

Université
de Liège

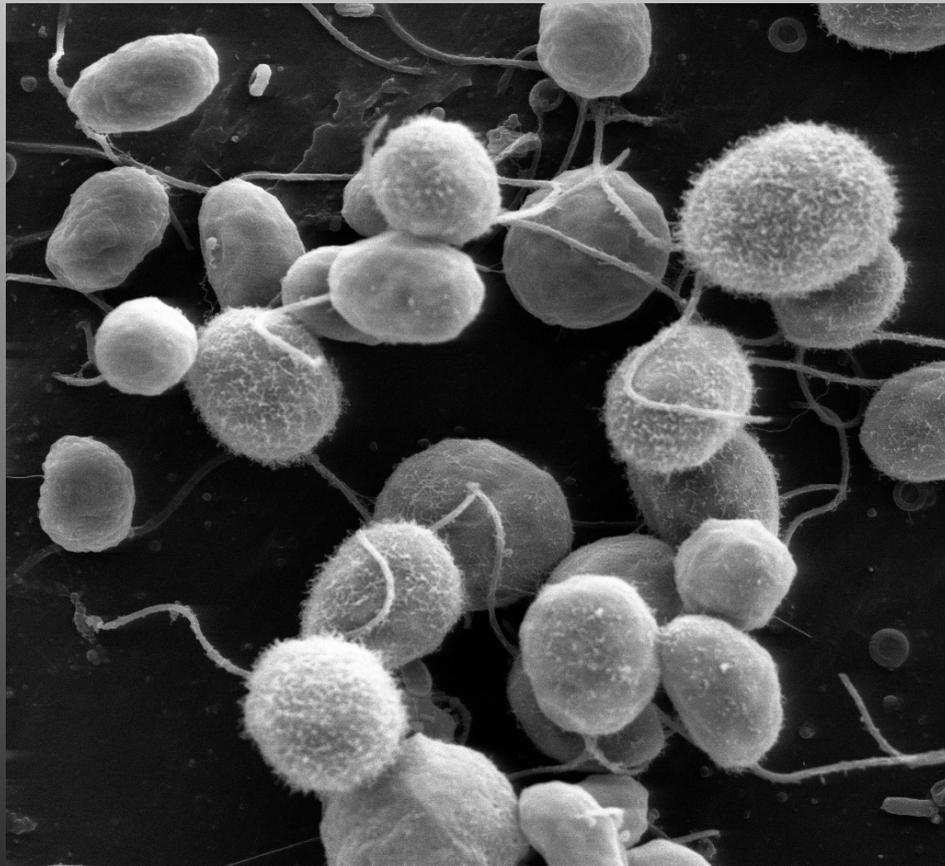


DÉPARTEMENT DES SCIENCES DE LA VIE
FACULTE DES SCIENCES

Laboratoire de biochimie végétale

**Caractérisation de la réponse photosynthétique de
Chlamydomonas reinhardtii à la carence en S :
effet de la source d'azote et influence de l'oxydase
alternative mitochondriale**

Prof. F.FRANCK



Juin 2010

Mémoire présenté par Thomas de Marchin en vue de l'obtention du grade
de master en Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire

Remerciements

Ce mémoire n'aurait pas été possible sans le soutien de la petite "Tribu" du labo. Je tiens particulièrement à remercier...

Le Docteur Fabrice Franck, promoteur de ce mémoire, toujours disponible et souriant, très souriant... A tel point que son rire nous avertit de son arrivée au labo. Sa patience n'atteint pas de limite lorsqu'il s'agit d'essayer d'expliquer aux étudiants les mécanismes parfois farfelus qui mènent à telle ou telle observation. Je le remercie pour tout le temps qu'il m'a consacré durant cette année et pour la confiance qu'il a bien voulu accorder à ma curiosité. Encore désolé pour Lyx :-)

Le Docteur Bart Ghysels, encadrant de ce mémoire et cycliste averti. Véritable source d'idées, celui-ci qui n'a pas ménagé ses efforts pour que j'arrive à la fin de ce mémoire. Il ne recule devant aucun défi, y compris de corriger un mémoire dans la langue des Gaulois...

Le Docteur Pierre Tocquin pour m'avoir appris à utiliser R même si ça ne lui apportait pas grand chose.

Le Doctorant Emmanuel Mignolet pour sa gentillesse et pour l'animation du labo.

Les Docteurs Grégory Mathy, Thomas Gérard, et Pierre Cardol pour leurs conseils et leurs théories de dernière minute.

Je remercie toute ma famille pour ses encouragements, mes parents avec une attention particulière pour ma mère qui a corrigé mes fautes d'orthographe à une heure du matin, mes trois petites soeurs Sophie, Alice et Pauline ainsi que mes grands-parents.

Un merci particulier à mon Olnoise Floriane, ma copine depuis sept ans, qui se réjouit que j'aie fini mon mémoire pour me voir un peu plus souvent. Merci de m'avoir soutenu et merci de partager tous ces moments avec moi.

Et enfin, une pensée pour mon chien, Zwip, qui m'a bien épaulé durant ces derniers jours de travail intensif.

Thomas.

Résumé

Titre du mémoire : Caractérisation de la réponse photosynthétique de *Chlamydomonas reinhardtii* à la carence en S : effet de la source d'azote et influence de l'oxydase alternative mitochondriale.

Nom : de Marchin Thomas

Année : 2009-2010

Promoteur : F.Franck

Laboratoire de biochimie végétale

Chlamydomonas reinhardtii possède la capacité de produire de l'hydrogène à la lumière en absence d'oxygène. Cette condition peut être obtenue en cultivant les algues dans un milieu carencé en soufre. La carence en soufre entraîne une forte diminution de l'activité du photosystème II tout en maintenant une respiration élevée, ce qui provoque un passage de cultures fermées en anoxie et induit la production d'hydrogène. Dans des observations préliminaires, le laboratoire a mis en évidence des différences de vitesse de réponse à la carence en soufre entre la souche sauvage (contrôle) et une souche portant une construction RNA-i l'empêchant d'exprimer l'oxydase alternative mitochondriale (AOX). Cette enzyme, inductible par le nitrate, fait partie de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale et catalyse l'oxydation de l'ubiquinol en transférant directement ses électrons à l'oxygène. Ainsi l'AOX entre en compétition avec le complexe III et est impliquée dans une voie de dissipation du pouvoir réducteur en excès. Dans cette étude, nous avons caractérisé la réponse photosynthétique à la carence en soufre chez la souche sauvage et la souche déficiente en AOX dans des milieux contenant de l'ammonium ou du nitrate comme source d'azote. Nos observations ont montré que la carence en soufre affecte drastiquement les capacités photosynthétiques de la souche sauvage en ammonium. Nous avons relevé une chute de l'abondance de RbcL et de D1, du rendement photochimique du PSII et une dé-époxydation des xanthophylles ainsi que l'inactivation du cycle de Calvin. Cependant, nous avons observé que le déclin de plusieurs paramètres photosynthétiques en réponse à une carence en soufre est ralenti par la présence de nitrate et dans la souche déficiente en AOX. Nous avons pu constater que les différences d'importance et de vitesse du déclin de la photosynthèse entraînent aussi des différences dans la durée d'accumulation d'amidon au cours de la carence. Nous avons également montré que l'expression de l'AOX et la capacité de la voie alternative sont stimulées par la carence en soufre. Ces observations suggèrent un rôle important à la voie AOX dans la réponse de *C.reinhardtii* à la carence en soufre.

Table des matières

Introduction	5
1 Introduction	6
1.1 Chlamydomonas reinhardtii	6
1.2 La respiration	7
1.2.1 Description générale	7
1.2.2 La phosphorylation oxydative	7
1.2.2.1 La voie des cytochromes	7
1.2.2.2 La voie de l'oxydase alternative	8
1.3 La photosynthèse	10
1.3.1 Description générale	10
1.3.2 Réactions de la phase claire	10
1.3.3 Réactions de la phase sombre	12
1.3.4 Flexibilité de la photosynthèse vis à vis du contexte métabolique et environne- mental	12
1.3.4.1 Introduction	12
1.3.4.2 La chlororespiration	12
1.3.4.3 Les transitions d'état	13
1.3.4.4 Transfert cyclique d'électrons	14
1.3.4.5 Interactions entre mitochondries et chloroplaste	14
1.3.4.6 La photoproduction d'hydrogène	15
1.3.4.7 Réponses aux fortes intensités lumineuses	16
1.3.4.7.1 Le cycle des xanthophylles	16
1.3.4.7.2 La photoinhibition	16
1.3.5 La mesure de la fluorescence de la chlorophylle <i>a</i> pour déterminer les activités photosynthétiques	17
1.3.5.1 Introduction	17
1.3.6 Les courbes de montée rapide de fluorescence (OJIP)	19
1.4 L'assimilation de l'azote et du soufre	20
1.4.1 Acquisition et assimilation de l'azote	20
1.4.1.1 Introduction	20
1.4.1.2 Rôle d'AOX dans l'assimilation de l'azote	21
1.4.2 Acquisition et assimilation du soufre	22
1.4.2.1 Réponses à la carence en soufre	23
1.4.2.1.1 Introduction	23

1.4.2.1.2	Déclin des capacités photosynthétiques en réponse à la carence en soufre	23
1.5	But du travail	24
Matériel et méthodes		26
2	Matériel et méthodes	27
2.1	Souches	27
2.2	Milieux de culture	27
2.3	Conditions de culture	27
2.4	Dosage des chlorophylles	27
2.5	Mesure du paramètre ψ PSII	27
2.6	Spectroscopie de fluorescence à basse température	28
2.7	Mesure des échanges d'oxygène	28
2.8	Analyse de l'abondance en protéines	28
2.9	Analyse des pigments	29
2.10	Courbes de montée rapide de fluorescence	29
2.11	Dosage d'amidon	30
2.12	Mesure des capacités des deux voies de la respiration	30
Résultats		31
3	Résultats	32
3.1	Étude des capacités photosynthétiques	32
3.1.1	Analyse des variations du rendement de fluorescence causées par une transition obscurité-lumière	32
3.1.2	Évolution du rendement photochimique du PSII (ψ PSII)	34
3.1.3	Évolution du rendement photochimique maximum du PSII (F_v/F_m) au cours de la carence en S	34
3.1.4	Spectres à basse température	35
3.1.5	Photosynthèse et respiration	35
3.1.6	Abondance de protéines clés du cycle de Calvin, du PSI et du PSII	36
3.1.7	Analyse des pigments	37
3.1.8	Courbes de montée rapide de fluorescence lors d'un éclair saturant	38
3.1.8.1	Mise au point : détermination de la partie purement photochimique de la phase initiale (OJ) de la courbe de montée de fluorescence	38
3.1.8.2	Effet de la carence en soufre et de la source d'azote sur la montée initiale de la fluorescence chez le type contrôle et chez le mutant 530	40
3.2	Étude de la production d'amidon	41
3.3	Étude de l'implication de l'oxydase alternative mitochondriale	43
3.3.1	Mesure des capacités apparentes de la voie des cytochromes et de la voie alternative	43
3.3.2	Abondance de la protéine AOX	44

Table des matières

Discussion	45
4 Discussion	46
Bibliographie	50

Liste des Abréviations

AOX	Oxydase alternative mitochondriale
Chl	Chlorophylle
FADH ₂	Flavine adénine dinucléotide réduite
GTP	Guanosine Triphosphate
H ⁺	Proton
H ₂ O ₂	Peroxyde d'hydrogène
NADH	Nicotinamide adénine dinucléotide réduit
NADPH	Nicotinamide adénine dinucléotide phosphate réduit
NH ₄ ⁺	Ammonium
NO ₃ ⁻	Nitrate
OEC	Oxygen evolving complex
PC	Plastocyanine
PG	Propyl gallate
PQ	Plastoquinone
PQH ₂	Plastoquinol
PSI	Photosystème 1
PSII	Photosystème 2
PTOX	Oxydase platidiale
Q _A	Plastoquinone fixe du PSII
qNPQ	Quenching non-photochimique de la fluorescence
qP	Quenching photochimique de la fluorescence
ROS	Espèce réactive de l'oxygène
S	Soufre
SO ₄ ²⁻	Sulfate
UQ	Ubiquinone
UQH ₂	Ubiquinol

Introduction

1 Introduction

1.1 Chlamydomonas reinhardtii

Chlamydomonas reinhardtii est une algue unicellulaire eucaryote du genre *Chlamydomonas* et de l'ordre des Volvocales qui a été décrite en 1888 par Dangeard. Elle mesure entre 6 et 10 μ et est pourvue de deux flagelles. Elle possède un noyau, une paroi dépourvue de cellulose, des mitochondries et un chloroplaste unique doté d'un pyrénéoïde massif (voir figure 1 (Harris, 2008)). Cette algue est un organisme modèle étudié dans les laboratoires du monde entier pour différentes raisons telles que la disponibilité de la séquence de ses génomes nucléaire, chloroplastique, et mitochondrial. Il faut également noter que les scientifiques ont accumulé beaucoup de connaissances sur cette espèce en ce qui concerne sa morphologie, son métabolisme, sa génétique, etc. De plus, de nombreux outils moléculaires sont disponibles pour étudier cette algue. Il s'agit d'un organisme haploïde produisant des gamètes en milieu dépourvu d'azote (Abe *et al.*, 2004) capable de se développer en milieu inorganique en utilisant la photosynthèse pour produire de l'ATP et des équivalents réducteurs (conditions phototrophes), ou en milieu organique contenant de l'acétate (conditions hétérotrophes). Dans ce cas, la lumière n'est pas indispensable à son développement, ce qui facilite l'étude de mutants de la photosynthèse. Il a été démontré que la technique de RNA interférence est applicable à cet organisme (Fuhrmann *et al.* (2001); Schroda *et al.* (1999)), ce qui permet de produire des individus mutants beaucoup plus facilement qu'avec la technique de recombinaison homologue, dont le rendement est très faible (Schroda, 2005).

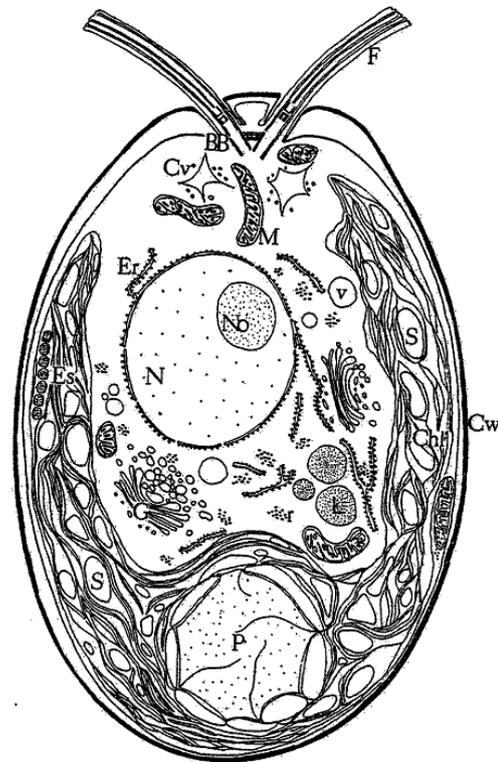


FIGURE 1: Représentation d'une cellule de *Chlamydomonas* en interphase. BB, corps basaux; Chl, chloroplaste; Cv, vacuole contractile; Cw, paroi; Er, reticulum endoplasmique; Es, eyespot; F, flagelle; G, appareil de Golgi; L, lipid body; Mi, mitochondrie; N, noyau; No, nucléole; P, pyrénéoïde; r, ribosomes; S, grains d'amidon; v, vacuole (Harris, 2001).

1.2 La respiration

1.2.1 Description générale

La respiration est le processus qui permet à la cellule d'oxyder des composés carbonés en produisant de l'ATP et des équivalents réducteurs qui sont nécessaires au métabolisme de la cellule. Chez les cellules eucaryotes, la majeure partie de ce processus se déroule dans les mitochondries. Celles-ci comportent deux membranes qui délimitent le compartiment intermembranaire et la matrice. La membrane interne s'invagine dans la matrice et forme des crêtes mitochondriales au sein de l'organite.

On peut décomposer la respiration en cinq étapes :

1. La glycolyse qui dégrade le glucose en pyruvate et permet la synthèse de d'ATP et de NADH. Cette étape a lieu dans le cytoplasme ainsi que dans le chloroplaste.
2. La transformation du pyruvate en acétyl-coA. Cette étape a lieu dans la mitochondrie tout comme les étapes ultérieures et produit du CO₂ et du NADH.
3. L'acétyl-coA rentre dans le cycle de Krebs ou cycle tricarboxylique, ce qui génère du CO₂, du FADH₂, du NADH et du GTP.
4. Le NADH est utilisé dans la chaîne de transport d'électrons mitochondriale, ce qui permet l'éjection de protons du stroma vers l'espace intermembranaire et l'établissement d'une différence de potentiel électrochimique transmembranaire (voir figure 2).
5. De l'ATP est synthétisé par l'ATP synthétase sous l'effet du flux de protons traversant la partie membranaire de cette enzyme grâce à la force proton-motrice. Ce processus produit également de l'eau (voir figure 2).

1.2.2 La phosphorylation oxydative

1.2.2.1 La voie des cytochromes

D'après (Nicholls et Ferguson, 2002).

La voie des cytochromes comporte quatre complexes (voir figure 2) :

1. La NADH : ubiquinone oxydoréductase (complexe I)
Deux électrons sont transportés du NADH vers l'ubiquinone UQ. Par NADH consommé, ce processus est accompagné de l'expulsion de 4 protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Composé de 42 sous-unités, le complexe I est le plus gros complexe protéique de la membrane mitochondriale.
2. La succinate ubiquinone oxydoréductase (complexe II)
Du succinate du cycle de Krebs peut être oxydé par ce complexe pour réduire les UQ. Dans ce cas, celui-ci est oxydé en fumarate et ce processus ne s'accompagne pas de la translocation de protons.
3. L'ubiquinol : cytochrome c oxydoréductase (complexe III)
Ce complexe oxyde une UQH₂ afin de réduire deux cytochromes c au cours d'une série de réactions d'oxydo-réductions portant le nom de cycle Q. Au cours de ce cycle, 4 protons sont libérés dans l'espace inter-membranaire par paire d'électrons transférés.
4. La cytochrome c oxydase (complexe IV)

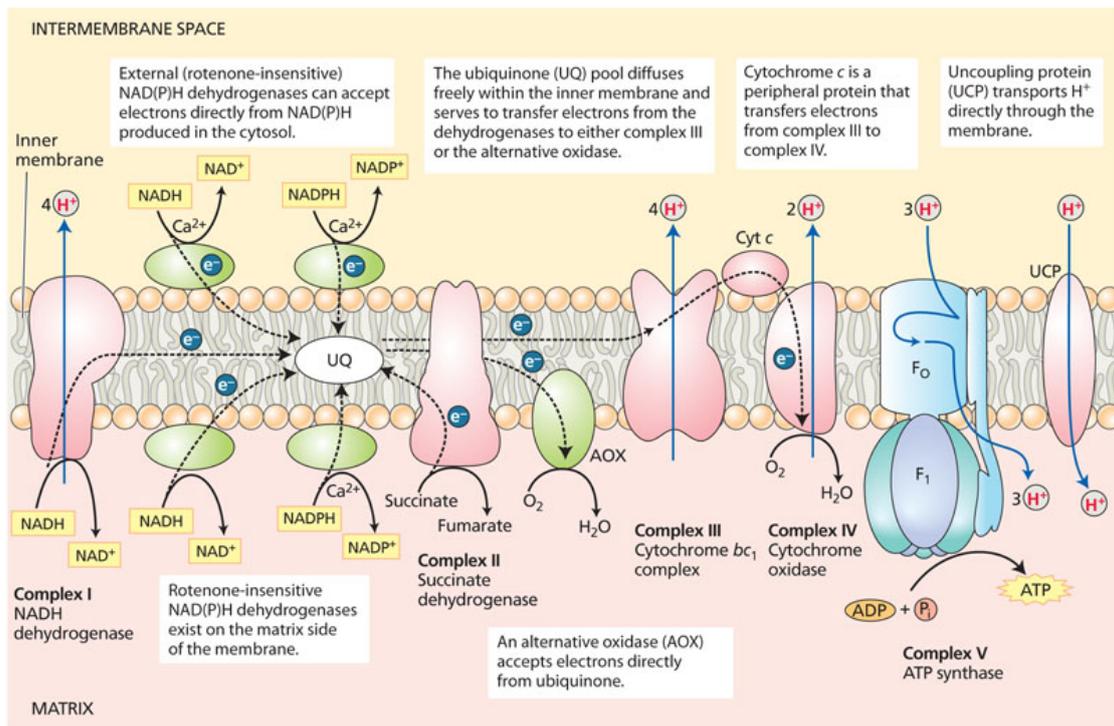


FIGURE 2: Chaîne de transport d'électron mitochondriale. Le cycle Q n'est pas représenté. Voir explications dans le texte. Source : "Plant Physiology Online".

Le cytochrome c, après avoir été réduit par le complexe III, transporte un à un des électrons jusqu'au complexe IV. Dans celui-ci, les électrons sont transportés jusqu'à l'oxygène, dernier accepteur d'électrons, qui sera réduit en eau.

Les différentes translocations de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire se traduisent en la formation d'un gradient électrochimique qui est utilisé par l'ATP synthétase pour phosphoryler de l'ADP.

Les mitochondries végétales possèdent également des NAD(P)H déshydrogénases n'induisant pas la translocation de protons situées sur les faces internes (exposées vers la matrice) et externes (exposées vers l'espace intermembranaire) de la membrane.

1.2.2.2 La voie de l'oxydase alternative

Chez les plantes supérieures, les algues et de nombreux champignons et protozoaires, il existe une oxydase alternative (AOX) oxydant l'ubiquinol et transférant ses électrons à l'oxygène. Ce transfert ne s'accompagne pas de la translocation de protons. Cette voie est donc qualifiée de non-phosphorylante car elle ne participe pas à la synthèse d'ATP. Elle est insensible à l'antimycine A mais est inhibée par le SHAM et le PG. Dans les spadices de *Sauromatum guttatum*, AOX est impliquée dans la production de chaleur, ce qui a pour effet de disperser les molécules odorantes et d'attirer les insectes pollinisateurs (Moore et Siedow, 1991). Cependant, le rôle de cette oxydase dans les tissus non-thermogéniques est mal connu. Deux rôles importants lui ont été attribués :

1. Son activation pourrait permettre d'éviter une sur-réduction de la chaîne de transport d'électrons en cas de stress, sur-réduction qui menerait à la production de ROS par les complexes I et III.
2. La réduction du pool d'ubiquinones étant dépendante de la présence de cofacteurs réduits, l'oxydation des UQH₂ par AOX pourrait permettre la régénération de ceux-ci, ce qui permettrait le

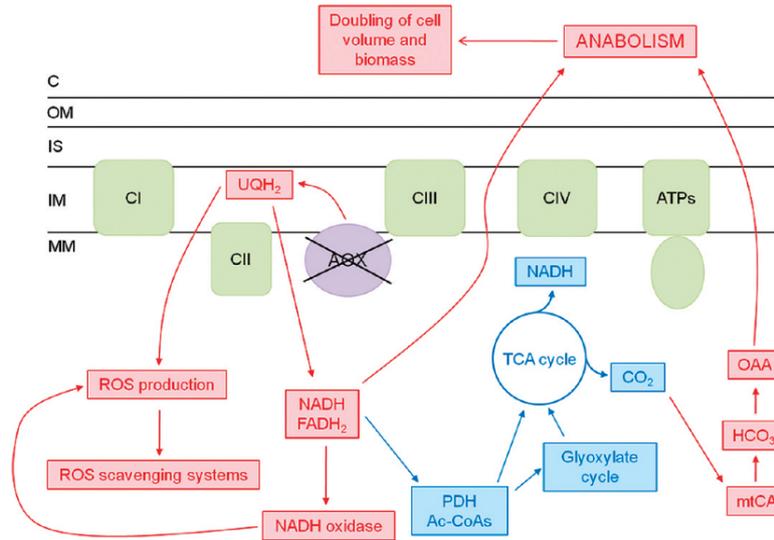


FIGURE 3: Effets observés en l’absence d’AOX. Les voies up-régulées et down-régulées sont en rouge et bleu, respectivement. UQH₂, ubiquinol ; ROS, espèces réactives de l’oxygène ; PDH, pyruvate déshydrogenase ; Ac-CoAs, acétyl-CoA synthétase ; mtCA, anhydrase carbonique mitochondriale ; OAA, oxaloacétate ; ATPs, ATP synthétase ; C, cytoplasme ; OM, membrane externe ; IS, espace intermembranaire ; IM, membrane interne ; MM, matrice mitochondriale (Mathy *et al.*, 2010).

maintien de la glycolyse et du cycle de Krebs dans une situation où la disponibilité en cofacteurs oxydés est faible.

Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, AOX est une protéine monomérique encodée par deux gènes, *Aox1* et *Aox2*. Des analyses transcriptionnelles ont montré que seul *Aox1* est significativement exprimé. Molen *et al.* (2006) ont montré que la stimulation de l’expression d’AOX est régulée par deux mécanismes différents, le premier est activé par les stress oxydatifs¹ et mène à une expression rapide mais transitoire d’AOX tandis que le deuxième est activé par la présence de NO₃⁻ (Baurain *et al.*, 2003).

Afin d’analyser le rôle physiologique d’AOX, Mathy *et al.* (2010) ont produit un mutant AOX par la technique de RNAi. Ils ont ensuite caractérisé ce mutant par une approche protéomique. Leurs observations confirment les deux rôles attribués à AOX :

1. La prévention de la production de ROS :

Les cellules mutantes produisent plus de ROS et on observe une up-régulation des enzymes les dégradant.

2. La consommation de pouvoir réducteur en excès pour régénérer des cofacteurs oxydés :

Les cellules mutantes ont un volume cellulaire et une biomasse deux fois plus importants que le type sauvage . Pour expliquer ces effets, les auteurs proposent que l’absence d’AOX conduit à une sur-abondance de cofacteurs réduits, cela provoquant une inhibition des réactions cataboliques en faveur des réactions anaboliques. Ceci est confirmé par l’observation de l’up-régulation de la voie des pentose phosphate qui mène à un stockage d’amidon (voie anabolique) et une baisse des enzymes du cycle de Krebs (voie catabolique).

Les modifications observées au niveau protéomique chez le mutant traduisent des adaptations qui permettent de rétablir partiellement l’état rédox des cofacteurs et de favoriser l’élimination des ROS en excès.

1. Antimycine A, le froid, H₂O₂

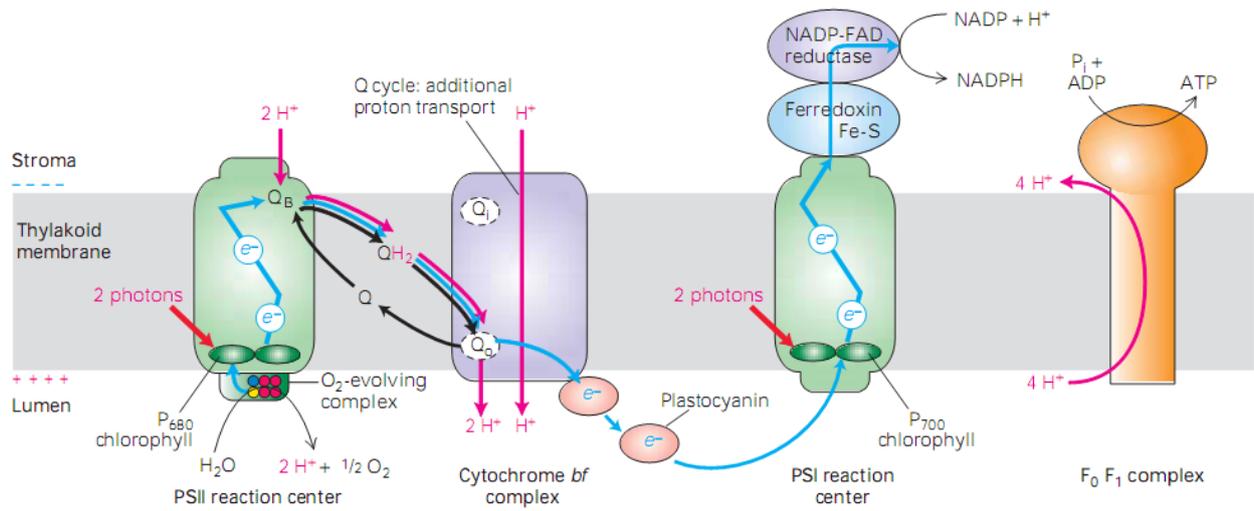


FIGURE 5: Représentation de la chaîne de transport d'électrons. Le cycle Q est mentionné mais n'est pas représenté. F₀F₁ : ATP synthétase (Lodish, 2003).

D'autre part, les auteurs ont remarqué une up-régulation de l'anhydrase carbonique mitochondriale (mtCA). Le rôle de celle-ci serait de fournir du HCO₃⁻ à partir de CO₂ pour la synthèse d'oxaloacétate étant donné que la baisse de capacité du TCA entraîne une baisse de production de CO₂.

Les différents effets observés en l'absence d'AOX sont résumés sur la figure 3.

1.3 La photosynthèse

1.3.1 Description générale

La photosynthèse est le processus qui permet aux organismes photosynthétiques de capter l'énergie lumineuse et de la convertir en énergie chimique. Chez les eucaryotes, celle-ci se déroule dans le chloroplaste. Cet organe est composé d'une double membrane, d'une matrice aqueuse (le stroma), ainsi que d'un réseau membranaire interne formant les thylakoïdes. Ces derniers peuvent être libres dans le stroma ou former des empilements nommés grana. Les réactions de la phase claire ont lieu dans les thylakoïdes contrairement aux réactions de la phase sombre qui ont lieu dans le stroma.

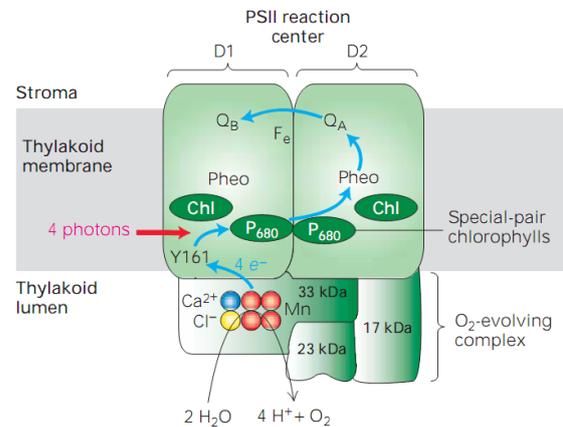


FIGURE 4: Centre réactionnel du PSII (Lodish, 2003).

1.3.2 Réactions de la phase claire

On appelle réactions de la phase claire l'ensemble des processus qui convertissent l'énergie lumineuse en énergie chimique sous forme d'ATP et d'équivalents réducteurs tel que le NADPH. Ces réactions font intervenir cinq complexes protéiques membranaires situés dans les thylakoïdes (voir figure 5) : les photosystèmes I et II, l'antenne collectrice de lumière LHCII (Light Harvesting Complex II), le cytochrome b₆f et l'ATP synthétase.

1. L'antenne collectrice de lumière LHCI

Bien que les molécules de chlorophylle *a* dans un centre réactionnel soient capables d'absorber directement la lumière, le plus souvent leur énergie leur est transférée indirectement par des complexes chlorophylles-protéines collecteurs de lumière. L'antenne collectrice de lumière LHCI est un complexe multi-protéique comportant des pigments qui permettent d'élargir la gamme de longueurs d'ondes absorbées et d'augmenter la proportion d'énergie lumineuse absorbée. L'état excité d'une molécule de chlorophylle qui a absorbé un photon est transférée de chlorophylle en chlorophylle jusqu'à un centre réactionnel.

2. Le photosystème II (PSII)

La première étape de la photosynthèse est l'excitation d'une paire spéciale de chlorophylles dans le centre réactionnel du PSII : P680. Cette excitation peut se faire suite à l'absorption d'un photon par un pigment appartenant au LHCI ou à d'autres polypeptides du PSII. L'excitation de P680 va provoquer le transfert d'un électron de P680 vers la phéophytine (séparation de charges primaire). Des transferts successifs vont alors entraîner la réduction de la plastoquinone (PQ) fixe Q_A , qui va elle-même réduire partiellement une PQ échangeable Q_B (voir figure 4). La double réduction de Q_B entraînera sa protonation par deux protons du stroma pour former le plastoquinol PQH_2 , qui se dissociera du PSII. La paire de chl oxydée $P680^+$ sera réduite par un électron provenant de la photolyse de l'eau (dans le complexe OEC). Après quatre séparations de charges successives, une molécule d'oxygène et quatre protons seront libérés dans le lumen.

3. Le cytochrome b_6f (Cyt b_6f)

La fixation d'une PQH_2 au site Q_o du Cyt b_6f provoque son oxydation par ce complexe et la libération des deux protons dans le lumen. Un des électrons transite par le centre Fe-S de la protéine de RIESKE et va réduire une plastocyanine (PC) tandis que l'autre transite par deux cytochromes (b_h et b_l ; non représentés sur la figure 5) et va réduire partiellement une PQ au site Q_i . A la suite d'une deuxième série de réactions identiques, la double réduction de cette PQ entraîne sa protonation et sa libération. Elle peut ensuite être ré-oxydée au site Q_o . La conséquence de ce cycle, appelé cycle Q, est que pour deux électrons transférés à la plastocyanine, quatre protons sont libérés dans le lumen.

4. Le photosystème I (PSI)

L'excitation de la paire spéciale de chlorophylles dans le centre réactionnel du PSI (P700) suite à l'absorption d'un photon va provoquer le transfert d'un électron dans le photosystème jusqu'à une ferrédoxine pour aboutir, après deux séparations de charges, à la réduction du $NADP^+$, réaction catalysée par la ferrédoxine-NADP réductase. A chaque oxydation, la paire de chlorophylles P700 récupère un électron d'une PC soluble.

5. L'ATP synthétase (ATPs)

Les différentes translocations de protons de la matrice vers le lumen se traduisent en la formation d'un gradient électrochimique transmembranaire qui est utilisé par l'ATP synthétase chloroplastique pour phosphoryler de l'ADP.

La photosynthèse permet donc la conversion d'énergie lumineuse en énergie chimique sous forme de NADPH et d'ATP.

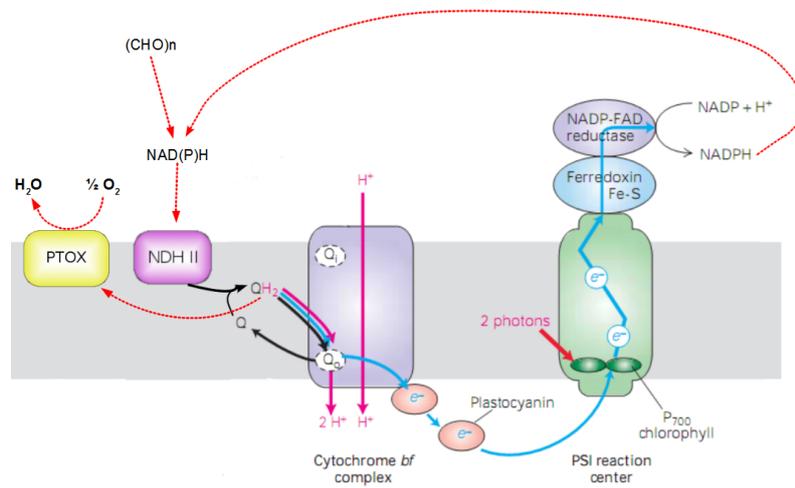


FIGURE 6: Principe de la chlororespiration. PTOX, plastoquinone oxydase ; NDHII, NADH(P)H déshydrogénase de type II. Schéma modifié de (Lodish, 2003).

1.3.3 Réactions de la phase sombre

L'ATP et le NADPH produits par la phase claire sont ensuite utilisés dans les réactions de la phase sombre (cycle de Calvin) pour réduire le CO_2 fixé par la Rubisco dans le stroma. Le bilan est le suivant : l'assimilation d'une molécule de CO_2 nécessite 3 molécules d'ATP et 2 molécules de NADPH. Il a été calculé que le rapport $\frac{ATP}{NADPH}$ produit suite au transport d'électrons de l'eau au NADP^+ (transport linéaire) est inférieur (1,28 ATP produit par NADPH) au rapport 1,5 nécessaire à la phase sombre. Dans ce cas, le déficit d'ATP peut être comblé par un transfert cyclique d'électrons autour du PSI (voir 1.3.4.4).

1.3.4 Flexibilité de la photosynthèse vis à vis du contexte métabolique et environnemental

1.3.4.1 Introduction

L'adaptation de la photosynthèse aux variations des conditions lumineuses ou au contexte métabolique demande un réglage très précis entre la conversion de l'énergie lumineuse par les deux photosystèmes et son usage par le métabolisme, en particulier en fonction du rapport du pouvoir phosphorylant (ATP) et réducteur (NAD(P)H). Ce réglage s'appuie sur l'existence de voies auxiliaires au transport linéaire des électrons telles que la chlororespiration ou un transfert cyclique autour du PSI, mais aussi sur une grande flexibilité structurelle des photosystèmes permettant de réguler l'absorption de l'énergie lumineuse.

1.3.4.2 La chlororespiration

L'existence d'une chlororespiration chez *Chlamydomonas reinhardtii* a été proposée par Bennoun (1982) sur base de l'observation d'une réduction des PQ de la chaîne de transport d'électron par du NAD(P)H à l'obscurité. Ainsi, les PQ peuvent être réduites à l'obscurité par un pool de NAD(P)H du stroma grâce à une NAD(P)H déshydrogénases de type II (Mus *et al.* (2005) ; Desplats *et al.* (2009) ; Jans *et al.* (2008)). Les PQH_2 peuvent être oxydées par l'oxygène grâce à une plastoquinone oxydase. L'existence de cette dernière chez *Chlamydomonas reinhardtii* a été montrée par Cournac *et al.* (2000).

1 Introduction

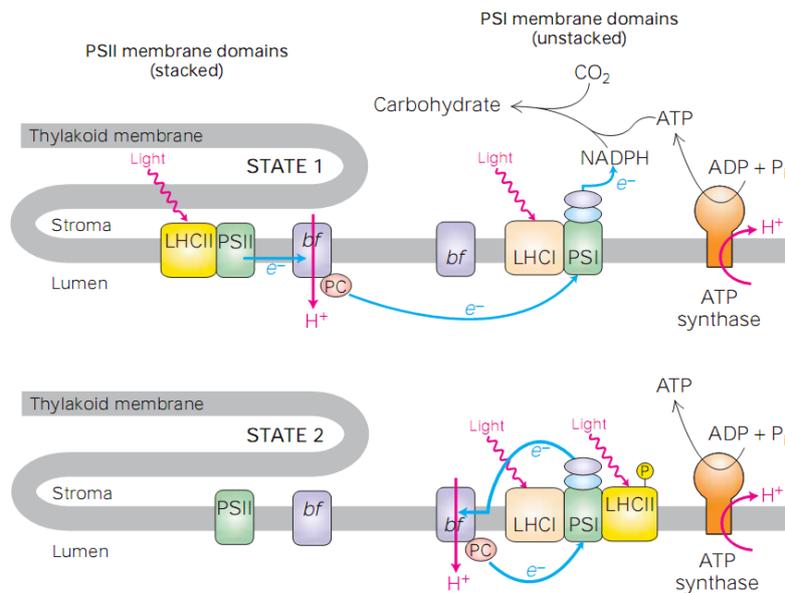


FIGURE 7: Les transitions d'état (Lodish, 2003).

Elle possède des homologues avec l'oxydase alternative mitochondriale (AOX) et a donc été nommée PTOX (plastid terminal oxydase).

Les rôles attribués à la chlororespiration (voir figure 6) sont :

- L'oxydation des équivalents réducteurs en excès en cas de déficience de l'activité mitochondriale (Cournac *et al.*, 2000).
- Une participation à la biosynthèse des caroténoïdes par couplage entre PTOX et la phytoène désaturase, qui utilise PQ comme substrat (Joet, 2002).
- Elle pourrait aussi, d'une manière similaire à AOX, permettre d'éviter la formation d'espèces réactives de l'oxygène (Casano *et al.*, 2000) .

1.3.4.3 Les transitions d'état

Les spectres d'absorption des deux photosystèmes sont différents : le PSI est enrichi en chl *a* et comporte des formes de ce pigment qui absorbent à grandes longueurs d'onde tandis que le PSII est enrichi en chl *b*. A cause de ces différences pigmentaires, le spectre du PSI dans le rouge est décalé vers les grandes longueurs d'onde par rapport au spectre du PSII. Les deux photosystèmes peuvent donc être excités différemment en fonction de la source lumineuse et cela peut conduire à un déséquilibre de la chaîne de transport d'électrons. Afin de compenser cela, les antennes LHCII peuvent migrer d'un photosystème à l'autre afin de faire varier leurs sections optiques, ce qui permet de rétablir la balance d'excitation. Ce phénomène est appelé transition d'état (Bonaventura et Myers (1969); Murata (1969)).

Les transitions d'état sont contrôlées par l'état redox du pool de PQ. Si le pool de PQ est réduit à cause de l'excitation préférentielle du PSII ou par réduction non-photochimique des PQ, la kinase STT7 (Depege *et al.*, 2003) va catalyser la phosphorylation du LHCII, qui va alors migrer vers le PSI. C'est ce qu'on appelle l'état 2. Dans le cas où les PQ sont oxydés à cause de l'excitation préférentielle du PSI, STT7 va être inactivée et une phosphatase constitutivement active va déphosphoryler le LHCII, qui va alors migrer vers le PSII (Allen, 1992). C'est ce qu'on appelle l'état 1 (voir figure 7).

Les transitions d'état auraient également pour rôle de favoriser le transfert cyclique d'électrons (voir

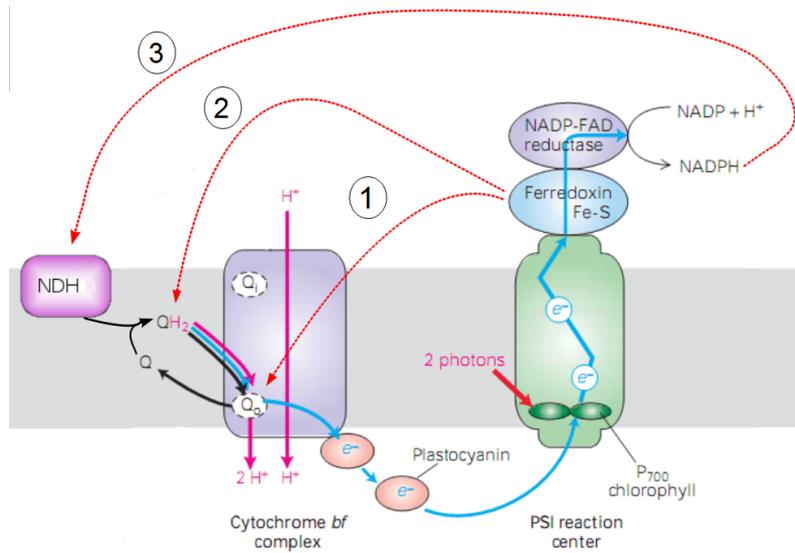


FIGURE 8: Transport cyclique d'électrons. Schéma modifié de (Lodish, 2003).

1.3.4.4).

1.3.4.4 Transfert cyclique d'électrons

En plus du transport d'électrons linéaire de l'eau vers la ferrédoxine, il existe un transport cyclique d'électrons autour du PSI et du cyt b_6f menant à la synthèse d'ATP uniquement. Il est admis (Arnon et Chain (1975); Arnon *et al.* (1967); Joliot et Joliot (2002)) que la ferrédoxine réduite par le PSI peut donner ses électrons aux PQ mobiles soit par l'intermédiaire du cyt b_6f , soit par l'intermédiaire d'une ferrédoxine : plastoquinone oxydoréductase hypothétique ou encore par l'intermédiaire du NAD(P)H qui peut réduire les PQ grâce à une NAD(P)H déshydrogenases (de type II chez *Chlamydomonas*).

Le rôle du transfert cyclique d'électrons serait de moduler le rapport $\frac{ATP}{NADPH}$ produits par la photosynthèse afin de répondre à la demande énergétique de la cellule. Ce phénomène serait régulé par les transitions d'état (Wollman, 2001).

1.3.4.5 Interactions entre mitochondries et chloroplaste

Les organismes photosynthétiques utilisent l'énergie lumineuse pour convertir le CO_2 en hydrates de carbone. Une part de ces derniers est ensuite utilisée par la respiration pour générer de l'énergie et les intermédiaires nécessaires pour le métabolisme. Bien que ces deux processus soient aujourd'hui bien compris, nous en savons encore peu sur leur régulation mutuelle. Les interactions entre chloroplaste et mitochondrie dépendent essentiellement de l'échange de pouvoir phosphorylant et d'équivalents réducteurs.

Par exemple, lorsque la synthèse d'ATP dans la mitochondrie est faible (suite à l'ajout d'inhibiteurs de la respiration, dans des mutants de la chaîne respiratoire ou sous anoxie), la glycolyse est stimulée, ce qui induit une augmentation de la concentration en NAD(P)H dans le chloroplaste et induit le transfert cyclique d'électrons (voir 1.3.4.4) afin d'augmenter la production d'ATP par le chloroplaste (Wollman (2001); Cardol *et al.* (2003); Cardol *et al.* (2009)).

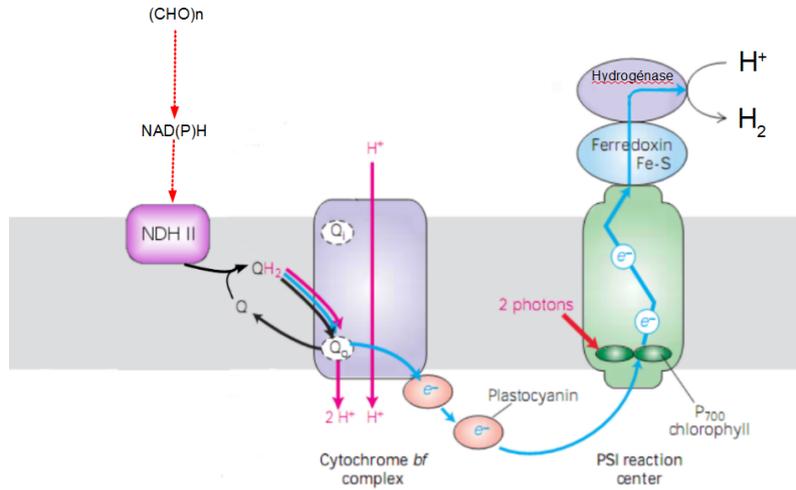


FIGURE 9: Principe de la production d'hydrogène. Schéma modifié de (Lodish, 2003).

1.3.4.6 La photoproduction d'hydrogène

Une caractéristique intéressante des *Chlamydomonas* est leur capacité de produire de l'hydrogène gazeux à la lumière en absence d'oxygène. L'enzyme qui catalyse la formation d' H_2 (HydA1) est une hydrogénase de type [FeFe] qui intervient à la fin de la chaîne de transport d'électrons photosynthétique et réduit deux protons pour produire une molécule d' H_2 avec les électrons cédés successivement par deux ferrédoxines.

Cette caractéristique ouvre la possibilité de produire une énergie renouvelable à partir de l'énergie lumineuse, ce qui est évidemment très intéressant dans le contexte actuel (Melis et Happe, 2001). Cependant, *Chlamydomonas* ne produit de l'hydrogène gazeux que dans des conditions anaérobies car l'enzyme HydA1 est rapidement inhibée par l'oxygène, de même que l'expression de son gène. La stratégie la plus utilisée actuellement pour produire de l'hydrogène est de diviser le processus en une phase d'accumulation de biomasse dans des conditions standards et une phase de production d'hydrogène dans un milieu carencé en soufre. La carence en S entraîne une forte diminution de l'activité du photosystème II tout en maintenant une respiration élevée. Ceci provoque un passage de la culture fermée en anoxie, ce qui permet une induction et une activité hydrogénase (Melis *et al.*, 2000). Le pouvoir réducteur pour la formation d'hydrogène proviendrait en partie de l'amidon par l'intermédiaire de la NAD(P)H déshydrogénase de type II (Jans *et al.*, 2008) (voir figure 9) ainsi que de l'activité résiduelle du PSII.

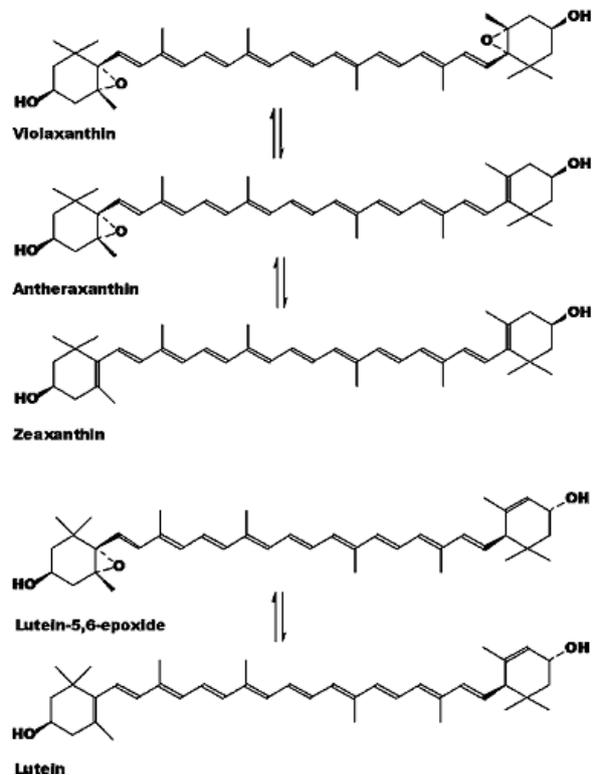


FIGURE 10: Cycle xanthophylles. Schéma modifié de (Muller *et al.*, 2001).

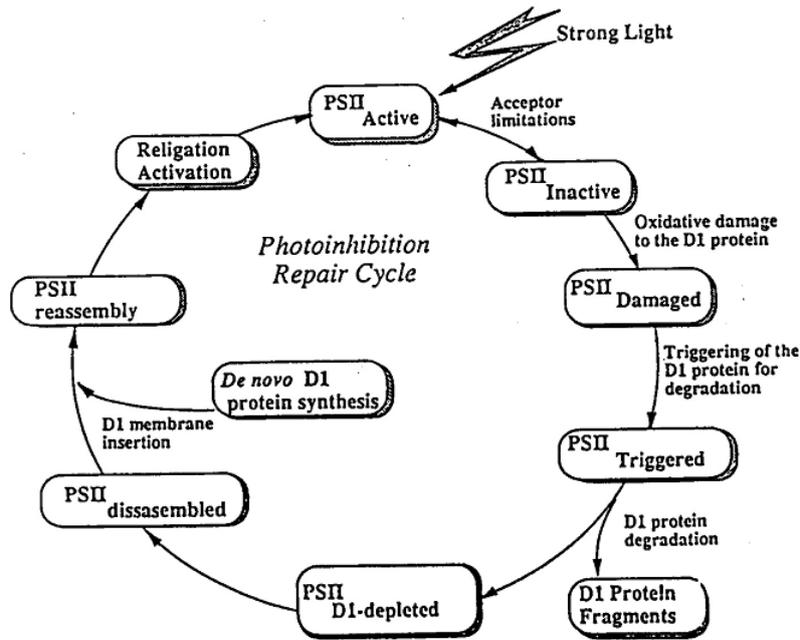


FIGURE 11: Cycle de la photoinhibition (Virgin, 1992).

1.3.4.7 Réponses aux fortes intensités lumineuses

1.3.4.7.1 Le cycle des xanthophylles Sous lumière intense, la chaîne photosynthétique expulse beaucoup de protons dans le lumen et celui-ci s'acidifie fortement, ce qui a pour effet d'activer l'enzyme violaxanthine-déépoxydase (VDE)² qui convertit le pigment violaxanthine associé aux LHCs en antheraxanthine puis en zéaxanthine (voir figure 10). Une enzyme exprimée de façon constitutive, la zeaxanthine époxydase (ZE) catalyse la réaction inverse d'époxydation et permet un retour à la normale dans des conditions non stressantes. Chez *Chlamydomonas*, un cycle supplémentaire entraînant la conversion du pigment lutéine,5-6,époxyde en lutéine a été découvert (Niyogi *et al.*, 1997). Celui-ci ferait également intervenir la VDE.

La diminution de pH a aussi pour effet d'induire un changement conformationnel de la membrane thylakoïdale détectable par une variation d'absorbance à 535nm (Bilger et Bjorkman, 1994).

Ces deux phénomènes participent à une voie de dissipation de l'énergie au niveau des antennes LHCII lorsque la photosynthèse est saturée (Young *et al.*, 1997). Le mécanisme de dissipation fait intervenir la protéine PSBS (Li *et al.*, 2000) et permet la désexcitation de la chlorophylle, l'énergie d'excitation étant alors dissipée sous forme thermique. Deux mécanismes sont proposés :

1. Soit les xanthophylles agiraient comme intermédiaires et favoriseraient le changement de conformation des LHCII qui favoriserait la dissipation.
2. Soit les xanthophylles agiraient directement comme piège à énergie avant de la dissiper.

1.3.4.7.2 La photoinhibition A des intensités lumineuse sur-saturantes pour l'activité photosynthétique, l'assimilation du carbone et la régénération du NADP⁺ sont limitantes et les transporteurs de la chaîne photosynthétique sont constamment réduits, ce qui peut provoquer l'apparition de ROS. La photoinhibition est la conséquence d'une photoprotection renforcée (pour éviter la formation des ROS) et de dommages causés au PSII lors de stress lumineux prolongés. Elle est caractérisée par une

2. Chez *Chlamydomonas*, le gène codant pour cette enzyme n'a pas été identifié (Anwaruzzaman *et al.*, 2004).

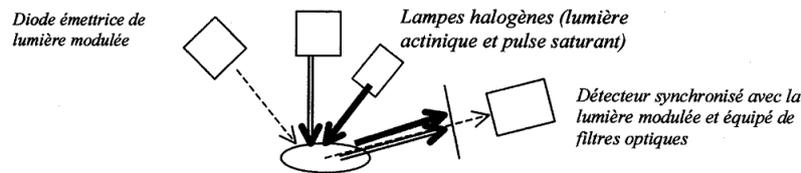


FIGURE 12: Principe du PAM. Source : cours de 1er master de bioénergétique, partim photosynthèse de F.Franck.

baisse du rendement photochimique du PSII. Voici les différentes étapes proposées pour expliquer ce phénomène (Prasil *et al.* (1992), voir figure 11) :

1. Le site de liaison de PQ sur le centre du PSII (site Q_b) est occupé plus souvent par PQH₂ que par PQ. Il en résulte la formation de Q_A métastable.
2. Des doubles réductions de Q_A se produisent. Q_A quitte le centre réactionnel, ainsi que le manganèse.
3. La stabilisation de TyrZ⁺, Chl⁺ et P680⁺ provoque des modifications covalentes du centre réactionnel, causant vraisemblablement un changement de conformation protéique qui déclenche la dégradation de D1 par une protéase spécifique.
4. Les sous-unités restantes du cœur du PSII (CP43, CP47, D2) se déplacent des zones granaires vers les zones inter-granaires.
5. Après la photoinhibition, D1 (encodé par le génome chloroplastique) est resynthétisé et le centre réactionnel se reconstitue. Il est alors à l'état inactif et associé aux membranes inter-granaires. Son activation nécessite de la lumière pour l'incorporation du manganèse (photoactivation).
6. Le cœur PSII réparé est réintégré aux membranes granaires.

En réalité, D1 est en permanence sujette à destruction par la lumière (même sous lumière modérée) et doit être renouvelée, il existe donc un équilibre entre sa destruction et son remplacement. Dans des conditions où la lumière absorbée par les antennes dépasse la capacité d'utilisation photosynthétique, la traduction du RNAm *psbA* est inhibée par la production de H₂O₂. Dès lors, dans des conditions environnementales non favorables à la fixation de CO₂, un excès d'énergie lumineuse absorbée par les pigments photosynthétiques peut empêcher la réparation du PSII et donc conduire à la photoinhibition observée (Takahashi et Murata, 2008).

1.3.5 La mesure de la fluorescence de la chlorophylle a pour déterminer les activités photosynthétiques

1.3.5.1 Introduction

D'après (Maxwell et Johnson, 2000).

L'énergie absorbée par une molécule de chlorophylle du PSII peut suivre trois destins :

1. Elle peut être utilisée par la photosynthèse.
2. Elle peut être dissipée sous forme de chaleur par les antennes du PSII.
3. Elle peut être ré-émise sous forme de fluorescence à une longueur d'onde d'environ 670nm.

Ces trois processus entrent en compétition de sorte que la baisse d'efficacité d'un de ceux-ci va entraîner l'augmentation de l'efficacité des deux autres. On peut donc obtenir des informations sur le rendement

de la photochimie et de la dissipation de chaleur des antennes du PSII en mesurant l'efficacité de l'émission de fluorescence.

Cette approche a connu un boom en 1984 lorsque Quick et Horton (1984) ont utilisé un système de mesure modulé. Dans ce type de système, la lumière utilisée pour mesurer la fluorescence est modulée (allumage et extinction à haute fréquence) et le détecteur est modifié pour ne détecter que la fluorescence modulée émise en réponse à cette lumière modulée. Cela permet de mesurer le rendement de la fluorescence en présence de lumières continues additionnelles nécessaires pour les besoins de l'expérience (voir figure 12). Sans ce dispositif, l'intensité de la fluorescence serait affectée directement par les différentes lumières excitatrices et il serait impossible de déterminer les variation du rendement de fluorescence.

Les changements dans le rendement de fluorescence de la chlorophylle ont été observés la première fois par Kautsky *et al.* (1960). Ils ont montré qu'en transférant du matériel photosynthétique de l'obscurité à la lumière, on observe une augmentation de la fluorescence. Cela peut-être expliqué par la réduction des accepteurs du PSII dans la chaîne de transport d'électrons comme les PQ et en particulier Q_A . Une fois que le PSII absorbe de la lumière et que Q_A a accepté un électron, il n'est plus capable d'en accepter un deuxième jusqu'à ce qu'il ait donné son électron à Q_B . Durant ce laps de temps, le centre réactionnel du PSII est dit "fermé". Une augmentation de la proportion de centres fermés conduit à une baisse de la photochimie et donc à une augmentation de la fluorescence. On obtient donc des informations sur l'état rédox de la chaîne de transport d'électrons en mesurant la fluorescence émise par le PSII.

Évidement, pour pouvoir obtenir des informations sur les performances photosynthétiques des algues, il est nécessaire de distinguer l'extinction de fluorescence due à la photochimie (qP pour "photochemical quenching") de la dissipation d'énergie sous forme thermique (qNPQ pour "non-photochemical quenching"). Pour cela, on peut supprimer un des deux contributeurs et plus spécialement qP en utilisant la technique du pulse saturant. Dans cette approche, un éclair de haute intensité mais de durée courte (1s) est donné, ce qui a pour effet de transitoirement fermer tous les centres réactionnels du PSII et d'éteindre qP. On obtient alors le niveau maximal de fluorescence en absence de photochimie : F_m (voir figure 13).

La figure 13 nous montre diverses données recueillies par une expérience standard. Ces données permettent de calculer le rendement photochimique du PSII.

Pour l'échantillon adapté à l'obscurité :

$$\psi_{PSII_{dark}} = \frac{F_v}{F_m} = \frac{(F_m - F_o)}{(F_m)}$$

Pour l'échantillon adapté à la lumière :

$$\psi_{PSII_{light}} = \frac{(F'_m - F_t)}{(F'_m)}$$

Ce paramètre détermine la proportion de la lumière absorbée par le PSII qui est utilisée pour la photochimie. Il évolue au cours du temps en fonction des conditions de l'expérience.

Le paramètre ψ_{PSII} à l'obscurité représente l'efficacité maximale du PSII avant que l'expérience ne débute. Une chute de celui-ci peut ainsi être révélatrice d'une photoinhibition.

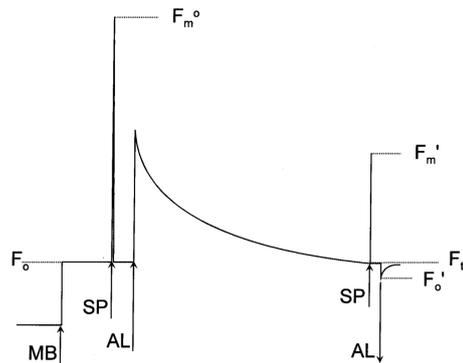


FIGURE 13: Principe de l'analyse par la méthode PAM (Maxwell et Johnson, 2000).

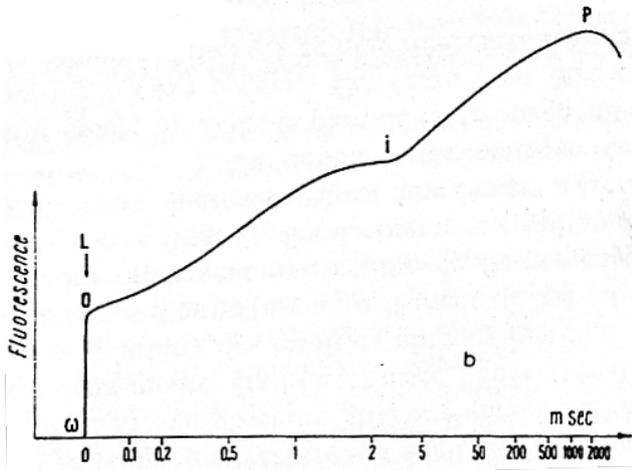


FIGURE 14: Courbe de montée rapide de fluorescence chez *Chlorella* observée par Delosme (1967).

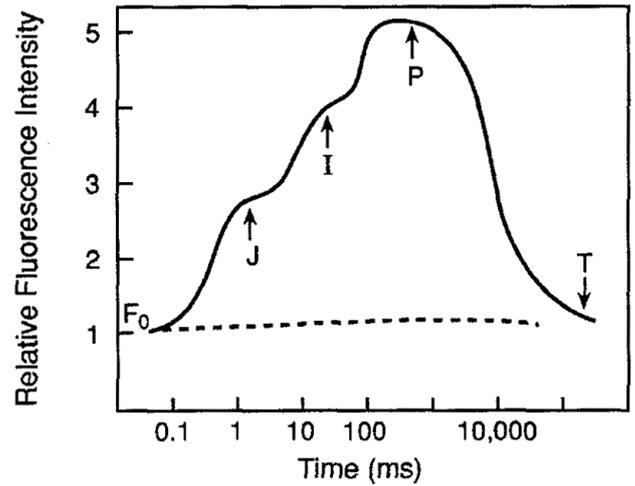


FIGURE 15: Courbe de montée rapide de fluorescence observée sur des feuilles de pois par Strasser *et al.* (1995).

Finazzi *et al.* (1999) ont montré qu'une transition d'état vers l'état II peut mener à une chute du rapport $\frac{F_v}{F_m}$ dans un contexte métabolique très réducteur (anaérobiose, inhibition de la respiration,...). Ceci est l'effet combiné de deux processus :

1. Une partie des antennes du PSII migre vers le PSI, ce qui provoque une baisse de la fluorescence et notamment de F_m .
2. Le niveau F_o baisserait proportionnellement à F_m si il n'était pas également influencé par l'état rédox des PQ, qui dans ce contexte est fort réduit, ce qui provoque parallèlement une augmentation de F_o .

1.3.6 Les courbes de montée rapide de fluorescence (OJIP)

D'après Govindje (1995) et Lazar (2006).

Tout organisme photosynthétique adapté à l'obscurité et exposé à une lumière d'intensité élevée montre une montée rapide de fluorescence d'un niveau F_o à un niveau F_m qui correspond à la réduction de Q_A dans le centre réactionnel du PSII. Cette montée rapide de la fluorescence n'est pas linéaire mais peut être décomposée en plusieurs phases. Pour pouvoir discerner ces phases, il faut utiliser des appareils de mesure dotés de certaines caractéristiques :

1. L'intensité de la lumière excitatrice (saturante) doit être très importante : de l'ordre de $3000 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.
2. Cette intensité maximale doit être atteinte très rapidement (temps d'allumage court, dans le domaine des microsecondes).
3. La résolution temporelle du détecteur de fluorescence doit être très bonne étant donné la vitesse du processus observé.

Delosme (1967) a étudié ce phénomène sur une suspension de *Chlorella* en plaçant une carabine "22 long rifle" pointée sur une plaque en métal séparant une lampe au xénon d'un échantillon, ce qui permet un éclairage subit et homogène de l'échantillon lorsque la balle de l'arme déplace la plaque en métal. Il a montré l'existence de deux phases de montées (voir figure 14) :

1. une phase photochimique dont le rendement de fluorescence à un instant t est entièrement déterminé par le nombre de photons absorbés par le système.
2. une phase thermique dont le rendement de fluorescence ne dépend plus seulement du nombre de photons absorbés mais est fortement influencé par la température.

Depuis, en utilisant de nouveaux fluorimètres à diodes à allumage rapide, Strasser *et al.* (1995) ont observé un nouveau point d'inflexion correspondant à une nouvelle phase et ont proposé la nomenclature OJIP (voir figure 15) :

1. La phase O-J (1-2ms) correspond à la réduction de Q_A dans le centre réactionnel du PSII et est nommée phase photochimique.

La pente initiale et l'importance de cette phase dépend de l'intensité de la lumière excitatrice. Cette phase serait aussi influencée par le stade S du OEC par l'équilibration du côté donneur du PSII puisque $P680^+$ est un quencher de la fluorescence de la chl a (Strasser *et al.*, 1995).

2. La phase J-I et la phase I-P sont des phases thermiques associées à la ré-oxydation de Q_A^- par les PQ.

La présence de deux phases thermiques pourrait être due à l'hétérogénéité des PSII. En effet, on distingue les PSII α présents en majorité dans les zones granaires, des PSII β plutôt présents dans les zones inter-granaires. Ces PSII hétérogènes se trouvent donc dans des environnements différents et montrent des différences dans la vitesse de réduction des PQ. Barthelemy *et al.* (1997) ont apporté des arguments expérimentaux suggérant que la phase J-I serait associées aux PSII α tandis que la phase I-P serait associée aux PSII β .

Les courbes de montée rapide de la fluorescence sont donc la conséquence de la réduction des accepteurs du PSII (Q_A, Q_B et le pool de PQ) avec des électrons provenant de l'eau (Strasser *et al.*, 1995). Les différentes phases composant ces courbes sont associées aux changements de l'état rédox des transporteurs d'électrons de la chaîne photosynthétique (Lazar, 2006).

1.4 L'assimilation de l'azote et du soufre

1.4.1 Acquisition et assimilation de l'azote

1.4.1.1 Introduction

D'après (Stern et Harris, 2008).

L'azote est l'un des composants essentiels à la formation des acides aminés, des acides nucléiques, de la chlorophylle ainsi que de nombreux cofacteurs tel que le NAD(P)H. Chlamydomonas est capable d'assimiler l'azote inorganique et organique. Nous parlerons ici principalement de l'assimilation d'N inorganique sous forme de NH_4^+ et de NO_3^- .

Chlamydomonas préfère assimiler du NH_4^+ plutôt que du NO_3^- , l'assimilation du premier étant énergiquement plus favorable étant donné qu'il est sous forme réduite. Cependant, les microorganismes exploitent principalement le NO_3^- , celui-ci étant présent à une concentration 10 à 10000 fois plus importante dans les sols naturels.

La première étape dans l'assimilation du NH_4^+ est son transport du milieu extracellulaire vers le cytoplasme et les organites, principalement vers le chloroplaste où le NH_4^+ est assimilé par l'intermédiaire du cycle GS/GOGAT et le L-Glutamate produit est incorporé dans le métabolisme (voir figure 16).

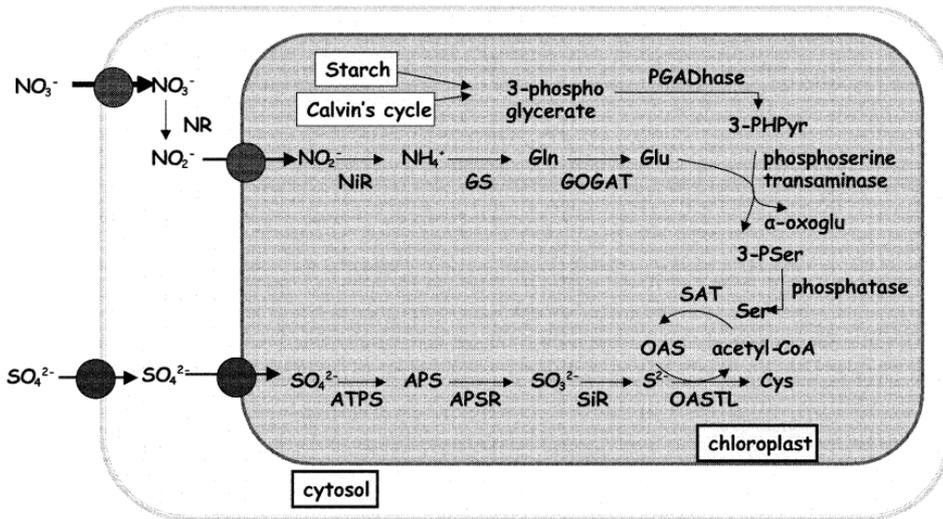


FIGURE 16: Assimilation du sulfate et lien avec l'assimilation du nitrate (Mosulén *et al.*, 2003).

(C) Nitrate/nitrite assimilation cluster

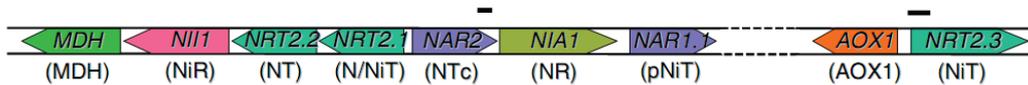


FIGURE 17: Représentation des deux clusters du groupe de linkage IV codant pour des gènes d'assimilation du nitrate et du nitrite. MDH : malate déshydrogénase ; NiR, Nitrite réductase ; NT, N/NiT, NTc, NiT : transporteurs du nitrate et du nitrite ; NR, nitrate réductase ; pNiT, transporteur plastidial du nitrite ; AOX1, oxydase alternative (Stern et Harris, 2008).

Le NO_3^- quant à lui est transporté dans la cellule et est réduit en NO_2^- par la nitrate réductase (NR) grâce au pouvoir réducteur du NAD(P)H^3 . La nitrate réductase est sujette à une régulation rédox, l'absence de NO_3^- conduisant à sa réduction et à son inactivation. Elle est aussi régulée par la lumière, avec une activité maximale en présence de lumière et minimale à l'obscurité.

Le NO_2^- est ensuite réduit en NH_4^+ dans le chloroplaste par une nitrite réductase (NiR) grâce au pouvoir réducteur de la ferrédoxine réduite⁴ (voir figure 16). Le NAD(P)H et la ferrédoxine réduite sont fournis par la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques.

1.4.1.2 Rôle d'AOX dans l'assimilation de l'azote

Curieusement, le gène *Aox1* est présent dans le cluster des gènes d'assimilation de l'azote à côté du gène *Nrt2.3*.⁵ et est sous le contrôle de la source d'azote. Son expression est stimulée par le NO_3^- et inhibée par le NH_4^+ . Baurain *et al.* (2003) ont observé que la capacité apparente *in vivo* de la voie alternative est deux fois plus importante en milieu NO_3^- qu'en milieu NH_4^+ .

Gérin *et al.* (2010) ont procédé à une étude protéomique sur l'adaptation du mitoprotéome à la source de N chez *Chlamydomonas reinhardtii* et ont émis des hypothèses quand au rôle d'AOX dans l'assimilation de l'azote en présence de NO_3^- (voir figure 18) :

1. L'activité AOX mènerait à la stimulation du TCA, ce qui aurait pour effet d'augmenter la production de CO_2 , qui serait ensuite converti en HCO_3^- par une anhydrase carbonique afin de

3. ce qui consomme 2 électrons

4. ce qui consomme 6 électrons

5. AOX a d'ailleurs initialement été identifiées comme un gène d'assimilation du NO_3^- .

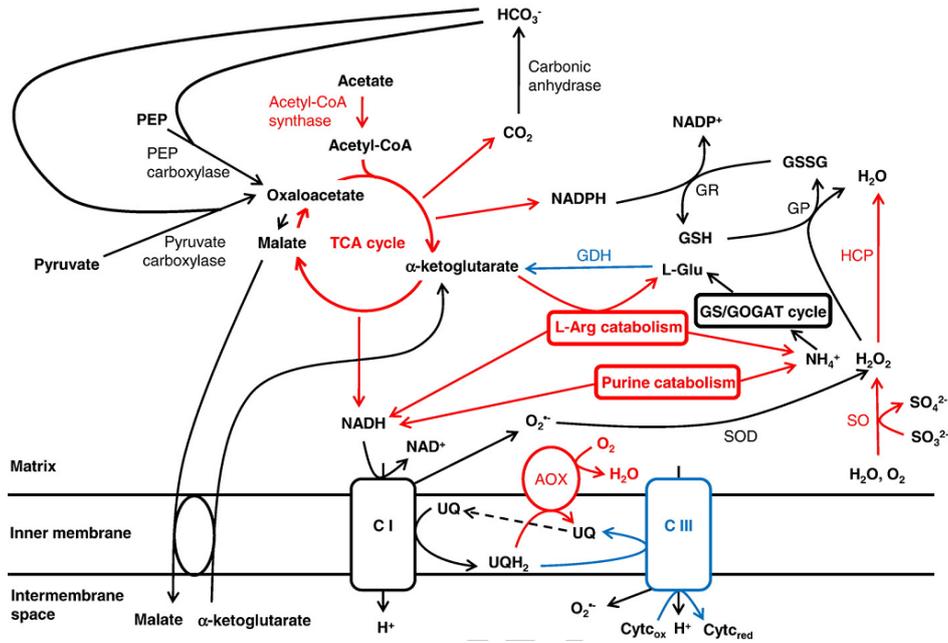


FIGURE 18: Adaptation du mitoprotéome à la source de N. En rouge et bleu, les voies métaboliques up ou down-régulé, respectivement lors du passage d'un milieu contenant du NH_4^+ à un milieu contenant du NO_3^- (Gérin *et al.*, 2010).

générer du malate, lequel serait exporté dans le cytoplasme pour la réduction du NO_3^- et du NO_2^- .

2. L'activité AOX mènerait à la stimulation du catabolisme de la L-arginine et des purines, qui constituent des sources de NH_4^+ . Cela permettrait en partie d'éviter d'utiliser du pouvoir réducteur afin de réduire NO_3^- .
3. L'up-régulation du TCA et du catabolisme de la L-arginine et des purines fournirait un pouvoir réducteur qui, avec le fait que le complexe III est down-régulé, provoquerait une sur-réduction de la chaîne de transport d'électrons et amènerait à la production des ROS. AOX favoriserait dans ce cas l'oxydation des UQH_2 afin de prévenir un stress oxydatif.

1.4.2 Acquisition et assimilation du soufre

Le soufre (S) est un micronutriment essentiel à la vie, présent dans les protéines, les transporteurs d'électrons, les lipides et d'autres métabolites. Les organismes autotrophes incorporent le soufre présent dans le sol principalement sous forme SO_4^{2-} . Celui-ci se trouve souvent lié à des molécules organiques. Dès lors, beaucoup de microorganismes sécrètent des aryl et alkyl-sulfatases ainsi que des sulfonatasés qui clivent le SO_4^{2-} de ces molécules organiques. Lors d'une carence en S, *Chlamydomonas reinhardtii* sécrète une arylsulfatase (ARS) qui hydrolyse les esters de sulfate. *Chlamydomonas* possède une faible capacité d'accumulation du S, ce qui explique pourquoi cette algue est si rapidement affectée par une carence en cet élément.

Le SO_4^{2-} qui rentre dans la cellule est transporté dans le chloroplaste et activé par une ATP sulfurylase (ATPS) pour former de l'adénosine 5'-phosphosulfate (APS) qui est réduite en SO_3^{2-} par l'APS réductase (APSR). Le SO_3^{2-} est ensuite réduit en S^{2-} par la sulfite réductase (SiR). La cystéine est synthétisée par l'action de deux enzymes : La sérine acétyltransférase (SAT) qui catalyse la synthèse de O-acétylsérine (OAS) à partir de L-sérine et d'acétyl-CoA, et l'O-acétyl-thiolyase (OASTL) qui

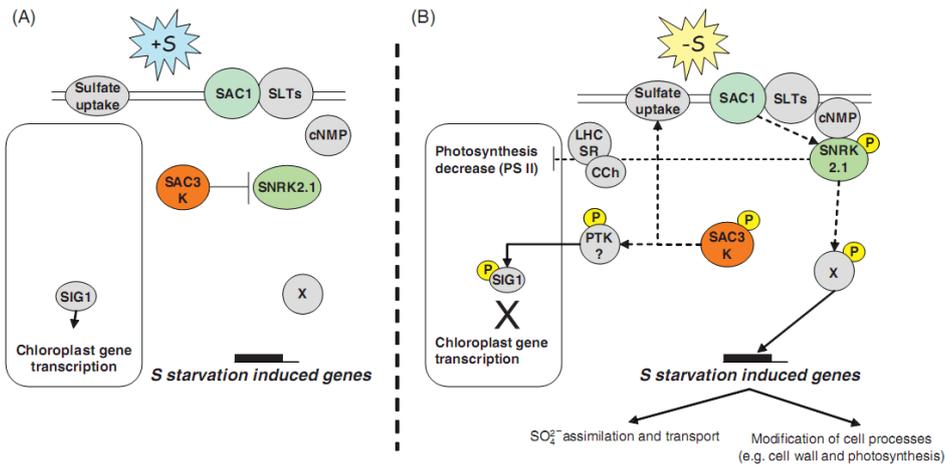


FIGURE 19: Modèle de signalisation de la carence en S chez *Chlamydomonas*. (A) En condition non carencée, SAC inhibe la kinase SNRK2.1. (B) En condition carencée, le senseur SAC1 phosphoryle SNRK 2.1 par l'intermédiaire d'une guanylyl cyclase (cNMP). D'autres protéines comme les transporteurs SLT et/ou SULTR pourraient interagir avec SAC1 pour contrôler le transport et la signalisation par SNRK 2.1. Une fois cette kinase activée, celle-ci irait phosphoryler un facteur de transcription X qui régulerait l'expression des gènes impliqués dans la carence en S. SAC3 quand à elle régulerait le transport de SO_4^{2-} et activerait une kinase plastidiale qui conduirait à la dégradation du facteur sigma SIG1 dans le chloroplaste (Stern et Harris, 2008).

catalyse la production de L-cystéine à partir de OAS et de S^{2-} . Notons que l'assimilation du S, tout comme du NO_3^- , passe par des étapes de réduction dans le chloroplaste et nécessite l'apport de pouvoir réducteur par la chaîne de transport d'électrons photosynthétique. De plus, la figure 16 montre que l'assimilation de S est dépendante de l'assimilation de N pour l'apport de L-sérine, qui provient de la synthèse de 3-phospho-sérine à partir de glutamate et de 3-phosphohydroxypyruvate. Mosulén *et al.* (2003) ont montré qu'il y a une induction de la NR, la Nir et de la GS lors d'une carence en SO_4^{2-} , ce qui démontre bien la relation entre l'assimilation du S et du N.

1.4.2.1 Réponses à la carence en soufre

1.4.2.1.1 Introduction On distingue les réponses générales des réponses spécifiques à une carence. Les réponses générales sont associées aux carences en tout nutriment essentiel tels que l'arrêt de la croissance et des divisions, le ralentissement du métabolisme, l'augmentation du diamètre de la cellule, l'accumulation d'hydrates de carbone et le ralentissement des processus photosynthétiques. Les réponses spécifiques sont associées à la carence en un élément spécifique, ici le S.

Lors de la carence en S, on observe plusieurs phénomènes :

1. Une stimulation de la synthèse des protéines impliquées dans l'assimilation du S tel que les transporteurs de haute affinité et l'ARS.
2. Une accumulation d'amidon probablement consécutive au ralentissement du métabolisme. Les réserves stockées peuvent être rapidement mobilisées lorsque le S devient à nouveau disponible.
3. Un déclin des capacités photosynthétiques.

Un modèle de signalisation de *Chlamydomonas* à la carence en S est présenté figure 19.

1.4.2.1.2 Déclin des capacités photosynthétiques en réponse à la carence en soufre Wykoff *et al.*

(1998) ont étudié la réponse de la photosynthèse après 24 heures de carence en S et ont dénombré diverses altérations touchant la chaîne de transport d'électrons :

1. On observe une diminution de 20 à 30% de la proportion de centres réactionnels fonctionnels du PSII.
2. La fluorescence maximale diminue.
3. La production d'O₂ photosynthétique est réduite de 76% après 24h et de 90% après 48 heures.
4. Alors que le PSII est fortement affaibli, le PSI ne semble pas touché par l'absence de S.

Différents mécanismes peuvent conduire à ce déclin des capacités photosynthétiques. Il est connu que la carence en S provoque une baisse de la transcription des gènes chloroplastiques (Irihimovitch et Stern (2006); Irihimovitch et Yehudai-Resheff (2008)) par l'intermédiaire de la sérine/théronine kinase SNRK2.2 auparavant nommée SAC3 (Davies *et al.* (1994); Irihimovitch et Stern (2006); Gonzalez-Ballester *et al.* (2008)), ce qui diminue de manière générale l'abondance des protéines impliquées dans le transfert d'électrons. La disponibilité réduite d'acides aminés soufrés entraîne un ralentissement du cycle de remplacement de D1 (Wykoff *et al.* (1998); Zhang *et al.* (2002)). Cependant, la baisse d'abondance de D1 n'est pas le premier effet de la carence en S mais est précédée par une dégradation massive de la Rubisco, qui chute d'environ 80% dans les 24 premières heures de la carence en S (Zhang *et al.*, 2002). Bien que cette dégradation ait du sens d'un point de vue physiologique, étant donné que la Rubisco est la protéine la plus abondante dans les cellules photosynthétiques et représente une source majeure de S, le mécanisme de sa dégradation n'est pas encore élucidé.

1.5 But du travail

Avant d'entrer dans le vif du sujet, il convient de replacer cette étude dans son contexte. Le mutant 530, portant une construction RNA-i l'empêchant d'exprimer l'oxydase alternative mitochondriale, présente un phénotype possédant des similitudes avec celui du mutant *Stm6* (Kruse, 2005), qui a été décrit comme un super producteur d'hydrogène. Parmi les ressemblances entre les deux souches, on observe une accumulation accrue d'amidon (Mathy *et al.* (2010); Kruse (2005)) et une capacité réduite de réaliser les transitions d'état. Ces deux phénotypes ont été mis en avant par Kruse (2005), en combinaison avec d'autres phénotypes comme une consommation d'oxygène plus importante, comme explication de la capacité supérieure de production d'hydrogène de *Stm6*.

Le laboratoire de biochimie végétale a voulu comparer la capacité de production d'hydrogène de la souche 530 avec une souche témoin par le procédé décrit par Melis *et al.* (2000) qui consiste à induire l'anaérobiose dans une culture d'algue par un passage en milieu carencé en S. Étant donné que Baurain *et al.* (2003) ont montré que l'AOX est exprimée en présence de NO₃⁻, l'expérience s'est déroulée dans un milieu contenant du NO₃⁻ comme source d'azote afin d'accentuer les possibles différences phénotypiques entre la souche mutante et la souche contrôle.

Cependant, l'expérience ne s'est pas déroulée comme attendu dans la mesure où, suite à la carence en S, les cultures ne sont pas tombées en anoxie et donc ne produisaient pas d'hydrogène. Suite à cette observation, une première caractérisation du déclin des performances photosynthétiques a permis de mettre en évidence des différences de vitesse de réponse à la carence en S en fonction de la source d'azote (NH₄⁺ ou NO₃⁻) et de la souche utilisée (T2 ou 530) (Ghysels, Mignolet, Franck, communication personnelle).

Le but de ce travail est d'analyser de manière plus approfondie la réponse photosynthétique à la

1 Introduction

carence en S chez la souche contrôle T2 et chez le mutant 530 dans des milieux contenant soit du NH_4^+ ou du NO_3^- comme source d'azote.

Matériel et méthodes

2 Matériel et méthodes

2.1 Souches

L'étude porte sur les souches suivantes :

- La souche 25 : souche sans paroi dérivée de la souche cw15 (Davies et Plaskitt, 1971).
- La souche 530 : souche mutante RNAi n'exprimant pas l'oxydase alternative mitochondriale (AOX) caractérisée par Mathy *et al.* (2010).
- La souche T2 : souche témoin de la souche 530.

2.2 Milieux de culture

Les milieux de culture sont stérilisés par autoclavage pendant 25 minutes à 120°C. Ils peuvent être solidifiés par ajout d'agar bactériologique (Merck) à une concentration de 15g/l.

- Tris Acétate Phosphate NH₄ (**TAP NH₄**) : milieu ajusté à pH 7 par ajout d'acide acétique glacial. Celui-ci contient donc une source de carbone organique assimilable par les algues . La source d'azote est du NH₄Cl (Gorman et Levine, 1966).
- Tris Acétate Phosphate NO₃ (**TAP NO₃**) : milieu de composition identique excepté que la source d'azote est ici NaNO₃ et non du NH₄Cl.
- Tris Acétate Phosphate NH₄ sans soufre (**TAP NH₄ -S**) : variante du TAP NH₄ sans soufre.
- Tris Acétate Phosphate NO₃ sans soufre (**TAP NO₃ -S**) : variante du TAP NO₃ sans soufre.

2.3 Conditions de culture

Les cultures de Chlamydomonas sont agitées par un agitateur rotatif à une température de 25°C sous une lumière (Philips master tl5 HO 54w) d'intensité égale à 50 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$. La densité cellulaire est déterminée par comptage des cellules dans un volume connu grâce à la cellule de Thomas après ajout de KIO₃ afin d'immobiliser les algues.

2.4 Dosage des chlorophylles

Un volume de culture de 1 ml est prélevé puis centrifugé à 16000 g. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans du méthanol 100%, de l'éthanol 95% ou de l'acétone 80%. Un spectrophotomètre Lambda 20 UV/VIS (Perkin Elmer) est utilisé afin de déterminer la concentration en chlorophylle selon les formules de Lichtenthaler (1987).

2.5 Mesure du paramètre ψ PSII

La fluorescence est mesurée grâce à un fluorimètre MKII (Hansatech Instruments) à 25°C. Celui ci se compose d'une cuvette de 2ml pour y injecter les algues, d'une lumière modulée analytique (pulses de

1 μs) servant à exciter la chlorophylle sans induire de transport d'électrons mesurable, d'un détecteur ne mesurant que la partie modulée du signal et d'une lumière saturante donnée sous forme d'éclairs de 1 seconde ($3000 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$) permettant de mesurer Fm. Le protocole de l'expérience est le suivant : Les algues sont au préalable réadaptées à l'obscurité sur un agitateur magnétique pendant deux heures puis un volume de culture de 2 ml d'une concentration en Chl de 5 $\mu\text{g/ml}$ est placé dans la cuvette et la fluorescence est mesurée à l'obscurité durant un laps de temps de 3,4 minutes, ensuite les algues sont illuminées à $50 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durant 6,8 minutes. Les données sont extraites de l'appareil grâce au logiciel OMS de la marque Hansatech puis traitées grâce à un script en langage de programmation R écrit par Pierre Tocquin (ptocquin@ulg.ac.be) et modifié en partie par moi-même afin qu'il corresponde à mes besoins. La version du script utilisée pour traiter les données est la 0.0.4.5. Ces traitements nous permettent de déterminer le paramètre ψPSII .

2.6 Spectroscopie de fluorescence à basse température

Les spectres de fluorescence à basse température (77K) sont réalisés sur des suspensions d'algues congelées dans l'azote liquide à l'aide d'un spectrofluorimètre LS 50B (Perkin Elmer). La longueur d'onde d'excitation est de 440 nm. Un filtre bleu à large bande (corning CS 4-96) est placé entre la source et l'échantillon et un filtre rouge passe-haut (Schott RG 630) est placé entre l'échantillon et le détecteur, afin de minimiser la lumière parasite. Les largeurs des fentes d'excitation et d'émission sont de 10 nm et 5 nm, respectivement. Les spectres sont normalisés en fixant à 1 l'amplitude du signal d'émission de fluorescence à 685 nm.

2.7 Mesure des échanges d'oxygène

La respiration et la photosynthèse sont mesurées par polarographie grâce à une électrode de Clark (Chlorolab, Hansatech Instruments) à 25°C. L'électrode est calibrée chaque jour à l'aide de dithionite de sodium. Un volume de deux ml de culture d'algues adaptées à l'obscurité durant deux heures et de concentration en chlorophylle de 5 $\mu\text{g/ml}$ est placé dans la cuvette. La vitesse de respiration est déterminée à l'obscurité durant un laps de temps de 3,4 minutes, ensuite les algues sont illuminées à $50 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durant 6,8 minutes afin de stimuler la photosynthèse et la vitesse de cette dernière est déterminée par un éclaircissement à $400 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$ durant 6,8 minutes. Les données sont extraites de l'appareil grâce au logiciel OMS de la marque Hansatech et traitées grâce au script utilisé pour mesurer les paramètres de fluorescence. Le script calcule la vitesse d'échange d' O_2 à la fin de chaque période et la divise par la concentration en chlorophylle, les vitesses s'expriment alors en $\mu\text{mol O}_2.\text{g Chl}^{-1}.\text{s}^{-1}$.

2.8 Analyse de l'abondance en protéines

L'analyse de l'abondance des protéines s'est faite selon le protocole de l'anticorps Anti-PsaB d'AGRI-SERA :

Les échantillons sont congelés dans l'azote liquide immédiatement après avoir été prélevés puis sont resuspendus dans un tampon d'extraction composé de Tris HCl (pH 8,5) 245 mM ; EDTA 0,5 mM ; LDS 2% ; glycérol 10% ; Pefabloc SC 0,1mg/ml (inhibiteur de protéase de la marque ROCHE). Les échantillons sont ensuite plongés dans l'azote liquide puis soniqués et replongés dans l'azote liquide.

Une deuxième sonication est réalisée puis les échantillons sont centrifugés et les surnageants récupérés afin d'éliminer le matériel insoluble. La concentration en Chl est ensuite déterminée dans chaque échantillon. Le volume correspondant à 0,25 µg de Chl est mélangé à du bleu de chargement (Tris HCl pH 6,8 : 60 g/l; glycérol 50% v/v; SDS 10%; bromophénol) et du DTT 50 mM. Les protéines sont ensuite séparées sur un gel SDS-page à gradient d'acrylamide 6-12% (Lonza) par une migration à 120 volts dans du tampon AccuGENE (Lonza). Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le "PageRuler Plus Prestained Protein Ladder" (Fermentas).

Après la migration, les protéines sont transférées sur une membrane PVDF par l'application d'un champ électrique de 30 V durant une nuit. Le transfert est réalisé en plaçant une éponge, un papier Wathmann absorbant, le gel, la membrane, un papier Wathmann et finalement une éponge dans une cuve contenant le tampon de transfert (Tris 3g/l; glycine 14,4g/l; méthanol 20% v/v). Après transfert, les membranes sont lavées 2 x 5 min dans l'eau puis placées dans une solution de blocage (PBS 1x; Tween 20 0,05%; BSA 5%) durant 2h. Les anticorps primaires sont ajoutés et l'hybridation se déroule durant 1h. Les membranes sont ensuite lavées 3 x 10 min dans la solution de blocage puis l'anticorps secondaire est ajouté et l'hybridation se déroule durant 1h. Les membranes sont lavées 3 x 10 min dans la solution de blocage. La membrane est révélée grâce à l'ajout de NBT BCIP pendant 10 min. La phosphatase alcaline présente sur les anticorps secondaires précipite le NBT BCIP, laissant apparaître des bandes là où se trouvent nos protéines. La membrane est lavée à l'eau pour arrêter la réaction. Tous les anticorps utilisés durant cette étude sont de marque AGRISERA excepté l'anticorps anti-AOX qui est un don du Dr. S. Merchant (UCLA, USA).

Dilutions utilisées pour les anticorps : Anti-PsaB 1/10000 ; Anti-RbcL 1/5000 ; Anti-PsbC 1/3000 ; Anti-PsbA 1/5000 ; Anti-Cyt f 1/5000 ; Anti-AOX 1/54000 ; Anti-goat 1/5000 ; Anti-rabbit 1/5000

Les quantifications de l'intensité des bandes révélées sur les western blots ont été effectuées selon <http://www.lukemiller.org/journal/2007/08/quantifying-western-blots-without.html>.

2.9 Analyse des pigments

Un échantillon de 1 ml de culture d'algue est prélevé et centrifugé 5 minutes à 13000 g. Le surnageant est éliminé et le culot est resuspendu dans du méthanol 100%. 200 µl d'extrait sont soumis à une chromatographie liquide à haute performance. L'appareillage comprend une pompe 616, un échantillonneur automatique 717plus et un spectrophotomètre à barrette de diodes en ligne 996 (Waters). Une colonne XTerra MS C18 5µm (Waters) est utilisée pour la séparation. Les pigments sont élués pendant 2 minutes dans 100% de solvant B (méthanol : acétate d'ammonium 0,5M 80 : 20 pH 7), ensuite pendant 20 minutes dans un gradient de 100% de solvant C (acétonitrile : eau 90 : 10) à 31% de C et 69% de solvant D (éthyl acétate) et enfin pendant 3 minutes dans un gradient du dernier mélange à 100% de solvant A. La vitesse du flux est de 1ml.min⁻¹. L'acquisition et le traitement des données sont effectués par le logiciel Empower Pro (Waters).

2.10 Courbes de montée rapide de fluorescence

Les courbes de montée rapide de fluorescence sont réalisées à l'aide d'un fluorimètre Aquapen AP100 (Photons Systems Instruments). Un échantillon de 100µl de culture d'algues à environ 10 µg Chl/ml est dilué dans 1500 µl de milieu obtenu par centrifugation d'un petit volume de culture, et ce afin de ne pas saturer le fluorimètre tout en ne modifiant pas le milieu. Des moyennes entre plusieurs courbes

sont réalisées afin d'atténuer le bruit de fond. Les données sont ensuite extraites de l'appareil grâce au logiciel Fluorpen (Photons Systems Instruments).

2.11 Dosage d'amidon

Le dosage de l'amidon est effectué par la méthode de Dubois *et al.* (1956). Le principe de cette méthode est d'hydrolyser les sucres avec de l'acide sulfurique. La fonction aldéhyde libérée peut alors réagir avec du phénol pour former un composé coloré. L'absorbance à 485 nm est ensuite mesurée et comparée à un standard afin de déterminer la concentration en sucre dans l'échantillon récolté.

L'absorbance à 750 nm est mesurée sur un échantillon de culture de 2 ml à l'aide d'un spectrophotomètre Lambda 20 UV/VIS (Perkin Elmer). Cette méthode dose les sucres, les sucres méthylés et les polysaccharides mais étant donné que l'accumulation de sucres de réserve chez *Chlamydomonas* se fait principalement sous forme d'amidon, nous dosons ici principalement l'amidon.

2.12 Mesure des capacités des deux voies de la respiration

La respiration et la photosynthèse sont mesurées par polarographie grâce à une électrode de Clark (Chlorolab, Hansatech Instruments). L'électrode est calibrée chaque jour à l'aide de dithionite de sodium. Un volume de deux ml de culture d'algues adaptées à l'obscurité durant deux heures et de concentration en chlorophylle de 10 µg/ml est placé dans la cuvette. L'antimycine A 2,5µM dans de l'éthanol (concentration finale = 0,4% v/v) est utilisée comme inhibiteur du complexe III mitochondrial (voie des cytochromes). L'acide salicylhydroxamique (SHAM) 1mM dans du méthanol (concentration finale = 0,4% v/v) est utilisé comme inhibiteur de l'AOX (voie alternative).

La capacité apparente de la voie des cytochromes correspond à la vitesse de la prise d'oxygène inhibée par l'antimycine A après l'addition de SHAM. La capacité apparente de la voie alternative correspond à la vitesse de la prise d'oxygène inhibée par le SHAM après l'addition l'antimycine A.

Résultats

3 Résultats

3.1 Étude des capacités photosynthétiques

3.1.1 Analyse des variations du rendement de fluorescence causées par une transition obscurité-lumière

Nous avons débuté cette étude par une analyse de la fluorescence de la chl *a* au PAM. Nous avons suivi l'induction de la photosynthèse d'une suspension d'algues adaptées à l'obscurité lors d'une exposition à une intensité lumineuse de 50 $\mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$. Celle-ci correspond à l'intensité lumineuse à laquelle les algues étaient exposées lors de leur culture.

Habituellement, après une période d'obscurité, l'induction de la photosynthèse (voir flèche sur la figure 20) se traduit par une montée de la fluorescence F_t , due à une réduction graduelle des PQ, suivie par une baisse de F_t , marquant une ré-oxydation des PQ, vers un équilibre dynamique qu'on appelle steady-state. Cette montée transitoire de la fluorescence, qu'on appelle aussi 'effet Kautsky' est considérée comme révélatrice d'un délai entre l'accumulation d'équivalents réducteurs et leur utilisation par la phase sombre pour la fixation du CO_2 . Ce délai est la conséquence du fait que les enzymes du cycle de Calvin sont dans un état inactif à l'obscurité et nécessitent une activation par la lumière, activation qui est relativement lente par rapport aux réactions de la phase claire. L'accumulation transitoire d'équivalents réducteurs limite la disponibilité en NADP^+ comme accepteur d'électrons de la chaîne. Dès lors, la chaîne de transport d'électrons se réduit au début de l'éclaircissement et F_t augmente. Par la suite, l'activation du cycle de Calvin a pour effet de ré-oxyder en partie la chaîne de transport d'électrons et fait baisser F_t .

La comparaison de la forme de cette induction entre les différentes conditions (figure 20) au cours de la carence montre certaines différences.

La figure 20a montre qu'avant carence en S, les courbes de fluorescence obtenues dans les cas de T2 NH_4^+ et de 530 NH_4^+ sont superposables, ce qui signifie que ces cultures réagissent de la même façon à la lumière. Ce résultat contraste avec les cas de T2 NO_3^- et 530 NO_3^- (figure 20c) où l'on observe que les courbes de fluorescence ne se superposent pas lorsqu'on compare le type sauvage (T2) au mutant (530). Ces résultats semblent logiques étant donné qu'AOX est exprimée en présence de NO_3^- mais pas de NH_4^+ (Baurain *et al.*, 2003). Dès lors, la souche 530 ne montre un phénotype particulier qu'en présence de NO_3^- .

Après 24 heures en carence en S (figure 20b), les courbes de fluorescence des souches en NH_4^+ ne se superposent plus, ce qui indique l'apparition d'une différence phénotypique pour la souche 530 alors que, chez le type sauvage (T2), l'AOX est réputée n'être exprimée que sur NO_3^- . Cela suggère que la carence en S elle-même stimule l'expression de AOX.

Dans le cas de T2 NH_4^+ , on observe surtout l'absence du profil de la forme Kautsky, signature de l'activation du cycle de Calvin, 24 heures après carence en S. Au lieu de la fluctuation typique, on constate plutôt une augmentation graduelle de F_t jusqu'au niveau steady-state. Une explication à cette observation pourrait être que le cycle de Calvin reste inactif, dès lors les équivalents réducteurs ne

3 Résultats

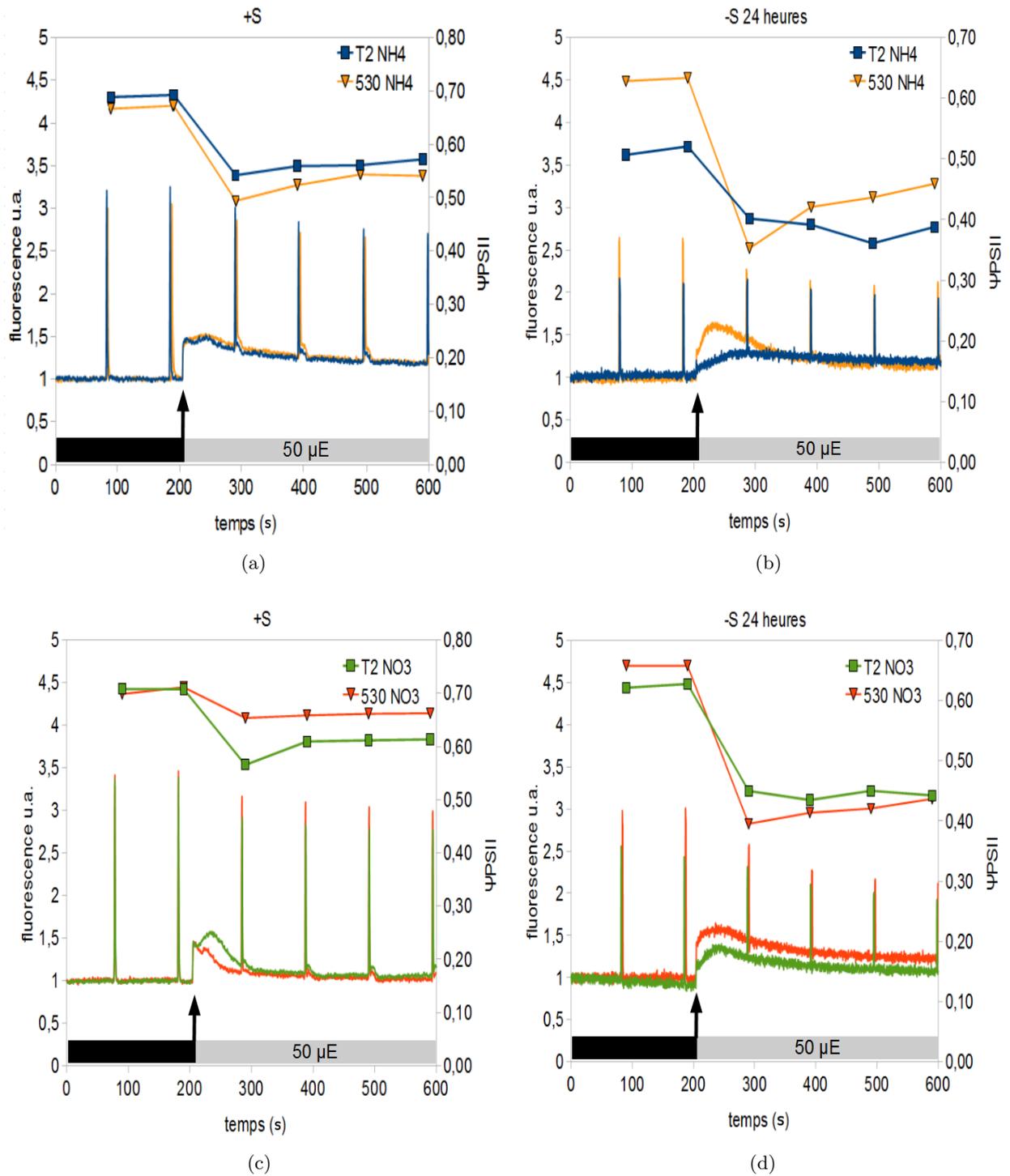


FIGURE 20: Changements du rendement de fluorescence et du rendement photochimique du PSII lors d'une transition de l'obscurité à la lumière ($50 \mu\text{mol photons}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$). (a) T2 NH₄⁺ et 530 NH₄⁺ en milieu non-carencé (b) après 24 heures de carence en S (c) T2 NO₃⁻ et 530 NO₃⁻ en milieu non-carencé (d) après 24 heures de carence en S. Axe y principal : rendement de fluorescence. Axe y secondaire : ψ_{PSII} calculé à partir des rendements de fluorescence obtenus avant et pendant les éclairs saturants (apparaissant comme des traits verticaux dans les enregistrements). Ces résultats sont ceux obtenus lors d'une expérience. Une répétition a donné des résultats similaires.

seraient pas utilisés dans la phase sombre mais par d'autres voies auxiliaires comme la chlororespiration. Ceci contraste avec les courbes de fluorescence obtenues dans les cas de T2 NO_3^- , 530 NO_3^- et 530 NH_4^+ qui montrent toujours la signature Kautsky 24 heures après carence en S.

3.1.2 Évolution du rendement photochimique du PSII (ψPSII)

La figure 20 montre également l'évolution de ψPSII , le rendement photochimique du PSII, au cours des 24 premières heures de la carence en S. Ces valeurs de ψPSII sont calculées à partir des variations de fluorescence causées par des éclairs saturants superposés à la lumière actinique dans les mêmes expériences (apparaissant comme des traits verticaux dans la figure).

Avant carence, le ψPSII à l'obscurité ($\psi\text{PSII}_{\text{dark}} = \frac{F_v}{F_m}$) ne dépend ni de la souche ni de la source d'azote, avec une valeur avoisinant 0,7, ce qui est une valeur commune pour des algues en bonne condition. Sous une lumière actinique de $50 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$, les souches T2 et 530 montrent également des valeurs de ψPSII ($\psi\text{PSII}_{\text{light}}$) proches l'une de l'autre sur NH_4^+ . Par contre, sur NO_3^- , les deux souches se distinguent avant carence par des valeurs de $\psi\text{PSII}_{\text{light}}$ différentes. Cette différence est conforme au fait que l'expression d'AOX est stimulée par le NO_3^- mais pas par le NH_4^+ . On constate que la valeur du $\psi\text{PSII}_{\text{light}}$ de la souche 530 est plus faible que celui de la souche T2. Cela pourrait être lié au fait que la souche 530 possède une capacité réduite à réaliser les transitions d'état en présence de NO_3^- (résultats du laboratoire non publiés).

24 heures après carence en S en milieu NH_4^+ , le ψPSII de la souche 530 est supérieur à celui de la souche T2 aussi bien à l'obscurité qu'à la lumière. Comme l'expression de l'AOX n'est pas stimulée par le NH_4^+ , cette différence phénotypique entre la souche T2 et la souche 530 après carence en S semble indiquer encore une fois que la carence en S stimule l'expression de l'AOX chez le type sauvage.

3.1.3 Évolution du rendement photochimique maximum du PSII (F_v/F_m) au cours de la carence en S

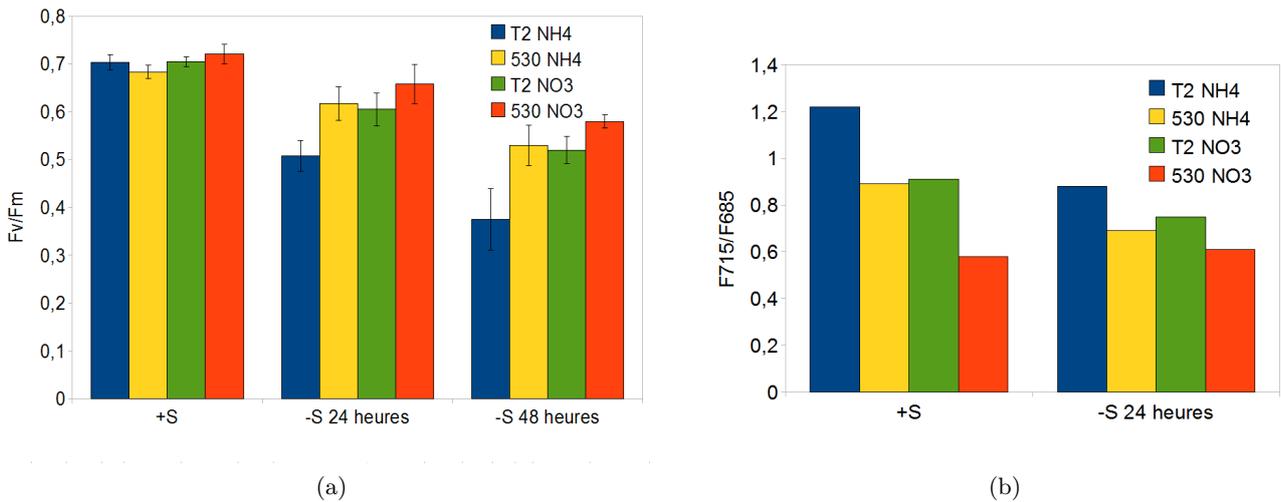


FIGURE 21: (a) Évolution du rendement photochimique maximal du PSII ($\psi\text{PSII}_{\text{dark}} = F_v/F_m$) au cours des 48 premières heures de la carence en S chez la souche contrôle (T2) et la souche 530, en condition NH_4^+ ou NO_3^- . Ce résultat est la moyenne de cinq expériences. (b) Évolution du rapport $\frac{F_{715}}{F_{685}}$ au cours des 24 premières heures de la carence en S.

Nous avons ensuite analysé de manière plus approfondie l'évolution du paramètre $\psi\text{PSII}_{\text{dark}}$ ($\frac{F_v}{F_m}$) en calculant des moyennes sur cinq expériences différentes de carence en S. Une chute de $\frac{F_v}{F_m}$ traduit

une baisse de la capacité photochimique du PSII généralement due à une photoinhibition. La figure 21a nous montre qu'avant carence, les quatre cas sont caractérisés par une valeur de $\frac{F_v}{F_m}$ égale à 0,7. D'une manière générale, le rapport $\frac{F_v}{F_m}$ chute au cours de la carence en S. La cinétique d'évolution de ce rapport semble similaire pour les cas 530 NH₄⁺, 530 NO₃⁻ et T2 NO₃⁻ tandis que la souche T2 en NH₄⁺ contraste avec les autres conditions par une chute beaucoup plus marquée de $\frac{F_v}{F_m}$ au cours de la carence en S.

3.1.4 Spectres à basse température

Finazzi *et al.* (1999) ont montré qu'une transition d'état vers l'état II peut mener à une chute du rapport $\frac{F_v}{F_m}$. Afin de déterminer si la chute de $\frac{F_v}{F_m}$ lors de la carence en S observée ci-dessus peut être expliquée par des différences dues à des transitions d'état, nous avons procédé à une analyse des spectres de fluorescence de la Chl *a* à 77 K. Pour cela, les spectres ont été analysés sur des suspensions d'algues adaptées à l'obscurité, dans les mêmes conditions que pour les mesures du rapport $\frac{F_v}{F_m}$.

Sous excitation dans le bleu (440 nm), le spectre d'émission de fluorescence à basse température (77K) montre deux bandes situées à 685 et 715 nm, qui correspondent à la fluorescence émise par la Chl *a* du PSII et du PSI, respectivement. Le rapport d'intensité de ces deux bandes ($\frac{F_{715}}{F_{685}}$) est donc indicateur de l'état de distribution de l'énergie d'excitation entre les photosystèmes : A l'état I, ce rapport est plus faible qu'à l'état II.

La figure 21b montre qu'en milieu non-carencé, la distribution de l'énergie d'excitation varie en fonction de la source d'azote ainsi qu'entre le type sauvage et le mutant. Les résultats obtenus ici confirment ceux obtenus précédemment au laboratoire (Franck, résultats non publiés). Après 24 heures de carence en S, nous observons que le rapport $\frac{F_{715}}{F_{685}}$ des échantillons adaptés à l'obscurité a diminué par rapport aux échantillons non carencés, excepté dans le cas de 530 NO₃⁻ où ce rapport a augmenté très légèrement. Ceci indique que les algues se rapprochent de l'état I après 24h de carence en S, excepté dans le cas de 530 NO₃⁻ où elles semblent légèrement plus à l'état II.

La comparaison de l'évolution du rapport $\frac{F_{715}}{F_{685}}$ avec celle du rapport $\frac{F_v}{F_m}$ au cours de la carence en S montre que la chute de $\frac{F_v}{F_m}$ n'est pas due à une transition d'état. En effet, seule une transition vers l'état II peut mener à une chute de ce rapport or on constate que les algues évoluent plutôt vers l'état I. La chute du rapport $\frac{F_v}{F_m}$ au cours de la carence en S doit donc être due à une photoinhibition.

Nous pouvons dès lors affirmer qu'au cours de la carence en S, le type sauvage (T2) sur NH₄⁺ subit une photoinhibition plus forte par rapport au même type sauvage sur NO₃⁻ ou par rapport à la souche mutante quelle que soit la source d'azote.

3.1.5 Photosynthèse et respiration

Nous avons voulu déterminer la capacité de production d'oxygène photosynthétique des différentes conditions au cours de la carence en S. Pour ce faire, la vitesse d'échange d'oxygène à l'obscurité est mesurée, ce qui permet de déterminer d'abord la respiration (R). Ensuite la vitesse d'échange d'oxygène à 50 µmol photons.m⁻².s⁻¹ est mesurée, ce qui permet de déterminer la photosynthèse nette (P_N). Cette intensité lumineuse a été choisie car elle correspond aux conditions de culture des algues, ce qui permet de faire un parallèle entre l'évolution de la production d'oxygène et les autres résultats présentés dans cette étude. La photosynthèse brute (P_B) est calculée de la sorte :

$$P_B = P_N - R$$

Cependant, après 24 heures de carence en S, la production photosynthétique d'oxygène est faible pour toutes les conditions et compense à peine la respiration. Dès lors, les vitesses d'échange d'oxygène mesurées à l'électrode de Clark ont des valeurs proches de 0 et sont difficiles à estimer précisément. Les valeurs d'écart-type étaient élevées après regroupement des valeurs de différentes expériences, ce qui a rendu impossible la mise en évidence de différences entre les souches et conditions.

3.1.6 Abondance de protéines clés du cycle de Calvin, du PSI et du PSII

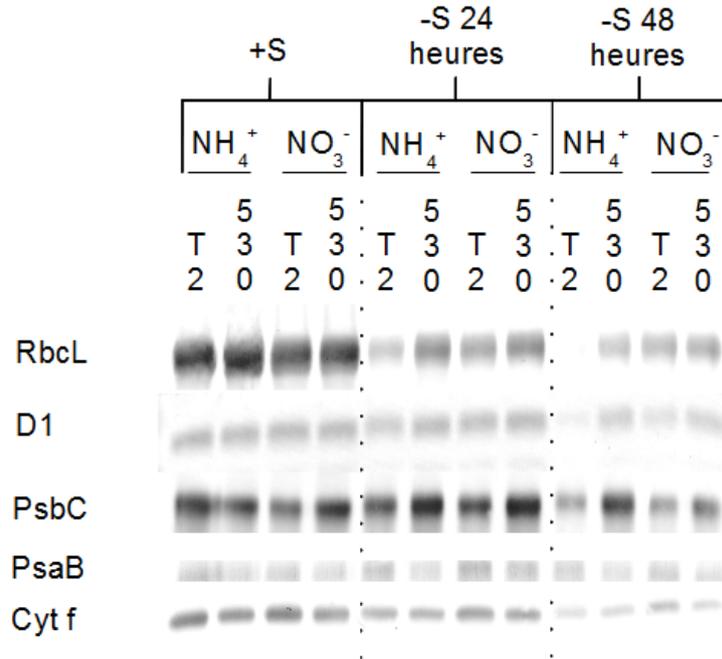


FIGURE 22: Évolution de l'abondance des protéines RbcL (grosse sous-unité de la Rubisco), de D1 (sous-unité du PSII), de PsbC (sous-unité du PSI), de PsaB (sous-unité du PSII) et du cyt f (cytochrome f) au cours des 48 premières heures de la carence en S.

Afin de mesurer l'impact de la carence en S sur l'abondance de protéines clés de la photosynthèse, nous avons réalisé des western blots de la protéine RbcL (grosse sous-unité de la Rubisco : 52,3 kDa), de D1 (sous-unité du PSII : 38 kDa), de PsbC (sous-unité du PSII : 44 kDa), de PsaB (sous-unité du PSI : 82,5 kDa) et du cytochrome f (34 kDa). Pour cela, des échantillons de cultures non carencés et carencés ont été prélevés et analysés.

La figure 22 montre qu'avant carence en S, l'abondance de RbcL, de D1, de PsbC et du Cyt f est similaire dans les quatre cas. L'abondance de PsaB semble légèrement inférieure chez la souche 530 que ce soit en NH₄⁺ ou en NO₃⁻.

D'une manière générale, l'abondance de RbcL, de D1 et du Cyt f baisse durant la carence en S tandis que l'abondance de PsaB et de PsbC varie également mais dans des proportions moins importantes. Cependant, la cinétique de la diminution de D1 et de RbcL est différente selon les cas. La chute rapide de RbcL (Rubisco) dans le cas de T2 NH₄⁺ et sa disparition après 48 heures de carence est en accord avec les observations de Zhang *et al.* (2002). L'observation la plus frappante est que la chute d'abondance de RbcL dans les autres cas est beaucoup moins importante que pour le cas T2 NH₄⁺ surtout dans les cultures en NO₃⁻ où on détecte encore des quantités importantes de la protéine après 48 heures de carence.

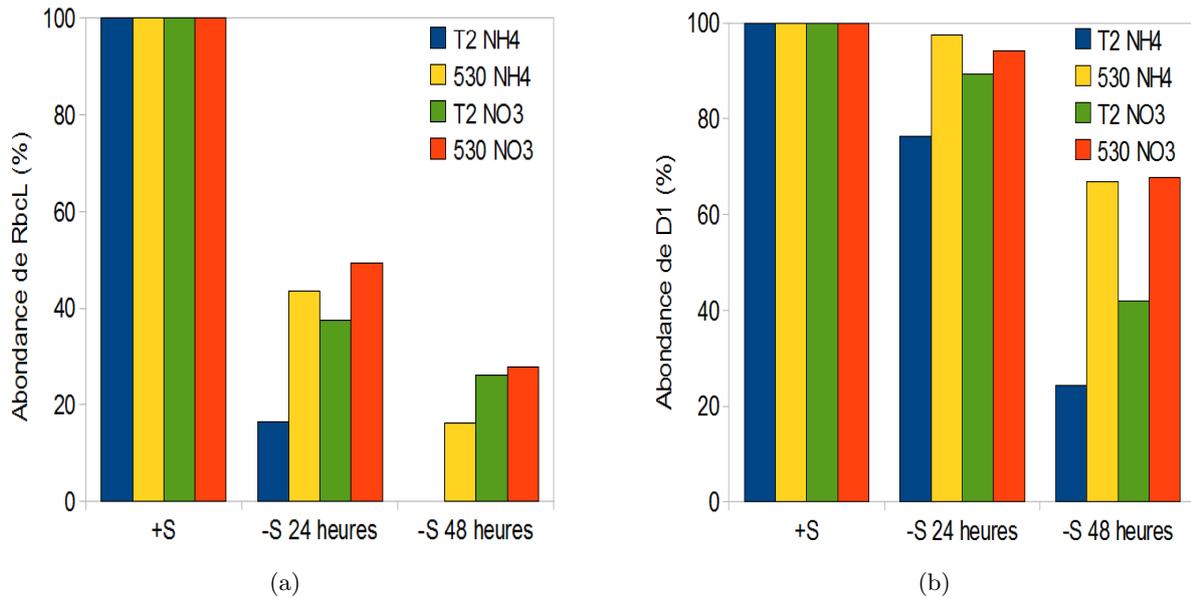


FIGURE 23: Quantification de l'abondance de (a) RbcL et (b) D1 à partir des western blots de la figure 22. Les résultats sont normalisés par rapport à la valeur d'abondance de chaque cas avant carence.

Le profil de la chute de D1 est similaire à celui de RbcL (figure 23) mais l'amplitude des variations est moins spectaculaire. Ceci est aussi en accord avec les observations de Zhang *et al.* (2002). Comme pour RbcL, nous observons également une chute plus rapide de D1 dans le cas T2 NH_4^+ que dans les trois autres cas. Notons aussi que, sur NO_3^- , la souche T2 montre une chute plus marquée de D1 que la souche 530.

Le niveau de PsbC varie peu au cours de la carence en S mais on constate une baisse plus marquée chez la souche T2.

L'abondance de PsaB ne varie pas excepté dans la condition 530 NH_4^+ où on observe une légère baisse au cours de la carence en S.

La diminution d'abondance du Cyt f est marquante surtout après 48 heures en carence en S. Elle est plus marquée dans les conditions NH_4^+ que dans les conditions NO_3^- .

3.1.7 Analyse des pigments

Nous avons procédé à une analyse des pigments par chromatographie liquide à haute performance afin de déterminer l'état de dé-époxydation des xanthophylles au cours de la carence en S. Une augmentation de l'indice de dé-époxydation $\frac{(A+Z)}{(V+A+Z)}$ traduit généralement une réponse à un stress, entraînant une augmentation de l'efficacité de la dissipation d'énergie d'excitation sous forme de chaleur. La figure 24 montre ce rapport au cours des 48 premières heures de la carence en S.

Avant carence, l'indice de dé-époxydation est similaire dans les deux souches et sur les deux sources d'azote, tandis qu'après 24h de carence en S, la situation est différente. L'observation la plus marquante est que l'indice de dé-époxydation augmente sensiblement dès 24h de carence dans le cas de T2 NH_4^+ alors qu'il ne varie pas significativement dans les trois autres cas. Entre 24 et 48 heures, le rapport $\frac{(A+Z)}{(V+A+Z)}$ n'a plus augmenté dans le cas de T2 NH_4^+ tandis qu'il a augmenté sensiblement dans les trois autres conditions. L'indice de dé-époxydation des xanthophylles semble donc évoluer plus rapidement dans le cas T2 NH_4^+ que dans les trois autres cas au cours de la carence en S. Ceci est à mettre en parallèle avec les changements plus rapides et/ou plus marqués constatés dans le cas de T2 sur

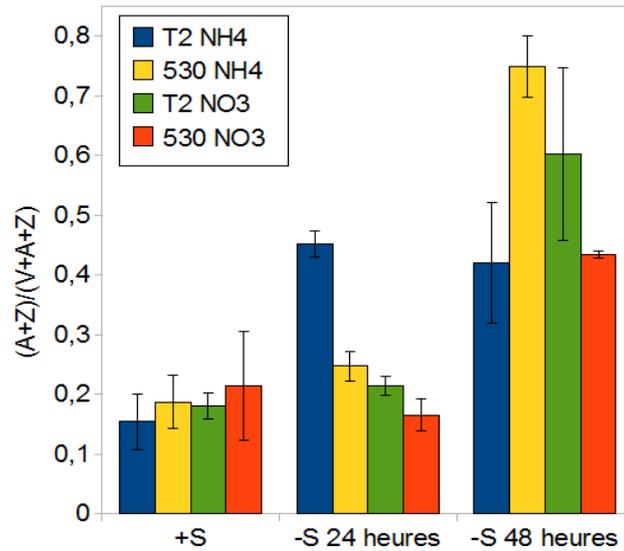


FIGURE 24: Évolution de l'indice de dé-époxydation des xanthophylles ($\frac{(A+Z)}{(V+A+Z)}$) au cours des 48 premières heures de la carence en S. V : violaxanthine ; A : anthéroxanthine ; Z : zéaxanthine. Ce résultat est la moyenne de deux expériences.

NH_4^+ lors des mesures fonctionnelles ainsi que lors des mesures d'abondance de RbcL et de D1 réalisées ci-dessus.

3.1.8 Courbes de montée rapide de fluorescence lors d'un éclair saturant

3.1.8.1 Mise au point : détermination de la partie purement photochimique de la phase initiale (OJ) de la courbe de montée de fluorescence

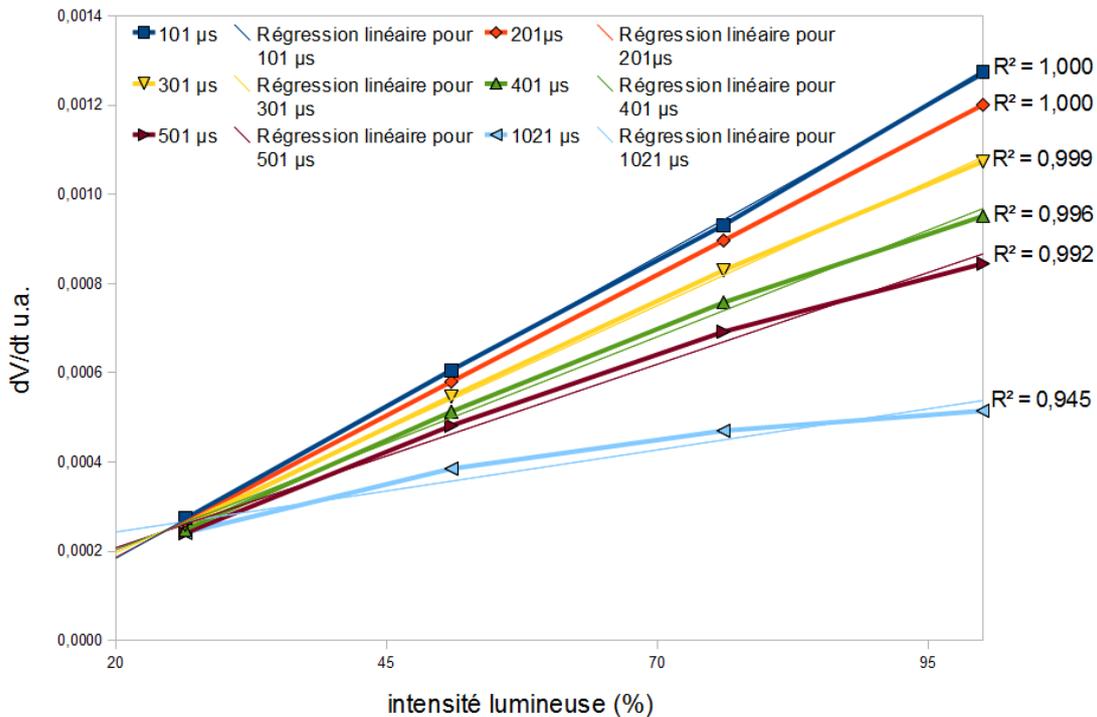


FIGURE 25: Dépendance de la vitesse de montée de fluorescence au début d'un éclair saturant, calculée à différents moments de la phase initiale OJ, en fonction de l'intensité lumineuse. L'intensité lumineuse à 100% correspond à $3000 \mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$.

Comme nous l'avons vu dans l'introduction, l'exposition de microalgues à un éclair de lumière saturante cause une montée rapide de la fluorescence du PSII. Cette montée de fluorescence est polyphasique, avec au moins deux points d'inflexion J et I, entre le minimum O (correspondant à F_o) et le maximum P (correspondant à F_m). La phase OJ des courbes OJIP est généralement qualifiée de phase photochimique, c'est-à-dire qu'elle traduit la séparation de charges dans le centre réactionnel du PSII. Par opposition, les phases qui suivent (J-I-P) sont qualifiées de thermiques car elles traduisent le transfert des électrons au-delà de l'accepteur endogène du centre, Q_A , transfert qui est dépendant de processus d'échanges et de diffusion de transporteurs membranaires (tels que le pool de PQ), et sont donc influencées par la température. Il est donc en principe possible d'obtenir des informations sur la photochimie des PSII fonctionnels (depuis l'absorption de lumière jusque la réduction de l'accepteur endogène Q_A) en analysant la vitesse de montée de la fluorescence dans la phase OJ. Cependant, il est vraisemblable que l'affirmation selon laquelle la phase OJ ait un caractère photochimique dans son entièreté est exagérée. En effet, l'inflexion J traduit une réoxydation transitoire de Q_A par les accepteurs secondaires. La fin de la phase OJ ne peut donc être purement photochimique. Afin de pouvoir ultérieurement utiliser la courbe de montée de fluorescence pour étudier le fonctionnement photochimique du PSII, nous avons donc dû déterminer la partie purement photochimique de la phase OJ. Par définition, la partie photochimique sera celle qui montrera une réponse linéaire vis-à-vis de l'intensité lumineuse, en termes de vitesse d'augmentation.

Nous avons donc enregistré les courbes OJIP d'une souche sauvage (souche 25 cultivée sur TAP) sous différentes intensités d'excitation (de 750 à 3000 $\mu\text{mol photons.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), toutes saturantes (permettant d'atteindre le rendement maximum de fluorescence F_m). Pour comparer les courbes entre elles, il est nécessaire de normaliser les montées de fluorescence obtenues à différentes intensités d'excitation. Pour ce faire, nous avons ramené la différence entre la fluorescence au temps t (F_t) et la fluorescence initiale (F_o) à la fluorescence variable totale ($F_m - F_o$). V_t est la fluorescence au temps t, normalisée de cette façon (Strasser *et al.*, 1995) :

$$V_t = \frac{F_t - F_o}{F_m - F_o}$$

Comme on le voit, cette normalisation nécessite la détermination correcte de la fluorescence initiale F_o . Or, l'allumage de la source lumineuse de l'appareil de mesure n'est pas instantané. Dès lors, on ne peut prendre en compte que les points mesurés après que la lumière excitatrice soit à son intensité maximale et on ne connaît donc pas la valeur exacte de F_o .

Pour contourner cette difficulté, nous avons procédé de deux manières.

1. Dans une première approche, nous avons remplacé F_o par sa valeur relativement à F_m : $F_o = \frac{F_m}{4,02}$. Le coefficient de 4,02 a été établi expérimentalement à partir de courbes de montée enregistrées à la plus basse intensité lumineuse (25 %, soit 750 $\mu\text{mol photon.m}^{-2}.\text{s}^{-1}$), condition pour laquelle la valeur expérimentale de F_o se rapproche le plus de la valeur réelle (la montée de fluorescence étant négligeable pendant le temps d'allumage des diodes).

$$V_t = \frac{F_t - (F_m/4,02)}{F_m - (F_m/4,02)}$$

2. Une autre approche a consisté à utiliser, pour la normalisation de la fluorescence, une valeur de F_o estimée grâce à une régression linéaire sur les 10 premiers points utilisables de la courbe (après le temps d'allumage des diodes).

Les deux approches ont donné des résultats identiques. La figure 25 montre la variation de $\frac{V_t}{t}$ en fonction de l'intensité lumineuse pour différentes valeurs de t , allant de 101 à 1021 μs , c'est-à-dire à différents moments de la phase OJ qui dure à peu près 1000 μs . Cette figure montre que, jusqu'à 301 μs , la vitesse de montée de fluorescence augmente linéairement avec l'intensité lumineuse. Après ce laps de temps, la courbe de tendance ne forme plus une droite et nous pouvons en conclure que d'autres facteurs que la photochimie interviennent. Cette mise au point permet de s'assurer que l'on peut utiliser la montée initiale de la courbe, jusqu'à 300 μs , comme indicateur des réactions qui ont lieu dans le PSII entre l'absorption de lumière et la réduction de Q_A .

3.1.8.2 Effet de la carence en soufre et de la source d'azote sur la montée initiale de la fluorescence chez le type contrôle et chez le mutant 530

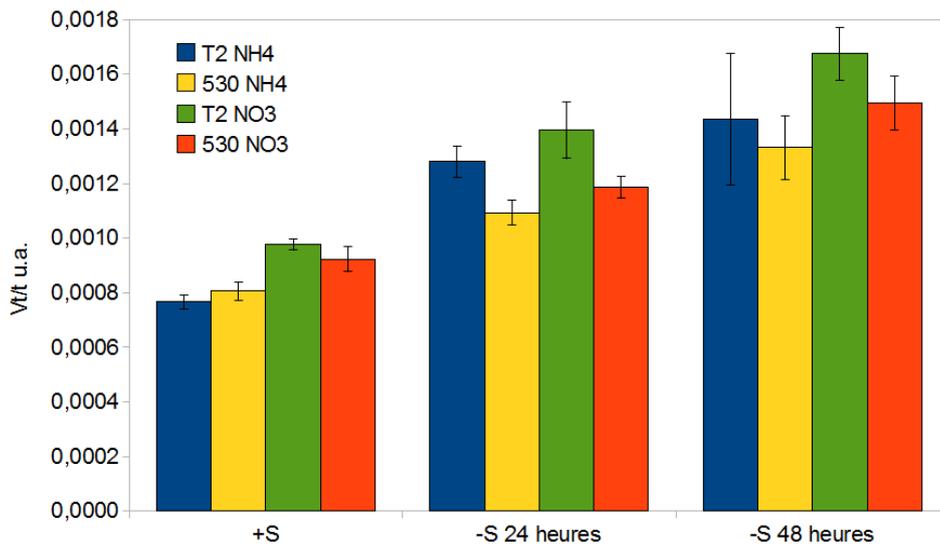


FIGURE 26: Évolution de la vitesse de montée de fluorescence à 301 μs au cours des 48 premières heures de la carence en S chez la souche contrôle (T2) et la souche 530, en condition NH_4^+ ou NO_3^- . Ce résultat est la moyenne de deux expériences.

Nous avons procédé à des mesures de la montée de fluorescence au cours de la carence en S. La figure 26 nous montre qu'en condition non carencée, la vitesse de montée à 301 μs des algues cultivées en NH_4^+ est plus faible que celle des algues cultivées en NO_3^- .

D'une manière générale, la vitesse initiale de montée de fluorescence pendant la phase photochimique augmente graduellement au cours des 48 premières heures de la carence en S. Dans le cas de T2 NH_4^+ , cependant, le changement semble plus rapide. En effet, après 24 heures en carence en S, on remarque que la vitesse de montée de fluorescence à 301 μs a proportionnellement augmenté davantage dans ce cas que dans les autres. Ceci montre encore une fois que la souche sauvage cultivée sur NH_4^+ semble la plus rapidement affectée par la carence en S. D'autre part, on observe d'une manière générale que la vitesse de montée de fluorescence est plus rapide chez la souche T2 que chez la souche 530.

Après 48 heures, les tendances sont identiques mais l'écart-type important nous empêche d'identifier clairement des différences entre les différents cas.

3.2 Étude de la production d'amidon

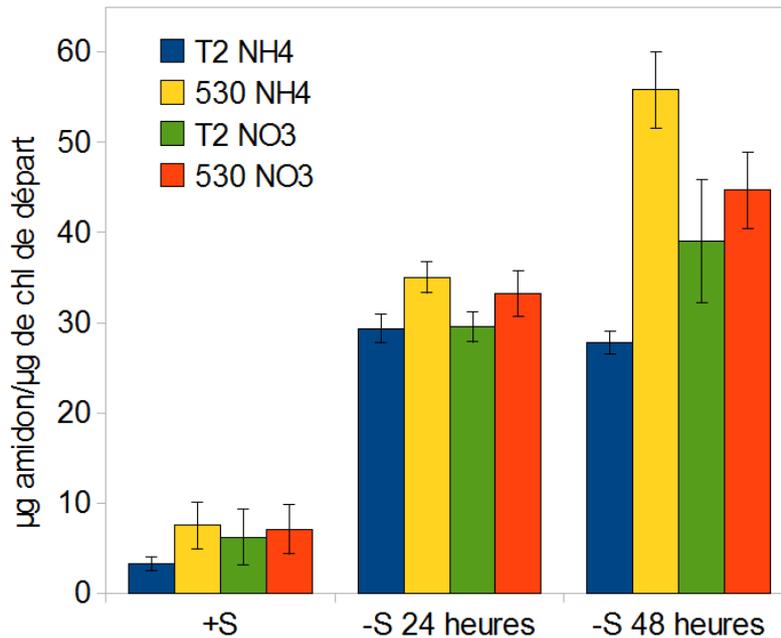


FIGURE 27: Évolution de la quantité d'amidon normalisée sur la concentration en chlorophylle de départ au cours des premières 48 heures de la carence en S. Cette expérience est la moyenne de deux expériences différentes.

La carence en S induit un arrêt du cycle cellulaire accompagné d'une accumulation massive d'amidon (Melis *et al.*, 2000). D'après les observations décrites dans la littérature, cette accumulation s'arrête entre 24h et 48h de carence, probablement à cause d'un arrêt de l'assimilation du CO_2 par la photosynthèse. La figure 27 montre l'évolution de la teneur en amidon au cours des 48 heures de carence en S chez les souches T2 et 530 en présence de NH_4^+ ou de NO_3^- . Les teneurs en amidon sont normalisées sur la concentration en chlorophylle des cultures au moment de la mise en carence.

De manière générale, la concentration en amidon augmente dans toutes les cas au cours des 24 premières heures de la carence en S. Cependant, on constate que la souche T2 en NH_4^+ cesse d'accumuler de l'amidon après 24 heures, contrairement aux cultures 530 NH_4^+ , T2 NO_3^- et 530 NO_3^- pour lesquelles l'accumulation d'amidon continue entre 24 et 48 heures. L'arrêt de l'accumulation après 24h de carence en S chez T2 NH_4^+ correspond aux observations décrites dans la littérature (Melis *et al.*, 2000). Notons aussi la corrélation avec les résultats des western blots, qui montrent une dégradation totale de RbcL (sous-unité de la Rubisco) entre 24 heures et 48 heures de carence en S chez T2 en NH_4^+ . Il semble évident qu'une dégradation de RbcL cause l'arrêt de l'assimilation de CO_2 et compromet ainsi l'accumulation d'amidon. D'un autre côté, chez les cultures 530 NH_4^+ , T2 NO_3^- et 530 NO_3^- , les western blots suggèrent le maintien d'une partie des complexes Rubisco après 48h de carence en S, ce qui leur permettrait de poursuivre l'assimilation du CO_2 et donc, l'accumulation d'amidon.

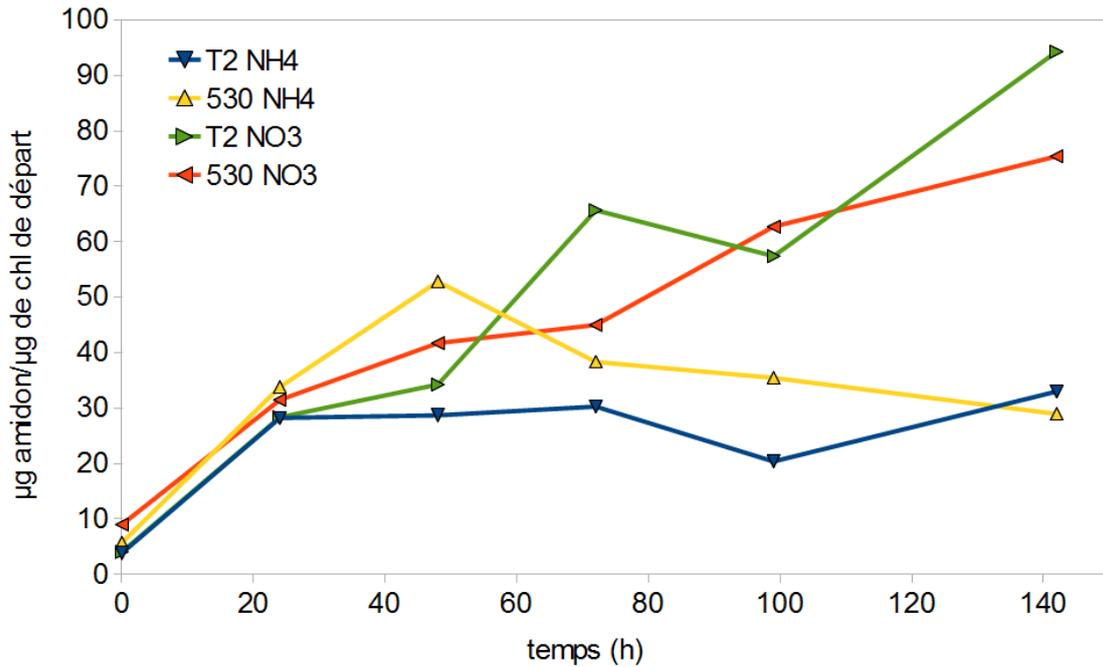


FIGURE 28: Évolution de la quantité d'amidon normalisée sur la concentration en chlorophylle de départ au cours des sept premiers jours de la carence en S.

Nous avons aussi étudié l'accumulation d'amidon à plus long terme. La figure 28 montre l'accumulation d'amidon normalisée sur la concentration en chlorophylle de départ au cours d'une carence en S de sept jours. Les différences en concentration en amidon observées entre la souche 530 et T2 au cours des 48 heures de la carence s'estompent à plus long terme pour laisser place à une différence flagrante entre les algues cultivées en NO_3^- ou en NH_4^+ . A long terme, les cultures cultivées en NO_3^- accumulent plus de deux fois plus d'amidon que les cultures cultivées en NH_4^+ .

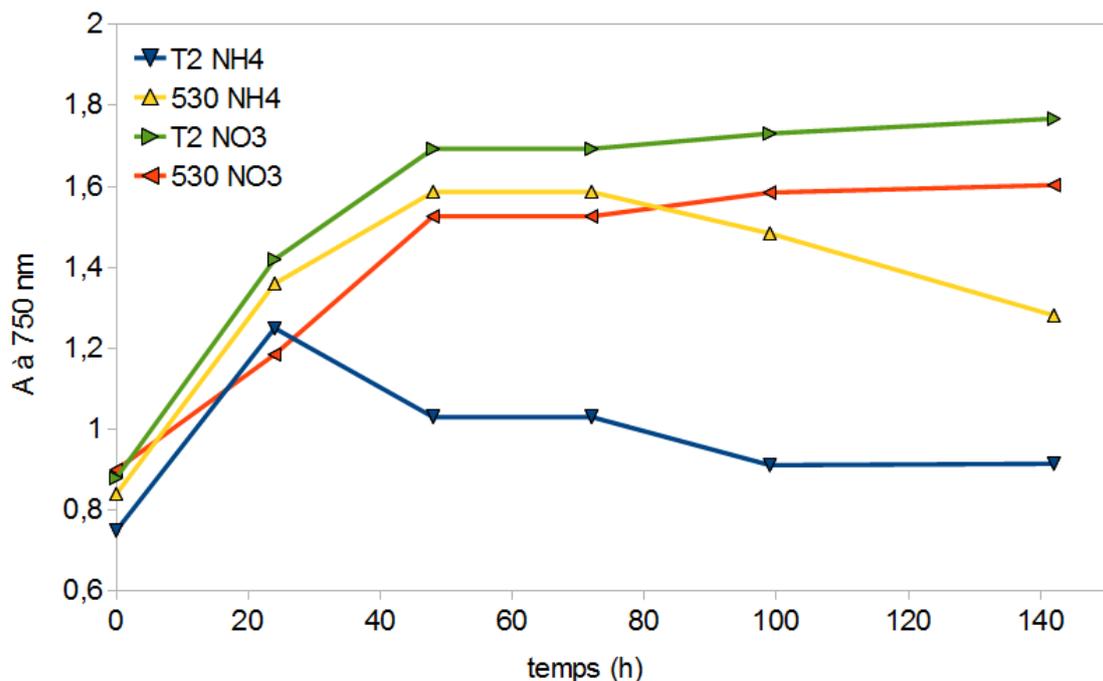


FIGURE 29: Évolution de l'absorbance à 750 nm au cours des sept premiers jours de la carence en S.

Afin de déterminer si l'accumulation d'amidon s'accompagne d'une augmentation de biomasse, nous

avons parallèlement étudié l'évolution de l'absorbance à 750 nm au cours de cette expérience. Il a été montré que l'absorbance à 750 nm varie linéairement avec la concentration en biomasse des cultures de *Chlamydomonas reinhardtii* (Sager et Granick, 1953). Effectivement, durant les premières 48 heures de carence, l'absorbance à 750 nm suit la tendance de la teneur en amidon. On observe donc que les cas 530 NH_4^+ , T2 NO_3^- et 530 NO_3^- accumulent de la biomasse durant les 48 premières heures de la carence en S tandis que la souche T2 en NH_4^+ n'accumule de la biomasse que pendant les premières 24 heures de la carence en S.

Cependant, on constate qu'après 48h la biomasse et l'amidon évoluent de manière divergente. Il est surprenant d'observer qu'après 48 heures en carence en S, la biomasse des cultures T2 et 530 en présence de NO_3^- n'évolue plus alors que leur niveau d'amidon qui continue à monter progressivement jusqu'à la fin de l'expérience (7 jours en carence).

Notons aussi que dans les cultures T2 et 530 en présence de NH_4^+ , l'accumulation de biomasse est suivie par un déclin alors que dans les cultures en NO_3^- , elle est suivie par une stabilisation.

3.3 Étude de l'implication de l'oxydase alternative mitochondriale

3.3.1 Mesure des capacités apparentes de la voie des cytochromes et de la voie alternative

	capacité apparente de la voie de l'oxydase alternative <i>in vivo</i>			capacité apparente de la voie des cytochromes <i>in vivo</i>		
	+S	-S 24 heures	-S 48 heures	+S	-S 24 heures	-S 48 heures
T2 NH_4^+	19 %	59 %	58 %	82 %	79 %	63 %
530 NH_4^+	2 %	3 %	4 %	90 %	75 %	60 %
T2 NO_3^-	64 %	74 %	104 %	77 %	75 %	46 %
530 NO_3^-	6 %	12 %	0 %	90 %	68 %	50 %

TABLE 1: Évolution de la capacité apparente *in vivo* de la voie alternative et de la voie des cytochromes au cours des 48 premières heures de la carence en S chez la souche contrôle (T2) et la souche 530, en condition NH_4^+ ou NO_3^- . Valeurs exprimées en % de la respiration mesurée sans ajout d'inhibiteur.

La table 1 montre l'évolution de la capacité apparente, *in vivo*, de la voie alternative et de la voie des cytochromes au cours de la carence en S. Chez la souche T2, on observe qu'avant carence, la capacité de la voie alternative est plus importante en NO_3^- , ce qui est en accord avec Baurain *et al.* (2003).

Ensuite, nous constatons qu'une forte augmentation de la voie AOX est induite par la carence en S chez la souche T2 (en NH_4^+ aussi bien qu'en NO_3^-) parallèlement à une baisse de la capacité de la voie des cytochromes.

La souche 530 figure comme témoin négatif dans les mesures de capacité de la voie AOX car elle n'exprime pas l'AOX. Néanmoins, on observe une légère capacité résiduelle apparente de la voie al-

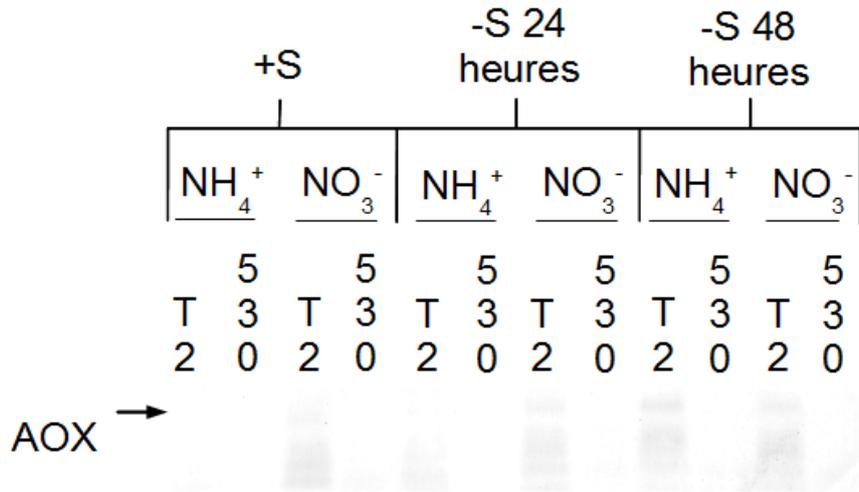


FIGURE 30: Évolution de l'abondance de l'oxydase alternative au cours des 48 premières heures de la carence en S.

ternative chez cette souche. Ceci pourrait être dû au fait que le SHAM peut, dans une faible mesure, inhiber PTOX, ce qui expliquerait la légère baisse de la vitesse de prise d'oxygène après son ajout chez cette souche.

D'une manière générale, la voie alternative est induite par la carence en S chez la souche T2 mais reste plus importante en NO_3^- qu'en NH_4^+ .

3.3.2 Abondance de la protéine AOX

Afin de compléter les mesures de capacité apparente de la voie AOX, nous avons analysé l'abondance de la protéine AOX (36 kDa) au cours de la carence en S. La figure 30 montre que chez la souche 530, l'AOX n'est pas exprimée, ce qui est conforme aux résultats attendus. En ce qui concerne la souche T2, on observe qu'en condition non carencée, l'AOX est exprimée uniquement en présence de NO_3^- , un résultat conforme à la littérature (Baurain *et al.*, 2003).

Cependant, on constate que l'expression d'AOX est aussi induite par la carence en S et pour cela, ne nécessite pas la présence de NO_3^- . En NH_4^+ , 48h de carence en S induisent une expression de l'AOX à un niveau équivalent à celle induite par le NO_3^- . De plus, les effets du NO_3^- et de la carence en S semblent cumulatifs car on observe également une stimulation de l'expression de l'AOX par la carence en S en NO_3^- .

Nous pouvons donc conclure que l'augmentation de la capacité apparente de la voie AOX en carence en S est le résultat d'une augmentation de l'expression de l'AOX. Ce résultat explique aussi pourquoi les phénotypes des souches T2 et 530, qui sont vraisemblablement identiques quand les algues sont cultivées en présence de NH_4^+ , divergent au cours de la carence en S en présence de NH_4^+ .

Discussion

4 Discussion

Les réponses à la carence en soufre chez *Chlamydomonas reinhardtii* ont été abondamment étudiées, principalement parce que la stratégie actuelle de production d'hydrogène par cette algue fait intervenir une carence en soufre afin de limiter la production d'oxygène photosynthétique, et permettre ainsi le passage en anoxie. Nous avons étudié les réponses photosynthétiques à la carence en soufre d'une lignée RNA-i (souche 530) n'exprimant pas l'oxydase alternative mitochondriale (AOX) et d'une souche témoin (souche T2), dans des milieux où l'azote est fourni soit sous forme d'ammonium, soit sous forme de nitrate. La situation habituellement décrite dans la littérature est celle de la souche témoin en présence d'ammonium .

Nos différentes observations sont reprises ci-dessous :

Après 24 heures de carence en soufre, les enregistrements des variations de fluorescence de la Chl *a* pendant l'induction de la photosynthèse montrent, chez la souche témoin, une forte altération de la fluctuation typique (effet Kautsky), qui reflète normalement l'activation du cycle de Calvin. Cet effet de la carence n'est observé, à ce stade, ni chez la souche témoin en présence de nitrate ni chez la souche AOX⁻ quelle que soit la source d'azote. Ceci indique que la carence en soufre entraîne une inhibition rapide (dans les 24 premières heures de carence) du cycle de Calvin chez la souche témoin cultivé en présence de nitrate, mais pas dans les autres cas étudiés.

Conformément aux résultats obtenus par Wykoff *et al.* (1998), nous avons observé une photoinhibition progressive du PSII au cours de la carence en soufre. Cette photoinhibition est signalée par une baisse du rendement photochimique du PSII à l'obscurité (ψ PSII_{dark}). Cependant, la souche témoin, quand elle est cultivée sur ammonium, se distingue clairement par une chute plus rapide de ce rendement au cours de la carence.

Par western blot, nous avons pu confirmer que la carence en soufre conduit de manière générale à une baisse de l'abondance de certaines protéines impliquées dans la photosynthèse. Similairement aux observations décrites dans la littérature, nous avons constaté que cette baisse est particulièrement marquée en ce qui concerne la grande sous-unité de la Rubisco (RbcL) et la sous-unité D1 du PSII Zhang *et al.* (2002). Chez la souche témoin sur ammonium, nous avons observé une chute de RbcL de 80% après 24 heures de carence. Cette protéine disparaît totalement après 48 heures. Le déclin de RbcL est accompagné par une chute de D1 de 20% après 24 heures et de 35% après 48 heures. Ces 'cinétiques' sont similaires à celles rapportées par Zhang *et al.* (2002). En bonne concordance avec les analyses fonctionnelles de la photosynthèse par fluorescence, nous avons observé pour les deux protéines des baisses de niveau nettement moins importantes dans les trois autres cas (souche témoin sur nitrate et souche AOX⁻ sur nitrate ou ammonium). Dans ces trois cas, un niveau significatif de la protéine RbcL a été détecté même après 48 heures de carence.

Nous avons aussi montré que la carence en soufre entraîne une dé-époxydation des xanthophylles, ce qui n'a pas été rapporté antérieurement. D'après les nombreux travaux sur la fonction du cycle des xanthophylles, cette dé-époxydation est favorisée par un gradient électrochimique transmembranaire important et devrait entraîner la dissipation d'énergie lumineuse excédentaire sous forme de chaleur

(Young *et al.*, 1997). Similairement aux autres observations, ce changement se produit avec une cinétique plus rapide pour la souche témoin sur ammonium (avec une dé-époxydation dès 24 heures de carence) que dans les trois autres cas (dé-époxydation détectable seulement après 48 heures).

Les mesures de vitesse de montée initiale de la fluorescence lors d'un éclair saturant ont montré que la vitesse initiale de montée de fluorescence augmente au cours de la carence en soufre dans les quatre cas étudiés. Ceci peut être la conséquence combinée de trois phénomènes : une transition de l'état de distribution de l'énergie d'excitation vers l'état I (augmentation de la section optique du PSII), une baisse de coopérativité des PSII (Joliot et Joliot, 1964) ou encore un dysfonctionnement du système d'oxydation de l'eau OEC (Strasser, 1997). Notre étude met évidence qu'une transition vers l'état I se produit effectivement au cours de la carence en soufre mais nous ne pouvons exclure que les deux autres modifications mentionnées ci-dessus se produisent également.

Nos résultats de suivi de la teneur en amidon lors de la carence en soufre s'inscrivent dans la ligne des observations décrites dans la littérature (Melis *et al.*, 2000) en ce qui concerne les 24 premières heures de la carence. Nous avons confirmé que celles si sont marquées par un stockage massif d'amidon. Néanmoins, nous avons pu constater une différence concernant cette accumulation d'amidon entre la souche témoin sur ammonium et les trois autres cas, de manière analogue avec les observations précédentes. Ici, la différence se situe dans la durée d'accumulation. En effet, on constate un arrêt de l'accumulation d'amidon après 24 heures de carence chez le témoin sur ammonium, conforme aux observations décrites dans la littérature, tandis que dans les trois autres cas l'amidon continue à s'accumuler entre 24 et 48 heures de carence. A plus long terme, nous avons observé qu'en présence de nitrate, les souches témoin et AOX⁻ poursuivent leur accumulation d'amidon durant sept jours de carence en soufre alors que l'accumulation s'arrête après 48 heures pour la souche AOX⁻ cultivée sur ammonium.

Nous avons également constaté que l'accumulation d'amidon au début de la carence se traduit par une augmentation de biomasse. A plus long terme, l'accumulation d'amidon, lorsqu'elle se poursuit, ne conduit pas à une augmentation supplémentaire de biomasse. Ceci pourrait indiquer que à ce stade de la carence, l'accumulation d'amidon est contrebalancée par une perte de la masse protéique.

Par western blot nous avons pu confirmer qu'en condition non carencée l'AOX n'est exprimée de manière importante qu'en présence de nitrate (Baurain *et al.*, 2003). Dans ce sens, nous avons aussi observé que la capacité apparente de la voie alternative de la respiration est trois fois plus importante sur nitrate que sur ammonium. Notre étude révèle en outre que l'expression de l'AOX est fortement induite par une carence en soufre, ce qui provoque l'augmentation de la capacité apparente de la voie alternative.

Dans l'ensemble, ces études nous ont permis d'énoncer les conclusions suivantes :

Nous avons confirmé que le déclin des fonctions photosynthétiques suite à une carence en soufre se marque par une dégradation massive de RbcL entraînant non seulement un arrêt de l'accumulation d'amidon après 24h de carence mais aussi une photoinhibition du PSII provoquée vraisemblablement par un baisse d'efficacité du cycle de remplacement de la protéine D1. Ces observations ont été faites avec la souche témoin sur ammonium, ce qui correspond au cas habituellement analysé dans ce type d'étude.

Par ailleurs, nous avons constaté que la cinétique (vitesse et amplitude) du déclin des paramètres photosynthétiques au cours de la carence est influencée par la source d'azote dans le milieu, la présence de nitrate ralentissant la régression de certaines fonctions de la photosynthèse, ainsi que par l'absence de l'AOX, qui a pour effet de ralentir d'une manière similaire la chute de certaines fonctions de la

photosynthèse. Ces deux points sont discutés plus en détail dans ce qui suit.

Effet de la source d'azote sur la réponse photosynthétique à la carence en S

Au cours de la carence en soufre, nous observons que, chez la souche témoin, la photoinhibition est moins rapide sur nitrate que sur ammonium. Nous pensons que l'assimilation du nitrate pourrait agir comme un puits d'électrons suffisant pour consommer en partie le pouvoir réducteur généré en excès par la photosynthèse. Cela permettrait d'oxyder en partie la chaîne de transport d'électron et ralentirait l'apparition de la photoinhibition. Cela expliquerait pourquoi on observe une cinétique de baisse de D1 moins rapide sur nitrate que sur ammonium mais cela n'expliquerait pas pourquoi le niveau de la protéine RbcL est maintenu à un niveau supérieur sur nitrate.

Influence de l'oxydase alternative mitochondriale sur la réponse photosynthétique à la carence en S

En principe, l'absence de l'AOX serait dommageable pour la cellule. En effet, la carence en soufre provoquerait l'accumulation d'équivalents réducteurs dans la cellule, équivalents réducteurs qui seraient ensuite consommés par les NAD(P)H déshydrogénases de la chaîne de transport d'électrons mitochondriale. Ceci entraînerait une sur-réduction de cette chaîne de transport d'électrons. L'oxydase alternative peut jouer un rôle protecteur en réoxydant en partie le pool d'ubiquinones, ce qui a pour effet de prévenir la formation de ROS (Vanlerberghe et McIntosh, 1997).

Cependant, nos observations contrastent avec ce raisonnement car, en ce qui concerne le fonctionnement de la photosynthèse, le mutant déficient en AOX semble plutôt protégé contre les effets dommageables de la carence en soufre.

L'effet protecteur de l'absence de l'AOX pourrait être expliqué de plusieurs façons :

1. Le mutant AOX⁻ semble adapté au stress oxydatif consécutif à l'absence de l'AOX. En effet, Mathy *et al.* (2010) ont observé une up-régulation des enzymes impliquées dans la dégradation des ROS chez ce mutant. On peut émettre l'hypothèse que le stress oxydatif provoqué par la carence en soufre serait ainsi mieux contrôlé par la souche AOX⁻ que par la souche témoin.
2. Mathy *et al.* (2010) ont également remarqué une up-régulation de l'anhydrase carbonique mitochondriale chez la souche AOX⁻. Cette caractéristique serait une adaptation vis-à-vis de la diminution de la production de CO₂ consécutive à la baisse d'activité du cycle de Krebs également observée chez ce mutant. Or, il est vraisemblable que la carence en soufre entraîne une réduction de l'activité du cycle TCA et donc de la production de CO₂. Dans ce cas, les mécanismes de concentration du CO₂ observés chez la souche AOX⁻ pourraient permettre à la cellule de compenser la diminution de la concentration intra-cellulaire en CO₂ et permettre le maintien du bon fonctionnement du cycle de Calvin. Dans le cas de la souche témoin, le manque de CO₂ entraînerait une chute de l'activité photosynthétique et menerait à une photoinhibition. Cela présupposerait évidemment que la réponse à l'absence d'AOX se manifeste sur ammonium, puisque nous observons une altération de la réponse à la carence en soufre même dans cette condition. Cependant, nous avons conclu plusieurs fois dans cette étude à la non-expression de l'AOX en milieu NH₄⁺ non carencé. Mais nous avons quand-même mis en évidence une capacité apparente non négligeable de la voie alternative dans cette situation chez la souche témoin et non chez la souche mutante. Il paraît donc vraisemblable que les deux souches diffèrent en ce qui concerne l'expression d'AOX, même sur ammonium. Nous devons donc en conclure que la voie

alternative est au moins partiellement induite sur ammonium, bien que les western blots n'aient pas permis de détecter AOX dans ce cas. Cela peut être dû à des concentrations en protéines encore trop faibles.

Influence de la source d'azote sur l'accumulation d'amidon

Selon nos recherches bibliographiques, l'effet de la source d'azote lors d'une carence en soufre n'a jamais été étudié.

D'une manière générale, l'assimilation d'azote et de soufre sont très liées, Prosser *et al.* (2001) ont montré que la carence en soufre inhibe en partie l'assimilation du nitrate chez l'épinard (*Spinacea oleracea*). Dès lors, on pourrait assister à une double carence dans le cas où les algues sont cultivées en absence de soufre sur nitrate. Dans cette situation, la cellule induirait la dégradation des protéines non-essentiels afin de remobiliser l'azote. Le carbone résultant de cette dégradation serait alors converti en amidon. Ceci permettrait d'expliquer l'accumulation supérieure d'amidon observée au terme de sept jours de la carence en soufre lorsque les algues sont cultivées sur nitrate. Bien entendu, cette tentative d'interprétation des résultats n'est que spéculation et devrait être confirmée expérimentalement.

Perspectives

Nous pensons qu'il serait intéressant de compléter ce travail par une étude de la viabilité cellulaire au cours de la carence en soufre. En effet, au cours de nos manipulations, nous avons constaté que le surnageant de certaines cultures après centrifugation n'était pas limpide et qu'une quantité non négligeable de chlorophylle y était présente. Ces effets étaient visibles surtout dans les cas de la souche témoin sur nitrate et dans le cas de la souche AOX⁻ indépendamment de la source d'azote. Ceci pourrait être expliqué par la lyse d'une partie des cellules.

Zhang *et al.* (2002) et Melis *et al.* (2000) ont montré que la production d'hydrogène est accompagnée d'une chute de la teneur en amidon après qu'il ait été accumulé lors de la carence en soufre. Ils en ont conclu que le pouvoir réducteur pour la production d'hydrogène proviendrait en partie de la consommation des réserves d'amidon. Notre étude a été réalisée dans des cultures ouvertes en présence d'oxygène, condition qui ne permet pas l'induction de l'hydrogénase. L'évolution de la teneur en amidon de la souche témoin sur ammonium montre que celle-ci reste stable 24 heures après carence, ce qui conforte les conclusions de Zhang *et al.* (2002) et Melis *et al.* (2000) dans la mesure où, dans notre cas, l'hydrogénase n'est pas en mesure de consommer l'amidon. Dans cette optique, l'observation selon laquelle l'accumulation d'amidon se poursuit pendant sept jours de carence en soufre dans les souches cultivées sur nitrate est une piste intéressante en vue d'augmenter le rendement de production d'hydrogène.

Bibliographie

- Abe, J., T. Kubo, Y. Takagi, T. Saito, K. Miura, H. Fukuzawa, and Y. Matsuda (2004, November). The transcriptional program of synchronous gametogenesis in *chlamydomonas reinhardtii*. *Current Genetics* 46(5), 304–315.
- Allen, J. (1992). Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta* (1098), 275–335.
- Anwaruzzaman, M., B. L. Chin, X. Li, M. Lohr, D. A. Martinez, and K. K. Niyogi (2004, December). Genomic analysis of mutants affecting xanthophyll biosynthesis and regulation of photosynthetic light harvesting in *chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynthesis Research* 82(3), 265–276.
- Arnon, D. I. and R. K. Chain (1975). Regulation of ferredoxin-catalyzed photosynthetic phosphorylations. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 72(12), 4961–4965.
- Arnon, D. I., H. Y. Tsujimoto, and B. D. Mcswain (1967, May). Ferredoxin and photosynthetic phosphorylation. *Nature* (5088), 562–566.
- Barthelemy, X., R. Popovic, and F. Franck (1997). Studies on the O-J-I-P transient of chlorophyll fluorescence in relation to photosystem II assembly and heterogeneity in plastids of greening barley. *Journal of Photochemistry and Photobiology B : Biology* 39(3), 213–218.
- Baurain, D., M. Dinant, N. Coosemans, and R. F. Matagne (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 physiology* 131(3), 1418.
- Bennoun, P. (1982). Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 79(14), 4352–4356.
- Bilger, W. and O. Bjorkman (1994, March). Relationships among violaxanthin deepoxidation, thylakoid membrane conformation, and nonphotochemical chlorophyll fluorescence quenching in leaves of cotton (*Gossypium hirsutum* L.). *Planta* 193(2), 238–246.
- Bonaventura, C. and J. Myers (1969, December). Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 189(3), 366–383.
- Cardol, P., J. Alric, J. Girard-Bascou, F. Franck, F. Wollman, and G. Finazzi (2009). Impaired respiration discloses the physiological significance of state transitions in *chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 106(37), 15979–15984.
- Cardol, P., G. Gloire, M. Havaux, C. Remacle, R. Matagne, and F. Franck (2003). Photosynthesis and state transitions in mitochondrial mutants of *chlamydomonas reinhardtii* affected in respiration 1. *Plant Physiology* 133(4), 2010–2020.

- Casano, L. M., J. M. Zapata, M. Martin, and B. Sabater (2000). Chlororespiration and poisoning of cyclic electron transport. *Journal of Biological Chemistry* 275(2), 942–948.
- Cournac, L., K. Redding, J. Ravenel, D. Rumeau, E. Josse, M. Kuntz, and G. Peltier (2000). Electron flow between photosystem II and oxygen in chloroplasts of photosystem i-deficient algae is mediated by a quinol oxidase involved in chlororespiration. *Journal of Biological Chemistry* 275(23), 17256–17262.
- Davies, D. R. and A. Plaskitt (1971). Genetical and structural analyses of Cell-Wall formation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Genetics Research* 17(01), 33–43.
- Davies, J. P., F. Yildiz, and A. R. Grossman (1994). Mutants of *Chlamydomonas* with aberrant responses to sulfur deprivation. *The Plant Cell* 6(1), 53–63.
- Delosme, R. (1967). Etude de l'induction de fluorescence des algues vertes et des chloroplastes au début d'une illumination intense. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 143(1), 108–128.
- Depege, N., S. Bellaïf, and J. Rochaix (2003, March). Role of chloroplast protein kinase stt7 in LHCII phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science* 299(5612), 1572–1575.
- Desplats, C., F. Mus, S. Cuiñé, E. Billon, L. Cournac, and G. Peltier (2009, February). Characterization of *nda2*, a plastoquinone-reducing type II NAD(P)H dehydrogenase in *Chlamydomonas* chloroplasts. *The Journal of Biological Chemistry* 284(7), 4148–57.
- Dubois, M., K. A. Gilles, J. K. Hamilton, P. A. Rebers, and F. Smith (1956, March). Colorimetric method for determination of sugars and related substances. *Analytical Chemistry* 28(3), 350–356.
- Finazzi, G., A. Furia, R. P. Barbagallo, and G. Forti (1999). State transitions, cyclic and linear electron transport and photophosphorylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Bioenergetics* 1413(3), 117–129.
- Fuhrmann, M., A. Stahlberg, E. Govorunova, S. Rank, and P. Hegemann (2001). The abundant retinal protein of the *Chlamydomonas* eye is not the photoreceptor for phototaxis and photophobic responses. *Journal of Cell Science* 114(21), 3857.
- Gonzalez-Ballester, D., S. V. Pollock, W. Pootakham, and A. R. Grossman (2008, May). The central role of a SNRK2 kinase in sulfur deprivation responses. *Plant Physiol.* 147(1), 216–227.
- Gorman, D. S. and R. P. Levine (1966). Cytochrome f and plastocyanin : their sequence in the photosynthetic electron transport chain. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 54.
- Govindje, E. (1995). Sixty-Three years since Kautsky : Chlorophyll a fluorescence. *Functional Plant Biol.* 22(2), 131–160.
- Gérin, S., G. Mathy, A. Blomme, F. Franck, and F. E. Sluse (2010). Plasticity of the mitoproteome to nitrogen sources (nitrate and ammonium) in *Chlamydomonas reinhardtii* : The logic of *aox1* gene localization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*.
- Harris, E. H. (2001). *Chlamydomonas* as a model organism. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 52(1), 363–406.

- Harris, E. H. (2008, December). *The Chlamydomonas Sourcebook : Introduction to Chlamydomonas and Its Laboratory Use* (2nd Revised edition ed.). Academic Press Inc.
- Irihimovitch, V. and D. B. Stern (2006, May). The sulfur acclimation SAC3 kinase is required for chloroplast transcriptional repression under sulfur limitation in *chlamydomonas reinhardtii*. *103*(20), 7911–7916.
- Irihimovitch, V. and S. Yehudai-Resheff (2008). Phosphate and sulfur limitation responses in the chloroplast of *chlamydomonas reinhardtii*. *FEMS Microbiology Letters* *283*(1), 1–8.
- Jans, F., E. Mignolet, P. A. Houyoux, P. Cardol, B. Ghysels, S. Cuiné, L. Cournac, G. Peltier, C. Remacle, and F. Franck (2008). A type II NAD (P) h dehydrogenase mediates light-independent plastoquinone reduction in the chloroplast of *chlamydomonas*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* *105*(51), 20546.
- Joet, T. (2002). Involvement of a plastid terminal oxidase in plastoquinone oxidation as evidenced by expression of the *arabidopsis thaliana* enzyme in tobacco. *Journal of Biological Chemistry* *277*(35), 31623–31630.
- Joliot, P. and A. Joliot (1964). Etude cinétique de la réaction photochimique libérant de l'oxygène au cours de la photosynthèse. *CR Acad Sci Paris* *258*, 4622–4625.
- Joliot, P. and A. Joliot (2002). Cyclic electron transfer in plant leaf. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* *99*(15), 10209–10214.
- Kautsky, H., W. Appel, and H. Amann (1960). Chlorophyll fluorescence and carbon assimilation. part xiii. the fluorescence and the photochemistry of plants. *Biochemische Zeitschrift* *332*, 277–292.
- Kruse, O. (2005). Improved photobiological h₂ production in engineered green algal cells. *Journal of Biological Chemistry* *280*(40), 34170–34177.
- Lazar, D. (2006). The polyphasic chlorophyll a fluorescence rise measured under high intensity of exciting light. *Funct. Plant Biol.* *33*(1), 9–30.
- Li, X., O. Bjorkman, C. Shih, A. R. Grossman, M. Rosenquist, S. Jansson, and K. K. Niyogi (2000). A pigment-binding protein essential for regulation of photosynthetic light harvesting. *Nature* *403*(6768), 391–395.
- Lichtenthaler (1987). Chlorophylls and carotenoids : pigment of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol.* (148), 350–382.
- Lodish, H. F. (2003, December). *Molecular Cell Biology*. W H Freeman & Co.
- Mathy, G., P. Cardol, M. Dinant, A. Blomme, S. G. rin, B. Ghysels, M. Cloes, E. D. Pauw, P. Leprince, C. Remacle, et al. (2010). Proteomic and functional characterization of a *chlamydomonas reinhardtii* mutant lacking the mitochondrial alternative oxidase 1. *Journal of Proteome Research*.
- Maxwell, K. and G. N. Johnson (2000, April). Chlorophyll fluorescence-a practical guide. *J. Exp. Bot.* *51*(345), 659–668.
- Melis, A. and T. Happe (2001). Hydrogen production. green algae as a source of energy. *Plant physiology* *127*(3), 740.

- Melis, A., L. Zhang, M. Forestier, M. L. Ghirardi, and M. Seibert (2000). Sustained photobiological hydrogen gas production upon reversible inactivation of oxygen evolution in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* 122(1), 127–36.
- Molen, T. A., D. Rosso, S. Piercy, and D. P. Maxwell (2006). Characterization of the alternative oxidase of *Chlamydomonas reinhardtii* in response to oxidative stress and a shift in nitrogen source. *Physiologia Plantarum* 127(1), 74–86.
- Moore, A. L. and J. N. Siedow (1991, August). The regulation and nature of the cyanide-resistant alternative oxidase of plant mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1059(2), 121–140.
- Mosulén, S., M. J. Domínguez, J. Vígara, C. Vílchez, A. Guiraum, and J. M. Vega (2003). Metal toxicity in *Chlamydomonas reinhardtii*. effect on sulfate and nitrate assimilation. *Biomolecular engineering* 20(4-6), 199–203.
- Muller, P., X. P. Li, and K. K. Niyogi (2001). Non-photochemical quenching. a response to excess light energy. *Plant Physiology* 125(4), 1558.
- Murata, N. (1969, February). Control of excitation transfer in photosynthesis i. light-induced change of chlorophyll a fluorescence in *Porphyridium cruentum*. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 172(2), 242–251.
- Mus, F., L. Cournac, V. Cardellini, A. Caruana, and G. Peltier (2005, July). Inhibitor studies on non-photochemical plastoquinone reduction and h2 photoproduction in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochimica Et Biophysica Acta* 1708(3), 322–32.
- Nicholls, D. G. and S. J. Ferguson (2002, August). *Bioenergetics, Third Edition* (3 ed.). Academic Press.
- Niyogi, K. K., O. Bjorkman, and A. R. Grossman (1997, August). *Chlamydomonas* xanthophyll cycle mutants identified by video imaging of chlorophyll fluorescence quenching. *Plant Cell* 9(8), 1369–1380.
- Prasil, O., N. Adir, and I. Ohad (1992). Dynamics of photosystem II : mechanism of photoinhibition and recovery process. In *Topics in photosynthesis* (The Netherlands : Elsevier, ed.), Volume 2, pp. 295–348.
- Prosser, I. M., J. V. Purves, L. R. Saker, and D. T. Clarkson (2001, January). Rapid disruption of nitrogen metabolism and nitrate transport in spinach plants deprived of sulphate. *J. Exp. Bot.* 52(354), 113–121.
- Quick, W. P. and P. Horton (1984). Studies on the induction of chlorophyll fluorescence in barley protoplasts. i. factors affecting the observation of oscillations in the yield of chlorophyll fluorescence and the rate of oxygen evolution. *Proceedings of the Royal Society of London. Series B, Biological Sciences* 220(1220), 361–370.
- Sager, R. and S. Granick (1953). Nutritional studies with *Chlamydomonas reinhardtii*. *Annals of the New York Academy of Sciences* 56(Growth of Protozoa), 831–838.

- Schroda, M. (2005). RNA silencing in chlamydomonas : mechanisms and tools. *Current Genetics* 49(2), 69–84.
- Schroda, M., O. Vallon, F. Wollman, and C. F. Beck (1999). A Chloroplast-Targeted heat shock protein 70 (HSP70) contributes to the photoprotection and repair of photosystem II during and after photoinhibition. *Plant Cell* 11(6), 1165–1178.
- Stern, D. and E. H. Harris (2008, November). *The Chlamydomonas Sourcebook : Organellar and metabolic processes*. Academic Press.
- Strasser, B. J. (1997, May). Donor side capacity of photosystem II probed by chlorophyll a fluorescence transients. *Photosynthesis Research* 52(2), 147–155.
- Strasser, R. J., A. Srivastava, and Govindjee (1995). polyphasic chlorophyll a fluorescence transient in plants and cyanobacteria. *Photochemistry and Photobiology* 61(1), 32–42.
- Takahashi, S. and N. Murata (2008). How do environmental stresses accelerate photoinhibition? *Trends in plant science* 13(4), 178–182.
- Vanlerberghe, G. C. and L. McIntosh (1997, June). Alternative oxidase : From gene to function. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* 48, 703–734.
- Virgin, I. (1992). *On the mechanism and consequences of light-induced D1 protein degradation in higher plants*. Ph. D. thesis, Stockholm.
- Wollman, F. A. (2001). State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *The EMBO Journal* 20(14), 3623–3630.
- Wykoff, D. D., J. P. Davies, A. Melis, and A. R. Grossman (1998, May). The regulation of photosynthetic electron transport during nutrient deprivation in chlamydomonas reinhardtii. *Plant Physiology* 117(1), 129–139.
- Young, A. J., D. Phillip, A. V. Ruban, P. Horton, and H. A. Frank (1997). The xanthophyll cycle and carotenoid-mediated dissipation of excess excitation energy in photosynthesis. *Pure and Applied Chemistry* 69(10), 2125–2130.
- Zhang, L., T. Happe, and A. Melis (2002). Biochemical and morphological characterization of sulfur-deprived and h₂-producing chlamydomonas reinhardtii (green alga). *Planta* 214(4), 552–561.