVSIA-----



A_t_NDA1	455	-----DLRESKEGKGISM-----	AGFLSWFIWRSAYL-----
A_T_NDA2	453	-----DLRESKDAKGISM-----	TGFVSWFIWRSAYL-----
S_T_NDA1	440	-----DLRESKEAKGVS-----	AGFTSEFFVWRSAYL-----
O_S_NDA456	444	-----DLRQSKEKGISL-----	ACFVSWFIWRSAYL-----
O_S_NDA562	506	-----DLRENKDARGVSM-----	ACFVSWLWRSAYL-----
C_R_NDA1	496	-----ELGDAGR-RHLS-----	ACFLSWVAWRSAYL-----
A_T_NDC1	457	-----SPSFIEGLTL-----	EGPTCHAARKLAYL-----
N_SP_BAB75793	350	-----TG---LGVKL-----	DGSLAVVARRLAYL-----
N_P_NDA	350	-----TG---LGIKL-----	DGPLASVARRIAYL-----
Th_NDA	351	-----AG---LGLTL-----	DGPLAMLARRLAYL-----
Syn_SLR1743	354	-----SG---LGIKL-----	SGPAALLARRLVYL-----
Syn_NDA390	343	-----SG---LGLTL-----	EGNLAHVARRLVYL-----
C_R_NDA5	521	GVRVGGAGPEAAEAAVAGAAAAEGKSSAVGDSGVTV-----	EGPLAQLMRRGAYL-----
C_R_NDA6	414	-----RAGGLVFSGCVPALTKS-----	RGLFVQYRKLKVNAPGP-----
C_R_NDA7	336	-----RMNGNVCGGCLPASIKS-----	KGLFVDDYRKLQGV-----
T_B_NDH2	383	-----ELNGPRKIDF-----	VGLKALFFWRSAYL-----
C_R_NDA3	679	-----QVEAFDVINLKL-----	YGSVAFLWKSYYI-----
R_S	378	-----QVFGLEL-----	KGFPALWRFYYL-----
Halo	343	-----DVEV-----	SGIAAPIRTF-----
B_S	356	-----IIGANSTPL-----	KGLPASLMKEASNY-----
D_R	347	-----WMKLPWNQKLAI-----	TGGIAHVMKRASEW-----
N_S_BAB73083	374	-----DLGLIKL-----	KGFSANAFWLLIHI-----
N_S_BAB77919	374	-----DLGLIKL-----	QGFIAVWFLLIHI-----
N_S_BAB73084	374	-----DLGFIKL-----	KGFFAWLFWLVIHI-----
Syne_SLR0851	376	-----DLGFAQF-----	TGLVANMIWVAHV-----
B_M	381	-----DMGRIRL-----	KGTIANWFWGIAHI-----
S_M	362	-----DFGRIKL-----	RGSLANWFWGIAHI-----
M_L	366	-----DFGWIKL-----	TGWLAWWFWGIAHI-----
B_J_1	374	-----DFGRIKL-----	RGTIANWFWGIAHI-----
X_A	365	-----HVGKIKL-----	SGVVAWFWLAAHV-----
C_T	359	-----EIGNLKF-----	DGATAWFTWLLVHI-----
C_G	379	-----KMGKVEV-----	TGFIWVWVWLAVHI-----
M_S	378	-----KVGPEVF-----	AGFFAWLWLVVHL-----
L_I	363	-----QVGILKM-----	KGLFCWLAWLVFVHL-----
G_M	357	-----CAFQMKF-----	RGFSANLVWLLVHL-----
N_S_BAB74663	370	-----KIGAFAF-----	TGFLAWLWLVGVHL-----
C_A	383	-----DAFGVRL-----	SGWLAVGVWLVFVHL-----
D_D	364	-----VRMGKEHTATGFWANVMWLFVHL-----	-----
B_T	369	-----EFSKVKM-----	QGFWANVMWLVVHL-----
C_H	363	-----DLFFIKF-----	KGFFAWLWLVFVHL-----
E_C_1	376	-----SLMGNLTRGSMML-----	ECRTARFVYISLYR-----
B_J_2	382	-----SMMGALVGGSLVF-----	EGLFARMMLSLYK-----
R_P	380	-----NLMGSLVGSFLT-----	EGYFARFMYRSLYK-----
B_V_2	386	-----NLMGGLIGGNVLI-----	EGLFARFMYRSLYR-----
A_V	375	-----NLMGNLT-GNVTL-----	EGWLARKFYISLYR-----
P_F	375	-----NLMGNLT-GSMVL-----	EGWLARMFYVSLYR-----
H_I	386	-----SLTNKFGKNPLTV-----	QCKFAQFVVSLYR-----
Z_M	361	-----DFLIAIMARCFL-----	AGL-----
B_V_1	394	-----QADFGARPRSVIV-----	DCLAAIGLYKFLYR-----
C_R_NDA2	568	-----DLPKFGPLTGTGAGFVWKSSET-----	-----
A_T_NDB1	521	-----ELP-----GDWVS-----	ACKSAQWLWYSVYA-----
S_T_NDB1	527	-----ELP-----GDWVS-----	MGHSTQWLWYSVYA-----
A_T_NDB2	532	-----QLP-----GDWVS-----	ICHSSQWLWYSVYA-----
A_T_NDB3	518	-----QLP-----GDWVS-----	ICHSSQWLWYSVYA-----
A_T_NDB4	532	-----ELP-----GDWVS-----	ICHSSQWLWYSVYA-----
N_C_U08980	524	-----DVS---WFN-GNLAS-----	GGSLTFLFWRSAYL-----
Y_L_NDH2	526	-----DLSPNFWGI-MNWSS-----	GCTMTYFWRSAVY-----
S_C_NDE1	508	-----DLA---VGE-AKYRL-----	AGSFTFLFWKSAYL-----
S_C_NDI2	493	-----DLH---MGD-SSYQL-----	KCMFAFLFWKSAYL-----
C_A	520	-----DLV---WGDWSNLSS-----	GGNLTFLFWRSAYI-----
S_C_NDI1	458	-----TIR---SGKRTFYTG-----	GGLMTEYLWRILYL-----
S_P_NDH2_1	496	-----DIEVPWFGK--QIHA-----	SGALAEYFWRSVYL-----
S_P_NDH2_2	496	-----DLKLPFMKK--MPL-----	QGIVCHTFWRLAYL-----
D_D	531	-----EFK---GDHSTTVS-----	EGYITVYLWRSVYF-----
N_S_BAB76910	364	-----NLFNKVQI-----	KCQAQHLIREGTYL-----
Syne_SLR1484	412	-----NLFDRVRI-----	QCKACDLRNATYL-----
N_C_NDE1	623	-----WGDGWNFS-----	GGLWAVYAWRSIYF-----
N_C_NDI1	501	-----QGPRDEI-----	RGWAAVWLRSAYL-----
P_F	484	-----DLPYYELKGGFRFSSTFWKVVYI-----	-----
P_Y	533	-----HLPFYEIKGCPFSFTFWKIVYM-----	-----
E_C_LpdA	413	-----DKESHVIGGAIVGTNGGELLGETGL-----	AIEMCCDAEDALTTHA-----
A_A	377	-----DPAAVNHLLKK-----	ELFTKYVMWTKGDM-----

A_t_NDA1	482	-----TRVVSWRNRFYVAINWLTTFV FGR-----
A_T_NDA2	480	-----TRVISWRNRFYVAINWLTTFV FGR-----
S_T_NDA1	467	-----TRVVSWRNKIYVLLINWLTTLV FGR-----
O_S_NDA456	471	-----TRVVSWRNRFYVAINWLTTLV FGR-----
O_S_NDA562	533	-----TRVVSWRNRFYVAVNWATTLV FGR-----
C_R_NDA1	522	-----TRLGSI PKR IAVAFDWSITM I FGR-----
A_T_NDC1	481	-----IRLPTDEHLMVR IISWFAKSAVDS-----
N_SP_BAB75793	371	-----YRLPTLDHQ I KVGFNW I VRP I IET-----
N_P_NDA	371	-----YRLPTLDHQ I KVGFNW I VRP I IET-----
Th_NDA	372	-----YRLPTLEHQ I KVG I N W I AKPFLDL-----
Syn_SLR1743	375	-----YRFPTWQHQL I VGLN W I TRP I GDW-----
Syn_NDA390	364	-----YRLPTWEHQVQVGLN W I VQP I TKL-----
C_R_NDA5	570	-----YRQPTNEQR I N WATS W I KLG I EAA-----
C_R_NDA6	450	APGAAGAAGASGLGRGAVGVAAVAGAPVGVQAAAEV-----
C_R_NDA7		-----
T_B_NDH2	407	-----SIVGSWRNRIYV I I V N W I GSA I FGR-----
C_R_NDA3	705	-----TKQVSFRNRVLI I LFDW I KTR I FGR-----
R_S	399	-----AFLPGLTTR I FVLI I N W I FMDG I SPR-----
Halo	357	-----GNMPAKVLKKGAAARW I AKITSWS-----
B_S	379	-----RYLTHI I KGLFS I AY-----
D_R	373	----------KWRSSVD-----
N_S_BAB73083	395	-----YFLIEFDKLI I VMI I QWAWNY I TRK-----
N_S_BAB77919	395	-----YFLIEFDTKLI I VV I FQWAWNY I TRN-----
N_S_BAB73084	395	-----YFLIEFDNKLI I VMI I QWAWNY I TRN-----
Syne_SLR0851	397	-----YYLIEFDNKLI I VMI I QWAWNY I TRG-----
B_M	402	-----FFLIIGT I SRFAVWSW I WTY I TGQ-----
S_M	383	-----YFLIGT I SRFAVWSW I WTY I LSGQ-----
M_L	387	-----YFLIGFRNRI I AVSI I SW I WIY I VTGQ-----
B_J_1	395	-----YFLIGLRHRI I SV I ALSW I WIY I ARDQ-----
X_A	386	-----YFLIGFRNRFV I LVN W I WAMAYWSYQ-----
C_T	380	-----YYLSIFKHR I FV I LMQWAWSY I FTG-----
C_G	400	-----MFLVGFNR I RFVSA I SWGLN I SRK-----
M_S	399	-----VYLVGFR I TK I I VTL I SWGVTF I LSTK-----
L_I	384	-----FYQVGF I KNI I T I L I TWWSY I AFR-----
G_M	378	-----YYLIGFRNRI I VMI I N W I WYWFHE-----
N_S_BAB74663	391	-----VYLPGYRSRI I L V L I TW I HTY I GSD-----
C_A	404	-----MALVGFNR I RAL V I LN W I WAYSY I FYD-----
D_D	387	-----LYLVGFNR I I FV I LFTWAWDY I FFE-----
B_T	390	-----RSILGVNR I KV V I LVN W I WNYFYD-----
C_H	384	-----MLLISVNRKI I I I F I N W I WAWAY I TKD-----
E_C_1	403	-----MHQIAL I EGYFKTGLMM I VGS I NRV-----
B_J_2	409	-----MHEHAL I GSVKVALDT I AR I I TR-----
R_P	407	-----MHEAALYGRGR I T I LSV I LSG--STR-----
B_V_2	413	-----LHVAAL I GYPR I V I LDT I VAHW I RRT-----
A_V	401	-----MHQVALYGT I FRT I LMM I GDRFRSS-----
P_F	401	-----MHQVALYGMFR I T I AML I GSK I GRG-----
H_I	413	-----MHQHAL I GC I K I G I I I VDK I NRY-----
Z_M	377	-----
B_V_1	421	-----KHLIFS I VYGLKRALFQS I GHW I QRR-----
C_R_NDA2	590	-----MSQFSFRNQCL I VAADW I LRTKI I FGR-----
A_T_NDB1	543	-----SKQVSWR I TRAL I VVSDW I TRRY I FGR-----
S_T_NDB1	549	-----SKQVSWR I TRYL I VVGDW I WRRY I FGR-----
A_T_NDB2	554	-----SKQVSWR I TRVL I VVSDW I WRRF I FGR-----
A_T_NDB3	540	-----SKQVSWR I TRVL I VVSDW I WRRF I FGR-----
A_T_NDB4	554	-----SKLVSWR I TRML I V I SDW I TRRF I FGR-----
N_C_U08980	549	-----SMCFSTRNRI I LV I NDW I WKS I L FGR-----
Y_L_NDH2	554	-----SMCFSMNRKI I VCI I DW I KVR I FGR-----
S_C_NDE1	533	-----AMCLSFNR I RVL I AMDWAKVY I FLGR-----
S_C_NDI2	518	-----AMCLSI I RNR I L I AMDWTKVY I FLGR-----
C_A	546	-----YMCLSVNRQV I LV I LDWAKVY I FFGR-----
S_C_NDI1	484	-----SM I L I SARSR I KVFFDW I KLAFFKR-----
S_P_NDH2_1	523	-----SELYSLRNRT I NV I LDW I RVK I FGR-----
S_P_NDH2_2	523	-----NEL I SAR I SQFMV I L I DW I KTR I FGR-----
D_D	556	-----TKLLSVNR I RAL I VSFDW I LKSS I VGR-----
N_S_BAB76910	386	-----QLLPNSAHN I KV I TTEW I L TDE I FQR--HR-----AVTPMQLG
Syne_SLR1484	434	-----ELLPIPLHNFKST I QW I LAET I DR I FHRPHAPTAQELKWAAMTPAQRQ
N_C_NDE1	645	-----TQCVSLR I TRV I L I A I DW I GKRA I FGR-----
N_C_NDI1	522	-----AKSMSWRNR I FL I VPIY I W I VSW I FGR-----
P_F	506	-----QLLLSWRSR I FHF I IDF I KTKWYGR-----
P_Y	555	-----QMLLTWKS I R I NFI I FSI I RTKI I YGR-----
E_C_LpdA	456	-----HPTL I ESI I G I AAEVFEGS I TDL-----
A_A	401	-----ALEKFLASW I-----

A_t_NDA1	506	-----DISRI-----
A_T_NDA2	504	-----DISRI-----
S_T_NDA1	491	-----DISRI-----
O_S_NDA456	495	-----DISRI-----
O_S_NDA562	557	-----DNTRIG-----
C_R_NDA1	546	-----DLSRW-----
A_T_NDC1	505	-----IALQSNLTK-----
N_SP_BAB75793	395	-----IYSADAVNE-----
N_P_NDA	395	-----LSK-----
Th_NDA	396	-----LTTIAS-----
Syn_SLR1743	399	-----LKNEPS-----
Syn_NDA390	388	-----LAQ-----
C_R_NDA5	594	-----AALAGG--SR-----
C_R_NDA6	487	-----AQAVAAGCDG-----
C_R_NDA7		-----
T_B_NDH2	431	-----DLTLINDYNDERTWLSLASEGAAREKVSRMNKVKTDGDGSNGNETTARSK
C_R_NDA3	729	-----DISLF-----
R_S	423	-----SVVQIHTRSVPPTRYVRYRAGDVIYEAGNRSDGFYTVVVTGAVEMTRTDPE
Halo	381	-----RAMKA-----
B_S		-----
D_R		-----
N_S_BAB73083	419	-----RGSRIIT----GK-----ESLAFANNFDDSDNTNNYSAANNRQPLNV
N_S_BAB77919	419	-----RRSRIIT----GR-----EAFVEPKTVNQQ-----
N_S_BAB73084	419	-----RGARIIT----GQ-----EIH LAVNTVNNS---GHYQPLEKRLPVNV
Syne_SLR0851	421	-----RGARIIT----DT-----PNPQSTSTVQKE-----LVRP
B_M	426	-----HSARIIT----QG-----KPSD----EFR-----
S_M	407	-----HSARIIT----QK-----DTLR----EER-----
M_L	411	-----RSARIIT----QG-----D-DD---KT-----
B_J_1	419	-----RAARIIT----QG-----S-SK---VVG-----
X_A	410	-----RAARLIF----GG-----ATDDPPSSKDG-----
C_T	404	-----YGARLIV----NKDWRFYREQKSSPCDDKKA-----
C_G	424	-----RWNLATT----RQLHSRTTLSKFAHELEEASSDLPIELRDNQRFSGK
M_S	423	-----RGQLTIT----EQQAYARTRI----EELEEIAA----AVQDTEK-AAS
L_I	408	-----AEARVIQ----DE-----ISADNG-----
G_M	402	-----RQVRLIT----ER-----VEE-----
N_S_BAB74663	415	-----RHVRVIL----SSKTMSVLHRPADLPYLQES-----R
C_A	428	-----RGVRLIF----GIGAEHEEALLDVGKRQDY-----R
D_D	411	-----RAARLII----PRGPIEDDA-----P
B_T	414	-----QSMRMIVYARKAKEIRDREAIEATTHWGKDLMQEPQPAKQEPQPNNSKEIV
C_H	408	-----TSLRLIL-----TQKGPKAEG-----
E_C_1	427	-----IRPRKLN-----
B_J_2	433	-----TEPHVKLN-----
R_P	429	-----PTPTVKLN-----
B_V_2	437	-----TLPRVKLN-----
A_V	425	-----TEPRKLN-----
P_F	425	-----TEPRKLN-----
H_I	437	-----LKPRKLN-----
Z_M	377	-----PLLAI-----
B_V_1	445	-----NQPSKLN-----
C_R_NDA2	614	-----DISRV-----
A_T_NDB1	567	-----DSSRI-----
S_T_NDB1	573	-----DSSRI-----
A_T_NDB2	578	-----DSSSI-----
A_T_NDB3	564	-----DSSRI-----
A_T_NDB4	578	-----DSSSI-----
N_C_U08980	573	-----DVSRE-----
Y_L_NDH2	578	-----DISRE-----
S_C_NDE1	557	-----DSSI-----
S_C_NDI2	542	-----DSSV-----
C_A	570	-----DCSRE-----
S_C_NDI1	508	-----DFFKGL-----
S_P_NDH2_1	547	-----DISSI-----
S_P_NDH2_2	547	-----YDAKV-----
D_D	580	-----DISRG-----
N_S_BAB76910	420	QTPWLSGVATTVAALIFATPLVWRVAQPAQFQQNLSWTGVPTLLNYLTPSR-----
Syne_SLR1484	481	EHQGIKAIA-IIAPLIFIVLLYLGFKTPERERAPFVQPSPGM-----NR-----
N_C_NDE1	669	-----DLRKY-----
N_C_NDI1	546	-----GISRF-----
P_F	530	-----
P_Y	579	-----
E_C_LpdA	478	-----PNPKAKKK-----
A_A		-----

A_t_NDA1		-----
A_T_NDA2		-----
S_T_NDA1		-----
O_S_NDA456		-----
O_S_NDA562		-----
C_R_NDA1		-----
A_T_NDC1	515	-----V-----
N_SP_BAB75793	405	-----K-----
N_P_NDA		-----
Th_NDA		-----
Syn_SLR1743		-----
Syn_NDA390		-----
C_R_NDA5	602	-----R-----
C_R_NDA6	497	-----G-----
C_R_NDA7		-----
T_B_NDH2	481	VDLPATK-----
C_R_NDA3		-----
R_S	473	TGLPQVRTIGPGGHFGERLILGATRRQTSVRAAEDTKVLVMDREEFLKLADSFQAFRDYF
Halo	386	-----
B_S		-----
D_R		-----
N_S_BAB73083	457	-----
N_S_BAB77919		-----
N_S_BAB73084	454	-----
Syne_SLR0851	446	-----
B_M		-----
S_M		-----
M_L		-----
B_J_1		-----
X_A		-----
C_T		-----
C_G	468	-----
M_S	458	-----
L_I		-----
G_M	414	-----
N_S_BAB74663	443	-----
C_A	456	-----
D_D	429	-----
B_T	464	-----
C_H	424	-----
E_C_1		-----
B_J_2		-----
R_P		-----
B_V_2		-----
A_V		-----
P_F		-----
H_I		-----
Z_M		-----
B_V_1		-----
C_R_NDA2		-----
A_T_NDB1		-----
S_T_NDB1		-----
A_T_NDB2		-----
A_T_NDB3		-----
A_T_NDB4		-----
N_C_U08980		-----
Y_L_NDH2		-----
S_C_NDE1		-----
S_C_NDI2		-----
C_A		-----
S_C_NDI1		-----
S_P_NDH2_1		-----
S_P_NDH2_2		-----
D_D		-----
N_S_BAB76910		-----
Syne_SLR1484		-----
N_C_NDE1		-----
N_C_NDI1		-----
P_F	530	-----
P_Y	579	-----
E_C_LpdA		-----
A_A		-----

A_t_NDA1		-----	
A_T_NDA2		-----	
S_T_NDA1		-----	
O_S_NDA456		-----	
O_S_NDA562		-----	
C_R_NDA1		-----	
A_T_NDC1	516	-----	LSGS
N_SP_BAB75793	406	-----	GTRY
N_P_NDA		-----	
Th_NDA		-----	
Syn_SLR1743		-----	
Syn_NDA390		-----	
C_R_NDA5	603	-----	GATL
C_R_NDA6	498	-----	SGSR
C_R_NDA7		-----	
T_B_NDH2	488	-----	KQNE
C_R_NDA3		-----	
R_S	533	GPYMARHGMTWPPLGETDGQAAPKVPTEKD	
Halo	386	-----	WDAL
B_S		-----	
D_R		-----	
N_S_BAB73083		-----	
N_S_BAB77919		-----	
N_S_BAB73084		-----	
Syne_SLR0851		-----	
B_M		-----	
S_M		-----	
M_L		-----	
B_J_1		-----	
X_A		-----	
C_T		-----	
C_G		-----	
M_S		-----	
L_I		-----	
G_M		-----	
N_S_BAB74663		-----	
C_A		-----	
D_D		-----	
B_T		-----	
C_H		-----	
E_C_1		-----	
B_J_2		-----	
R_P		-----	
B_V_2		-----	
A_V		-----	
P_F		-----	
H_I		-----	
Z_M		-----	
B_V_1		-----	
C_R_NDA2		-----	
A_T_NDB1		-----	
S_T_NDB1		-----	
A_T_NDB2		-----	
A_T_NDB3		-----	
A_T_NDB4		-----	
N_C_U08980		-----	
Y_L_NDH2		-----	
S_C_NDE1		-----	
S_C_NDI2		-----	
C_A		-----	
S_C_NDI1		-----	
S_P_NDH2_1		-----	
S_P_NDH2_2		-----	
D_D		-----	
N_S_BAB76910		-----	
Syne_SLR1484		-----	
N_C_NDE1		-----	
N_C_NDI1		-----	
P_F	530	-----	PFIK
P_Y	579	-----	PFI-
E_C_LpdA		-----	
A_A		-----	

## Annexe 4: Séquences des protéines Nda de l'alignement

```
>A.t_NDA1
MLWIKNLA--RISQTTSSSVGNVFRNPE----SYTLSSRFCTALQKQQVT
DT-----VQAK
EDVVNALEP-----QRYDGLAPTK
EGEKPRVLVLGSGWAGCRVLKIDTISIY-----DVVVCVSPRNMVF
TPLLAST--CVGTLEFRSVAEPIISRI-----QPAI
SREPGSYFFLANCSKLLDA-----DNHEV--H-----
----CETVTEG-SSTLKPWK-FKIAVDKLVACGAEASTFGINGVLENAI
FLREVVHHAQEIRRKLLLNMLSEV-PG---IGE-----
-----D---EKKRLLHCVVVGGGP-----
TGVEFSGELSDFIMK----DVRQRYSHVK-DDIRVTLIE-ARDILSSFDD
R---LRHYAIKQLNKS-GVKLVIRGI-VKEVKPQKLILDD-----
-----
-----GTEVP-----
-----YGPLVWSTGVGPPSFVRSLL-----D-----FPKD---PG-----
-----GRIGIDEWMRV-----
-----PS-----VQD-VFAIGDCSGYLES-----
TGK-----
-----
---STL--PALAQVAEREGKYLANLFNV-----
-----
-----MG---KAGGG
RANSK-EMELGE-----PFVYKHLGS-
---MATIGRYKALV-----
-----DLRESKEGKISM-----AGFLSWFIWRSAYL-----
-----TRVSWRNRFYVAINWLTTFVFG-----
-----DISRI-----
-----
-----
```

```
>A.T_NDA2
MFMIKNLT--RISPNTSSIIITR-FRNSGSSSLSYTLASRFCTAQETQ---
-----IQSP
AKIPNDVDR-----SQYSGLPPTR
EGEKPRVVVLGSGWAGCRLMKIDTNLY-----DVVVCVSPRNMVF
TPLLAST--CVGTLEFRSVAEPIISRI-----QPAI
SREPGSFFFLANCSRLDA-----DAHEV--H-----
----CETLTDG-LNTLKPWK-FKIAVDKLVIASGAEASTFGIHGVMENAI
FLREVVHHAQEIRRKLLLNMLSDT-PG---ISK-----
-----E---EKRLLHCVVVGGGP-----
TGVEFSGELSDFIMK----DVRQRYAHVK-DDIHVTLIE-ARDILSSFDD
R---LRRYAIKQLNKS-GVRFVIRGI-VKDVSQKLILDD-----
-----
-----GTEVP-----
-----YGLLVWSTGVGPPSPFVRSLL-----G-----LPKD---PT-----
-----GRIGIDEWMRV-----
-----PS-----VQD-VFAIGDCSGYLET-----
TGK-----
-----
---PTL--PALAQVAEREGKYLANLLNA-----
-----
-----IG---KNGGG
RANSK-EIELGV-----PFVYKHLGS-
---MATIGRYKALV-----
-----DLRESKDAKISM-----TGFVSWFIWRSAYL-----
-----TRVISWRNRFYVAINWFTTFVFG-----
-----DISRI-----
-----
-----
```

>S.T\_NDA1  
 MPWFKNLI--KISKTITNQSSS-YKSITPLASPLL--TQFLQFTKQY---  
 -----  
 -----STN-----DHVVGLEATK  
 SDQKPRIVVLGSGWAGCRLMKDIDTNIY-----DVVCVSPRNHMVF  
 TPLLAST--CVGTLEFRSVAEPIGRI-----QPAV  
 STQPASYFFLANCNAIDF-----DNHMI---E-----  
 ----CETVTEG-VETLEAWK-FNVSYDKLVIASGAHALTFGIKGVNEHAT  
 FLREVVHHAQEIRRKLLLLNLMLSDV-PG---VSE-----  
 -----E---EKRRLLHCVVVGGGP-----  
 TGVEFSGELSDFILK---DVHQRYAHVK-DYIHVTLIE-ANEILSSFDD  
 R---LRVYATNQLTKS-GVRLVRGL-VQHVQPDNIILSD-----  
 -----  
 -----GTNVP-----  
 ----YGLLVWSTGVGSPFVNSL-----D-----IPKA---K-----  
 -----GRIGIDEWLRV-----  
 -----PS-----VQD-VYSIGDCSGFLES-----  
 TGR-----  
 -----  
 ---QVL--PALAQVAERQ GKYLASLLNK-----  
 -----  
 -----VG---KQGGG  
 HANCAQ-NINLGD-----PFVYKHLGS-  
 ---MATIGRYKALV-----  
 -----DLRESKEAKGVSL-----AGFTSFFVWRSAYL-----  
 -----TRVVSWRNKIYVVLINWLTTLVFGR-----  
 -----DISRI-----  
 -----  
 -----

>O.S\_NDA456  
 MAASSLLR--SLSRISRRGCVG-GAGPSPFHHSRLPYSPFSTAAADA---  
 -----  
 -----VER-----RGFAGLGPTA  
 KGEKARVVVLGTGWAGSRLMKDIDTTGY-----EVVCVSPRNHMVF  
 TPLLAST--CVGTLEFRSVAEPLARI-----QPAV  
 SKSPGSYFLLARCTAVDP-----DAHTI---D-----  
 ----CETVTEGEKDTLKPWK-FKVAYDKLVFACGAEASTFGIRGVTDHAI  
 FLREVVHHAQEIRRKLLLLNLMLSDV-PG---ISE-----  
 -----E---EKRRLLHCVVVGGGP-----  
 TGVEFSGELSDFIIR---DVKQRYSHVK-DYIHVTLIE-ANEILSSFDDV  
 R---LRQYATNQLTKS-GVRLVRGI-VKDVQPNKLILDN-----  
 -----  
 -----GEEVP-----  
 ----YGLLVWSTGVGSPSSFVKSL-----P-----FPKS---PG-----  
 -----GRIGVDEWLRV-----  
 -----PS-----ARD-VFAIGDCSGFLES-----  
 TGK-----  
 -----  
 ---DVL--PALAQVAERQ GKYL A HLLNH-----  
 -----  
 -----VM---KAGGG  
 HANCEI-DVDLGP-----AFVYKHLGS-  
 ---MATVGRYKALV-----  
 -----DLRQSKESKGISL-----AGFVSWFIWRSAYL-----  
 -----TRVVSWRNRFYVAINWLTTLVFGR-----  
 -----DISRI-----  
 -----  
 -----

>O.S\_NDA562

MAWSRIARGSQLTQPLSRILAEGNAAATPAAYALRNAAALGQRASSASAS  
SSFHSLALAGLADKYAAGAAGRLQPSRGI STTSPALRPAAEAAAARVVECS  
DAADEAAAA-----AAVPDLGPTR  
PGEKPRVVVLGTGWAACRFLKDVDTRAY-----DVVCISPRNHMVF  
TPLLAST--CVGTLEFRSVVEPVRSI-----QSAL  
ATRPGSYFFLASCTGIDT-----GRHEV---H-----  
----C-TAADGDGLPANPYN-FKVSYDKLVIASGSEPLTFGIKGV AENAI  
FLREVSHAQEIRKLLTNLM LSEN-PG---LSE-----  
-----E---EKKRLLHCVVVGGGP-----  
TGVEFSGELSDFITR---DVRERYAHVK-DYVKVT LIE-ANEILSSFDV  
G---LRQYATDHLSKY-GVNLVRGV-VKEVKPREIELSD-----  
-----  
-----GSRVP-----  
-----YGVLVWSTGVGPSEFVRS L-P-----LPKS---PG-----  
-----GRIGVDEWLRV-----  
-----PS-----VED-VFALGDCAGFLEG-----  
TGR-----  
-----  
---AVL--PALAQVAEREGRYLARVMSR-----  
-----  
-----IA---AQDGG  
RAGRAVGS AELGE-----PFVYKHIGS-  
---MASVGRYKALV-----  
-----DLRENKDARGVSM-----AGFVSWLMWRSAYL-----  
-----TRVVSWRNRFYVAVNWATTLVFG R-----  
-----DNTRIG-----  
-----  
-----

>C.R\_NDA1

MAASALLA--TVASSYIRRSSG-----VGTSL LGAFSNDH---  
-----RPCGTAVYQHLRRL  
AAQAQASKK-----TASSDQLPLK  
TGRQ-RLVVLGSGWAAARLLHDIDPNLY-----DLTVISPRNHMVF  
TPLLAST--TVGTLEPRSVAVHLHEI-----QPCL  
SR-PSSSVFIADAHAVDA-----ASRTV---T-----  
----CRSV-DG-----LD-FSVQYDKLAICTGSQGSTFGIPGVLEN AH  
FLRDVKQADAIRQKLIENIALAGV-PGEPSRQQ-----  
-----D---EFSRLLHIVIVGGGP-----  
TGVEVAGELTDFISHEVCVDLMRMYPERA-KAMRVTLVE-ARELLGSFDA  
S---LREYAARKLIQ G-GVLLRKG I-VHEVTPREVVLKD-----  
-----  
-----GTVLP-----  
-----YGLCIWSTGVGPTPFSLSL---P-----FAKT---AV-----  
-----GRIAVDKYMRVLAPPSPTATSTSAANPAPATSQPQQSEPT  
SQTPAGSTGKVPGLLADES DTPSTAGLAPVPH-VYALGDVC----A-----  
NPD-----  
-----  
---KPL--PALAQVAEQQGRYLARVLNE-----  
-----  
-----LA---RGPPH  
-----GVPQHT-----EFVYRQLGA-  
---MATVGGHSAVL-----  
-----ELGDAGR-RHLSL-----AGFLSWVAWRSAYL-----  
-----TRLGSIPKRLAVAFDWSITMIFGR-----  
-----DLSRW-----  
-----  
-----



>A.T\_NDC1

M-----AVLSSVSSLIPFSYGATRLTSKASLASRTSGF---  
-----NLSSRWNSTRNPMPLYLSRAVTNN  
SGTTEISDN-----ETAPRTYSWP  
DNKRPRVCILGGGFGGLYTALRLESLVW---PEDKKPQVVLVDQSERFVF  
KPMLYEL--LSGEVDVWEIAPRFSDLLTN-----TGIQFLRDRV  
KTLPCDHLGVNGSEISV-----TGGTV--L-----  
----LESGFK-----IEYDWLVLALGAESKLDVVPGAMELAF  
PFYTLEDAIRVNEKLS-----KLE-----  
-----RKNFKDGSIAIKVAVVGGCY-----  
AGVELAATISERLQD-----RG-----IVQSINVSKNILTSAPD  
G--NREAAMKVLTSR-KVQLLLGY-LVQS---IKRASNLEEDEGYFLE  
LQPAERG-----  
-----LESQIIE-----  
----ADIVLWTVGAK--PLLTKL-----EPSPGNVPLN---AR-----  
-----GQAETDETLRV-----  
-----KG-----HPR-IFALGDSSSLRDS-----  
-NG-----  
-----  
--KIL--PTTAQVAFQEADFTGWNIWA-----  
-----  
-----AI----NNR--  
--PL-----L-----PFRFQNLGE--  
--MMTLGRYDAAI-----  
-----SPSFIEGLTL-----EGPIGHAARKLAYL-----  
-----IRLPTDEHLMVRIWFAKSAVDS-----  
-----IALLQSNLTK-----  
-----V-----  
-----LSGS

>N.SP\_BAB75793

M-----TEQT-----  
-----  
-----  
----KRIVILGGGFGGLYTALRVSQLPW--ETQOKPEIVLVDQSDRFLF  
SPLLYEL--LTGELQSWEIAPPFIELLEG-----TGIRFYQAVV  
SG-----IDI-----DQQRV--H-----  
----LQDGPE-----IPYDRLVLTGGETPLDLVPGAISYAY  
PFRTIADTYRLEERLR-----VLE-----  
-----E--SDAEKIRVAIVGAGY-----  
SGVELACKLADRLGE-----RG-----RFRLVEISDQILRTSPD  
F--NREAANKALDAK-GVFIDLET-KVES---IGQNT-----IS  
LEYKN-----  
-----QVDTIP-----  
----VDLVIWTVGTRVTNVVKSLL--P-----FKQN--QR-----  
-----GQITNTPTLQV-----  
-----LD-----HPD-IFALGDLADCIDA-----  
-EG-----  
-----  
--QQV--PATAQAAFQQADYAAWNIWA-----  
-----SL---TQR--  
--PL-----L-----PFRYQQLGE--  
--MMALGTDNATL-----  
-----TG--LGVKL-----DGSLAYVARRLAYL-----  
-----YRLPTLDHQLKVGFNWLVRPDIET-----  
-----IYSAVDVAVNE-----  
-----K-----  
-----GTRY

>N.P\_NDA

M-----TQQN-----  
-----  
-----SRICILGGGFGGLYALRLSQLPW---ESTQKPEIVLVDQSDRFLF  
SPLLYEL--LTGELQTWEIAPPFEELLQG-----TGVRFYQGVV  
SG-----IDI-----EQQRV--D-----  
----IHEGPE-----IPYDRLVLAALGGETPLDLVPGAAAYGY  
PFRTISDAYRLEERLR-----FLE-----  
-----E---SDADKIRVAIIIGAGY-----  
SGVELACKLADRLGE-----RG-----RFRIVEIADQILRTSPE  
F--NREAACKALDAR-GVFLDLET-KVEL---IEQNS-----IT  
LEYKN-----  
-----QLDTIP-----  
-----VDLVIWTVGNKVAPVVKSL-----P-----LKQN--QR-----  
-----GQINTTSNLQV-----  
-----ID-----HPE-IFALGDLADCHDV-----  
-EG-----  
-----  
---QQV--PATAQAAFQQADYTAWNIWA-----  
-----  
-----SL----TNR--  
---PL-----L-----PFHYQQLGE-  
---MRTLKNNATL-----  
-----TG--LGIKL-----DGPLASVARRIAYL-----  
-----YRLPTLDHQLKVGFNWLVRPPIIET-----  
-----LSK-----  
-----  
-----

>Th\_NDA

M-----IRESAV-----  
-----  
-----RSQICILGGGFGGLYALRLAQFPW---SS--PPEITLVDHSDRFVVF  
TPLLYEL--ITGELEAWEIAPPFVELLRD-----TPVVFHQGAV  
TT-----IDL-----QEKTV--H-----  
---LGKGD-----FTYEKLVLALGGETPKSTIPGVAADAL  
TFRTLSDAYRLEEALQ-----RCE-----  
-----H---SDRDRIRVVVVGAGP-----  
SGVELACKLAERLGS-----RG-----RIRLVDRNPEILKSSPE  
F--NRKAALRALEDR-GVWIDLET-TPVA---LTRDR-----IS  
LQYKD-----  
-----RVDELP-----  
-----VDIVLWTVGTAVSPVIAAL-----D-----LPKT--AS-----  
-----GRLQVTPTLQV-----  
-----VD-----HPD-IFALGDAADAVDE-----  
-QG-----  
-----  
---QPI--PHTAQAAFQQADYVAVNNLWA-----  
-----  
-----SL----SDR--  
---PL-----L-----PCRYSHLGE-  
---MLTLGRDRAAL-----  
-----AG--LGLTL-----DGPLAYLARRLAYL-----  
-----YRMPTLEHQLKVGLNWIAKPFLDL-----  
-----LTTIAS-----  
-----  
-----

>Syn\_SLR1743

M-----TDAR-----  
-----  
-----PRICILGGGFGLYTALRLGQLSW---EGHTPPEIVLVDQRDRFLF  
APFLYEL--VTEEMQTWEIAPPFVELLAE-----SGVIFRQAEV  
TA-----IDF-----DHQKV---L-----  
----LNDQDKG-----T-ESLAFDQLVIALGGQTPLPNLPGLKDYGL  
GFRTLEDAYKQKQK---SLE-----  
-----Q---ADAEKIRIAIVGGGY-----  
SGVELAAKLGDRLE-----RG-----RIRI IERGKEILAMSPE  
F---NRQQAQASLSAK-GIWVDTET-TVTA---ITATD-----VT  
LQFRE-----  
-----QEDVIP-----  
----VDLVLWTGTTVSPLIRNL-----A-----LPHN---DQ-----  
-----GQLRTNAQLQV-----  
-----EG-----KTN-IFALGDGAEGRDA-----  
-SG-----  
-----  
---QLI--PTTAQGAQQOTDYCAWNIWA-----  
-----  
-----NL---TGR---  
---PL-----L-----PCRYQPLGE-  
---MLALGTDGAVL-----  
-----SG---LGIKL-----SGPAALLARRLVYL-----  
-----YRFPTWQHQLTVGLNWLTRPLGDW-----  
-----LKNEPS-----  
-----  
-----

>Syn\_NDA390

M-----SQ-----  
-----  
-----PHIVIIGGGFAGLYTALRLLQFPW---ETSQRPDITLIDRQNHVVF  
SPLLYEL--ITEEMQPWEVAPTYTELLRH-----GPVKFVQTQV  
QT-----VDP-----EQKNV---V-----  
----CGDRQ-----ITYDYLVIAAGGTTKFNLPGIKEYAL  
PFKTLNDALHLKEKLR-----ALE-----  
-----T---SVAEKIRIAIVGGGY-----  
SGVELACKLADRLGD-----RG-----RLRIIDRGDEILKNAPK  
F---NQLAAKEALEAR-GIWVDYAT-EVTE---VTADS-----LS  
LRYKG-----  
-----EVDTIP-----  
----ADLVLWTGGTAIAPWVKDL-----A-----LPHA---GN-----  
-----GKLDVNAQLQI-----  
-----QN-----HPN-IFALGDVAQAEDN-----  
-----  
----L--PMTAQVAIQQADVCAWNLRG-----  
-----  
-----LI---TNK---  
---PL-----L-----PFKFFNLGE-  
---MLTLGENNATL-----  
-----SG---LGLEL-----EGNLAHVARRLVYL-----  
-----YRLPTWEHQVQVGLNWLQVPLTKL-----  
-----LAQ-----  
-----  
-----

>C.R\_NDA5  
MLAFNSLA--ASQPATSARNAAAATPVYSNMQRSVSRMQRLGLSSVF---  
-----AGDWSGAARLMGFRAAGSQAPHGA  
RAVATQATG-----SPAFGPGTSS  
GHHSRPRVVVLGGGFGGLYA AVRLEQLMW---PRGNKPQITLVDQADR FVF  
KPLLYEL--INGAATADEVSPSFEQLLAP-----YPIRFVQAQV  
AS-----VSPAAPHADAPDPDAPDAAGAV---T-----  
----LSDGTQ-----LPYDFLVVALGGQPDSRGPVPGVKEWAV  
PFAGYEDALRVKGTLD-----LLS-----  
-----D--AGAGGC-VVVVGAGY-----  
AGVELAATVAERLRA-----RGAG-GAVAVKVLTPGSHILEGCPE  
G--QGEAASKALADL-GVEVLTGA-RVLGLDPPLAASD-----AG  
EQSPAAG-----  
-----TSAAALPTACRVSYSLASDAGSAAGGAA  
RSHLGADLVVWTAGTS--PATREA-----RAGFP--FPVN--AR-----  
-----GALETEPTLRV-----  
-----SG-----SDN-VFALGDVAVAAPSPADP  
HHT-----  
-----QAL--PATAQVAFQQADYAAWNVWA-----  
-----  
-----AI---NGR--  
----PL-----L-----PFKYQHLGS-  
---MMALGQTNAVALPIPVPTALADAVRSSPLGPLLSAAGVRVGGAGPE  
AEA AVAGAAAEGKSSAVGDSGVTV-----EGPLAQLMRRGAYL-----  
-----YRQPTNEQRLNVATSWVKLGLEAA-----  
-----AALAGG--SR-----  
-----R-----  
-----GATL

>C.R\_NDA6  
M-----  
-----  
-----  
PADKPRLLILGGGPAGVILAQRCCSSF-----VVTLVDPKEYFEI  
TWATPRG--LMDPRVAAAAAINYWDIPDL-----G--RVIQARV  
TQL-----TSQSA--L-----  
----LSSGDT-----ISFDFAAVCSGSSTSE-L-----  
-FKSAAATSR-GQLA-----EMK-----  
-----G--EIRSAKSVLVVGGGP-----  
SGVEMAAEIVDAFAG-----K-----AVTLVHGGKRLLAELPP  
R--AGAAAQRWLEAH-HVKVMLGR-RVESKPPDDPSLGATSATGTTAT  
GTHSGSAHTAVGGAVAAAVPDERSWGAGSYAHSHAAAASHPDGGHHTHH  
AHNPLLD SAGAAAAGLPSVVRLSDGSSLA-----  
----ADVVLWCTGSR--PAAAFM----A-GGELAGCLD--ER-----  
-----GAVKVLPSLQV-----  
-----EG-----HPH-MFALGDVNNVPET-----  
-----  
-----KLGFLAAKQAELAAASLQA-----  
-----  
-----LA---RAKAA  
GGPAPK-----L-----QRWKPNGGTL  
AVMMVTLGRDDGVM-----  
-----RAGGLVFGSVCVPALIKS-----RGLFVQKYRKLKLVNAPGP  
APGAAGAAGASGLGRGAVGVA AVAGAPVGAVQAAAEV-----  
-----AQAVAAGCDG-----  
-----G-----  
-----  
-----SGSR

>C.R\_NDA7

M-----  
-----  
-----  
-APKPRVLIIGGGFAGVTLAKKASAF-----DVTLVDSKSYFEL  
TWTTVRG--IVDPEVASRSAISYKDIPGM-----G--RFVQATV  
TSL-----SAKSA--V-----  
----LSNGET-----LSFDYAALATGSSYSDTA-----  
-FKSTASSR-EQRLA-----ELK-----  
-----ALTEDIKASKSIVVVGPP-----  
AGVEVAAEIVEAHAG-----K-----QVTLVHPGAQLLNGTPP  
K--AGAAKKWLESH-RVTVLLNT-SVQKPP--EGRGPVSLT-----  
-----  
----LDG-----KEGRTLA-----  
----ADVVLWCAGAR--PNTAFL-----Q-GGELAGCLD--ER-----  
-----GAVKVLPSLQV-----  
-----EG-----HPH-MFALGDVNNVPEA-----  
-----  
-----KLGYLATEHGKLVAVSLKA-----  
-----  
-----LI-----SAKP-  
-GASPK-----L-----GAWKPGMGN-  
QVMIVSLGRGDGVC-----  
-----RMNGNVCGGCLPASIKS-----KGLFVDDYRKQLGV-----  
-----  
-----

>T.B\_NDH2

MICRTSFL-----  
-----  
-----  
--RKPVVVVGTGWAGCYFVRDTPKQLA-----ELHVLSTRNHHVL  
TPLLPT--TTGTLEFRSICEPITRI-----QPAL  
AHLNRFNRFCVYD-INF-----EQKRV--D-----  
----CISVDNTSVGPHALVNTFDVQYDKLVLAHGAQPNTFNVPGAVERAC  
FLREVNEARTIRKRLVQNIMTANL-PV--TSV-----  
-----E--EKKRLLHTVVVGGPP-----  
TGVEFSADLAEFLRD--DVKNINPELV-QFCKVTVLE-AGEVFSTFDL  
R--VREWGRRLDAL-GVRIVKGN-VVAVQEKEVITKS-----  
-----  
-----GEVFS-----  
----TGLVVWSTGVGPSPLTKEL--K-----VDRT--RQ-----  
-----GRISVDEHLQVLRDGV-----  
-----IPD-VYAIGDCATNESN-----  
-----  
----PL--PTLAAVASRQGVYLAKKINA-----  
-----  
-----EL--AGK--  
--PF--AA-----PFKYESLGS--  
--MVS LGTSSAVV-----  
-----ELNGPRKLDL-----VGLKALFFWRSAYL-----  
-----SIVGSRNRLYVIVNWLGS AIFGR-----  
-----DLTLINDYNDERTWLSLASEGAAREKVSRM  
NKVKTGDGDSNGNETTARSKVDLPATK-----  
-----  
-----KQNE

>C.R\_NDA3

MRTSIPCRGGRVSSRNAATQRLAVAPAGRNCPRGRTAVRVRAEAPRDGSP  
TALKEPPTKAPATAPARTPLAPPSAPAPGPQYFPKPGDPQWPPQRPFAA  
IALDNLDSVVDVGRHLGRMNVEADKLAMRQQEQ---LVPGDNGRMRLR  
ASTKPVVLVLGSGWGAHSLIKVIDTDTY-----DVVVVSPRNHFLF  
TPMLPST--AVGTVEFRSLLEPIR-----  
TSNPCVTYLEAECDSLDP-----HTKVA---V-----  
----CTSSFAYDDGRRPQFE---IQYDKAVVAVGEQPATFGVKGVKEHCF  
FMKEVSDAVALRKRIA EK FELASL-PG---TSE-----  
-----E---DRKAALHFVVVGGGP-----  
TGVEFAGTLSDFVRE---DLKKKYPALM-KYVKVTLLQSAQQILTQFDA  
G---LGRATEALESS-GVEVRTGVRVVEITINKVMLVS-----  
-----  
-----DAQVLLKGGEELP-----  
-----YGVCVWSAGNAPRPLVTQI-----ASQVAEQAAAAEAPPN-----  
-----AKLCVDSFLRV-----  
-----VG-----ATD-LMALGDCSLVLGN-----  
-----  
----RL--PSTAQVAGQQGAYLAHLINSQYQLGVGGYTQPPPFQIVKRNK  
LQVWAGAGGTGAYALQAAAEENAVLSWLTTAMMGKTRIQASKEVADAMF  
RMDAPPVVRVHSESLTKATPLDKEAPPGAKAVCDISAVMA----AAAAA  
GGADPVAVARASADCLRSLEEEELKAREGAEATEVRYDRPFEFSLGLI-  
---MAYVGNKALT-----  
-----QVEAFDVINLKL-----YGSVAFLLWKSUYI-----  
-----TKQVSFRNRVLILFDWMKTRVFGR-----  
-----DISLF-----  
-----  
-----

>R.S

M-----  
-----  
-----VGPATGR  
IVVTSRIVVLGGGFGGMYAARALKRRLG---RAA---EIELVNAENYFVF  
QPLLPEV--GAGSITPAHAVSPLRFLLRD-----VFVR--KATV  
DS-----VDF-----DRRLV---T-----  
----VFQGVQ-----RRPTEIGYDHLVIALGQAADLSKMPGLEEHAL  
TMRTLEDARRLRAHVIGQLEHAQI-T---RLP-----  
-----E---VKRGALTFCVVGGGF-----  
SGIETAGEMKDLIDR---SLKFYPDIDP-SEVRMIVVEFADRILGEMSQ  
G---LADYATRTLRLER-GIEVKLGTGVASATGTQLVTTT-----  
-----  
-----GEVID-----  
----TRTIVATIGNAPSPVRRM---G-----LPSE---R-----  
-----GRISVDRTLAV-----  
-----KG-----RSD-VWALGDCALIALKDAPO  
GPR-----  
-----  
---DYA--PPTAQFAVREAEQLAENIAS-----  
-----  
-----TL---TGGT-  
---PQ-----PFDYRSKGA-  
---LASLGARKGVA-----  
-----QVFGLEL-----KGFPWLLWRFYYL-----  
-----AFLPGLTTRIFVLLNWFMDGISPR-----  
-----SVVQLHTRSVPPTRYVRYRAGDVIYEAGNR  
SDGFYTVVTGAVEMTRTDPETGLPQVRTIGPGGHFGERLILGATRRQTSV  
RAAEDTKVLVMDREEFLKLDASFQAFRDYFGPYMARHGMTWPPLGETDQ  
AAPKPVPTKED

>Halo

M-----  
-----  
-----  
---TTRVVVLGAGYAGAGAIAGLESELG---PDA---ELVWVADTDYHLV  
LHEAHRV--IRDPGVQEKITIPVEDI-KS-----RTTEFIEDSV  
TD-----IDT-----DERSV---S-----  
---LADGDD-----VAYDYLVVVGIGSETATYGIEGMAEHPL  
TLKSLDDAMEIHEQVREA-----AQD-----  
-----A---TRDDPANVVIGGAGL-----  
SGIQSAGEVAEFRDR-----HN-APIDVTLVEALPEIFPPGDS  
E---IQGALRHRLEDA-GVTILTDDPITAASEDAIEFDE-----  
-----RDSL D-----  
-----YDVFVWTGGVTGPSELSDV-----E-----MDAE---H-----  
-----NRLQASSTLQA-----  
-----DD-----ER-VFAVGDCSMISQG-----  
-ND-----  
-----  
---DVA--PPTAQAAWQAADVARNVAR-----  
-----  
-----AM---EGR---  
---PL-----E-----TWTYEDQGT-  
---LVSVGETAIAH-----  
-----DVEM-----SGIAAPIRTF-----  
-----GNMPAKVLKKGAAARWIAKITSWS-----  
-----RAMKA-----  
-----  
-----WDAL

>B.S

M-----  
-----  
-----  
---SKHIVILGAGYGGVLSALTVRKHYT---KEQA--RVTVVNKYPTHQI  
ITELHRL--AAGNVSEKAVAMPLEKLFKG-----KDIDLKIAEV  
SS-----FSV-----DKKEV---A-----  
---LADGST-----LTYDALVVGLGSVTAYFGIPGLEENSM  
VLKSAADANKVFQHVEDR-----VRE-----  
-----YSKTKNEADATILIGGGGL-----  
TGVELVGELADIMPN-----LAKKYGVDH-KEIKLKLVEAGPKILPVLPD  
D---LIERATASLEKR-GVEFLTGLPVTNVEGNVIDLKD-----  
-----GSKVV-----  
---ANTFVWTGGVQGNPLVGES---G-----LEVN---R-----  
-----GRATVNDFLQS-----  
-----TS-----HED-VFVAGDSAVYFGP-----  
-DG-----  
-----  
---RPY--PPTAQIAWQMDELIGYNLFA-----  
-----  
-----YL---EGKTL  
ETFKPV-----NSGT-----  
---LASLGRKDAVA-----  
-----IIGANSTPL-----KGLPASLMKEASNV-----  
-----RYLTHIKGLFSLAY-----  
-----  
-----





>N.S\_BAB77919

```

M-----
-----
-----VDA--HE
KKAPHQVVIIGGGFGGLYTAKTLATAN---V----SVTLIDKRNHFHLF
QPLLYQV--ATGTLSPGDISSPLRAVFSKS-----KNTQVLLGEV
KD-----INP-----KAQQV--I-----
----LDDKV-----VPYDTLIVATGANHSYFGKDHWKDVAP
GLKTVEDAIEMRRRIFGAFEEA-----ESE-----
-----TDPEKRRAWLTFVIVGGGP-----
TGVELAGAI AELAYK---TLKEDFRSIDT-SETKILLQGGDRILPHIAP
E---LSQVAAESLQKL-GAIIQTKTRVTNIENDIVTFKK-----
-----
-----GD-EVKEIP-----
-----SKTILWAAGVKASPMGQVLAERT-G-----VECD--HA-----
-----GRVIVEPDLTI-----
-----RD-----YKN-IFVVGDLGNF SHQ-----
-NG-----
-----
---KPL--PGVAPVATQQGEYVAKLIKK-----
-----
-----RL---KGQTL
P-----QFRYNDVGS-
---LAMIGQNLAVV-----
-----DLGLIKL-----QGFIAWVFWLLIHI-----
-----YFLIEFDTKLLVVFQAWWNYITRN-----
-----RRSLIT-----GR-----EAFVEPKTV
NQQ-----
-----

```

>N.S\_BAB73084

```

M-----
-----
-----VEA--LD
NNPPHKVVIVGGGFGGLYAALAKAK---V----DVTLIDKRNHFHLF
QPLLYQV--ATGTLSPADISSPLRAVLSKS-----KNTQVLLGEV
ND-----IDP-----EAQEL--V-----
----MGDEK-----IPYDTLIVATGAKHSYFGKDNWEEFAP
GLKTVEDAIEMRRRIFTAFEEA-----EKE-----
-----KDPKRRAWLTFVVVGGGP-----
TGVELAGAI AELAYK---TLKEDFRNIDT-TETQVILLEGLDRILPPFAP
E---LSQEA EISLQKL-GVLVQTKTLVTNIENDIVTLKQ-----
-----
-----GE-EVKEIA-----
-----SKTVLWAAGVKASAMKVLAEKT-G-----VECD--RA-----
-----GRVIVESDLSI-----
-----KG-----HSN-IFVVGDLANF SHQ-----
-NG-----
-----
---KPL--PGVAPVAKQEGEYVAALVQK-----
-----
-----RL---QGQTL
P-----AFNYTDKGS-
---LAMIGQNAAVV-----
-----DLGFIKL-----KGFFAWLFWLVIHI-----
-----YFLIEFDNKLVMIQVWVWNYITRN-----
-----RGARLIT-----GQ-----EIHLAVNTV
NNS---GHYQPLEKRLPVNV-----
-----

```

>Syne\_SLR0851

M-----  
-----  
-----NSP--TS  
PRRPH-VVIVGGGFAGLYTAKNLRSP---V----DITLIDKRNHFLF  
QPLLYQV--ATGSLSPADIASPLRGVLKGQ-----KNIRVLMDKV  
ID-----IDP-----DKQKV--V-----  
----LEDHAP-----IAYDWLVVATGVSHHYFGNDHWAALAP  
GLKTIEDALTIRQRIFAAFEAA-----EKE-----  
-----SNPERQQAWLTFVIVGAGP-----  
TGVELAGAI AEIAHS--SLKDNFHRIDT-RQAKILLIEGVDRVLPYKP  
Q--LSARAQRDLEDL-GVTVLTERMVTDINPEQVTVHN-----  
-----NG-QTETIV-----  
-----TKTVLWGAGVRASSLGKIIIGDRT-G-----AELD--RA-----  
-----GRVVVNPDLVS-----  
-----AS-----FDN-IFVLGDLANYSHQ-----  
-GD-----  
-----  
---QPL--PGVAPVAMQEAAYLSKLIPA-----  
-----  
-----RLAE--KEQIM  
V-----PFRYIDYGS-  
---LAVIGQNKAVV-----  
-----DLGFAQF-----TGLVAMMIWVWAHV-----  
-----YYLIEFDNKLIVMLQWGWNYFTRG-----  
-----RGARLIT-----DT-----PNPQSTSTV  
QKE-----LVRP-----  
-----  
-----

>B.M

M-----  
-----  
-----VTPENISG---ISKAAIFQ--MD  
AANSPHIVVVGAGFGGLQLIRDLGAK---V----RITLIDQRNHHLF  
QPLLYQV--ATTILSTSEIAWPIRNLFRDR-----AEVTLLGTV  
ID-----VDT-----ARKSV--F-----  
----LENGDE-----VSYDMLVLATGARHAYFGNDQWEKLAP  
GLKALEDATTIRRRLLLAFERA-----ERE-----  
-----PDMARRQALLTFSIVGGP-----  
TGVELAGIIAELARR--TLWPEFRNIDT-RQARVLLLEVGPRIILSAFPE  
D--LSAYARRALEKL-GVEVRLGIPVKDITQEGVTVGD-----  
-----EFIP-----  
----CHTTVWAAGVAASPAALWL----D-----AESD--RA-----  
-----GRVKVLSNLSV-----  
-----PG-----HED-IFAIGDTAWVEGD-----  
-DG-----  
-----  
---RPV--PGIAPAQKQQGAYVAKVIRS-----  
-----RV---ENKTP  
PL-----PFRYKHQGN-  
---LATIGKGAVV-----  
-----DMGRIRL-----KGTIAWWFWGIAHI-----  
-----FFLIGTRSRAAVAWSWLWTYITGQ-----  
-----HSARLIT-----QG-----KPSD-----  
EFR-----  
-----  
-----

>S.M

M-----  
-----  
-----  
-QERHHVVVVGGFGGLQLVNDLKGAP---V----KVTLIDRRNHHLF  
QPLLYQV--ATTVLATSEIAWPIRRLYRDR-----QEVTTLLGEV  
AG-----VDM-----IAKEV--T-----  
----LAHGQS-----IPYDTLVLATGATHAYFGHDEWAAVAP  
GLKTLEDATTIRRRVLIAFEQA-----EVE-----  
-----EDTARRDALLTFTIIGAGP-----  
TGVELAGIIAEMAHR--TLPGEFRRIDT-RLARVVLVEAGPRILPAFSE  
E--LSAYASRELEKL-GVEVLTGTPVTDCTDEGVTIGE-----  
-----  
-----SFVP-----  
-----SRTLVAAGVQASPAARWV---G-----ADAD--RA-----  
-----GRVKVGPLTA-----  
-----PH-----HPD-IFVIGDTASVIQE-----  
-DG-----  
-----  
---KPV--PGIAPAQKQQGAYVAQVIRG-----  
-----  
-----RL----TGSPA  
PG-----PFRYRHQGS-----  
---LATIGKRAAII-----  
-----DFGRIKL-----RGSRAWIWIWGIAHI-----  
-----YFLIGTRSRFAVAWSWLWTYLSGQ-----  
-----HSARLIT-----QK-----DTLR-----  
EER-----  
-----  
-----

>M.L

M-----  
-----  
-----NE-----M  
NQASHHVVVVGGAGFGGLELTHALAGQP---V----RITMIDKRNHHLF  
QPLLYQV--ATTALATSEVAWPIRHLLRKR-----KDVTTLLANV  
TG-----VDR-----AGKRV--L-----  
----LDDGSA-----VAYDTLVLATGARHAYFGHDEWEPFAP  
GLKTLEDATTIRRRILLAFEQA-----ERE-----  
-----TDPAKREALLTIAIVGGP-----  
TGVELAGTIVELAHD--TLRGEFRNIDT-RQTRVVLIEAGDRILANFAP  
K--LSDYASKALERL-GVTVELGRAVTRCDAEGVVFQD-----  
-----  
-----KQLA-----  
----ARTILWAAGVAASPAEAWL---G-----AKAD--RA-----  
-----GRVLVEPDLGV-----  
-----PG-----SPE-IFVIGDAALVLRP-----  
-DG-----  
-----  
---RPV--PGVAPSAKQEGRHVAATIKA-----  
-----  
-----RL----GGDNT  
AR-----PFHYKHAGD-----  
---LATIGKRAAAI-----  
-----DFGWIKL-----TGWLAWWLWGIAHI-----  
-----YFLIGFRNRLAVSLSWLWIYVTGQ-----  
-----RSARLIT-----QG-----D-DD-----  
KT-----  
-----  
-----

>B.J\_1

M-----  
-----  
-----KQ---RSSKSRGR--IM  
TTTTPHRVVIVGAGFGGLEATYRLAGTP---V-----DITLIDRRNHHLF  
QPLLYQV--ATASLATSEIAWPVRHLMRDR-----REVTTLFATV  
SG-----VDA-----TRRCV---L-----  
----IDDGSE-----VPYDTLVLATGARHAYFGHDEWEQFAP  
GLKTLEDATTLRRHILVAFERA-----ERE-----  
-----TDPAKRAARLTFVIVGAGP-----  
TGVELAGTIAEMAHH--TLPEDFRNIDT-TKARVVLIEAGPRVLAGFAD  
E--LSAYAQASLEKI-GVEVVLGQPVTEIDRDGVVYGG-----  
-----  
-----TRLD-----  
----AKTKIWAAGVRASPAAEWL---G-----VPAD---RA-----  
-----GRVQVEADLTI-----  
-----PG-----HPE-IFAIGDTVITISAW-----  
-EG-----  
-----  
--KPV--PGIAPAQKQGRHVAETVKA-----  
-----  
-----RL---RGE-T  
KG-----AFRYKHSGS-----  
---LAQIGKRLAVI-----  
-----DFGRIKL-----RGTIAWWIWGIAHI-----  
-----YFLIGLRHRLSVALSWLWIYARDQ-----  
-----RAARLIT-----QG-----S-SK-----  
VVG-----  
-----

>X.A

M-----  
-----  
-----TS--LP  
SQAPLHLVVVGGGFAGLWATRALDDPG---I-----RITLVDRQNHHHLF  
QPLLYQV--ATAGLSAPDIAAPLRHILREQ-----RNVEVLLGDV  
TD-----IAP-----SRREV---V-----  
----LADGGT-----LGYDMLLLATGATHAYFGNDQWAEHAP  
GLKTLYDALVLRKLLLAFAERA-----EAE-----  
-----SDPAARAAWLSFAVVGGGP-----  
TGVELAGTLAEIARH--TLKNEFRHIDP-RQARVRLVEAGPRVLPSPPE  
D--LTAKARKQLERL-GVEVHTGTPVTQIDALGYQLGD-----  
-----  
-----TFVP-----  
----ARTVVWAAGVAASPLARTL---G-----VPLD---RA-----  
-----GRVLVEADLSV-----  
-----PG-----HPE-IFVGGDLASV-QQ-----  
-DG-----  
-----  
--RPV--PGVAPAQKQMGKHIKAIRA-----  
-----  
-----RQ---RGQTA  
P-----AFRYQDYGN-----  
---LATIGRMAAIV-----  
-----HVGKCLKL-----SGVVAWWFWLAAHV-----  
-----YFLIGFRNRFVVLVNWAMAYWSYQ-----  
-----RAARIIF-----GG-----ATDDPPPPSS  
KDG-----  
-----

>C.T

M-----  
-----  
-----  
---KKKVIVGGGFTGLNTARILSNRKD---V----EVTLIDRKNYHLF  
QPLLYQV--AMAALGEGDIATPLRNMLAGY-----DNVTVFKGNV  
CN-----VDL-----EQKKV--K-----  
---TDFGD-----IEYDYLVLACGAQHXYFGKNDWEEHAP  
GLKNLAQASEIRRRVMEAYEAA-----ERT-----  
-----NDMKERKKQLTFVIVGGGP-----  
TGVELAGSIGEMSRY--TLSKFYRHIDP-KLTRIFIVEAAERILGTFSP  
E--LSSKATRELEKL-GVQVWTSSMVSDVDADGVQIGR-----  
-----  
-----ERIE-----  
----AATVLWAAGVKASEIGQNM----G----VQTD--RS----  
-----GRIMVEADLSL-----  
-----PG-----HPE-VFVGGDQACYTLE-----  
-NG-----  
-----  
---STL--PGMAPVAMQEGKAIGRMILD-----  
-----  
-----DL----KGKPR  
K-----PFKYRDKGQ-  
---MATIGRNRAIV-----  
-----EIGNLKF-----DGAIWFTWLLVHI-----  
-----YYLSTFKHRVFLMQAWASYFTFG-----  
-----YGARLIV-----NKDWRFYREQKSSPCDD  
KKA-----  
-----  
-----

>C.G

M-----  
-----  
-----  
-----SVNPT--RP  
EGGRHHVVVIGSGFGLFAAKNLAKAD---V----DVTLIDRTNHHLF  
QPLLYQV--ATGILSSGEIAPSTRQILGSQ-----ENVNVIKGEV  
TD-----INV-----ESQTVTASL-----  
---GEFTRV-----FEYDSL VVGAGAGQSYFGNDHFAEFAP  
GMKSIDDALEIRARIIGAFERA-----EIC-----  
-----EDPAERERLLTFVVGAGP-----  
TGVELAGQLAEMHR--TLAGEYKNFNT-NSAKIILLD GAPQVLP PFGK  
R--LGRNAQRTLEKM-GVNVRLNAMVTNVDATSVTYKT-----  
-----  
-----KDGEHTIE-----  
----SFCKIWSAGVAASPLGKLVAEQT-G----VETD--RA----  
-----GRVMVNDL SV-----  
-----GD-----QKN-VFVVGDMNY-----  
-----  
---NNL--PGVAQVAIQSGEYVAEQIEA-----  
-----  
-----EVEG--RSNTE  
RE-----AFDYFDKGS-  
---MATISRFSAVV-----  
-----KMGKVEV-----TGFIGVWLWLVAVHI-----  
-----MFLVGFRNRVSAISWGLNALSRK-----  
-----RWNLATT-----RQQLHSRTTTL SKFAHEL  
EEASSDLPIELRDNQRFSGK-----  
-----  
-----

>M.S

M-----  
-----  
-----S-HPG--AT  
ASDRHKVVIIGSGFGGLTAAKTLKRAD---V-----DVKLIARTTHHLF  
QPLLYQV--ATGIISEGEIAPATRVILRKQ-----KNAQVLLGDV  
TH-----IDL-----ENKTVDSVL-----  
----LGHTYS-----TPYDSLIIAAGAGQSYFGNDHFAEFAP  
GMKSIDDALELRGRILGAFEQA-----ERS-----  
-----SDPVRRAKLLTFTVVGAGP-----  
TGVEMAGQIAELADQ--TLRGSFRHIDP-TEARVILLDAAPAVLPPMGE  
K--LGKKARARLEKM-GVEVQLGAMVTDVDRNGITVKD-----  
-----  
-----SDGTIRRIE-----  
-----SACKVWSAGVSASPLGKDLAEQS-G-----VELD--RA-----  
-----GRVKVQPDLLT-----  
-----PG-----HPN-VFVVGDMAAV-----  
-----  
---EGV--PGVAQGAIQGGRYAAKIIKR-----  
-----  
-----EVSG--TSPKI  
RT-----PFEYFDKGS-  
---MATVSRFSAVA-----  
-----KVGPFVEF-----AGFFAWLCWLVLHL-----  
-----VYLVGFKTKIVTLLSWGVTFLSTK-----  
-----RQQLTIT-----EQQAYARTRI---EEL  
EEIAA---AVQDTEK-AAS-----  
-----  
-----

>L.I

M-----  
-----  
-----G  
EFNQKKVVVIGAGFGGLQAVKQLSQNNN--L-----DITVIDKKNHHLF  
QPLLYQV--ATAVLSPADIAIPTRSLVGES-----KNVTVVLGEA  
TK-----IDL-----KTKTV--Y-----  
----YQNTS-----TNYDYLLILSAGARSSYFGNDHWEKYTI  
GLKNLKDALKIRHKLLISFEKA-----ELS-----  
-----GDPEVVKSLNLYVIIGGGP-----  
TGVELAGSIAELSHQ--IIRDEFHTIDP-ALSKITLIEASPRLLMTFDP  
S--LGEFTKKRLERR-GVEVLTGTRVIDINERGVQLEG-----  
-----  
-----KMIP-----  
-----TQTVIWAAGVQANSIAATL-----G-----VTLD--RG-----  
-----GRVIVDEFNCNI-----  
-----EG-----HSE-VFVIGDIASYSKG-----  
-LE-----  
-----  
---RPL--PGVSPVAMQQGRYVASLIQN-----  
-----  
-----DL---KNKKR  
K-----PFHYIDKGS-  
---MATIGRTDAVA-----  
-----QVGILKM-----KGLFGWLAWLFFVHL-----  
-----FYQVGFKNKITILITVWWSYIAFR-----  
-----AEARVIQ-----DE-----ISA  
DNG-----  
-----  
-----

>G.M

M-----  
-----  
-----  
-----KRVV I I G M G F G G I R A A R V L A G K G-----L-----D V V L V D R N N Y H L F  
Q P L L Y Q V--G T A G L E Q E S I A Y P V R A M A R E W-----R G T R F H L A E V  
A G-----V D F-----P A R E V--V-----  
-----T G N G R-----I P Y D Y L I I G A G S V T N Y F G L E S V E R H A F  
D L K E L V D G E R L R N H I L T A F E R A-----V V E-----  
-----P D P A K R R A L M T F V I V G G G P-----  
T G V E F A G A L M E L V R Y--V L A K D Y P E L S V-Q A A R V V L V E A F D R L L A A M P Q  
E--L Q V Y T L E K L R A M-G V E V L F N A R V V D A E P E R V I L H D-----  
-----  
-----G--A I I P-----  
-----A H T L F W S A G V K A A P L A A T L-----G-----V T P K--P G-----  
-----G R I P V E P D L T L-----  
-----A G-----H P E-V Y V I G D M A H L-E Q-----  
-D G-----  
-----  
--A A L--P M V A P V A M Q M G T Y A G E A I V A-----  
-----  
-----R E--K G E T P  
K-----P F R Y R D R G S--  
--M A T I G R S A A V A-----  
-----C A F G M K F-----R G F S A W L V W L L L H L-----  
-----Y Y L I G F R N R I V V M L N W I W Y Y W F H E-----  
-----R Q V R L I T-----E R-----  
-----V E E-----  
-----

>N.S\_BAB74663

M-----  
-----  
-----M-----  
--R N R R V V I V G A G F G G L Q A A Q S L A H-S G--A----D V L L I D R H N Y H T F  
V P L L Y Q V--A T G Q I E P E Y I A Y P I R T I L R R F S F N Y R R Q H H K P Q V Q F L M A E V  
E Q-----I D F-----S G Q I V-----  
--K T A K G A-----I D Y D F L V L A T G S R T Q F W G V N G A E E Y A F  
P M R S L E E A V A L R N H I F S C F E Q A-----I Q E-----  
-----S D A A K R Q Q L L T F T I V G G G A-----  
T G V E M A G A L V E M L R G--C L R R D C P T I D F-G E V K I I L V Q S G D R L L V E F P K  
K--L G N Y T Y K K L H Q L-G V E V Y L Q T R V S Q L T E G F V H L D N-----  
-----  
-----A--E I I P-----  
-----C A S V I W T A G L E A N L P G V S E-----E-----L P V A--H K-----  
-----G K I V V H P T L Q V-----  
-----L E-----H P N-V Y A I G D L A Y V-E K-----  
-N G-----  
-----  
--K S L--S G V A P E A L Q Q G V A V A R N I Q Q-----  
-----  
-----Q I--R G K S P  
K-----P F S Y F N K G R--  
--L A I I G C Y S G V G-----  
-----K I G A F A F-----T G F L A W L M W L G V H L-----  
-----V Y L P G Y R S R L L V L L T W L H T Y L G S D-----  
-----R H V R V I L-----S S K T M S V L H R P A D L P Y L  
Q E S-----R-----  
-----

>C.A

M-----  
-----  
-----ISLERRQI-----VSSPHIISNQPA  
QSRPRVIVGAGFGGLAAVRTLAQ-AP--V-----DVLINRTNYHGF  
WPLLYQV--ATAGLEPESIAYPVRAILRRY-----RNVNFLLAEV  
HS-----VDF-----TRQLV-----  
-----HTNTGS-----VQYDYLILAAGSTTNFFGNERIARHTL  
GMKDLNEAQRLRNHVLLCCERA-----AAE-----  
-----SDPKRMALLTFAVVGGGP-----  
TGVELAGAFVELIRH--VIRHDYPLMDV-RQARVVLIEATDRILASFPD  
S--LQQAALHRLQRM-GVEVRLNTPVADADTNGLRFRD-----  
-----  
-----G-----SSLA-----  
-----AKTVVWAAGVRGAPLADAL-----G-----VTLG--RG-----  
-----ARVVVTPQLTL-----  
-----PD-----DDR-VFVIGDMAYL-EG-----  
-YR-----  
-----  
---PGVAYPMVAPVAIQMGEQAARNILA-----  
-----  
-----QI-----DGRPM  
Q-----PFQYHDKGQ-----  
---MATIGRSAAVL-----  
-----DAFGVRL-----SGWLAWVWGLFVHL-----  
-----MALVGFRNRALVLLNWAYSIFYD-----  
-----RGVRLIF-----GIGAEHEHEEALLDVGKR  
QDY-----R-----  
-----  
-----

>D.D

M-----  
-----  
-----TG-----ST  
GNSRTRVVVAGGGFAGVWAVRRLARDKN--L-----DIILVDRNNYHTF  
LPLLYQV--AAAELEPGQIAYPLRAIFRKY-----PNVHFVIGDV  
RS-----IDM-----KNKVL-----  
---HTDGPH-----IPFDKLVVAMGSFTAFYGVPGADKXCF  
RLKNLEQAITLRNHIVSCFEQA-----THE-----  
-----RNPDRKDRILTYTVVGGGP-----  
TGVEYAGALAEIRQ--PLTKDFPTLNT-GQARVVLLEAGDGLLAGFPD  
H--LRRYAFERLTHM-GVDVRLNAKVTAVTPDSVELEG-----  
-----  
-----S-----SPLR-----  
-----TETVVWTAGVQGHALAGQM-----G-----LPTG--RG-----  
-----GRVPVLPPTLQV-----  
-----EG-----HPD-VFVAGDMALP-QG-----  
-DS-----  
-----  
---PA--PLIAPNAIQGALAADNIRA-----  
-----  
-----AL-----AGRPL  
R-----AFRYRDKGS-----  
---MATIGRAAAV-----  
-----VRMGKEHTATGFVAWVMWLFVHL-----  
-----LYLVGFRNRFLVFTWAWDYIFFE-----  
-----RAARIII-----PRGPIEDDDA-----  
-----P-----  
-----  
-----



>B.T

M-----  
-----  
-----SLNIA  
KDSKRVVIVGGGFGGLKLANLKKSG---F---QVVLIDKNNYHQF  
PPLIYQV--ASAGMEPTSISFPFRKIFQHR-----KDFYFRMAEV  
RA-----VFP-----EKNMI-----  
----QTSIGK-----AEYDYLVLAAAGTTTNNFFGNKHIEEEAM  
PMKNVSEAMGLRNALLANLERA-----VTC-----  
-----SNKQEQQELLNIVVVGGA-----  
TGVEVAGVLSEMKKF--VLPNDYDPMPS-SLMHIYLI EAGSRLLAGMSE  
D---SSSHAEQFLREM-GVNILLNKRVTDYRDHKVTLED-----  
-----  
-----G---SEIA-----  
----TRTFIWVSGVTGVSFGNMN-----T-----SVIG---RG-----  
-----GRIKVDAFNRV-----  
-----EG-----TNN-VFAIGDLCILSGD-----  
-ED-----  
-----  
---YPNGHPQLAQVAIQOGELLAKNLIR-----  
-----  
-----LE---KGKEM  
K-----PFHYRNLGS-  
---MATVGRNRAVA-----  
-----EFSKVKM-----QGWFAWVMWLVVHL-----  
-----RSILGVRNKVVVLLNWWVNYFTYD-----  
-----QSMRMIVYARKAKEIRDREAIEATTHWGKD  
LMQEPQPAKQEPQPNNSKEIV-----  
-----  
-----

>C.H

M-----  
-----  
-----IM---  
-ENKKNVVVIGGGFAGVQFIKKLDQKL---F---NVTLLDKINHHQF  
QPLFYQV--ATSQLEPSSISFPFRKIFQEN-----ENVQIRLAEV  
TG-----INP-----QANTV-----  
----HTSIGD-----FNYDYVVAAGCKTNFFGNKVIEENSY  
TLKSTSDSIALRNHVLI NFEKI-----IS-----  
-----APKEEQEALFNIVIVGGGP-----  
TGVELAGAF AEIKRN--ILPKDYPGIDF-TKLRIMLIEGSKNTLNSMSE  
L---AHKASRMYLEKM-GVEIQTELFVKNYDGTKIAELSN-----  
-----  
-----G---ERIP-----  
----TASLIWAAGVTTNTFDGLE-----D-----SVYG---PA-----  
-----KRIKVDRTSLV-----  
-----SG-----YAN-VYAVGDIAYMETP-----  
-K-----  
-----  
---YPKGHPQLANVAIQAKNLSNLKA-----  
-----  
-----IQ---KNKTL  
T-----EFEYKDLGS-  
---MATIGKNKAVV-----  
-----DLPFIKF-----KGFFAWLTWFMVHL-----  
-----MLILSVKNKLIIFINWAWAYITKD-----  
-----TSLRLIL-----  
-----TQKGPKAEG-----  
-----  
-----

>E.C\_1

```
M-----  
-----  
-----TT-----  
--PLKKIVIVGGGAGGLEMATQLGHKLG---RKKKAKITLVDRNHSHLW  
KPLLHEV--ATGSLDEGVDALSYLHARN-----HGFQFQLGSV  
ID-----IDR-----EAKTITIAE-----  
----LRDEKGELLVPERK-----IAYDTLVMALGSTSNDFNTPGVKENCI  
FLDNPHQARRFHQEMLNLFKYS-----  
-----NLG--ANGKVNIAIVGGGA-----  
TGVELSAELHNAVQ--LHSYGYKGLTNEA-LNVTLVEAGERILPALPP  
R---ISAAAHNELTKL-GVRVLTQTMVTSADDEGGLHTKD-----  
-----  
-----GEYIE-----  
----ADLMVWAAGIKAPDFLKDIG---G-----LETN---RI-----  
-----NQLVVEPTLQT-----  
-----TR-----DPD-IYAIGDCASCPR-----  
PEG-----  
-----  
---GFV--PPRAQAAHQMATCAMNNILA-----  
-----  
-----QM---NGKPL  
K-----NYQYKDHGS-----  
---LVSLSNFSTVG-----  
-----SLMGNLTRGSMMI-----EGRIARFVYISLYR-----  
-----MHQIALHGYFKTGLMMLVGSINRV-----  
-----IRPRLKLH-----  
-----  
-----
```

>B.J\_2

```
M-----  
-----  
-----SEA-----Q  
AGKP-RVVIVGGGAGGLELATRLGDKYG---RKGRLDVTLIERNRTHVW  
KPKLHEI--AAGSMDIAAHEVDYLAQSYW-----HGFYRIRIGEM  
IG-----IDR-----ERRQVLVAP-----  
----YLDAEGREVTPKRS-----FDYDVLVIAVGSQNNDFGTPGVAEHAI  
KLESQADAKRFHERMVNACIRAHA-----  
-----QSSPLGEHQKVAIIIGAGA-----  
TGVELAAELHRTTRE--VVAHGLDQVDPQKDIRITLIEAADRVLPALPE  
R---VSKETEKLLVRL-GVNVLVGAKVSVVGS DHVSLTD-----  
-----  
-----GRTIP-----  
----AELIVWAAGVKAPDSLKEIA---G-----LETN---RI-----  
-----NQLVVRPTLQA-----  
-----TR-----DDN-IFAIGDCSACSW-----  
GDR-----  
-----  
---GNV--PPRAQAAHQASHLYSQIPR-----  
-----  
-----HL---RGEAL  
K-----DYRYRDFGS-----  
---LVSLGEFSTVG-----  
-----SMMGALVGGSLVF-----EGLFARMMYLSLYK-----  
-----MHEHALHGSVKVALDTLARLITRR-----  
-----TEPHVKLH-----  
-----  
-----
```

>R.P

```

M-----
-----
-----SD-----
--KPHRIVIVGGGAGGLELATALGNKYG---KSDAVRVTLVDRSRTHIW
KPLLHAI--AAGSLRRSQHELNylaQAHW-----HGFHYRLGEM
NG-----LDR-----ARKVIKLAP-----
---VIDDEGREINPESE---LAYDTLVIAIGSVTNDFGTPGARDHAV
PLETPEQASRFNKRmVNAclRAQH-----
-----QHAPIEPGQLHVAIIGAGA-----
TGTELAELHHTARE--IIAYGLDKIDPEHDLKIVLIEAAPRILPALPP
R---ISDATLKLlLDL-GVEVRTGARVAEVLDAHVRlAD-----
-----
-----GEVIP-----
-----SELVVAAGVRAPDFLEGID---G-----LDTN---RI-----
-----NQLVVRPTLQT-----
-----TR-----DDN-VFGMGDCAACAIP-----
GYE-----
-----
---NGV--PPRAQAAHQEAefmLEQIEK-----
-----
-----RL---KGEPL
G-----EFRYRDLGS-----
---LVSLGKYSavg-----
-----NLMGSLVGKSFLI-----EGYFARFMYRSLYK-----
-----MHEAALYGRGRTLLSVLSG--STR-----
-----PTPTVKLH-----
-----
-----
-----

```

>B.V\_2

```

M-----
-----
-----H-----
----RIIVGGGAGGLELATRLGDRYGASGNRPARALVTLVDRNPThIW
KPLLHEV--AAGSMDPFTQELEYAAQARW-----HGFEFQQGEL
TA-----LDR-----TAKRIALAP-----
---VNDSGAELLpARN---LEYDTLVVAIGSTTHFFGVQGAENAI
ALDTVGEAERFRKRLIAACmRAEH-Q---APAEP-----
-----APGAAEPRIQVVIVGGGA-----
TGVELSAELRNtAQV--LSVYGLHKLDPRHdVGIvLIEsGPRILPALQE
R---VSSATAELLEKL-GVRLlLAERVTEVAPGFVHTAS-----
-----
-----GKAVR-----
-----ADLTVWAAGIKAPAVLGQLD---G-----LQVN---KL-----
-----GQLDVRRTLQT-----
-----VI-----DDN-VFALGDCAACAwp-----
GHE-----
-----
---RNV--PPRAQAAHQASfLLKAIGC-----
-----
-----RL---DGRPL
P-----EFTYRDFGS-----
---LVSLGHFSavg-----
-----NLMGGLIGGNMLI-----EGLFARFMYMSLYR-----
-----LHVAALHGYPmVLDtVAHWLRRT-----
-----TLPRVKLH-----
-----
-----
-----

```

>A.V

```

M-----
-----
-----TH-----
----RIVIVGGGAGGVELATRLGKTMG----RNFQAKITLVDANMTHLW
KPLLHEV--AAGSLNSTGDELNYVAQAKW-----NNFEFYGRM
CG-----LDR-----ANKRIRLAA-----
----QPAQEDRAPLPERE----LEYDTLVLSVGSTTNDFGTPGAAENCI
FLEGRDQAERFRRPLLSHYLRAH-----
-----ASNDD-GHQVKVAIVGAGA-----
TGVELAAELRHASKE--LVAYGLERIPP-ENLSITLIESSPRVLAALPE
R---ISRSAHATLESL-GVRVLVSTAVSEVTAEGVKTGD-----
-----
-----DQFIP-----
----ADLMVWAAGVRAPAFKELD----G-----LETN--RI-----
-----NQLQVRQTLQT-----
-----TL-----DDD-IFAFGDCASCPQP-----
GTD-----
-----
---RPV--PPRAQAAHQASLLAKSLHR-----
-----
-----KL----QEDSL
CW-----SIATANHGS-----
---LISLSSFSAIG-----
-----NLMGNLT-GNVTL-----EGWLARKFYISLYR-----
-----MHQMALYGTFRITLMMMLGDRFRSS-----
-----TEPRLKLH-----
-----
-----

```

>P.F

```

M-----
-----
-----TH-----
----RIVIVGGGAGGLELATRLGKTLG----KRG TASVMLVDANLTHIW
KPLLHEV--AAGSLNSSEDELNYVAQAKW-----NHFEFYQLGRM
SG-----LDR-----ERKRIQLAA-----
----TYDETGVELLPARE----LGYDTLVIAVGSTTNDFGTEGAAQHCL
FLDTRKQAERFHQQLLHHLRAH-----
-----AGQTDIVERISVAIVGAGA-----
TGVELAAELHNAAHE--LHAYGLDRIKP-ENMHITLIEAGPRVLPALPE
R---IGGPVHKTLEKL-GVNVMTNAAVSQVTADSLITAD-----
-----
-----GKVID-----
----ASLKVWAAGIRAPDFLKDID----G-----LETN--RI-----
-----NQLHVLPTLQT-----
-----TR-----DEN-IFAFGDCAACPQP-----
GSE-----
-----
---RNV--PPRAQAAHQASLLAKSLKL-----
-----
-----RI----EGKAL
P-----EYKYTDYGS-----
---LISLSRFSAVG-----
-----NLMGNLT-GSVML-----EGWLARMFYVSLYR-----
-----MHQMALYGMFRTAMLMLGSKIGRG-----
-----TEPRLKLH-----
-----
-----

```

>H.I

M-----  
-----  
-----KN-----  
-----VVIVGGGAGGIELATFLGNKLG-----RQKQAKVTLVDRNATHLW  
KPLLHEI--ATGVMDGDVDSLSYRAHGKN-----HFFSFQSGSI  
IR-----INR-----EQKYVELAP-----  
----VYQEGDMLVIARR-----IPYDYLVIAGSKSNDNFNTKGVADNCI  
FLDSSKQALRFQHKLLELFLKFSE-NRALDDIGEEEF-----  
-----KQKLVDENKVNIAIVGGGA-----  
TGVELTAELYHAAED--LSSYGYGKIDS-SCLQVTLVEAGTRLLPALPE  
N--LSAAVLDELKEM-GTNVQLNTMITEAQPNTLITKD-----  
-----  
-----GGEIK-----  
----ADLIVWAAGVRASTVTQQFD----G-----LEIN--RI----  
-----NQLVVKDTLQT-----  
-----TV-----DDS-IFAIGDCAALIQ-----  
SNG-----  
-----  
--KLV--PPRAQAAHQMAKACAKNIFA-----  
-----  
-----LF----ENKPL  
K-----SFKYNDKGT-----  
--LVSLSNFTALG-----  
-----SLTNKFGKNPLTV-----QGKFAQFAYVSLYR-----  
-----MHQHALHGCIKIGLIIILVDKLNRY-----  
-----LKPRLKLNH-----  
-----  
-----

>Z.M

M-----  
-----  
-----SK-----  
NGRPDRIVVGGGAGGLQLVRALGERFG-----KEADVILVDRSPTHVW  
KPLFHEV--ATGALDADLDEVSYRYHGKH-----WGYHYVRGTL  
ED-----IDR-----KNHEIILEP-----  
----LVDEEGHKISDQER-----LRYDYLVLALGVSANDFNTPGVRENCL  
FLDSRAQADRFREHLFDACASASR-TM-----  
-----IAQPGMEKPVVTVIGAGA-----  
TGVELSAELYNTAIE--LGNFGLKFKGA-NCMQVTLVEAAPRILAPLPE  
F--MAEDAHTVLQRL-GVDIKTNTMVVEAGEGFIKTKD-----  
-----  
-----GQTIE-----  
----SDIQLWAAGVKAPDFLSKVE----G-----LEVA--RS----  
-----NQIIVKPTLQS-----  
-----TT-----DDR-IFAMGDCCSCKLP-----  
EAE-----  
-----  
--RPV--PPRAQAAHQMADTVFENIVR-----  
-----  
-----LR----KGEPL  
K-----  
-----  
-----DFLIAIMARCFLI-----AGL-----  
-----  
-----PLLAI-----  
-----  
-----

>B.V\_1

M-----  
-----  
-----NHNHTHTVATDR  
APPTPRIVIVGGGAGGLQLATRLGDTVG----RRGQAEVVLVDRYPHFW  
KPLLHEA--ASGHRDPATHTIEYVAQAKR-----HGFRFVQGAL  
QA-----LDR-----ATRVTITAA-----  
----VHDADGTEILPQRE----LGYDDLVLAVGSVTNFFNVPGAARHAL  
PLENLDQAEDFRRKFLAACTRANH-AAE-----  
-----QHPARRAAPVCISVIGAGA-----  
TGVELAAALRHAVQQ--LTTYRFKALVSTRDVHIRLIEGGARILPALDE  
R--LSARMHAQLRTL-SVDVLTDTRVAQVDADAVTTAT-----  
-----  
-----GERLA-----  
----SDITIWAAGVAGPAILRELG---G-----IALN---RS----  
-----NQVIVTDTLQT-----  
-----PD-----DAH-VYAFGDCAACPSA-----  
DAL-----  
-----  
---SVL--PPRAQVAHQAVYLGDAFAR-----  
-----  
-----RL----AGKRV  
A-----RFAFRDAGT-----  
---VVSLGHTGAVY-----  
-----QADFGARPRSVIV-----DGLAAIGLYKFLYR-----  
-----KHLFSVYGLKRALFQSLGHWLQRR-----  
-----NQPSIKLH-----  
-----  
-----

>C.R\_NDA2

M-----  
-----NMLLQOQKLAAGCKQRSVAQPSRGCV  
AAHTGLRSRGRVSRQRSVTTAVMTPPAKSESSP----VYTTMSLDGQNL  
KTAKPRLVVLGSGWGAMSFLKALPTSIS-----STYELIVVSPRNYFLY  
TPLLPAV--ATGTMEERSIVEPVRNFIV-----GKGEFYEALC  
KD-----IDP-----VAKELVCCF-----  
----PEDAGLDSACFK-----MSYDVLVMAVGSVNNTFGIKGVDQYCF  
YFKSIEDANRLRSRVSECFERAAL-PA-----  
-----TPEEERKLLTFVVVGGGP-----  
TGVEVAAELYDMIEE--DLSKLYPNLV--KDVSIQVVELMDHVLSTYDR  
A--ISLYTAEQFKRA-GIKLVLNSRVASVEDGVVRVFN-----  
-----  
-----KANESVDIK-----  
----FGACVWATGIAMNPLVRQL----Q-----EKLPGQSHF-----  
-----RSVLTDDCMRV-----  
-----KGS-----DGS-IWALGDAATIDQPKALD  
YAEQLFEQADTNRDGRLSLEELRVLLNTASKEFSHLEEHRFLDSQTGVK  
RFGGLVAKSLSPADAAAAAASNSSQPFAVLLDGNTEISKEQFKDILGKVD  
KGLRAL--PATAQVANQQGKYLAADFAGN-----  
-----  
-----RV----TGAPF  
LDAALADKIK-----PFRYFHKGS-----  
---AAYVGS DKAVF-----  
-----DLPKFGPLTGTGAGFVWKS YET-----  
-----MSQFSFRNQCLVAADWLRTKIFGR-----  
-----DISRV-----  
-----  
-----

>A.T\_NDB1

M-----TLLSSL--  
-GRASRSAPLA-----SKLL  
LLGTLG-GGSIVA-----YADANE----EANK-----KE  
EHKKKKVVVLGTGWAGISFLKDL DITSY-----DVQVVSPQNYFAF  
TPLLPSV--TCGTVEARSIVESVRNITKKKNG-----E-IELWEADC  
FK-----IDH-----VNQKVHCRPVF-----  
----KDDPE-----ASQEFSLGYDYLIVAVGAQVNTFGTTPGVLENCH  
FLKEVEDAQRIRRGVIDCFEKAIL-PG-----  
-----LTEEQRRLKLFVIVGGGP-----  
TGVEFAAELHDFIIE--DITKIYPSVK--ELVKITLIQSGDHILNTFDE  
R---ISSFAEQKFTRD-GIDVQTGMRVMSVTDK DITVKV-----  
-----  
-----KS---SGELVSIP-----  
-----HGLILWSTGVGTRPVISDFMEQV-----GQG---GR-----  
-----RAVATNEWLQV-----  
-----TG-----CEN-VYAVGDCASIAQRKILG  
DIANIFKAADADNSGTLTMEELGVDIIVRYPQVELYLKSKHMRHIND  
LLADSE---GNARKEVDIEAFKLALSEADSQM-----  
---KTL--PATAQVAAQQGAYLAKCFNR-----  
-----  
-----MEQC--KELPE  
GPKRFRTGGHHQFRP-----FQYKHFQ--  
---FAPLGGDQAAA-----  
-----ELP-----GDWVS-----AGKSAQWLWYSVYA-----  
-----SKQVSWRTRALVVDWTRRYIFGR-----  
-----DSSRI-----  
-----  
-----

>S.T\_NDB1

M-----RGFTYL--  
-SKVLHSHSSY-----SKLL  
VLCSVS-TGGLLV-----YAESNV----ESGKQVVEQNQP  
ESKKRVRVVLGTGWGGTSFLKDV DISSY-----DVQVVSPRNYFAF  
TPLLPSV--TCGTVEARSIVEPVRNI IKKRSRSG-----E-IQFWEAEC  
LK-----IDP-----VNRTVSCRSGI-----  
----NDNLA-----GHNDFSLQYDYL VVAVGAQVNTFNTPGVMEHCH  
FLKEVEDAQRIRRTVIDCFEKSVI-PG-----  
-----LSEEERTNLHFVIVGGGP-----  
TGVEFAAELHDYVYE--DLVKIYPSVK--DFVKITVIQSGDHILNTFDE  
R---ISSFAEQKFQRD-GIEVSTGCRVTSVSDHF INMKV-----  
-----  
-----KS---TGKHVEVP-----  
-----YGMVVWSTGVGTRPFVKDFMEQV-----GQE---KR-----  
-----RILATDEWLRV-----  
-----KG-----CSN-VYALGDCASVDQHKVME  
DISTIFEAADKDDSGTSLVVEFRDVL EDIIRYPQVDLYLKNKHLLEAKD  
LFRDSE---GNEREEVDIEGFKLALSHVDSQM-----  
---KSL--PATAQVAAQQGTYLARCLNR-----  
-----  
-----WDQC--KSNPE  
GPRRFKSSGRHEFLP-----FEYRHLGQ--  
---FAPLGGDQAAA-----  
-----ELP-----GDWVS-----MGHSTQWLWYSVYA-----  
-----SKQVSWRTRYLVVGDWVRRYIFGR-----  
-----DSSRI-----  
-----  
-----

>A.T\_NDB2

M-----RNFSVFER  
FSKAFKDHPSL-----TRIL  
VVSTIS-GGGLIA-----YSEANA----SYGANGGAVVET  
GTKKKKVVLLGTGWAGTSFLKLNLSQY-----EVQIISPRNYFAF  
TPLLPSV--TCGTVEARSVVEPIRNIARKQNV-----E-MSFLEAEC  
FK-----IDP-----GSKKVYCRSKQ-----  
----GLSSN-----GKKEFSVDYDYLVIATGAQSNFNPVGVEENCH  
FLKEVEDAQRIRKTVIDSFEKASL-PG-----  
-----LSDEERKRILHFVVVGGGP-----  
TGVEFAAELHDFVTE--DLVKLYPKAK--NLVQITLLEAADHILTMFDK  
R---ITEFAEEKFTRD-GIDVKLGSMVVKVNDKEISAKT-----  
-----  
-----KG----GEVSSIP-----  
-----YGMIVWSTGIGTRPVIKDFMKQI-----GQG---NR-----  
-----RALATDEWLRV-----  
-----EG-----CDN-IYALGDCATINQRKVM  
DIAAIFKKADKENSGLTLMKEFHEVMSDIDRYPQVELYLKSKGMHGITD  
LLKQAQAENGSNKSVELDIEELKSALCQVDSQV-----  
--KLL--PATGQVAAQGGTYLAKCFDR-----  
-----  
-----MEVC--EKNPE  
GPIRIRGEGRHRFRP-----FRYRHLGQ-  
---FAPLGGEQTAA-----  
-----QLP-----GDWVS-----IGHSSQWLWYSVYA-----  
-----SKQVSWRTRVLVSDWMMRRFIFGR-----  
-----DSSRI-----  
-----  
-----

>A.T\_NDB3

M-----AVLDLMFC  
SNYYFLFH-----  
-----S-GGLIV-----YSEANP----SYSNNG---VET  
KTRKRKVVLLGTGWAGASFLKTLNNSY-----EVQVISPRNYFAF  
TPLLPSV--TCGTVEARSVVEPIRNIARKQNV-----E-MSFLEAEC  
FK-----IDP-----GSKKVYCRSKQ-----  
----GVNSK-----GKKEFDVDYDYLVIATGAQSNFNPVGVEENCH  
FLKEVEDAQRIRSTVIDSFEKASL-PG-----  
-----LNEQERKRLHFVVVGGGP-----  
TGVEFASELHDFVNE--DLVKLYPKAK--NLVQITLLEAADHILTMFDK  
R---ITEFAEEKFTRD-GIDVKLGSMVVKVNDKEISAKT-----  
-----  
-----KA----GEVSTIP-----  
-----YGMIVWSTGIGTRPVIKDFMKQI-----GQG---NR-----  
-----RALATDEWLRV-----  
-----EG-----CDN-IYALGDCATINQRKVM  
DIAAIFKKADKENSGLTLMKEFHEVMSDIDRYPQVELYLKSKGMHGITD  
LLKQAQAENGSNKSVELDIEELKSALCQVDSQV-----  
--KLL--PATGQVAAQGGTYLAKCFDR-----  
-----  
-----MEVC--EKNPE  
GPIRIRGEGRHRFRP-----FRYRHLGQ-  
---FAPLGGEQTAA-----  
-----QLP-----GDWVS-----IGHSSQWLWYSVYA-----  
-----SKQVSWRTRVLVSDWMMRRFIFGR-----  
-----DSSRI-----  
-----  
-----



>A.T\_NDB4

M-----SFHSFYQR  
ASSLTKAYPST-----SKIL  
LLSTFSGGGVVLV-----YSDSNPLKRILHADATLSDGN  
PIRKKKVVVLGSGWGSYFLSYLNNPNY-----DVQVVSPRNFLLF  
TPLLPSV--TNGTVEARSIVEPIRGLMRKKGf-----E---YKEAEC  
VK-----IDA-----SNKKIHCRSKE-----  
----GSSLK-----GTTEFDMDYDILILAVGAKPNTFNTPGVEEHAY  
FLKEAEDALNIRHSVIDCFERASL-PN-----  
-----LTEEERKKILHFVVVGGGP-----  
TGVEFSAELHDFLVQ--DVAKIYPKVQ--EFTKITLLEAGDHILNMFDK  
R---ITAFAEKQFQD-GIDLKTGSMVVGVTADEISTKE-----  
-----  
-----RE---TGKIVSEP-----  
-----YGMVVWSTGIGSRPVIKDFMQQI-----GQG---QR-----  
-----RVLATDEWLRV-----  
-----EG-----CDG-VYALGDTATINQRRVME  
DIAAIFNKADKGNTGTLLKKKDFNSVVKDQCORYPQVELYLKKNKLNKNIAN  
LLKSAN-----GEDTQVNIKFKQALSEVDSQM-----  
---KNL--PATAQVASQQGKYLAKCFNK-----  
-----  
-----MEKC--EKKPE  
GPLRFRGEGRHRFQP-----FRYRHFQS-  
---FAPLGGEQTAA-----  
-----ELP-----GDWVS-----IGHSSQWLWYSVYA-----  
-----SKLVSWRTRMLVISDWTRRFVFGF-----  
-----DSSSI-----  
-----  
-----

>N.C\_U08980

MASTRALGRSL-APSMGVAR---LQTQAVSRLSSAPRRALISESRQVA  
VTQQIRRAHTE---TTPLPEPPKERR-RFRKLRWLWR-----APLF  
VSLAGIAYVGGV-----YEERNP---GPQVEPDP-----  
--SKKTLVVLGTGWGSVLLKLDTEHY-----NVIVISPRNYFLF  
TPLLPSV--TTGLIEHRSIMEPIRTILRHKA-----N-VKFYEA  
SS-----VDP-----ERKVVRVLD-T-----  
----SEIRG-----DVVETEIPYDMLVVGVAENATFGIPGVREHTC  
FLKEIGDAQIRKIMDCVETAAF-KG-----  
-----QSQEEIDRLHMMVVVGGGP-----  
TGVEFAGELQDFEE--DIKLLIPDIA--DRFRVTLIEALPNVLPFSK  
Q---LIEYTESTFKEE-KIDIMTKTMVKRVTEKTVEAEI-----  
-----  
-----SKPDGTREKITLP-----  
-----YGLLVWATGNAVPRPVKDLMERI-P-----AQKD---SR-----  
-----RGLAVNEYLVV-----  
-----QG-----TRD-IWAVGDCAV-AG-----  
-----  
-----Y--APTAQVASQEGNFLAGLFNN-----  
-----  
-----MART--EVLEQ  
RVREL--SGSLNLPAGNAEISKEIEEHERQLRRIKDIKP-FHYSHQGS-  
---LAYIGSEKAVA-----  
-----DVS---WFN-GNLAS-----GGSLTFLFWRSAYL-----  
-----SMCFSTRNRLLVINDWVKSFLFGR-----  
-----DVSRE-----  
-----  
-----

>Y.L\_NDH2

MLRLRPVRAVSVARSVALTRSLHVSVAKFNKIEGTAP-AGLPKEVKQTA  
GHQ----GHHQ----EIPKPDENHPRRKKFHFWRSLWR-----LTYL  
SAIASLGYIGYRI-----YVIRNP----SDQLPADP----  
--SKKTLVVLGSGWGSVSFLKKLDTSNY-----NVIVVSPRNYFLF  
TPLLPS--PTGTIEHRSIMEPIRGIIRHKQA-----E-CQYLEADA  
TK-----IDH-----EKRIVTIRSAV-----  
----SENSK-----EEVIKEIPFDYLVVGVGAMSSTFGIPGVQENAC  
FLKEIPDAQQIRRTLMDCIEKAQF-E-----  
-----KDPEVRKRLHHTVVVGGGP-----  
TGVEFAAELQDFED--DLRKWIPDIR--DDFKVTLVEALPNVLPFSFSK  
K--LIDYTEKTFSE-KISILTKTMVKSVDENVIRAEQ-----  
-----TKGDGKETLEMP-----  
----YGTLVWATGNTVRPVVRELMSKI-P-----AQKG--SR----  
-----RGLLVNEYLVV-----  
-----EG-----TEG-IWALGDCSA-TK-----  
-----Y--APTAQVASQEGSYLANLLNG-----  
-----IAKT--EDLNN  
EITNLEKQSEHTFDEQERKNIFAQLESKSRKLRRSRAMLP-FEYSHQGS-  
--LAYIGSDRAVA-----  
-----DLSFNFWGI-MNWSS-----GGTMTYYFWRSAYV-----  
-----SMCFSMRNKILVCIDWMKVRVFGF-----  
-----DISRE-----  
-----  
-----

>S.C\_NDE1

M-----IRQSLMKTWANSRFSLSQSKSGLVK  
YAKNRSFHAARNLLEDKKVILQKVAPTTGVVAKQSFFKRTGKFTLKALLY  
SALAGTAYVSYSL-----YREANP----STQVPQSDTFPN  
GSKRKTLLVILGSGWGSVLLKNLDTTLY-----NVVVVSPRNYFLF  
TPLLPS--PVGTIELKSIVEPVRTIARRSHG-----E-VHYEAEA  
YD-----VDP-----ENKTIKVK-----  
----SSAKN-----NDYDLKDYDLVVGVAQPNTFGTPGVYESS  
FLKEISDAQEIRLKIMSSIEKAAS-LS-----  
-----PKDPERARLLSFVVVGGGP-----  
TGVEFAAELRDYVDQ--DLRKWMPELS--KEIKVTLVEALPNILNMFDK  
Y--LVDYAQDLFKEE-KIDLRLKTMVKKVDATTITAK-----  
-----TGDDIENIP-----  
----YGVLVWATGNAPREVSKNLMTKL-E-----EQDS--R----  
-----RGLLIDNKLQL-----  
-----LG-----AKGSIFAIGDCTFHFG-----  
-----L--FPTAQVAHQEGEYLAQYFCK-----  
-----AYKI--DQLNW  
KMTA-----KDDSEVARLKNQIVKTQSQIED-----FKYNHKGGA-  
--LAYIGSDKAIA-----  
-----DLA--VGE-AKYRL-----AGSFTFLFWKSAYL-----  
-----AMCLSFNRVVLVAMDWAKVYFLGR-----  
-----DSSI-----  
-----  
-----

>S.C\_NDI2

M-----LPRLG FARTARS IHRFKMTQIS----  
---KPFHSTE---VGKPGPQQKLSKSYTAVFKKWFVR-----GLKLT FY  
TTLAGTLYVSYEL-----YKESNP----PKQVPQSTAFAN  
GLKKKELVILGTGWGAI SLLKKLDTSLY-----NVTVVSPRSFFLF  
TPLL PST--PVGTIEMKSIVEPVR SIARRTPG-----E-VHYIEAEA  
LD-----VDP-----KAKKVMVQ-----  
----SVSED-----EYFVSSLSYDYL VVSVGAKTTTFNIPGVYGNAN  
FLKEIEDAQNIRMKLMKTIEQASS-FP-----  
-----VNDPERKRL LTFVVVGGGP-----  
TGVEFAAELQDYINQ--DLRKWMPDLS--KEMKVILIEALPNILNMF DK  
T--LIKYAEDLFARD-EIDLQVNTAVKVV EPTYIRT L-----  
-----QNGQTNTDIE-----  
----YGMLVWATGNEPIDFSKTLMSRI-P-----EQTN---R----  
-----RGLLINDKLEL-----  
-----LG-----SENSIYAIGDCTAHTG-----  
-----  
----F--FPTAQVAHQEGEYLAKILDK-----  
-----  
-----KLQI--EQLEW  
DMLNS-----TDETEVSRLQKEVNLRKSKL DK-----FNYKHMGA-  
---LAYIGSETAIA-----  
-----DLH--MGD-SSYQL-----KGMFAFLFWKSAYL-----  
-----AMCL SIRNRILIAMDWTKVYFLGR-----  
-----DSSV-----  
-----  
-----

>C.A

M-----FTRSLIKGGRLATTRSLVMN STSLV  
LKNQFKKYSTS---TPPKVAKSKSSTIGKIFRYTFYT-----AVI  
SVIGSAGLIGYKI-----YEESQP---VDQVKQTP LF PN  
GEKKKTLVILGSGWGAISLLKNLDTTLY-----NVVIVSPRNYFLF  
TPLLPSV--PTGTVELRSII EPVRSVTRRCPG-----Q-VIYLEAEA  
TN-----INP-----KTNELTLKQSTTVVSGHS  
GKDTSSSKSTVAEYTGVEEITTTLN YDYL VVGVAQPSTFGIPGVAENST  
FLKEVSDASAIRKLM DVIEAANI-LP-----  
-----KDDPERKRLLSIVVCGGGP-----  
TGVEAAGEIQDYIDQ--DLKKWVPEVA--DELKVSLVEALPNV LNTFNK  
K--LIDYTKEVFKDT-NINLMTNTMIKKVNDKSLIANH-----  
-----KNPDGSTE SIEIP-----  
----YGLLIWATGNAPRDFTRDLIAKV-D-----EQKN---AR----  
-----RGLLVDERLKV-----  
-----DG-----TDN-IFALGDCTF-TK-----  
-----  
----Y--PPTAQVAFQEGEYLANYFDK-----  
-----LHAV--ESLKY  
TIANP-----TPKDNVEKLSRKLARLEKNLPH-----FIYNYQGS-  
---LAYIGSEKAVA-----  
-----DLV--WGDWSNISS-----GGNLTF LFWRSAYI-----  
-----YMCLSVKNQVLVVL DWAKVYFFGR-----  
-----DCSKE-----  
-----  
-----

>S.C\_NDI1

M-----LSKNLYSN-----KRLLTSTNTLVR  
FASTRSTGVEN-----  
---SGAGPTSFKT-----MKVIDP---QHS-----  
--DKPNVLILGSGWGAISFLKHIDTKKY-----NVSIIISPRSYFLF  
TPLLPSA--PVGTVDEKSIIEPIVNFALKKKG-----N-VTYEAEA  
TS-----INP-----DRNTVTIKSLSAV-----  
----SOLYQPENHLGLHQAEPAEIKYDYLISAVGAEPNTFGIPGVTDYGH  
FLKEIPNSLEIRRTFAANLEKANL-LP-----  
-----KGDPERRRLLSIVVVGGP-----  
TGVEAAGELQDYVHQ--DLRKFLPALA--EEVQIHLVEALPIVLNMF EK  
K--LSSYAQSHLENT-SIKVHLRTAVAKVEEKQLLAKT-----  
-----  
-----KHEDGKITEETIP-----  
-----YGTLIWATGNKARPVITDLFKKI-P-----EQNS---SK-----  
-----RGLAVNDFLQV-----  
-----KG-----SNN-IFAIGDNAF-AG-----  
-----  
-----L--PPTAQVAHQEAAYLAKNFDK-----  
-----  
-----MAQI--PNFQK  
NLSSRKDKIDLLFEENNFK-----P-FKYNDLGA-  
---LAYLGSERAIA-----  
-----TIR--SGKRTFYTG-----GGLMTFYLRILYL-----  
-----SMILSARSRLKVFFDWIKLAFFKR-----  
-----DFFKGL-----  
-----  
-----

>S.P\_NDH2.1

ML-----FSRSILRG---MPKAGIPKSPLALS  
ASRNRLANSVRFASDAASSPKSTTSKWKILKRTTLGL-----  
-FATAVVLYGANV-----YRFRHP---DPHQPLPDP---  
--SKKTLVVLGAGWGATSILRTIDTSLF-----NVIVVSPRNYFLF  
TSLLPST--ATGSVHTRSIVQPIRYMLRHKSC-----Y-VKFYEAEC  
TD-----VDA-----DKKVIHIKK-----  
----TTTTDG-----VDLEQEIKYDYLVC SHGAETQTFNIPGIAEYGC  
FLKEIWDAQKIRARILHCLEQAQF-KD-----  
-----LPAETRRRYVHTVVVVG GP-----  
TGMEFAGEMADFIED--DLKSWYPELA--DDFAVTLVEALPSVLP M FSA  
K--LRDYTQSLFDSS-HIKIRTNTALKKVTAENIHVEV-----  
-----  
-----KNPDGSKQEEVIP-----  
-----YGLLVWAGGNRARP LTKKLEGS-E-----EQNN---R-----  
-----RGLVDEY LKL-----  
-----KG-----YKD-IFALGDCTH-TA-----  
-----  
-----Y--APTAQVASQQGAYLGQLFNK-----  
-----  
-----LGSL---NFEK  
PSEDRHIALGDEMDSS TLI SLANEKHASTKV F-----LP-FKYSHQGS-  
---LAYVGHEKAIA-----  
-----DIEVPWFGK--QLHA-----SGALAFYFWR SVYL-----  
-----SELYSLRNRTNVTLDWIRVKLFGR-----  
-----DISSL-----  
-----  
-----

>S.P\_NDH2.2

MS-----VSKARLQS-----VVR  
LSRTVPYSKTMVRSFHVSCAVKNSGNVPTPRNKSFFSRALEMAEVTSSLS  
MLGAVALFQSLRR-----LNNSSP----KGK-----S  
GVPKKNIVVLGSGWGAVAAIKNLDPSLY-----NITLVSPRDHFLF  
TPMLPSC--TVGTLRLPSITEPIVALFKGKID-----P-SNIHQAE  
TA-----IDT-----SAKKVTIRG-----  
----TTEAN-----EGKEAVIPYDTLVFAIGAGNQTFGIQGVRDHGC  
FLKEAGDAKKVFNRIFEILEQVRFNKD-----  
-----LSPEERARLLHITVVGGGP-----  
TGMEFAAEMQDFIDN--DVKDMFPELQ--KDIHVTLIEAAPGVLPMTK  
S---LITYTENLTKNL-NIKIMTKTVVKDVNEKNLIVQK-----  
-----  
-----TNPDGSKAMQEIP-----  
-----YGMLVWAAGITARPLRTRTLMSSI-P-----EQSG---AR-----  
-----KGLIVDEFFRV-----  
-----KG-----VPE-MYAVGDCAF-SG-----  
-----  
-----L--PATAQVANQQGAWLAKNLNV-----  
-----  
-----EGKK--FALHE  
RIQALEKQLGEKEAPSQVAGLKQQVEQLKLE-----P-FKYHHQGA-  
---LAYVGDEKAIA-----  
-----DLKLPFMKK--MLPL-----QGIVGHTFWRLAYL-----  
-----NELISARSQFMVLIDWLKTRLFGR-----  
-----YDAKV-----  
-----  
-----

>D.D

MISRAFSK-----VNKNQLIKTVSTNRIVACKNNQTQFI  
QRFSTSTDNSNNEQNQQQQQQKEQEPKKKMNKFAFWG-----  
-GLAVAGLGGFWIIDMVVNDDFSVDKFRTRLP----ESERK-----  
--KRPKVILGTGWGSLCFLRKLHTDLF-----DVTIISPRNYFLF  
TPLLVG--TTGTVEVRSIMEPIRKYCKRADA-----EDATFYEAEC  
LS-----VDP-----VSKKVKCYDN-----  
----SAVKG-----EVSEFELEYDHLIVGVGADNQTFGIPGVKENAC  
FLKEINDTRNIRDKIIDCLETASY-PG-----  
-----QPEKEIDRLNLFVVVGGGP-----  
SGVEFTAELNDFLQS--DLLKTYP-LA--KRINVTLVEALPHILTIFDK  
K---IIDHVEKRLQSSNNTKIWTKTAVVGVREKEITVKN-----  
-----  
-----TT---TKEESIHP-----  
-----YGLLVWATGNTPRKITTQIMQSIGP-----NIQN---NR-----  
-----RGLVDDYFRV-----  
-----AG-----TDG-IWSIGDASINPS-----  
-----  
---KPL--AQTAQVASQQGRYLGRLFNQ-----  
-----  
-----LAEEMNNDLIK  
KRENPDAAHKEEKEKQEKLNLFNSITGSNKSFEAVKEKPLFKYKHMGT-  
---LAYVGDHQAVA-----  
-----EFK--GDHSTTVS-----EGYITYYLWRSVYF-----  
-----TKLLSVNRALVSFDWLKSSVFG-----  
-----DISRG-----  
-----  
-----

>N.S\_BAB76910

M-----  
-----  
-----  
QQASHPTVILGGGFAGLFTALHLSQQNY-----SYPIILIEQRDRFSF  
KPLLYEL--LSGELHSQQVYPRYQELLAG-----SKVKFVQDTV  
QS-----IDI-----HQQRVD-----  
-----TVSGQA-----FHYSNLILALGSKTTYFATPGAAEYAM  
PFTSGEQAIALRQHRLRHKLYQAIQT-----  
-----SDSERRLLLTVAIIIGAGP-----  
SGIELACTLADLLPIWYDELGGDG-----SEIHVVLVNRSREILKGDVN  
SHL-RCTVERAMKNRLIPVDLFLFDAAVTKITPDGVECRR-----  
-----  
-----HG--QIQMLQ-----  
-----AGTIAWTAGTAPHPLLMEL---PV-----SQ-----NR-----  
-----GRLLVKPTLQL-----  
-----SN-----FPE-IFAAGDCATDSD-----  
-----  
---HPQ--PPTAQVAYQQGIAIAQNLR-----  
-----  
-----IS---QNKPT  
I-----PVQVQLRGT-----  
---LMKLGLNEGVA-----  
-----NLFNKVQI-----KGQAGHLIREGTYL-----  
-----QLLPNSAHNLKVTTEWLTDELQFQR-HR-----  
--AVTPMQLGQTPWLSGVATTVAALIFATPLVWRVAQPAQFQQNLSWTGV  
PTLLNYLTPSR-----  
-----  
-----

>Syne\_SLR1484

M-----  
-----  
-----  
-----GFQFPGNWPFLACLYRGSASGHSETCSGVGWKTVAIN  
SSDSATTVIIGGGFVGLFTALHLRHHQH-----AGPIVLVEPQANFVF  
KPMLYEL--LTEELPESVVCPSYEKLLAD-----SGIDIVQARV  
AD-----VQL-----KEKRLV-----  
---LDSGQE-----QHYDYLVLAVGSVQGYLGAQGAENAF  
AFRSQTEAIALRDHLKACLEKSLTT-----  
-----ADQAEKERLLTVAIVGAGP-----  
AGVEMAATLADLLPSWYVPMGGNI-----NDLKIYLVNHAPGILAGDAN  
SGLKRCALEE-LQARTIPVTLKLGVGKSVTPESLQFVE-----  
-----  
-----TGEELRHLD-----  
-----TGTTIWTAGTAVNPLLKTLKEQIPA-----EELD---RH-----  
-----GQPLVTSTLQL-----  
-----PS-----FPQ-VFAAGDCVTVKD-----  
-----  
---NPK--PALAQIAYQQGAAIAKNLMA-----  
-----  
-----VH---NGKPL  
V-----SPDPQLRGT-----  
---LMKLGLNNGVA-----  
-----NLFDRVRI-----QGKAGDLLRNATYL-----  
-----ELLPTPLHNFKSTTQWLAEETIDRFHRPHAPTAQELK  
WAAMTPAQRQEHQGIKAI- I IAPLIFIVLLYLGFKTPERERAPFVPPQS  
PGM-----NR-----  
-----  
-----

>N.C\_NDE1

M-----LRTYRVARASGLATAPRTLTLTSTTATRHLFTLPKSLQLRRP  
EKLSLISQRQLSGRPLPRTQSRLLNFGYRTAAWFGSSIAFVGLSFVAFFL  
YDASTYSSHATNQGDITVPKLLNPRRGGPKNLPILFLDDDDSEEKKK  
HKEKPRLVILGGGWSVALLKELNPDDY-----HVTVVSPANYFLF  
TPMLPSA--TVGTLELNSLVEPIRNIIDR-----VKGHYIRAAA  
ED-----VDF-----SSRLVEVSQ-----  
-----KDPRGNEVRFYVVPYDKLVI AVGSTTNPBGVKGL-ENCH  
FLKDINDARQIRNKIIQNLELSCLPT-----  
-----TSDEERKRLLSFVVCGGGP-----  
TGVEFAAELFDLLNE--DLTLHFPRLLR-NEISVHLIQSRDHILNTYDE  
A--VSKYAEDRF SRD-QVDVLVNSRVAEVRPESILFTQ-----  
-----  
-----RGPDKTTVTKECP-----  
-----MGFCLWSTGVSQAEFCKRISRQLGP-----AQTN---R-----  
-----HALETDTHLRL-----  
-----NGTP---LGD-VYAIGDCSTIQNN-----  
-----VADHIITFLRNLAWKHGKDPESELELHFSD  
WRDVAQQIKKRFPOATAHLKRLDKLFEEYDKDQNGTLDGELRELLKQID  
SKLTSL--PATAQRAHQGGQYLAHKFNK-----  
-----  
-----LA---RAAPG  
LSANEIHEGDLDAAVYK-----AFEYRHLGS-  
---LAYIGNSAVFD-----  
-----WGDGWNFS-----GGLWAVYAWRSIYF-----  
-----TQCVSLRTRVLM AIDWGKRALFGR-----  
-----DLMRY-----  
-----  
-----

>N.C\_NDI1

M-----  
-----  
-PPLRRDINASRLKSQDGFHYTLREDLFLFPPGVHPVSTTGLDGEKFFHH  
KDRKERVVILGSGWAGYSFAKDLDPKEY-----ERIFISPRSYFVF  
TPLLAST--AVGTLEFRTVLEPIRRLD-----YGIGFHQGWA  
QD-----IDF-----ANKTIRVEANANADSASK  
AVVPIGQGGQLNQASARGAL-FDVPYDKLVIACGAYSQTFGIEGVREHAN  
FLRDVGDARRIRLRLVLSL FELCAYPKGVDN-----  
-----LTDEDANLLHFAIVGGGP-----  
TGIEYASELHDLIHD--DL SKMYPDLL--KFVRITVYDVSPKVLPMFDQ  
A--LSKYAMDAFKRQ-KIEIRTQHNI ERVRPADGKLG S-----  
-----  
-----EYGELKLIKQYGDKEVG-----  
-----AGLVVWSTGLMANPLIKQLASKDFA-----VPISPEDRAEARRP  
KAKLATDARTGGILVDEHFRVRIETQTTDAAKGSEIV-----  
-----PTSSNSLLRD-VFVLGDAAVIESQ-----  
-----  
--RTL--PKTAQVAAQQATYLAKVLNK-----  
-----  
-----ANEGVIDVKDA  
P-----GFKFRNWGV-----  
--MTYLGSKAIH-----  
-----QGPRDEL-----RGWAAVWLWRSAYL-----  
-----AKSMSWRNRFLVPIYWLVSWFGR-----  
-----GISRF-----  
-----  
-----

>P.F

```

-----
-----
-----MLVKFRKCGQANIFRSISNVRKIYNVAKNNLKNNKD
IERKEKIIILGSGWGGFNLLNIDFKKY-----DVTLISPRNYFTF
TPLLPC--CSGTLNVNCTESIRNFLRKKNG-----YCGNYLQLEC
TD-----VFY-----EDKYINCID-----
-----IENNKVK-----LFYDYLIIVAVGAKTNTFNINGVDKYAY
FVKDIDDALKIRKKFLDILEKC-----TLPN-----
-----ISNEEKKMLHVAVVGGGP-----
TGVEVTAEFADFINK--EVKINYKDIF--NFISISIEGGNNLLPTFTQ
N--ISDFTKENFHN-LNINVLTNYYVIDVDKHSFHISQ-----
-----
-----SLNKNEK-KKLS-----
-----YGLLIWASGLAQTTLIQKFLKTIPV-----QANN-----
-----AILKVDEKLRV-----
-----IGI-----PSNNIYAIGDCKKIOPKLLHE
HTNEI IKILTGNKLTSEALKLKQSELTKTFPQLSISKWDYEKNKKGEMTP
QQFHDYLFIDKNY-----
--KSP--TPTAQNAKQEAYYLSNVFNN-----
-----
-----FI---HTNQK
--FNIP-----SFIEKWKGS-
--LAYIGNHQVVA-----
-----DLPYYELKGGFRSSTFWKVVYI-----
-----QLLLSWKSRLFHFFIDFIKTKWYGR-----
-----
-----PFIK

```

>P.Y

```

Y-----
-----
---ITNTLFLYRQTMILSVKNSKIKGIYRSVSNFCNLNKIKNVNYINKK-
---REKVVILGSGWGGIHFLLNIDFQKY-----DVTLISPRNYFTF
TPLLPC--CSGTLNVNCTESIRNFLRKKNG-----YCGNYLQLEC
TD-----IVY-----KDKYIKCKD-----
---NVNNNEIK-----INYDYLVISVGAKTNSFNKIGVDKYAF
YIKDIIDALKIRTKFISNLEACIKGKAGAVTNTITNDSSSSISDSSSSI
GDSSSSIGDSSSSISDDLAKKMLHIVVVGGGP-----
TGVEVAAELADFVNK--DIKNKYKEIY--KYISISIEGGNNLLPTFTQ
N--ISKFTEKIFKNKLNINVYTNHYHVEIDENNFYIKS-----
-----
-----SINKNEEHKKIP-----
-----YGIIIWASGLAQTPLINNFIKKIPE-----QENN-----
-----KNLKVNOYLQI-----
-----IGI-----KPNNIYAIGDCKQISPINSHE
HVNEI INCLGNSKITSDVLKQSKELSNIFFPQLSDTKWDYNKKNKSEMSI
KELQEYLFMIDKNY-----
--KSP--PPTAQNAKQEAFFYLSNIFNN-----
-----
-----YL---YNSNS
NGNTIP-----PFIEKWKGS-
--LAYVGNHQVVA-----
-----HLPFYIEIKGGPFSFTFWKIVYM-----
-----QMLLTWKSRIINFIFSFLRRTKIYGR-----
-----
-----PFI-

```



>E.C\_LpdA

M-----  
-----  
-----TAGDKYIEVMMS  
TEIKTQVVVLGAGPAGYSAAFRCADLGL-----ETVIVERYNTLGG  
VCLNVGCIPSKALLHVAKVIEEAKALAEHGIVFGPKTDIDKIRTWKEKV  
INQLTGGLAGMA-----KGRKVKVNVGL-----  
----GKFTGANTLEVEGENGKTVINFDNAIIAAGSRP--IQLPFIPHEDP  
RIWDSTDALELK-----  
-----EVPERLLVMGGGI-----  
IGLEMGTVYHALGSQ-----IDVVEMFDQVIPAADK  
D---IVKVFTKRISKKFNLMLETKVTAVEAKEDGIYVTM-----  
-----  
-----EGKKAPAEPQR-----  
----YDAVLVAIGRV--PNGKNLDAGKAG-----VEVD---DR-----  
-----GFIRVDKQLRT-----  
-----NVPHIFAIGDIVGQ-----  
-----  
-----PMLAHKGVHEGHVAAEVIAG-----  
-----  
-----KKHYF  
DPKVIPSIAYTEPEVAWVGLTEKEAKEKEKGISYETA----TFPWAASGRA  
IASDCADGMTKLIF-----D  
KESHRVIGGAIIVGTNGGELLGEIGL--AIEMGDAEDIALTIHA-----  
-----HPTLHESVGLAAEVFECSITDL-----  
-----PNPKAKKK-----  
-----  
-----

>A.A

M-----  
-----  
-----TKVLVLGGRFGALTAAYTLKRLVG-----SKADVVKVINKSRFSYF  
RPALPHV--AIGVRDVDELKVDLSEALPE-----KGIQFQEGTV  
EK-----IDA-----KSSMYYTK-----  
-----PDGSMAEEDYDYVIVGIGAHLATELVKGWDKYG  
SVCEPEFATKLEKLESFQGN-----  
-----IAIGSGPFYQGHNPVKVPEFVFN  
ADSACEGPVFEMSLM---LHGYFKKGMMLDKVHVTVFSPG-EYLSDLSP  
N---SRKAVASIYNQL-GIKLVHNFKIKEIREHEIVDEK-----  
-----  
-----GNTIP-----  
----ADITILLPPYTGNPALKNSTPDLVD-----DG-----  
-----GFIPDLNMVS-----  
-----IK-----YDN-VYAVGDANSMTV-----  
-----  
-----PKLGYLAVMTGRIAAQHLAN-----  
-----  
-----RLGVPTKVDKY  
YPTIMCVA-----DNPYEGYAVS  
VKDDTWYGGTVSIA-----  
-----DPAAVNHLKK-----ELFTKYMWTKGDM-----  
-----ALEKFLASW-----  
-----  
-----