amU
Aix Marseille Université

NNT : 2024AIXM0463

THÈSE DE DOCTORAT

Soutenue à AMU — Aix-Marseille Université
le 9 décembre 2024 par

Cassy GÉRARD

Régulation de l'assimilation du CO_2 chez *Chlamydomonas reinhardtii* par une protéine chloroplastique conditionnellement désordonnée : CP12

Discipline
Biologie Santé

Spécialité
Biochimie Structurale

École doctorale
ED 62 – Sciences de la vie et de la santé

Laboratoires
Bioénergétique et Ingénierie des Protéines - UMR 7281
Institut des Sciences Moléculaires de Marseille - UMR 7313

Composition du jury

Julien HENRI MCF, Sorbonne Université	Rapporteur
Thierry CHARDOT DR, INRAE	Rapporteur
Sandrine LANFRANCHI MCF, Sorbonne Université	Examinatrice
Isabelle LANDRIEU DR, CNRS	Examinatrice
Sonia LONGHI DR, CNRS	Présidente du jury
Hélène LAUNAY CR, CNRS	Directrice de thèse
Brigitte GONTERO DR, CNRS	Membre invitée Co-encadrante
Mehdi YEMLOUL MCF, Aix-Marseille Université	Membre invité Co-encadrant

cnrs
iSm2 Institut des Sciences Moléculaires de Marseille UMR 7313

Affidavit

Je soussignée, Cassy Gérard, déclare par la présente que le travail présenté dans ce manuscrit est mon propre travail, réalisé sous la direction scientifique de Hélène Launay et Brigitte Gontero, dans le respect des principes d'honnêteté, d'intégrité et de responsabilité inhérents à la mission de recherche. Les travaux de recherche et la rédaction de ce manuscrit ont été réalisés dans le respect à la fois de la charte nationale de déontologie des métiers de la recherche et de la charte AMU relative à la lutte contre le plagiat.

Ce travail n'a pas été précédemment soumis en France ou à l'étranger dans une version identique ou similaire à un organisme examinateur.

Fait à Marseille le 07/10/2024



Cette œuvre est mise à disposition selon les termes de la Licence Creative Commons Attribution - Pas d'Utilisation Commerciale - Pas de Modification 4.0 International.

Liste de publications et participation aux conférences

Liste des publications réalisées dans le cadre du projet de thèse :

1. **Gérard C**, Lebrun R, Verthuy C, Le Guenno H, Kosta A, Guérard F, Gakière B, Chang KS, Jin E, Avilan L, Gontero B, Launay H. Effects of CP12 on inorganic carbon acquisition and assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*. Submitted.
2. B. Rodrigues Fachini, **C. Gérard**, A. Marchand, O. Bornet, V. Gros, C.Vigor, C. Oger, G.Reversat, T. Durand, G. Parsiegla, B. Gontero, H. Launay and F. Carrière, "Digestion and bioconversion of microalgal galactolipids by direct action of lipolytic enzymes on *Chlamydomonas reinhardtii* biomass" Submitted.
3. Launay H, Avilan L, **Gérard C**, Parsiegla G, Receveur-Brechot V, Gontero B, Carriere F. Location of the photosynthetic carbon metabolism in micro-compartments and separated phases in microalgal cells. FEBS Lett. 2023 Dec ;597(23) :2853-2878. doi : 10.1002/1873-3468.14754. Epub 2023 Oct 24. PMID : 37827572.
4. **Gérard C**, Carrière F, Receveur-Bréchot V, Launay H, Gontero B. A Trajectory of Discovery : Metabolic Regulation by the Conditionally Disordered Chloroplast Protein, CP12. Biomolecules. 2022 Jul 28 ;12(8) :1047. doi : 10.3390/biom12081047. PMID : 36008940 ; PMCID : PMC9406205.
5. **Gérard** C, Lebrun R, Lemesle E, Avilan L, Chang KS, Jin E, Carrière F, Gontero B, Launay H. Reduction in Phosphoribulokinase Amount and Re-Routing Metabolism in Chlamydomonas reinhardtii CP12 Mutants. Int J Mol Sci. 2022 Feb 28 ;23(5) :2710. doi : 10.3390/ijms23052710. PMID : 35269851 ; PMCID : PMC8910624.

Participation aux conférences et écoles d'été au cours de la période de thèse :

1. (2024) International Conference on Magnetic Resonance in Biological Systems (ICMRBS), Seoul, Korea. Lighting talk and poster presentation «Structural

properties of the conditionally disordered protein CP12 in complex media ».

2. (2024) École d'été CNRS, Analyses protéomiques quantitatives, choix des méthodes et analyse des données, Sète, France.
3. (2024) Sfphϕ Meeting of the French Photosynthesis Society, Paris, France. Oral presentation, «Regulation of CO_2 assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii* by a conditionally disordered chloroplast protein : CP12».
4. (2023) The 20th International Conference on the Cell and Molecular Biology of Chlamydomonas Princeton University, New Jersey, United States. Oral presentation, «Rerouting of metabolism in CP12 mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*».
5. (2023) Junior Scientists Microbiology Meeting of Marseille, Marseille, France. Oral presentation, «Rerouting of metabolism in CP12 mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*».
6. (2023) NMR for Life Science, Virtual event from Nantes, France. Poster presentation, «Structural properties of the conditionally disordered protein CP12 in complex media ».
7. (2022) Summer school, Molecular and biophysical basis of photosynthesis, Venice, Italy. Oral presentation, «Effect of CP12 deletion, an Intrinsically Disordered Protein, on *Chlamydomonas reinhardtii* metabolism».

Résumé et mots clés

La protéine chloroplastique CP12 est une protéine conditionnellement désordonnée impliquée dans la régulation de l'assimilation du CO_2 chez les organismes photosynthétiques. Elle participe à la régulation lumière/obscurité du cycle de Calvin-Benson-Bassham (CBB) par sa liaison avec deux enzymes clés : la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et la phosphoribulokinase. À l'obscurité, en conditions oxydantes, la CP12 est partiellement structurée et forme un complexe ternaire impliquant ces enzymes dans lequel leurs activités enzymatiques sont réduites, ce qui stoppe le cycle de CBB. À la lumière, le chloroplaste est un environnement réducteur, et la CP12 réduite est désordonnée. Afin d'explorer d'autres fonctions que celle décrite ci-dessus, le gène de la CP12 unique a été muté dans *Chlamydomonas reinhardtii* pour empêcher sa production. Bien que les taux de croissance des souches de type sauvage et des souches sans la protéine CP12 soient identiques, une étude en protéomique quantitative relative a révélé que l'absence de CP12 réoriente le métabolisme de manière importante. Son rôle dans l'acquisition du carbone inorganique est exploré au cours de ces travaux. L'absence de CP12 induit une relocalisation de la RuBisCO et une affinité accrue pour le carbone inorganique.

La diversité des fonctions de la CP12 peut être comprise grâce à une caractérisation plus approfondie de ses propriétés structurales dans ces conditions réductrices. À ce jour, la CP12 n'a été étudiée qu'en solution, loin des conditions réelles de son environnement natif, encombré et hétérogène. Par Résonance Magnétique Nucléaire, l'influence de paramètres physico-chimiques tels que l'encombrement moléculaire, le pH ou l'effet des charges a été étudiée sur les ensembles conformationnels de la protéine. La CP12, en tant que protéine conditionnellement désordonnée, est un bon candidat pour démontrer l'influence de ces paramètres sur la conformation des protéines et la régulation des voies métaboliques.

Mots clés : CP12, phosphoribulokinase, Cycle de Calvin-Benson-Bassham, Protéine intrinsèquement désordonnée, *Chlamydomonas reinhardtii*, Résonance magnétique nucléaire, Protéomique quantitative

Abstract and keywords

The chloroplast protein CP12 is a conditionally disordered protein involved in the regulation of CO_2 assimilation in photosynthetic organisms. It plays a crucial role in the light/dark regulation of the Calvin-Benson-Bassham (CBB) cycle by interacting with two key enzymes: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and phosphoribulokinase (PRK). In the dark, under oxidizing conditions, the partially structured CP12 binds to these enzymes, forming a ternary complex, thereby inhibiting their activity and turning off the CBB cycle. In contrast, in light conditions, where the chloroplast environment is reducing, the protein becomes disordered. To explore additional functions of CP12, a mutation was introduced in the single CP12 gene in *Chlamydomonas reinhardtii* to prevent its production. Although the growth rates of the wild-type and mutant strains were similar, relative quantitative proteomics revealed that the absence of CP12 caused significant metabolic rerouting. The study primarily focused on CP12's function in the assimilation of inorganic carbon. The absence of CP12 induced a relocation of RuBisCO and a higher affinity for inorganic carbon.

The diverse functions of CP12 can be better understood by further characterizing its structural properties under reducing conditions. To date, CP12 has been studied exclusively in solution, which does not fully reflect the crowded and heterogeneous conditions of its native environment. Consequently, the effects of various physicochemical parameters such as molecular crowding, pH, and electrostatic forces on the protein's conformational states have been examined. As a conditionally disordered protein, CP12 serves as an ideal model to demonstrate how these factors influence protein conformation and, in turn, the regulation of metabolic pathways.

Keywords: CP12, phosphoribulokinase, Calvin-Benson-Bassham cycle, Intrinsically disordered protein, *Chlamydomonas reinhardtii*, Nuclear magnetic resonance, Quantitative proteomics

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier les membres de mon jury, Julien Henri, Thierry Chardot, Sandrine Lanfranchi, Isabelle Landrieu et Sonia Longhi d'avoir accepté d'évaluer mes travaux de thèse.

Je tiens ensuite, évidemment, à remercier mes encadrant.e.s de thèse, sans qui ce travail n'aurait pas lieu d'être. Merci à vous, Hélène, Brigitte, Mehdi, pour la confiance que vous m'avez accordée dès le début, pour ce projet qui s'annonçait comme un défi. Merci aussi pour votre investissement durant la préparation du concours de l'école doctorale.

Hélène, merci pour tout ce que tu m'as appris. Ton expertise scientifique m'a grandement aidé pour cette thèse. Merci d'avoir été aussi optimiste quand je ne l'étais pas et d'avoir cru en moi pendant ces années de thèse.

Merci à toi, Brigitte, du fond du cœur. Même lorsque tu n'étais pas présente, tu l'étais malgré tout. Ta disponibilité m'a beaucoup aidé, et tu as toujours su satisfaire ma curiosité scientifique, c'était un plaisir de travailler avec toi. Je ne regrette pas d'avoir suivi les conseils de Sandrine, que je vais remercier une nouvelle fois ici pour sa bienveillance durant mon année de Master 2, qui m'a permis de travailler dans ton équipe.

Merci Stephen, pour ton aide immense pour traiter mes données. Mais aussi, pour mon amélioration en anglais qui me permet désormais de comprendre presque toutes tes blagues.

Évidemment, merci à Luisana, la plus belle. Merci d'avoir changé littéralement mon quotidien au laboratoire. Un véritable rayon de soleil. J'ai appris tellement avec toi, je ne savais pas que c'était autant possible d'allier travail et bonne humeur. Et, pour ça, je ferai abstraction de tous les desserts que tu m'as volé pendant ces deux ans.

Un grand merci à ma Glaucia-Maria, pour sa bienveillance et son soutien. Et, aussi, pour nos discussions scientifiques plus qu'enrichissantes, qui m'ont finalement donné goût à la biophysique. Un milieu sombre qui a grandement besoin de femmes aussi brillantes que toi.

Je tiens à remercier tous les autres membres de mon équipe pour toutes les discussions et conseils scientifiques : Frédéric, Véronique, Goetz, Sidi et aussi, Achille, le maître de la RMN. Merci à Alix, tes passages sont rares à Marseille, mais ils sont toujours aussi appréciables, c'était toujours un plaisir de discuter science avec toi, et j'ai hâte de continuer. Je tiens également à remercier à tous les étudiants qui ont été de passage dans cette équipe, et qui ont permis d'apporter une ambiance

de travail agréable : Marie, Maïssa, César, Beatriz, Elfie, Paul, Gaël, Omar. Des remerciements particuliers à ma petite Marion : quel plaisir de t'avoir eu en tant que stagiaire. Même avec un contexte, parfois difficile, on a formé une belle équipe et c'était un plaisir de travailler avec toi. Merci pour ton investissement. Je tiens aussi à remercier la reine du BIP, Odélia, qui nous aide quotidiennement pour toute la préparation de nos milieux.

Je tiens également à remercier mon comité de suivi de thèse : Simon, Elisa et Xenie pour vos précieux conseils (et Simon, merci pour toutes les discussions autour du café du matin).

Merci aux permanents du BIP avec qui j'ai passé de bons moments et qui ont toujours été là pour répondre à mes diverses questions : Arlette, Chloé, Pierre, Alessio, Eric, Barbara, Marianne, Isabelle et Marlène pour ses délicieux thés réconfortants.

Merci à l'équipe enseignante, Michel, Dorothée et Solène.

Merci à tous nos collaborateurs et particulièrement aux membres de la plateforme protéomique, Régine, Maya et Christophe (la protéomique qui est devenue pendant un temps ma deuxième maison). Régine, merci pour ta disponibilité et ta gentillesse, c'est géniale de travailler avec quelqu'un comme toi. EonSeon, merci pour ton enthousiasme permanent et ton accueil en Corée. Merci à Olivier, de la plateforme RMN, de m'avoir aidé pour mes nombreuses acquisitions et d'avoir accepté que je mette n'importe quoi dans le spectro... Merci à Hugo et Artémis, de la plateforme microscopie.

Un GRAND merci à mes amis, en légende, Maxime, Jérémy et... Gaspard pour avoir rendu cette fin de thèse si amusante. Merci pour tous ces fous rires (même à 8h du matin). Qui l'eût cru que c'était possible de passer de bons moments pendant la rédaction ? Merci aussi à Umberto, Martina, et tous les autres étudiants du BIP (et du LISM) qui ont fait de ce laboratoire, un endroit chaleureux où il est agréable de travailler : Andréa, Giulia, Colette, Vita, Orion, Marie, Amélie, Ludo, Louis, Stéphane, Lara, Chloé, Alison, Lucas, Alex, Varun... Mélanie et Aurore, merci pour votre accueil. Anna, merci pour ton soutien, et pour les parmigiana...

Merci à Charlotte, qui me soutient depuis toujours, avec qui j'ai partagé des moments comme la préparation du concours... Je pense à toi.

Et enfin, merci à toi, Nil, pour tout. (<3)

Table des matières

Affidavit 2

Liste de publications et participation aux conférences 3

Résumé et mots clés 5

Abstract and keywords 6

Remerciements 7

Table des matières 9

Liste des acronymes 13

1. Introduction 17
1.1. La photosynthèse . . . 17
1.1.1. La phase photochimique . . . 17
1.1.2. Le cycle de Calvin-Benson-Bassham . . . 19
1.1.2.1. Enzymes impliquées . . . 19
1.1.2.2. Régulation du cycle . . . 21
1.2. Le paradoxe de la RuBisCO . . . 22
1.2.1. La promiscuité de la RuBisCO . . . 22
1.2.2. La faible affinité pour le dioxyde de carbone de la RuBisCO 23
1.2.3. Les mécanismes de concentration du dioxyde de carbone . . 24
1.2.3.1. Flux de carbone minéral . . . 24
1.2.3.2. Le pyrénoïde . . . 26
1.3. Fonctions métaboliques de la protéine CP12 . . . 27
1.3.1. Une protéine répandue dans le monde photosynthétique . . . 28
1.3.2. Régulation du cycle de Calvin-Benson-Bassham . . . 30
1.3.3. La CP12 au-delà du cycle de Calvin-Benson-Bassham . . . 31
1.4. Vers l'étude des propriétés structurales de la CP12 dans des conditions physiologiques . . . 34
1.4.1. Les protéines intrinsèquement désordonnées . . . 34
1.4.2. Propriétés structurales de la CP12 en solution, une protéine conditionnellement désordonnée . . . 36
1.4.2.1. La CP12 à l'état réduit . . . 37
1.4.2.2. La CP12 à l'état oxydé . . . 39

1.4.3. Pertinence de l'étude de la CP12 dans des conditions physiologiques . . . 42
1.4.3.1. L'encombrement moléculaire . . . 42
1.4.3.2. Cas des IDPs et de la CP12 . . . 42
1.5. *Chlamydomonas reinhardtii*, organisme modèle . . . 43

2. Objectifs du travail de thèse **45**

3. Matériels et méthodes **47**
3.1. Matériels . . . 47
3.1.1. *Chlamydomonas reinhardtii* . . . 47
3.1.1.1. Souches . . . 47
3.1.1.2. Conditions de culture . . . 47
3.1.2. *Escherichia coli* . . . 48
3.1.3. Plasmides . . . 48
3.2. Méthodes . . . 51
3.2.1. Suivi de croissance de *Chlamydomonas reinhardtii* . . . 51
3.2.2. Extraction d'ADN et amplification par PCR . . . 51
3.2.3. Extraction des protéines . . . 51
3.2.4. Dosage de la concentration des protéines . . . 52
3.2.5. Extraction des métabolites . . . 52
3.2.6. Quantification des lipides . . . 52
3.2.6.1. Extraction lipidique . . . 52
3.2.6.2. Chromatographie sur couche mince . . . 53
3.2.7. Extraction et quantification de la chlorophylle . . . 53
3.2.8. Activité enzymatique de la PRK . . . 54
3.2.9. Mesure de la photosynthèse . . . 55
3.2.9.1. Taux net de la photosynthèse . . . 55
3.2.10. Techniques électrophorétiques . . . 56
3.2.10.1. Électrophorèse en conditions dénaturantes . . . 56
3.2.10.2. Électrophorèse en conditions natives . . . 56
3.2.10.3. Technique d'immunoempreinte . . . 57
3.2.11. Chromatographie d'affinité . . . 57
3.2.12. Protéomique quantitative . . . 58
3.2.12.1. Préparation des échantillons . . . 60
3.2.12.2. Séparation par chromatographie liquide et analyse par spectrométrie de masse . . . 60
3.2.12.3. Identification des protéines . . . 60
3.2.12.4. Analyse des données . . . 60
3.2.13. Production de la protéine recombinante CP12 . . . 61
3.2.13.1. Transformation . . . 61
3.2.13.2. Expression de la protéine CP12 recombinante . . . 61

3.2.14. Purification de la CP12 . . . 62
3.2.14.1. Extraction des protéines solubles et purification par chromatographie d'affinité . . . 62
3.2.14.2. Obtention de la protéine CP12 sous sa forme mature 62
3.2.15. Analyse MALDI-ToF . . . 63
3.2.16. Spectroscopie RMN . . . 63
3.2.16.1. Préparation des échantillons . . . 63
3.2.16.2. RMN dans la cellule d'*E. coli* . . . 63
3.2.16.3. Préparation du lysat cellulaire de *C. reinhardtii* . . 64
3.2.16.4. 1D ^{1}H . . . 64
3.2.16.5. HSQC ^{1}H ^{15}N . . . 64
3.2.16.6. HNCACB/HN(CO)CACB et HNCA/HN(CO)CA . 65
3.2.16.7. ^{15}N R_1H, ^{15}N R_2H, {^{1}H}-^{15}N het-NOE, CEST . . 65
3.2.16.8. Traitement des données . . . 66

4. Effet de la délétion de la protéine CP12 dans le métabolisme de *Chlamydomonas reinhardtii* 67
4.1. Résumé de la publication . . . 67
4.2. Article : « Reduction of Phosphoribulokinase Amount and Re-Routing Metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* CP12 Mutants » . . . 67
4.3. Résultats complémentaires . . . 91
4.3.1. Caractérisation des souches Δ*CP12* et Δ*CP12* complémentées 91
4.3.2. Recherche de phénotype pour le mutant Δ*CP12* . . . 94
4.3.2.1. Courbes de croissance . . . 94
4.3.2.2. Efficacité de la photosynthèse en présence de quantité de CO_2 saturante . . . 95
4.3.2.3. Métabolisme des lipides . . . 96
4.4. Discussion . . . 97

5. Interaction entre la CP12 et la PRK en conditions réductrices 98
5.1. Introduction . . . 98
5.2. Résultats . . . 98
5.2.1. Une interaction directe entre CP12 et PRK dans des conditions réductrices . . . 98
5.2.2. Protection *in vivo* de la PRK par la CP12 . . . 100
5.2.3. De la détermination d'un K_D *in vitro* à la présence d'un complexe CP12-PRK *in vivo* . . . 101
5.3. Discussion . . . 102

6. Étude de la fonction de la protéine CP12 sur l'acquisition du carbone minéral chez *Chlamydomonas reinhardtii* 104
6.1. Résumé de la publication . . . 104
6.2. Article . . . 104

7. Étude de l'ensemble conformationnel de la CP12 en conditions réductrices **132**
7.1. Introduction . . . 132
7.2. Purification de la forme mature de la CP12 . . . 132
7.3. Étude de la dynamique de la CP12 en se rapprochant des conditions physiologiques . . . 137
7.4. Corrélation entre les propriétés structurelles de la CP12 et les paramètres physico-chimiques . . . 140
7.4.1. le pH . . . 140
7.4.2. Concentration et nature des sels . . . 145
7.4.3. Ajout d'un mélange d'acide aminé . . . 148
7.4.4. Encombrement moléculaire . . . 149
7.5. Étude des propriétés structurales de la CP12 en milieu mimant le milieu cellulaire . . . 151
7.5.1. Propriétés structurales dans les cellules d'*E. coli* . . . 151
7.5.2. Propriétés structurales dans des cellules lysées de *C. reinhardtii* 152
7.6. Discussion . . . 153

8. Conclusions et perspectives **157**
8.1. De nouveaux partenaires pour la CP12 à l'état désordonné . . . 157
8.2. Un lien avec la phase photochimique ? . . . 160
8.3. Après la protéomique, la métabolomique ? . . . 162
8.4. Études structurales de la CP12 dans la cellule de *C. reinhardtii* . . . 163

A. Annexes **192**

B. Revues bibliographiques **207**
B.1. « A Trajectory of Discovery : Metabolic Regulation by the Conditionally Disordered Chloroplast Protein, CP12 » . . . 207
B.2. « Location of the photosynthetic carbon metabolism in microcompartmments and separated phases in microalgal cells » . . . 224

C. Contribution scientifique externe **251**

Liste des acronymes

ADK3
adénylate kinase 3. 30, 157

ATP
adénosine triphosphate. 17–19

BPGA
1-3-bisphosphoglycérate. 19

CAM
métabolisme acide crassulacéen. 24, 30

CBB
Calvin-Benson-Bassham. 5, 17–24, 27, 29–32, 41, 43, 45, 67, 104, 157, 163

CCM
mécanismes de concentration du CO_2. 24–27, 104

CD
dichroïsme circulaire. 37, 39, 149, 206

CDP
protéine conditionnellement désordonnée. 27

CO_2
dioxyde de carbone. 17

CP12
Chloroplast Protein 12 kDa. 21

CRISPR
Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats. 47

DCMU
« Dichorophenyl-dimethylurea ». 32

DGDG
digalactosyldiacylglycérol. 53, 96, 97

DIC
"Dissolved Inorganic Carbon". 25

DTT
dithiothreïtol. 56, 57, 60, 63, 92, 93

ECL
« enhanced chemiluminescence ». 57

EDTA
éthylènediaminetétraacétique. 134

EPYC
essential pyrenoid component. 26, 45, 104

FBA
fructose-1,6-phosphate aldolase. 20, 21

FBPase
fructose-1,6-bisphosphatase. 20, 22

Fd
ferrédoxine. 18

FNR
ferrédoxine-NADP réductase. 18

G3P
glycéraldéhyde-3-phosphate. 19

GAPDH
glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase. 5, 19–21, 24, 27, 28, 30–33, 40, 41, 45, 67, 101, 157, 165

HPLC
chromatographie en phase liquide à haute performance. 144

HRP
« horse radish peroxidase ». 57

HSQC
« Heteronuclear Single Quantum Correlation ». 135, 137, 138, 140, 142, 144–146, 149, 152, 153

IDP
protéines intrinsèquement désordonnées. 27, 31, 34–36, 38, 42, 65, 132, 138–140, 154, 155, 163

IPTG
Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside. 48, 61, 64, 152

LB
Luria Bertani. 61, 63

LDH
lactate deshydrogénase. 54

MALDI-ToF
« Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight ». 63, 133

MGDG
monogalactosyldiacylglycérol. 53, 96, 97

NADH
nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite. 21

NADP
nicotinamide adénine dinucléotide phosphate. 21

NADPH
nicotinamide adénine dinucleotide phosphate, forme réduite. 17–19, 21, 32

NTRC
NADPH-dependent thioredoxin reductase C. 33

PBS
« phosphate buffer saline ». 57

PDB
« Protein Data Bank ». 20, 161

PGA
3-phosphoglycérate. 19, 22

PGK
phosphoglycérate kinase. 19, 20

PK
pyruvate kinase. 54

ppm
partie par million. 47

PRK
phosphoribulokinase. 5, 20, 21, 24, 27, 28, 30–33, 41, 45, 67, 92, 93, 95, 97, 98, 100–104, 157, 165

PSM
Peptide Spectral Match. 92

RMN
Résonance Magnétique Nucléaire. 5, 38–40, 46, 63, 103, 132, 135, 138, 149, 155, 162, 163, 165

RNP
ribonucleoprotéine. 47

ROS
« reactive oxygen species ». 32

RPE
ribulose-5-phosphate épimérase. 20

RPI
ribose-5-phosphate isomérase. 20, 21

Ru5P
ribulose-5-phosphate. 20, 32, 54

RuBisCO
Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygénase. 19, 22–24, 26, 27, 32

RuBP
ribulose-1,5-bisphosphate. 19, 20, 22, 32, 54, 104

SANS
« Small Angle Neutron Scattering ». 156, 205

SAXS
diffusion des rayons X aux petits angles. 38–40, 144, 145, 154

SBPase
sedoheptulose1,7 bisphosphatase. 20, 21

SDS
sodium dodecyl sulfate. 56

SPR
résonance plasmonique de surface. 98, 102

TAP
Tris Acétate Phosphate. 47, 164

TCA
acide trichloroacétique. 57

TPI
triose phosphate isomérase. 20

TRK
transcétolase. 20, 22

TRX
thiorédoxines. 21, 31, 32, 160

WT
wild-type. 47, 104, 162

1. Introduction

1.1. La photosynthèse

La photosynthèse est sans doute l'un des mécanismes les plus importants sur terre puisqu'elle favorise à la fois la croissance de presque tous les organismes vivants et constitue un élément essentiel du cycle global du carbone. Elle permet l'assimilation du dioxyde de carbone (CO_2) de l'atmosphère pour le convertir en composés organiques. Au cœur de ce processus, se trouve une réaction fondamentale : la photolyse de l'eau en ses constituants élémentaires sous l'effet de la lumière (1.1). Ce processus libère de l'oxygène dans l'atmosphère, et maintient ainsi un environnement aérobie. Il permet également la formation d'ozone, réduisant ainsi la quantité de rayons ultraviolets nocifs atteignant la surface de la Terre [10].

$$6CO_2 + 12H_2O \longrightarrow C_6H_{12}O_6 + 6\,O_2 + 6\,H_2O \tag{1.1}$$

La première phase de la photosynthèse, la phase photochimique, permet la conversion de l'énergie lumineuse (photons) en énergie chimique sous forme d' adénosine triphosphate (ATP) et de nicotinamide adénine dinucleotide phosphate, forme réduite (NADPH). Elle a lieu dans les membranes des thylacoïdes où les pigments sont regroupés dans les photosystèmes sur lesquels sont greffées les antennes collectrices qui vont capter l'énergie des photons. Cette énergie sera utilisée pour transférer les électrons dans les chaînes de transferts d'électrons. Cette première phase aboutit à la production de NADPH (pouvoir réducteur) et d'ATP (gradient de protons). Ce ratio NADPH/ATP, qui est de 2 NADPH/3 ATP issues de deux molécules d'eau (4 électrons), est essentiel à la régulation de la photosynthèse puisque ces deux molécules vont, entre-autres, permettre d'alimenter le cycle de Calvin-Benson-Bassham (CBB) pour rendre possible la fixation du CO_2 [13]. Le cycle CBB constitue la deuxième phase de la photosynthèse qui est essentielle puisqu'elle va permettre la production de molécules comme des glucides, des lipides ou encore des acides aminés et ainsi assurer la base de la production de biomasse, permettant à l'organisme photosynthétique de prospérer dans divers environnements.

1.1.1. La phase photochimique

Durant la phase photochimique, l'énergie des photons est récoltée par les pigments chlorophylliens, localisés dans les antennes des « light-harvesting complexes » (LHC) appelées antennes collectrices de la lumière et dans les centres réactionnels

des photosystèmes (PS). Dans les antennes des LHC, la collecte de l'énergie est assurée par les molécules de chlorophylle et les caroténoïdes qui sont excités puis reviennent à leur état fondamental en transmettant l'énergie à une molécule de chlorophylle voisine, qui la transmet à son tour à une autre molécule de chlorophylle. Cette transmission progressive de l'énergie d'excitation aboutit finalement à l'excitation de molécules de chlorophylle spéciales dans le centre réactionnel des deux photosystèmes, PSI (P700) et PSII (P680), où ont lieu les événements de séparation de charge [28]. L'oxydation de l'eau se produit au niveau du PSII grâce au cluster du manganèse du « Water oxidizing complex » (WOC) ou « Evolving Oxygen Complex » (EOC) qui arrache deux électrons aux molécules d'eau, qui sont transférés au P680. Contrairement à celles présentes dans les antennes, ces chlorophylles transfèrent un électron plutôt que de transférer l'énergie d'excitation à une chlorophylle adjacente. Ces chlorophylles sont donc considérées comme les premiers donneurs d'électrons et initiateurs de la chaîne de transport d'électrons. L'énergie lumineuse est convertie en énergie chimique de deux manières. Premièrement, le transport des électrons à travers la chaîne de transport photosynthétique conduit à la création d'un gradient de protons qui alimente l'ATP synthase, produisant ainsi de l'ATP. Deuxièmement, les électrons issus de l'oxydation de l'eau sont transportés dans la chaîne de transport d'électrons et réduisent finalement la ferrédoxine (Fd) du côté de l'accepteur du PSI [72]. La Fd est une protéine contenant du fer et elle est le substrat de la ferrédoxine-NADP réductase (FNR) [31] qui réduit le $NADP^+$ en NADPH, ce qui constitue une énergie d'oxydoréduction. L'ATP et le NADPH sont utilisés au cours de processus métaboliques, plus particulièrement comme substrats pour la fixation du dioxyde de carbone atmosphérique dans le cycle CBB ainsi que pour la photorespiration et l'assimilation de l'azote. Le flux d'électrons dépend donc, entre autres, de la disponibilité du $NADP^+$ en tant qu'accepteur d'électrons. Le cycle d'oxydo-réduction du $NADP^+$/NADPH permet de coupler la régulation des voies métaboliques avec la régulation du transfert d'électron (Figure 1.1).

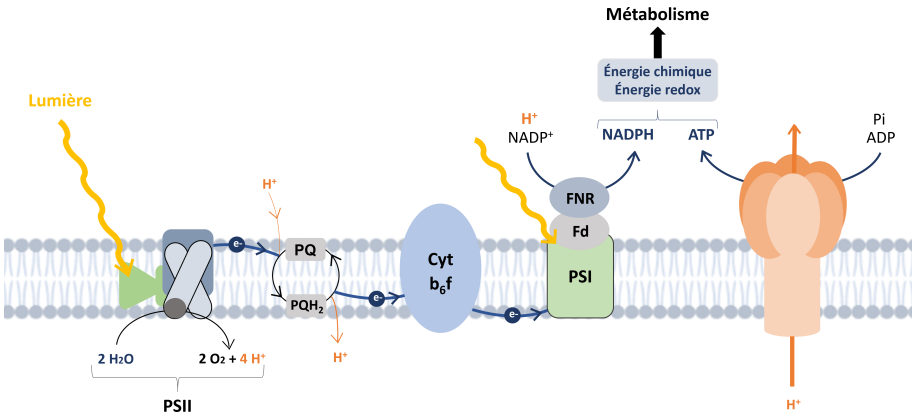


FIGURE 1.1. – Schéma de la phase photochimique de la photosynthèse représentant la chaîne de transport d'électrons. Les électrons issus de la photolyse de l'eau au niveau du photosystème II (PSII) sont transférés dans la chaîne de transport d'électrons au cours du processus photochimique pour induire la production d'ATP en créant un gradient de protons.

1.1.2. Le cycle de Calvin-Benson-Bassham

Chez les plantes supérieures et les algues, le cycle de CBB a lieu dans le stroma des chloroplastes. Il s'agit d'un ensemble de 13 réactions enzymatiques catalysées par 11 enzymes dont certaines utilisent le NADPH et l'ATP comme substrat et permet l'assimilation du CO_2 afin de produire des glucides sous forme d'amidon dans le chloroplaste ou de saccharose dans le cytoplasme [13].

1.1.2.1. Enzymes impliquées

La première étape de ce cycle est une réaction de carboxylation, elle implique une enzyme clé : la Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygénase (RuBisCO) (PDB 1GK8) qui est constituée de deux types de sous unités (une grosse sous-unité, L de 50-55 kDa et une petite S de 10-15 kDa) chez les plantes et les microalgues [108]. La réaction catalysée par la RuBisCO nécessite une activation préalable de cette enzyme par un ion magnésium et une molécule non-substrat de CO_2 (impliquée dans la carbamylation de la lysine en position 201 de la grosse sous-unité [62]. S'ensuit, l'interaction entre l'enzyme dans sa forme étendue avec le ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP). Après réarrangement structural, la RuBisCO adopte sa conformation fermée et permet la fixation d'une molécule de CO_2 et génère un intermédiaire instable à six atomes de carbone qui est clivé en deux molécules de 3-phosphoglycérate (PGA). L'étape de réduction commence ensuite par la phosphoglycérate kinase (PGK) qui utilise l'ATP pour la phosphorylation du PGA pour produire le 1-3-bisphosphoglycérate (BPGA). Celui-ci est déphosphorylé et réduit en présence de NADPH par la GAPDH pour générer du glycéraldéhyde-3-phosphate (G3P) qui sera utilisé par le cycle de CBB mais aussi par d'autres voies métaboliques. Le ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) est ensuite régénéré par

les activités enzymatiques successives de la triose phosphate isomérase (TPI), de la fructose-1,6-phosphate aldolase (FBA), de la fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), la transcétolase (TRK), la sedoheptulose1,7 bisphosphatase (SBPase), la ribulose-5-phosphate épimérase (RPE) et la ribose-5-phosphate isomérase (RPI). La dernière enzyme qui intervient pour la régénération du RuBP est la phosphoribulokinase (PRK) qui catalyse la phosphorylation du ribulose-5-phosphate (Ru5P) en RuBP en consommant de l'ATP.

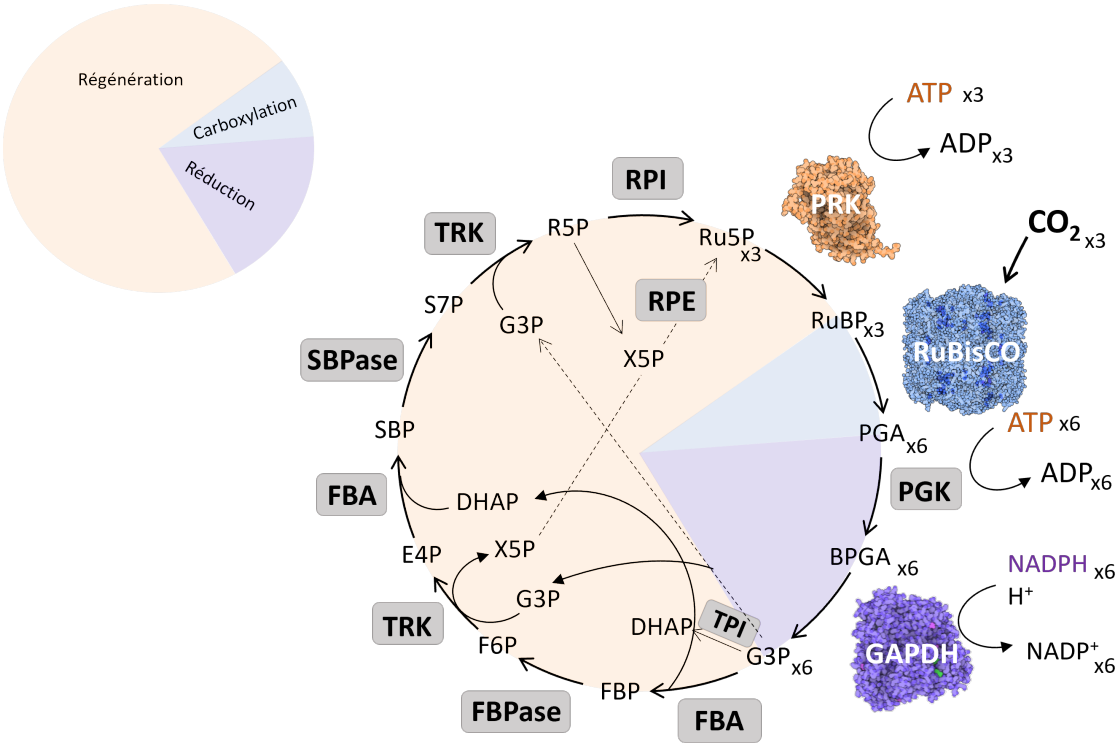


FIGURE 1.2. – Ensemble des réactions enzymatiques du cycle de CBB. Les structures des protéines sont générées à partir des données de la « Protein Data Bank » (PDB) via [147]. ribose-5-phosphate isomérase (RPI), phosphoglycérate kinase (PGK), fructose-1,6-phosphate aldolase (FBA), fructose-1,6-bisphosphatase (FBPase), triose phosphate isomérase (TPI), transcétolase (TRK), sedoheptulose1,7 bisphosphatase (SBPase). Selon [94].

Presque toutes les structures des enzymes du cycle CBB sont aujourd'hui résolues pour l'organisme modèle *Chlamydomonas reinhardtii*. Par exemple, la structure tridimensionnelle de la PRK, un homodimère de 70 kDa, a été résolue en 2019 et consiste en un long feuillet β mixte de neuf brins entouré par neuf hélices α et de quatre autres brins β [68]. Cependant, la PRK bactérienne est octamérique et ses monomères ont une similarité structurelle limitée avec celles des plantes et des archées, qui sont aussi des dimères [74]. Chez les plantes supérieures, la GAPDH existe sous différentes formes comme un hétérotétramère composé de

deux sous-unités GapA et de deux sous-unités GapB (A_2B_2), un homotétramère composé de quatre sous-unités GapA et sous forme d'hexadécamère (A_8B_8). Chez les algues vertes, il existe une forme unique de GAPDH, l'homotétramère A_4 [180]. Sa structure a été résolue récemment par cristallographie (PDB 7ZQ3, 7ZQ4, 7ZQK) [121]. D'autres enzymes du cycle CBB ont également fait l'objet de publications récentes comme la SBPase (PDB 7B2O) [131], la FBA (PDB 7BN) [95] et la RPI (PDB 6ZXT pdb) [96].

1.1.2.2. Régulation du cycle

La régulation obscurité/lumière du cycle de CBB se fait grâce à une combinaison complexe de processus biochimiques, y compris des réactions d'oxydoréduction, une transition des valeurs de pH, des interactions protéine-protéine qui sont décrits ci-dessous.

Oxydoréduction Une partie des enzymes du cycle de CBB est régulée par des protéines qui sont les thiorédoxines (TRX) [100]. Cette régulation se fait par une réaction de modification covalente impliquant l'état d'oxydation des groupements thiols de résidu cystéine dans les enzymes. Lorsqu'ils sont oxydés pour former des liaisons disulfures, les enzymes sont inactives ; lorsque les ponts disulfure sont réduits, les enzymes sont actives. Les TRX contiennent elles-mêmes des groupements thiols adjacents qui peuvent être oxydés en disulfures. Elles sont oxydées entre autres par les 2-Cys-peroxiredoxines, mais sont réduites par la ferrédoxine, le composant de transport d'électrons qui est lui-même réduit par le photosystème I et qui, à son tour, réduit le NADP en NADPH [50]. Ainsi, l'état d'oxydoréduction de la TRX détecte l'activation des réactions lumineuses et la transmet pour activer, par exemple, la PRK [69]. Les résidus cystéine régulateurs de cette enzyme se trouvent dans les parties N-terminale et C-terminale de la protéine (Cys16-Cys55 et Cys243-Cys249 chez *C. reinhardtii*) [181]. En conditions lumineuses, les TRX réduites catalysent la réduction du pont disulfure Cys16-Cys55, relâchant ainsi les contraintes structurelles qui perturbent la liaison correcte de l'ATP et déclenchant l'activation catalytique de la PRK [125]. À noter que cette régulation est différente chez les bactéries photosynthétiques où la PRK est octamérique et régulée de façon allostérique par le nicotinamide adénine dinucléotide, forme réduite (NADH) [130].

Interaction protéine-protéine La régulation de la PRK et de la GAPDH est en partie régulée par une protéine chloroplastique (de 8,5 kDa chez *C. reinhardtii*), la Chloroplast Protein 12 kDa (CP12). L'interaction de la CP12, dans un premier temps avec la GAPDH puis avec la PRK permet la formation d'un complexe ternaire où l'activité des enzymes décroit (détaillée dans la partie 1.3.2).

pH La lumière induit un transfert d'électrons dans l'appareil photosynthétique couplé à la translocation de protons à travers les membranes des thylacoïdes (1.1). Cela entraîne une acidification de la lumière des thylacoïdes et une alcalinisation du

stroma. Cette alcalinisation de pH 7 à 8 active la FBPase et la RuBisCO [76], [199] [137]. De plus, la translocation des protons à travers les membranes des thylacoïdes génère un gradient de protons (ΔpH) et un potentiel électrique (ΔΨ), qui ensemble forment la force motrice des protons (pmf) nécessaire au fonctionnement de l'ATP synthase dont son produit est ensuite utilisé dans le cycle de CBB [185].

Ion magnésium A la lumière, la concentration de Mg^{2+} augmente de 1 à 3 mM dans le stroma, une augmentation faible mais suffisante pour avoir un rôle régulateur [146]. Il a été montré qu'en effet, la présence de Mg^{2+} augmente l'activité de la FBPase [30]. C'est également le cas pour la TRK de *C. reinhardtii* qui nécessite une concentration d'ion Mg^{2+} de 1 mM pour être activable par le signal d'oxydo-réduction [144].

1.2. Le paradoxe de la RuBisCO

La RuBisCO est présente chez plus de 99,5 % des organismes photoautotrophes [148]. Il s'agit de la protéine la plus abondante de la planète qui catalyse la fixation d'environ 120 gigatonnes de carbone à partir du CO_2 atmosphérique chaque année [14]. Cependant, cette enzyme, si bien conservée, présente des limitations comme sa double affinité pour le CO_2 et l'oxygène ou encore un taux de renouvellement catalytique ou « turnover » lent par site actif.

1.2.1. La promiscuité de la RuBisCO

Une particularité de la RuBisCO, citée précédemment comme une limitation, est son activité oxygénase dont son origine reste encore inconnue aujourd'hui [176]. En effet, l'oxygène peut entrer en compétition avec le CO_2 pour les sites catalytiques de la RuBisCO et conduire à la photorespiration [21], [140] [156], un processus entraînant un prélèvement constant sur le pool de RuBP et une diminution de l'efficacité de fixation de carbone jusqu'à 50 % pour les climats les plus chauds [192]. En effet, la spécificité de la RuBisCO diminue avec une augmentation de la température. Avec la photorespiration, la RuBisCO va aboutir à la formation d'une molécule de PGA (contre deux pour la carboxylation) et à une molécule à deux atomes de carbone, le phosphoglycolate, rapidement déphosphorylé en glycolate par la phosphoglycolate phosphatase (Figure 1.3). Le glycolate est ensuite transporté dans le peroxysome puis oxydé par la glycolate oxydase en glyoxylate qui peut être transformé en glycine. Deux molécules de glycine peuvent être transformées en une molécule de sérine par un complexe glycine décarboxylase dans les mitochondries qui constitue la seule perte de carbone avec une molécule de CO_2 dégagée. De retour dans le peroxysome, la sérine est modifiée en hydroxypyruvate par la sérine-glyoxylate aminotransférase et l'hydroxypyruvate en glycérate par l'hydroxypyruvate réductase. Le glycérate est transporté dans le chloroplaste où il

est phosphorylé par la glycérate kinase en 3-phosphoglycérate, la molécule clé qui relie la photorespiration et le cycle CBB [83] [135].

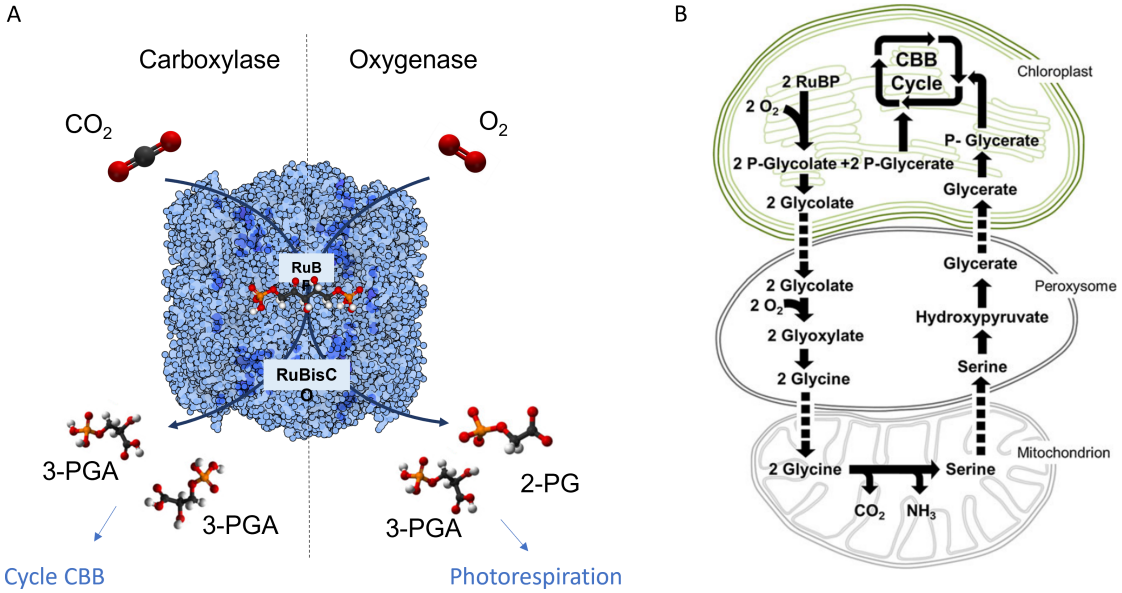


FIGURE 1.3. – **A.** Double fonction carboxylase/oxygénase de la RuBisCO. **B.** Schéma de la voie photorespiratoire indiquant les principaux intermédiaires et les différents compartiments impliqués. De [135].

.

Même si la photorespiration conduit à une perte globale de carbone, il est admis qu'elle est essentielle pour les organismes photosynthétiques puisque si l'une de ses principales enzymes est perturbée, le développement de l'organisme est affecté [164] [16]. Il a également été proposé que l'oxygénation soit un mécanisme de dissipation d'énergie et serait bénéfique dans certaines conditions de stress, notamment contre la photoinhbition [142].

1.2.2. La faible affinité pour le dioxyde de carbone de la RuBisCO

Un des points faibles de la RuBisCO pour les organismes aquatiques est l'utilisation du CO_2 qui a une diffusion environ 10 000 fois plus lente dans l'eau que dans l'air [166]. De plus, le carbone minéral (Ci) est majoritairement sous forme de bicarbonate (HCO_3^-), qu'il s'agisse d'eau douce ou d'eau de mer. La proportion de carbone minéral dépend de l'alcalinité et du pH du milieu (3.5), ce qui réduit considérablement la concentration de CO_2 par rapport à l'air [63]. La concentration de CO_2 à l'équilibre entre l'air et l'eau douce à une pression partielle de CO_2 atmosphérique de 400 ppm varie entre 25 $\mu mol\,L^{-1}$ à 5°C et 14 $\mu mol\,L^{-1}$ à 25°C [107] [109]. Cette faible concentration s'explique par la Loi de Henry qui énonce qu'à température constante et à saturation, la quantité de gaz dissous dans un liquide

est proportionnelle à la pression partielle qu'exerce ce gaz sur le liquide. Ainsi, la concentration du CO_2 dans l'eau dépend de sa pression partielle dans l'atmosphère sus-jacente et de sa solubilité qui dépend elle-même de la salinité, de la pression et de la température. De plus, une fois dissous, le CO_2 réagit rapidement avec l'eau pour former des ions bicarbonate (HCO_3^- et carbonate CO_3^{2-} (Equations (1.2)).

$$\begin{aligned} CO_2 + H_2O &\rightleftharpoons H_2CO_3 \\ H_2CO_3 &\rightleftharpoons HCO_3^- + H^+ \\ HCO_3^- + H^+ &\rightleftharpoons CO_3^{2-} + 2H^+ \end{aligned} \tag{1.2}$$

Un deuxième point concerne l'inefficacité catalytique de la RuBisCO pour la fixation du CO_2. En effet, les constantes catalytiques (k_{cat}) de l'enzyme, c'est-à-dire le nombre de réactions enzymatiques qu'une seule molécule d'enzyme saturée peut catalyser, par unité de temps, sont considérées comme faibles. Elles se situent entre 1 et 10 s^{-1} et aucune valeur de k_{cat} mesurée ne dépasse 15 s^{-1} alors que les enzymes métaboliques centrales typiques ont un taux de renouvellement autour de 80 s^{-1} [39]. À titre de comparaison avec d'autres enzymes du cycle de CBB, la GAPDH a une k_{cat} d'environ 300 s^{-1} et la PRK de 1000 s^{-1} [4].

1.2.3. Les mécanismes de concentration du dioxyde de carbone

Avec cette faible affinité pour le CO_2 de la RuBisCO, les organismes ont développé des moyens d'adaptation pour maintenir un taux d'efficacité photosynthétique important. Quand la concentration de carbone externe est faible, les mécanismes de concentration du CO_2 (CCM) se mettent en place. Il s'agit de changements adaptatifs qui ont lieu à tous les niveaux : métaboliques, physiologiques et structurels, parallèlement avec une série d'événements régulateurs au niveau des gènes et des protéines [134]. Dans la littérature, deux types de CCM sont différenciés : les CCM biophysiques (transporteurs de bicarbonate et anhydrases carbonique qui sont présents dans les carboxysomes chez les cyanobactéries, et dans les pyrénoïdes chez de nombreuses algues, et les CCM biochimiques (photosynthèse en C4 et métabolisme acide crassulacéen (CAM)) [149]. Il a été montré qu'il existe une corrélation entre le taux de CO_2 et le changement des paramètres cinétiques de la photosynthèse [189]. À haute concentration de CO_2, les microalgues ont des paramètres cinétiques semblables aux plantes supérieures C3 (dépourvus de CCM) et à faibles concentrations de CO_2, aux plantes dites C4.

1.2.3.1. Flux de carbone minéral

Les CCM utilisent un transport actif de carbone minéral (Ci) pour augmenter les concentrations intracellulaires de CO_2 dissous au site de localisation de la RuBisCO, c'est-à-dire que Ci doit ainsi passer à travers la membrane plasmique et l'enveloppe chloroplastique. Cela va entraîner une accumulation intracellulaire de HCO_3^- qui peut représenter une augmentation de la concentration de jusqu'à 1000 fois par

rapport à des environnements à faible teneur en CO_2, peut-être le système le plus efficace à ce jour [194].

Si *C. reinhardtii*, modèle des microalgues vertes, est pris comme exemple, trois états adaptatifs sont décrits à ce jour en fonction de la concentration de CO_2 disponible. Cela a un impact direct sur les paramètres cinétiques de l'efficacité photosynthétique. En effet, à :

- hautes concentrations de CO_2, c'est-à-dire, à une pression partielle de P_{CO_2} = 0.5%, le K½ (pour le "Dissolved Inorganic Carbon" (DIC)) qui correspond à la concentration de substrat nécessaire pour atteindre la moitié de la vitesse maximale de la photosynthèse, est élevé, de l'ordre de 156 µM
- faibles concentrations de CO_2, P_{CO_2} = 0,04% de CO_2, il y a une diminution du K½ de la photosynthèse, qui devient de 31 µM [170] donc une augmentation de l'affinité pour le CO_2 [35]
- très faibles concentrations de CO_2, P_{CO_2} moins de 0,01%, il y a une diminution de la V_{max} et une diminution encore plus importante du K½ de la photosynthèse

Il est important de noter que ces concentrations peuvent différer en fonction des conditions de cultures, notamment avec le taux d'aération, la densité cellulaire, l'intensité lumineuse ou encore la température. Il faut aussi noter que cette définition de faible et très faible concentration varie en fonction des auteurs. De plus, la proportion de carbone minéral est dépendante du pH [107] et *C. reinhardtii* croît en eau douce, connue pour être très peu tamponnée. Ainsi, les changements de pH dus au relargage du CO_2 (respiration) ou de sa consommation (photosynthèse) peuvent être rapides et changer la proportion des trois formes de carbone.

Les acteurs les plus importants des CCM sont sans doute transporteurs de bicarbonate et les anhydrases carbonique (CAH). Les anhydrases carbonique catalysent la réaction réversible de CO_2 en HCO_3^- [171] (Figure 1.4). La première découverte chez les microalgues vertes est la CAH3, localisée dans le lumen des thylacoïdes. La délétion de cette enzyme a montré qu'elle était responsable de la déshydratation du bicarbonate [165] [73]. La CAH1, induite en faible concentration de CO_2 est une anhydrase carbonique périplasmique [54] qui sert à maintenir l'équilibre du Ci à la surface de la cellule pour compenser la conversion lente du CO_2 en HCO_3^-. La CAH2, aussi périplasmique a le même rôle, mais elle est seulement induite pour des concentrations supérieures à 1% [53] [150]. CAH4 et CAH5 sont des anhydrases carboniques mitochondriales, induites en faibles concentrations de CO_2 [49]. La CAH6 est localisée dans le stroma du chloroplaste [129].Les CAH7, CAH8, CAH9 [202] ainsi que CAG3, CAG2 et CAG1 [27] ont été identifiées, mais sont peu caractérisées.

D'autres protéines jouent également un rôle important dans les CCM tels que les transporteurs de Ci (Figure 1.4) et font l'objet d'études récentes les mettant en lien avec le flux d'electrons de la photosynthèse [26] [24].

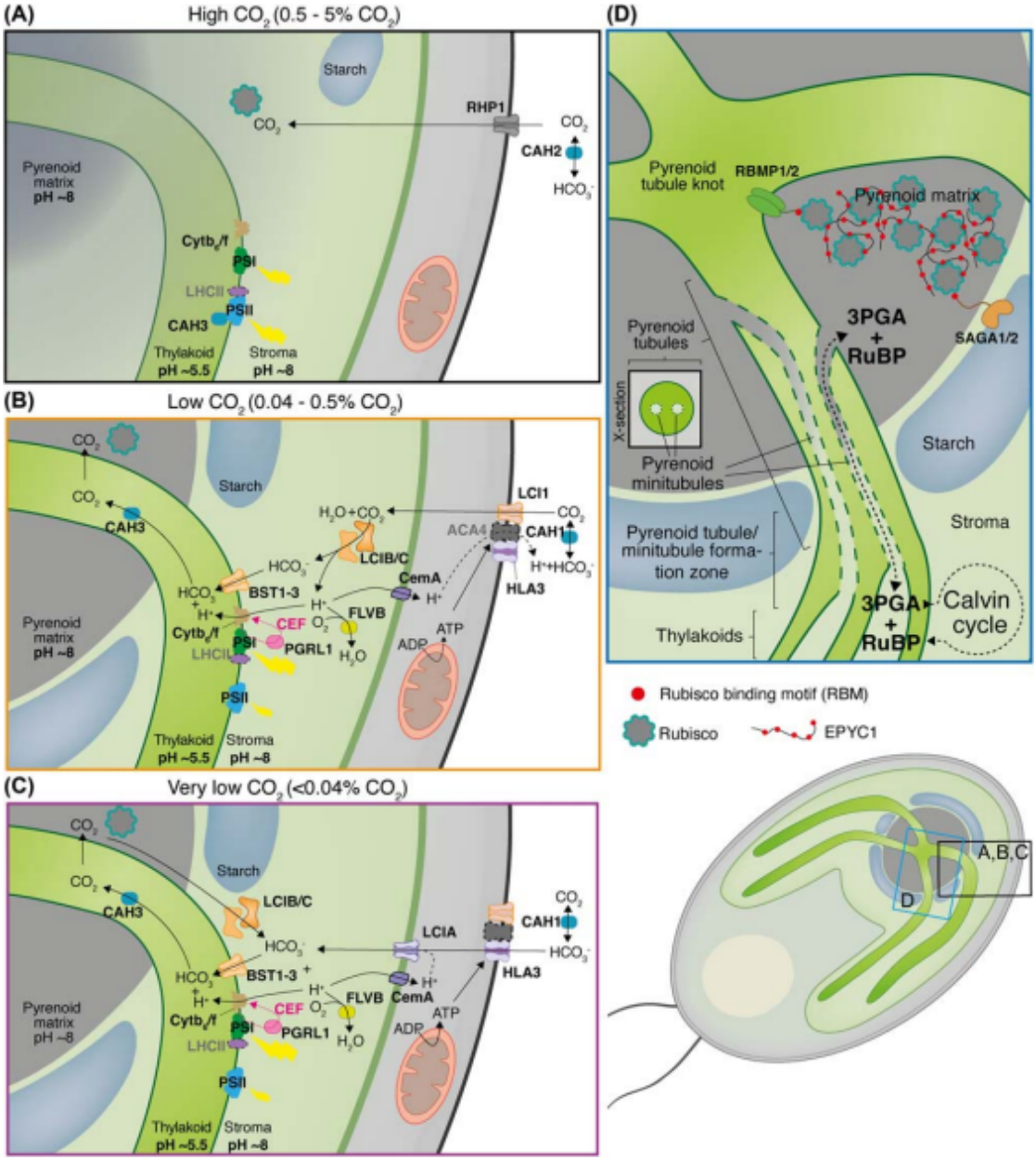


FIGURE 1.4. – Différents états d'acclimation au CO_2 chez *C. reinhardtii* représentant les composants majeurs des CCM. De [201].

.

1.2.3.2. Le pyrénoïde

Les algues eucaryotes déploient un CCM centré sur le pyrénoïde qui va servir de centre de fixation pour le CO_2 (Figure 1.4). Il s'agit d'une microstructure, ou séparation de phase liquide-liquide [52] contenant plus de 100 protéines dont la RuBisCO qui y est condensée. Cette condensation est facilitée par la protéine désordonnée essential pyrenoid component (EPYC) [110]. EPYC semble interagir

exclusivement avec la petite sous-unité de la RuBisCO via des motifs de liaison à la RuBisCO (RBMs) [75]. La taille du pyrénoïde varie selon les espèces, de 1 à 2 micromètres de diamètre, et ils se rétractent ou s'étendent de manière dynamique en réponse à la disponibilité du CO_2 et de la lumière. Il est entouré d'une gaine d'amidon et pénétré par un réseau de tubules dérivant des thylacoïdes [127]. Ce réseau de tubules permet l'acheminement du CO_2 vers le pyrénoïde selon une étude récente [77]. Les études approfondies sur le pyrénoïde sont récentes et certains scientifiques ont produit des pyrénoïdes dans des plantes supérieures afin d'améliorer les rendements [1]. Les CCM à base de pyrénoïdes sont très abondants et il est estimé qu'ils sont responsables d'environ 30% de la capture du carbone au niveau mondial [12].

1.3. Fonctions métaboliques de la protéine CP12

Comme expliqué précédemment, la protéine chloroplastique CP12 joue un rôle clé dans la régulation lumière/obscurité du cycle de CBB en inhibant les activités enzymatiques de la PRK et la GAPDH par la formation d'un complexe ternaire. Cette protéine est très répandue chez les organismes photosynthétiques [67] [167], appartient à la famille des protéines intrinsèquement désordonnées (IDP), c'est-à-dire qu'elle ne possède pas de structure tertiaire stable. Cette protéine de 80 résidus d'acides aminés présente un biais dans sa composition en acides aminés : elle est enrichie en acides aminés chargés, possède un petit nombre de résidus hydrophobes (Figure 1.10). Plus précisément, la CP12 est une protéine conditionnellement désordonnée (CDP) [98] qui dépend de l'état d'oxydoréduction de ses quatre résidus cystéine. Dans des conditions oxydantes, à l'obscurité, ses résidus cystéine forment deux ponts disulfures structurant deux boucles polypeptidiques qui confèrent une certaine stabilité à la protéine. Comme beaucoup de CDP, la CP12 a des rôles clés et son désordre conditionnel redox-dépendant est important pour sa fonction principale : la régulation lumière/obscurité du cycle CBB. La partie C-terminale de la CP12 oxydée se lie dans un premier temps à la GAPDH et puis ce complexe se lie à la PRK. À la lumière, les conditions réductrices prévalent dans le chloroplaste, et la CP12 est totalement désordonnée et il y a dissociation du complexe ternaire et la GAPDH et la PRK deviennent actives (1.5). Cependant, des études récentes révèlent que la CP12 peut avoir d'autres fonctions que la régulation du cycle du CBB.

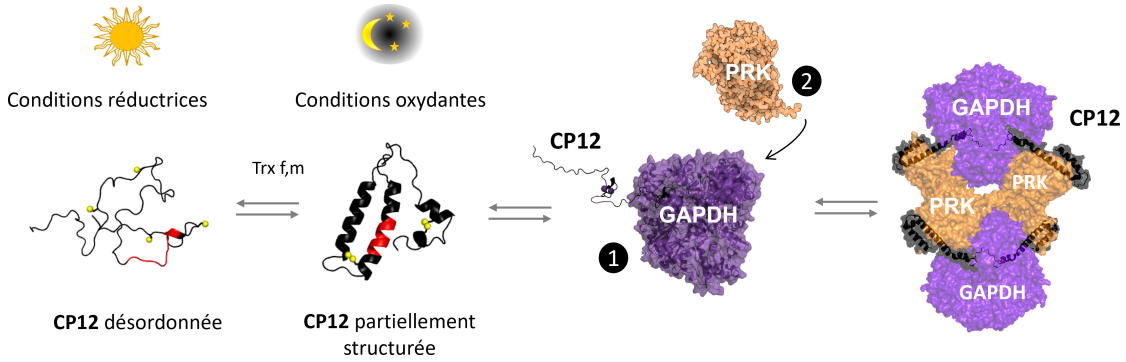


FIGURE 1.5. – Changement des propriétés structurales de la CP12 selon son état d'oxydoréduction. En conditions réductrices, la CP12 est désordonnée. En conditions oxydantes, la CP12 est partiellement repliée. Dans ces conditions, elle interagit avec le tétramère de GAPDH puis ce complexe interagit avec le dimère de PRK. Les résidus cystéine sont représentés en jaune, le domaine conservé en rouge.

1.3.1. Une protéine répandue dans le monde photosynthétique

La CP12 est largement répandue dans le monde photosynthétique. Une étude a d'ailleurs confirmé qu'elle était présente dans tous les génomes connus de cyanobactéries et de *Plantae* excepté *Prasinophyceae Ostreococcus* et *Micromonas* [67].

La séquence canonique de la CP12 contient une paire de résidus de cystéine N-terminale séparée par sept ou huit résidus, une paire de résidus de cystéine C-terminale séparée par huit résidus englobant un résidu proline central et une séquence conservée AWD_VEEL (Figures 1.6 et 1.7). Les deux paires de résidus cystéine sont capables de former des ponts disulfures nécessaires à la formation du complexe ternaire chez les algues vertes et les plantes supérieures [6] [117]. Chez *C. reinhardtii* [6] et [66] et chez *Pisum sativum* [198], la rupture du pont-disulfure N-terminal empêche le recrutement de la PRK dans un complexe stable, mais l'absence de conservation de cette paire de cystéine indique que sa présence pourrait ne pas être une condition pour l'interaction CP12/PRK. Cependant, chez la glaucophyte *Cyanophora paradoxa*, la CP12 est dépourvue des deux résidus cystéine à l'extrémité N-terminale [67]. L'absence de la paire de résidus de cystéine à l'extrémité N-terminale a également été constatée chez l'algue rouge *Galdieria sulphuraria* et chez la cyanobactérie *Synechococcus elongatus* PCC7942, mais elle n'a pas entravé la formation du complexe ternaire [139] [175]. Il est toutefois possible que l'affinité entre la PRK et la CP12 soit beaucoup plus faible lorsque ce pont disulfure est absent et que cette absence module la stabilité de l'hélice α en position N-terminale.

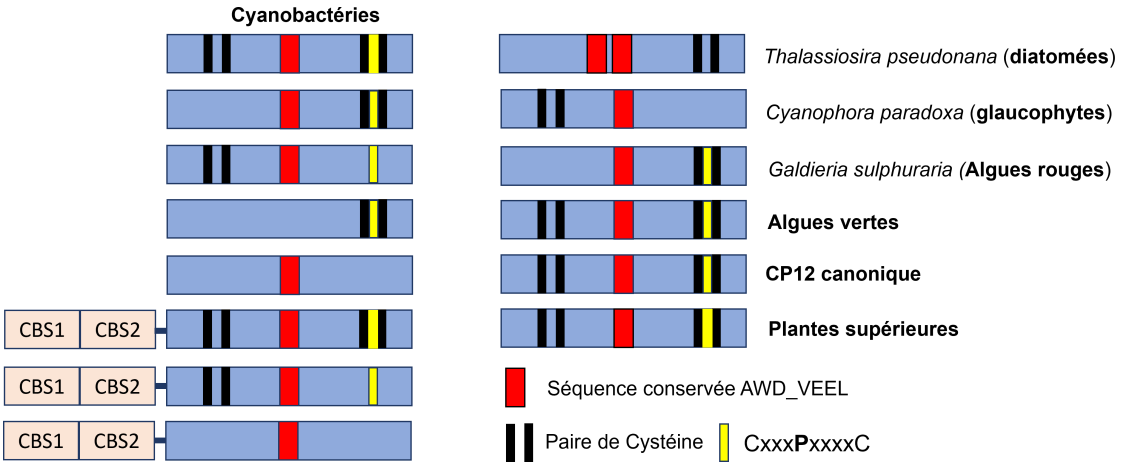


FIGURE 1.6. – Représentation schématique des variants structuraux de la CP12. CBS : cystathionine β-synthase. Les lignes noires représentent les paires de résidus cystéine, les rectangles rouges représentent la séquence conservée et les lignes jaunes représentent la proline. Modifiée de [167].

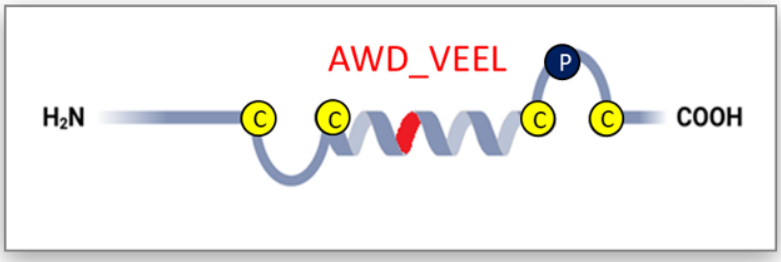


FIGURE 1.7. – Structures secondaires prédites de la CP12. Les résidus de cystéine conservés sont indiqués par des cercles noirs, et les résidus de proline conservés par des cercles jaunes. La numérotation provient de la séquence CP12 de *C. reinhardtii*. Modifiée de [198].

Les protéines CP12-1 et CP12-2 sont présentes chez toutes les plantes supérieures, et malgré des différences dans leur séquence et leur expression, une redondance dans leurs fonctions a été proposée [113], [163] [105]. Une troisième forme de CP12, la CP12-3, est parfois présente chez les plantes supérieures et forme un seul clade dans les deux arbres phylogénétiques [67]. Chez *A. thaliana*, la localisation de ces trois isoformes diffère ; CP12-2 est principalement présente dans les tissus photosynthétiques, et suit les niveaux d'expression des enzymes du cycle CBB, tandis que CP12-3 et CP12-1 sont exprimés dans les tissus non photosynthétiques tels que les racines [163]. Il a été également montré que la CP12-3 a un niveau d'expression plus faible chez *Arabidopsis thaliana* que les deux autres formes [113]. En revanche, chez *C. reinhardtii*, une isoforme unique, localisée dans le chloroplaste,

a été mentionnée. Dans la plante C4 qu'est le maïs (*Zea mays*), un homologue de CP12 a été trouvé dans les faisceaux cribro-vasculaires mais pas dans les cellules du mésophylle [55]. Récemment, deux protéines CP12 ont été trouvées dans la canne à sucre, une autre plante en C4 [112]. Bien que cela n'ait jamais été rapporté, il est très probable que les plantes CAM possèdent également cette protéine.

Chez les cyanobactéries, des protéines CP12 fusionnées à deux domaines de la cystathionine β synthase (CBS) (CBS-CP12) ont été identifiées. L'analyse de 333 génomes de cyanobactéries a révélé la présence de nombreux de ces variants [167]. Une protéine semblable à la CP12 a été trouvée dans la diatomée d'eau douce *Asterionella formosa*, associée à la GAPDH et à la ferrédoxine NADP réductase, mais la séquence de cette protéine n'est pas disponible [124] [19]. En revanche, chez la diatomée marine *Thalassiosira pseudonana*, trois protéines CP12 sont identifiées. CP12-1 et CP12-2 sont prédites pour être localisées dans le chloroplaste, mais seule la CP12-2 a été caractérisée [160]. Le gène codant pour cette dernière est d'ailleurs retrouvé chez d'autres diatomées. Néanmoins, chez les diatomées, le complexe PRK/GAPDH/CP12 n'a jamais été trouvé, et il semble que l'absence de deux résidus cystéine aux positions 245 et 248 sur la PRK des diatomées pourrait l'expliquer [181]. Chez *T. pseudonana*, la CP12 présente des caractéristiques structurales différentes de celles des plantes et microalgues. Elle est dimérique, contient deux copies homologues du motif AWD_VEEL et ne possède qu'une paire de résidus cystéine en position C-terminale [160].

Les cyanophages infectant les picocyanobactéries marines des genres *Prochlorococcus* et *Synechococcus* expriment une protéine dont l'extension C-terminale est similaire à celle de CP12. Cette protéine est capable d'interagir avec le site actif de la GAPDH de l'hôte, de stopper son cycle de CBB comme le fait la CP12 canonique et utilise le NADPH produit par l'hôte pour alimenter sa propre biosynthèse de désoxynucléotides pour la réplication [182]. D'autres protéines possèdent également une extension C-terminale similaire à l'extrémité C-terminale de la CP12, comme la sous-unité B de la GAPDH A2B2 des plantes supérieures, l'adénylate kinase 3 (ADK3) de *C. reinhardtii* [206]. Cette extrémité CxxxPxxxxC interagit avec la GAPDH dans le complexe ternaire et cette interaction est également conservée dans l'A2B2 GAPDH et l'ADK3 [115]. Chez les algues où la GAPDH possède uniquement la sous unité A, la CP12 pallie l'absence de la sous unité B. Chez ces algues, l'homotétramère A4 est présent. En revanche chez les algues vertes, Prasinophyceae, *Ostreococcus tauri* et *Ostreococcus lucimarinus*, la CP12 n'est pas présente, mais elles possèdent la sous-unité B de la GAPDH, qui sont typiques des Streptophytes [154].

1.3.2. Régulation du cycle de Calvin-Benson-Bassham

La CP12 est connue pour être le «chef d'orchestre» du cycle CBB. L'implication de la CP12 en conditions oxydantes dans des complexes supramoléculaires contenant la GAPDH et la PRK a été démontrée dans plusieurs organismes photosynthétiques, que ce soit chez les plantes supérieures [198], [197] [157] ou chez les algues vertes et

rouges [65], [139]. L'affinité de la CP12 pour la GAPDH diffère d'une espèce à l'autre avec une constante de dissociation pour GAPDH/CP12 de l'ordre du micromolaire chez *A. thaliana* [118] mais de l'ordre du nanomolaire chez *C. reinhardtii* [66].

Chez les plantes et les algues vertes, la régulation du complexe se fait par l'intermédiaire de l'état rédox des résidus cystéine qui sont la cible des TRX. Chez *A. thaliana*, il a été montré que les TRX f et m sont capables de dissocier *in vitro* le complexe via la réduction des résidus cystéine de la CP12 [116]. Chez *C. reinhardtii*, la présence de la CP12 diminue le temps nécessaire à l'activation de la PRK par les TRX : environ 20 secondes contre environ 10 minutes pour la PRK seule [5]. Chez les feuilles du pois, le complexe ternaire est également régulée en fonction de l'intensité lumineuse : en haute intensité, le complexe se dissocie en quelques minutes puis commence à s'associer à nouveau en faible intensité lumineuse en quelques minutes. Mais cinq minutes à l'obscurité sont nécessaires pour que toutes les protéines PRK et GAPDH soit associées dans le complexe ternaire [81]. Chez *C. reinhardtii*, il faut 20 à 30 min pour une dissociation complète du complexe *in vitro* en présence d'un réducteur [4]. Chez le pois ainsi que chez *C. reinhardtii*, la PRK n'a pas besoin d'être complétement oxydée pour être en complexe [97] [184], contrairement à *A. thaliana* [117]. Chez les cyanobactéries, il est intéressant de noter que la plupart des enzymes du CBB (dont la PRK) ne sont pas régulées par l'état d'oxydoréduction contrairement aux plantes supérieures et aux algues vertes. Chez *S. elongatus* PCC7942, le complexe se forme d'ailleurs en réponse au rapport NADP(H)/NAD(H) et non via les TRX [175].

La formation de ces complexes supramoléculaires entraine la diminution des activités enzymatiques de la PRK et de la GAPDH [198], [97], [116]. De plus, l'étude de mutants de délétion de la CP12 chez différents organismes révèle des conséquences sur les enzymes du cycle CBB. Chez *A. thaliana*, des lignées transgéniques avec une triple mutation *cp12-1,2,3* ont été générées et ont montré un phénotype sévère de croissance avec une diminution de la quantité de protéine PRK mais pas de son expression génique. La quantité de la protéine GAPDH reste cependant inchangée. Les lignées transgéniques qui ont montré une déficience dans l'assimilation du carbone étaient celles avec la plus faible quantité de PRK et non celles avec les phénotypes les plus sévères [105]. Des études de mutants de délétion de la CP12 chez la plante tropicale *Stylosanthes guianensis* et chez *Nicotiana tabacum* ont également révélé un impact négatif sur la croissance [80][102] et sur l'efficacité photosynthétique en l'absence de la protéine, bien que ce dernier soit mineur chez le tabac [80].

1.3.3. La CP12 au-delà du cycle de Calvin-Benson-Bassham

Comme beaucoup d'IDP, la CP12 est une protéine multipliant les partenaires et de plus en plus d'études montrent également qu'elle est en mesure de multiplier ses fonctions avec un rôle important dans la protection de divers stress chez les organismes photosynthétiques. Chez *C. reinhardtii*, dans des conditions oxydantes, elle peut lier d'autres enzymes telles que la malate déshydrogénase, le facteur d'élon-

gation 1α2 et la protéine associée au ribosome de 38 kDa, mais dans une moindre mesure en comparaison avec la GAPDH, la PRK et la fructose-1,6-bisphosphate aldolase [48]. En l'absence de CP12, l'activité de la malate déshydrogénase diminue chez le tabac [80].

La cynabactérie *Synechococcus elongatus* PCC7942 délétée de la CP12, dans des conditions de haute intensité lumineuse, croit plus lentement que la souche sauvage, le niveau de chlorophylle diminue et un augmentation des « reactive oxygen species » (ROS) est observée [174]. Chez *A. thaliana*, le complexe ternaire permet une protection complète de la GAPDH contre les dommages oxydatifs causés par des oxydants forts tels que H_2O_2, glutathion oxydé (GSSG) ou du S-nitroglutathion (GSNO) [114]. Le complexe chez *C. reinhardtii* est aussi protégé contre l'oxydation causée par les oxydants GSSG ou GSNO [114]. De plus, il a été montré que la CP12 de *C. reinhardtii* agit comme une co-chaperone et permet de protéger la GAPDH contre l'aggrégation et l'inactivation à la chaleur [47].

La CP12 permet la séparation de l'activité du cycle CBB et de la voie des pentoses phosphate durant les cycles jour/nuit chez *Synechococcus elongatus* PCC7942 et chez les Plantae [175] [118]. À l'obscurité, la consommation d'oxygène par la souche délétée de la CP12 est plus faible et la concentration de RuBP, le produit de la réaction PRK est plus élevée que pour la souche sauvage. Chez les cyanobactéries, la principale voie métabolique à l'obscurité est la voie des pentoses phosphate qui comprend la synthèse et consommation du Ru5P. En inhibant l'activité de la PRK, qui consomme également le Ru5P, la CP12 régule ainsi le flux de carbone du cycle CBB vers la voie des pentoses phosphate à l'obscurité, [175]. En 2022, chez la cyanobactérie Synechocystis sp. PCC 6803, en l'absence de la CP12, il a été montré que la croissance est similaire à celle de la souche sauvage que ce soit en lumière continue ou en cycle lumière/obscurité. Cependant, une diminution de la croissance est observée chez le mutant en présence d'un inhibiteur de la photosynthèse (« Dichorophenyl-dimethylurea » (DCMU)) avec un apport de glucose. Les auteurs ont ainsi révélé le rôle essentiel de la CP12 dans le catabolisme du glucose en l'absence de photosynthèse [17] et [106]. Ils ont également montré son implication de la consommation de nicotinamide adénine dinucleotide phosphate, forme réduite (NADPH) ainsi que production de terpènes chez cette cyanobactérie.

Toujours chez les cyanobactéries, la CP12 fusionnée au domaine CBS de *Microcystis aeruginosa* a révélé que l'expression de cette protéine est clairement induite par la lumière. En outre, la CBS-CP12 s'oligomérise et forme un hexamère, mais ne forme pas de complexe ternaire avec la GAPDH et la PRK. Elle peut se lier à l'AMP et inhibe ensuite l'activation de PRK par les TRX [71]. Les auteurs proposent que cette nouvelle architecture confère à CP12 des fonctions régulatrices supplémentaires chez les cyanobactéries.

Chez la canne à sucre (Saccharum spp.), la quantité de protéine de l'une des isoformes de la CP12, la CP12-1, a diminué lors du syndrome de la feuille jaune [112]. Celui-ci correspond à une accumulation anormale de saccharose et d'amidon dans les feuilles, précédants leurs jaunissements. Cette CP12 pourrait être un point de régulation important dans le métabolisme des plantes C4, tandis que la RuBisCO

et la phosphoénolpyruvate carboxylase n'ont été régulées négativement qu'à un stade ultérieur et pourraient être des points secondaires.

Chez la légumineuse tropicale *Stylosanthes guianensis*, un rôle potentiel de la CP12 dans la tolérance au froid a été suggéré [102]. Une analyse transcriptomique du maïs a également révélé les différentes régulations des gènes sensibles au froid et, parmi eux, le gène CP12 est présent [9]. Récemment, une étude a confirmé ce rôle chez *C. reinhardtii* où, dans des conditions de froid, la CP12 est réduite par NADPH-dependent thioredoxin reductase C, déclenchant ainsi la dissociation du complexe PRK/CP12/GAPDH [177].

Un lien entre la CP12 et les CCM peut-être également suggéré puisque la quantité de CP12 augmente en faible concentration de CO_2 chez la diatomée marine *Thalassiosira pseudonana* [34] [160]. Cependant, chez Synechocystis sp. PCC 6803, la croissance est identique dans des conditions de faibles et de hautes concentrations de CO_2 [106]. De plus, la CP12 a été localisée par fluorescence confocale chez *C. reinhardtii*, elle est située à proximité du pyrénoïde, et sa répartition n'est pas homogène dans le stroma du chloroplaste [193].

Enfin, une analyse bioinformatique des séquences des protéines CP12 a révélé une certaine similarité structurelle avec des chaperons de cuivre d'*A. thaliana* qui jouent différents rôles dans l'homéostasie du cuivre [43], [78] [128]. Chez *C. reinhardtii*, il a été montré que la CP12 recombinante purifiée par chromatographie d'affinité sur des colonnes de nickel a une couleur jaune, même après dialyse avec un tampon dépourvu de métal et d'imidazole. Les spectres d'absorption de 280 à 600 nm montrent la présence d'un pic large autour de 410 nm et ces spectres ressemblent fortement à ceux de la ferrédoxine [43]. En utilisant la spectrométrie de masse sans dénaturation par électrospray, cette étude a montré *in vitro* que la CP12 était spécifiquement capable de lier Cu^{2+} et le Ni^{2+} avec une faible affinité (constantes de dissociation de 26 et 11 µM, respectivement), valeurs proches de celles obtenues pour la liaison du cuivre aux protéines prions (K_D de 14 µM) [168]. Le Cu^{2+} catalyse l'oxydation de la CP12 réduite, avec reformation des liaisons disulfures conduisant à la formation d'une CP12 oxydée, capable de se lier à un ion Cu^{2+}. Cependant, des études structurales ont montré que la GAPDH et PRK peuvent interagir avec la CP12 en présence ou en absence d'ions cuivre suggèrant que le cuivre n'est pas essentiel pour la fonction de la CP12 par rapport au complexe ternaire [119]. Bien que de nombreuses questions restent sans réponse, l'hypothèse que CP12 pourrait jouer un rôle dans l'homéostasie du cuivre peut être émise, comme d'autres chaperons du cuivre [78]. De plus, en utilisant la spectrométrie de masse, trois régions ont été identifiées comme étant impliquées dans la liaison des ions métalliques : Asp16-Asp23, Asp38-Lys50 et Asp70-Glu76 [47].

1.4. Vers l'étude des propriétés structurales de la CP12 dans des conditions physiologiques

1.4.1. Les protéines intrinsèquement désordonnées

La découverte de l'abondance naturelle et de l'importance fonctionnelle des protéines intrinsèquement désordonnées, également appelée « protéines dépliées à l'état natif » a changé le regard envers l'étude des protéines. Il est désormais largement admis que le paradigme structure-fonction des protéines qui a dominé les esprits scientifiques pendant plus de 100 ans, ne s'applique pas à toutes les protéines [187].

Les IDPs sont pourtant largement répandues dans l'ensemble des protéomes du règne du vivant, des virus [103] aux plantes et représentent jusqu'à 33 % des protéines présentes chez les Eucaryotes [203]. Elles diffèrent des protéines globulaires structurées par leur flexibilité. En effet, une IDP est une protéine fonctionnelle qui ne possède pas de structures secondaires et de structures tertiaires stables. Cela est notamment due à un biais dans leur composition en acides aminés puisqu'elles sont enrichies en acides aminés chargés par rapport aux protéines globulaires, et appauvries en acides aminés hydrophobes et elles présentent une proportion importante de résidus promouvant le désordre [186]. Leur plasticité conformationnelle et leur absence de structure rigide leur confèrent divers avantages fonctionnels leur permettant de participer à des interactions moléculaires multiples, et leur flexibilité leur permet d'avoir plusieurs partenaires d'interactions. Elle ont ainsi souvent été considérées comme le « hub » de réseau d'interaction de protéines. Elles peuvent former des complexes très stables ou transitoires, ou être impliquées dans des interactions de signalisation où elles subissent des transitions constantes entre des états ordonnés et désordonnés.

Elles restent cependant peu étudiées dans le domaine des algues alors qu'une étude récente menée chez *C. reinhardtii* a montré que 698 protéines étaient solubles à haute température, décrit comme étant une caractéristique des IDPs, puisque ces protéines sont dépourvues d'un noyau hydrophobe qui peut être exposé dans des conditions de dénaturation. De plus, 299 d'entre elles étaient prédites comme étant désordonnées selon des prédictions informatiques de désordre [205]. La protéine CP12, ainsi qu'EPYC1 restent les plus étudiées chez *C. reinhardtii* [93]. Chez les plantes, et plus particulièrement chez *A. thaliana*, la protéine LEA (« late embryogenesis abundant »), associée au stress est la plus caractérisée [152]. De plus en plus d'études s'intéressent aux fonctions inconnues des régions désordonnées chez divers organismes. Par exemple, la longue région désordonnée de la polysaccharides monooxygénases lytiques (LPMO) permet de moduler sa liaison à la cellulose ainsi que son activité enzymatique, une fonction cruciale pour la pathogénicité envers les plantes [173].

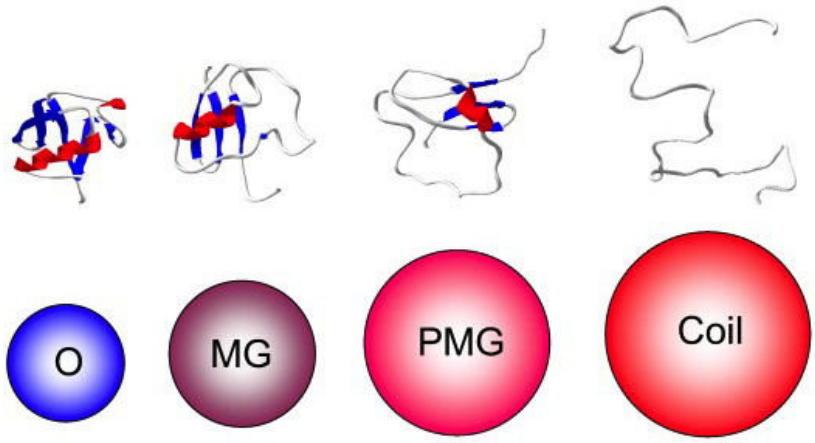


FIGURE 1.8. – Conformations possibles des protéines intrinsèquement désordonnées en solution. O, « Ordered » ; MG, « Molten Globule » ; PMG, « Pre-Molten Globule » ; Coil, pour « Random Coil ». De [188].

Les protéines désordonnées peuvent être classées en fonction de différentes propriétés telles que : leurs fonctions, la conservation de leur séquence en acides aminés au cours de l'évolution, leurs structures ou encore leur capacité à former des séparations de phase liquide-liquide [98]. En se basant sur la classification en fonction de leur structure, il est important de souligner que, malgré leur nom, les IDPs sont rarement complètement désordonnées, c'est à dire que l'échantillonage conformationel des IDPs n'est pas complètement aléatoire. Elles possèdent souvent des régions qui forment de manière transitoires des structures secondaires plus fréquemment que chez des polymères aléatoires ou « random coil ». Elles peuvent ainsi être classées en plusieurs catégories selon leurs propriétés structurales de plus ordonnées au moins désordonnées : les « molten globules » avec des structures secondaires présentes mais une structure tertiaire fluctuante, les "pre-molten globules" avec des structures secondaires transitoires et un ensemble plus relaché ; et les « random coil » avec une absence totale de structure organisée où aucune structure résiduelle n'est détectée dans la protéine libre en solution (1.8, [188]).

La différence entre les protéines repliées et les protéines désordonnées peut également être comprise d'un point de vue énergétique en analysant des paysages énergétiques potentiels (Figure 1.9). Le diagramme d'énergie libre des protéines qui se replient ont une forme d'entonnoir avec un seul minimum global, qui correspond à leur structure native stable [141]. En revanche, celui des protéines désordonnées possède plusieurs minima locaux d'énergie, séparés par de faibles barrières, ce qui permet aux IDPs de passer rapidement d'une conformation à une autre. Cela entraîne un ensemble de nombreuses structures différentes équiprobables car ayant des énergies à peu près égales.

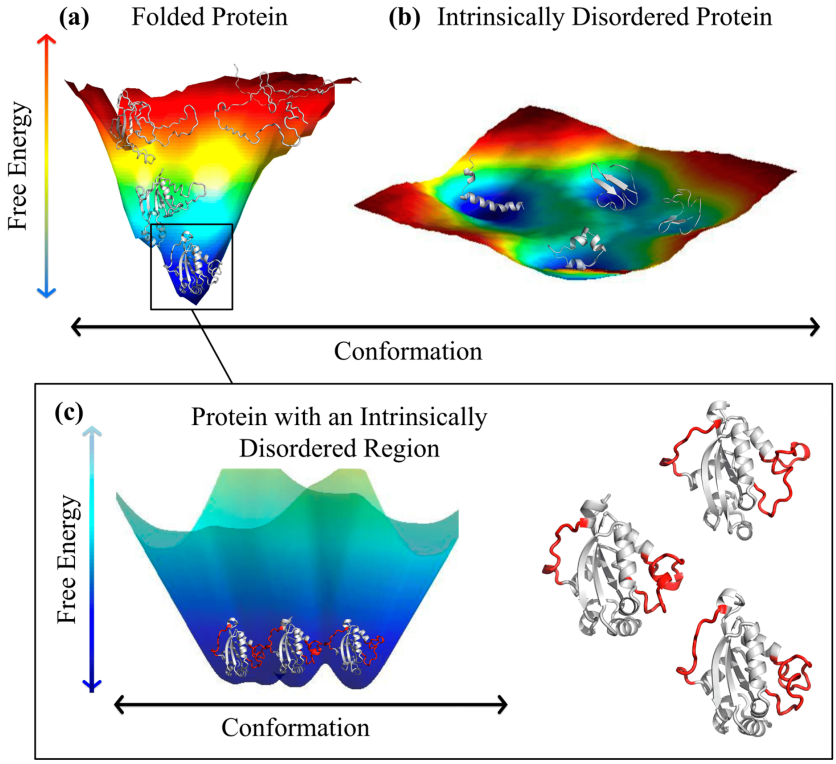


FIGURE 1.9. – Paysages énergétiques représentant l'énergie libre en fonction de la conformation des protéines pour une protéine repliée (a), intrinsèquement désordonnée (b) ou contenant une région désordonnée (c). De [23].

1.4.2. Propriétés structurales de la CP12 en solution, une protéine conditionnellement désordonnée

Comme mentionné précédemment, la protéine CP12 est une protéine désordonnée et plus précisément, une protéine conditionnellement désordonnée. Dans des conditions réductrices, correspondant à la lumière chez les organismes photosynthétiques, la protéine est décrite *in vitro* comme étant complètement désordonnée. Au contraire, dans des conditions oxydantes, correspondant à l'obscurité, la CP12 présente des structures secondaires plus ou moins stables. Lors de l'analyse de sa composition en acides aminés, la présence de résidus favorisant le désordre est remarquée, bien que la présence de 4 résidus cystéine soit assez atypique pour une IDP (Figure 1.10) [183]. En effet, ces résidus sont connus pour promouvoir « l'ordre » puisqu'ils peuvent former deux ponts disulfure (S-S) dans l'état oxydé de la protéine [61].

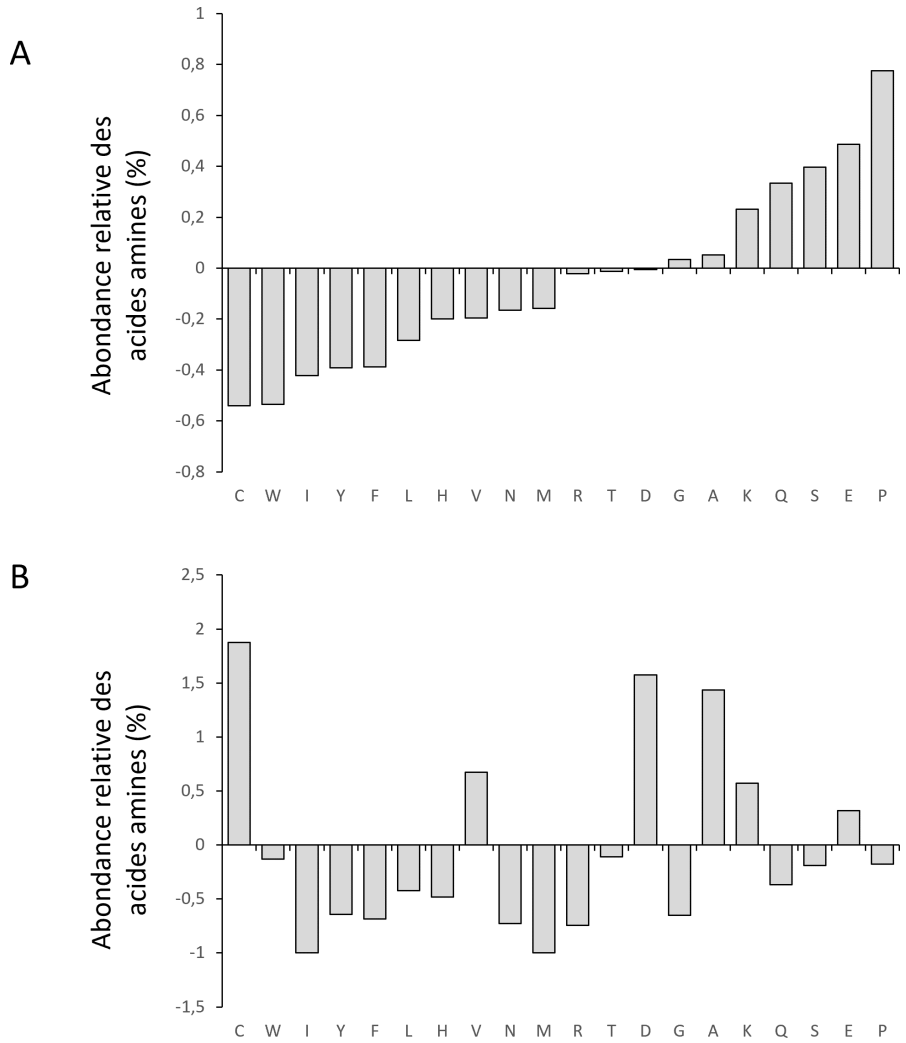


FIGURE 1.10. – La séquence de la CP12 présente un biais dans sa composition en acides aminés. A. Comparaison de la composition en acides aminés entre les protéines globulaires et les protéines intrinsèquement désordonnées. B. Comparaison de la composition en acides aminés entre la CP12 et les protéines intrinsèquement désordonnées. Les données ont été générées avec "Composition Profiler" (http ://www.cprofiler.org/) en utilisant comme base de donnée "Protein Data Bank" (PDB) Select 25 pour les protéines globulaires et DisProt 3.4 pour les protéines désordonnées.

1.4.2.1. La CP12 à l'état réduit

Une série de techniques biophysiques a confirmé que la CP12 en conditions réductrices est totalement dépourvue d'éléments structuraux secondaires et tertiaires stables en solution. Le spectre de dichroïsme circulaire (CD) de la CP12 (ou mimant la CP12 en conditions réductrices en utilisant des mutants de la CP12

dans lesquels les résidus cystéine ont été remplacés par des résidus sérine) a montré une ellipticité minimale à 200 nm, caractéristique des protéines désordonnées [66]. La représentation de Kratky de la courbe de la diffusion des rayons X aux petits angles (SAXS) a montré un plateau à q.Rg > 2, typique des polymères aléatoires et caractéristique des « random coil » [90]. Les déplacements chimiques des ^{1}H amides de tous les résidus de la CP12 mesurés par RMN présentent une dispersion minimale et sont regroupés entre 7,5 et 8,5 ppm ; leurs largeurs de raies étaient fines, caractéristiques typiques des protéines désordonnées [90]. Des données de relaxation de spin de la CP12 réduite se caractérisent par des ^{1}H-^{15}N het-NOE négatif et des valeurs de taux de relaxation ^{15}N-R2 très bas, typiques des IDPs [91]. L'échange des protons amide avec ceux de l'eau sont très rapides, et le coefficient de variation des déplacements chimiques 1H avec la température sont très négatifs, ce qui indique également l'absence de liaison hydrogène et de structures stables [89]. Ainsi, l'ensemble de ces données de RMN ont confirmé que la CP12 en conditions réductrices échange entre une myriade de conformations possibles rapidement à une échelle de temps de moins d'une nanoseconde. D'autres méthodes biophysiques ont confirmé les propriétés désordonnées de la CP12 réduite comme le transfert d'énergie par résonance de Förster (FRET), la spectroscopie de corrélation de fluorescence (FCS) ou la spectrométrie de masse [132].

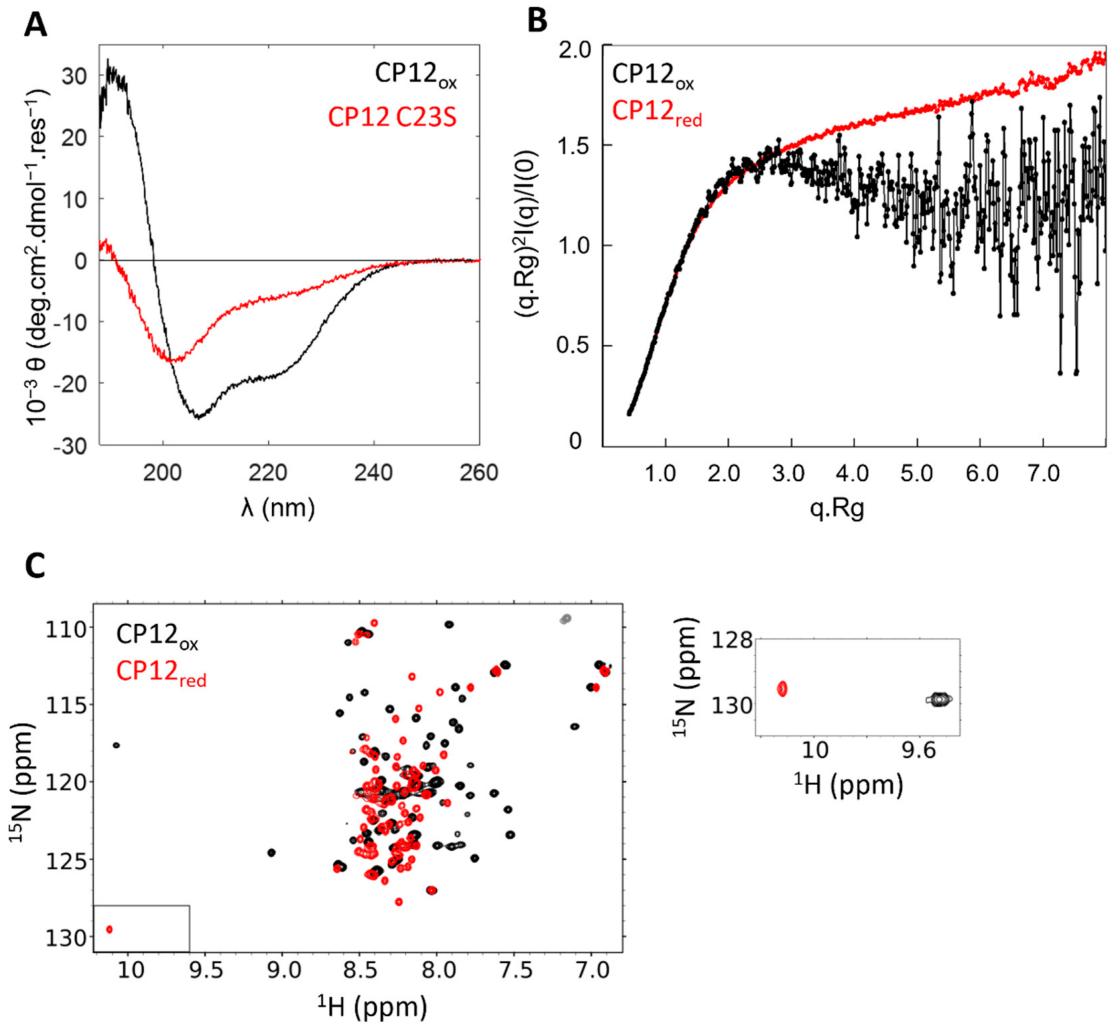


FIGURE 1.11. – Les analyses biophysiques de la protéine CP12 recombinante de *C. reinhardtii* confirmant son caractère désordonné. (A) Spectre de CD de 10 µM de la CP12 oxydée (en noir), de la CP12 avec une mutation mimant des conditions réductrices (en rouge). (B) Représentation normalisée de Kratky des données SAXS de la forme oxydée (en noir) et réduite (en rouge) de la CP12. (C) Spectres RMN ^{1}H ^{15}N HSQC de la forme oxydée (en noir) et réduite (en rouge) de la protéine CP12. L'encadrement à droite correspond au spectre entre 9,6 et 10 ppm.

1.4.2.2. La CP12 à l'état oxydé

Il a été démontré que dans des conditions oxydantes, la CP12 était partiellement repliée mais encore très flexible, et seule une structure modèle obtenue par modélisation moléculaire basée sur les séquences a été disponible pendant de nombreuses années [56]. L'analyse des courbes CD a montré que la CP12 oxydée était beaucoup plus hélicoïdale que dans sa forme réduite. De plus, une étude par

spectrométrie de masse à mobilité ionique a montré que la CP12 oxydée existe sous deux états conformationnels, l'un compact et l'autre étendu [85]. Par la suite, les données expérimentales obtenues par SAXS ont également montré des caractéristiques atypiques : le diagramme de Kratky de la CP12 oxydée était intermédiaire entre celui d'une protéine bien repliée (une courbe en forme de cloche avec une valeur de maximum à une valeur de q.Rg de $\sqrt{2}$ et celle d'une protéine totalement désordonnée (telle que celle de la protéine réduite), et ces caractéristiques sont celles d'une protéine aux propriétés structurelles instables [91] [151]. Le profil SAXS a confirmé la coexistence de deux populations de conformères en solution, l'un compact et l'autre plus désordonné. De même, le spectre RMN ^{1}H-^{15}N de la CP12 oxydée diffère de celui de la CP12 réduite et présente un petit nombre de résonances dispersées ainsi qu'un nombre réduit de résonances larges regroupées entre 7,5 et 8,5 ppm. Toutes ces données expérimentales ont pu montrer un équilibre à deux états pour la CP12 oxydée : (i) 60% des molécules de CP12 oxydée ont deux hélices dans la moitié N-terminale de la protéine et un domaine globulaire à l'extrémité C-terminale ; (ii) 40% des molécules de CP12 oxydée n'ont que le repli globulaire à l'extrémité C-terminale, tandis que la moitié N-terminale reste désordonnée [91] (Figure 1.12. Lorsque la partie C-terminale stable de la CP12 oxydée de *C. reinhardtii* se lie à la GAPDH, cela induit un désordre cryptique, et sa région N-terminale instable est encore plus déstabilisée [91]. Cette transition structurale lors de la liaison à la GAPDH contraste avec la CP12 oxydée des plantes supérieurs, où la liaison de la GAPDH conduit à un compactage de la région N-terminale [51]. Ces différences de stabilité de la conformation de la région N-terminale de la CP12 oxydée entre espèces correspondent aux différences d'affinité relative de la CP12 pour la GAPDH.

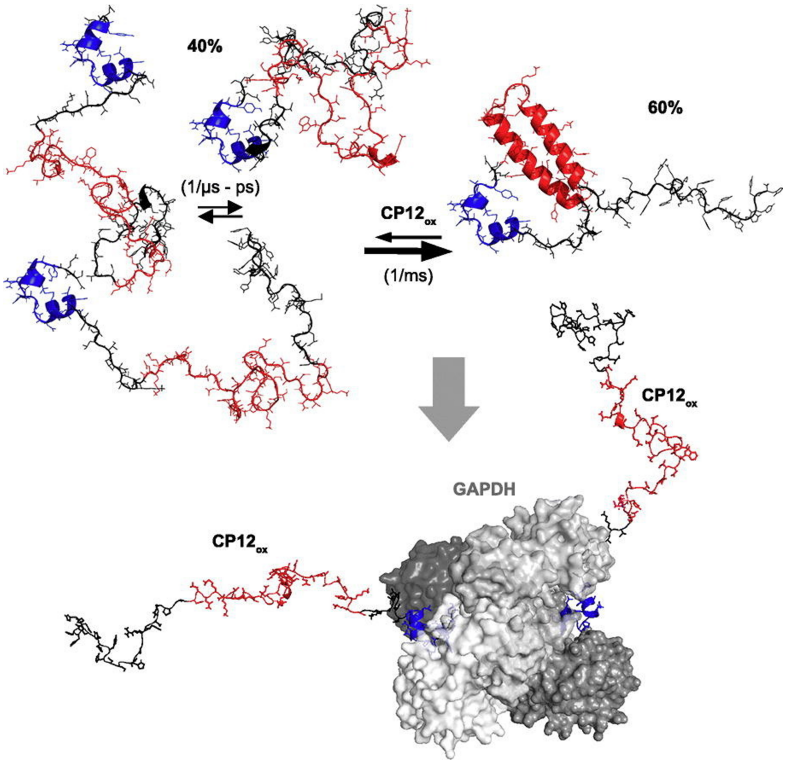


FIGURE 1.12. – CP12 à l'état oxydé de *C. reinhardtii*. Deux populations sont représentées : à gauche, modèles de la CP12 correspondant à une population désordonnée ; à droite est représenté un modèle correspondant à une CP12 partiellement structurée avec deux hélices α. Dans ces conditions, la partie C-terminale de la CP12 interagit avec la GAPDH. De [91].

Au vu de son caractère désordonné, les seules structures à haute résolution disponibles pour la CP12 sont celles de la CP12 oxydée au sein du complexe ternaire et ont été déchiffrées récemment par cristallographie et cryo-microscopie électronique [122], [204], [119] et [51]. Deux hélices α putatives se situent en position N-terminal. Une première est entre les résidus L8 et A22, et une deuxième, contenant la région conservée AWD_VEEL et impliquée dans l'interaction avec la PRK se situe entre les résidus A29 et K49. Ces régions hélicoïdales sont séparées par un coude, stabilisé par une liaison disulfure, situé entre les résidus G23 et A28. Le domaine C-terminal, correspondant à la zone d'interaction à la GAPDH, comprend une région ordonnée s'étendant des résidus L62 à Y78, et composée d'une courte hélice α suivie d'une boucle, toutes deux stabilisées par une liaison disulfure. Les résidus A51 à D60 forment un lien désordonné entre ces structures [90]).

Chez les organismes photosynthétiques où les transitions entre l'obscurité et la lumière sont corrélées à différentes conditions d'oxydo-réduction, ce concept de protéine conditionnellement désordonnée par les conditions d'oxydoréduction est d'une importance capitale. Ces transitions structurales observées pour la protéine CP12 pourraient être pertinentes et en lien étroit avec la régulation du cycle CBB

[104].

1.4.3. Pertinence de l'étude de la CP12 dans des conditions physiologiques

1.4.3.1. L'encombrement moléculaire

Un des effets à prendre en compte concernant l'étude des protéines dans la cellule est l'effet de l'encombrement moléculaire dû à la présence en grande quantité de macromolécules tels que les protéines, les acides nucléiques, les carbohydrates, les ribosomes, etc. La grande majorité des études structurales de protéines sont faites *in vitro* dans des conditions idéalisées et simplifiées, en solution diluée où cet effet n'est pas présent. Le volume exclu, c'est-à-dire le volume inaccessible à la molécule dans une solution, dû à la présence d'autres macromolécules de tailles similaires, n'est alors pas pris en compte. Dans la cellule, il y a très peu d'espace entre chaque molécule et cela a une répercussion sur le volume disponible pour la protéine, ce qui peut avoir des conséquences sur ses propriétés structurales. Afin d'étudier cet effet, de nombreuses études utilisent des agents d'encombrement comme des molécules biologiques comme l'albumine ou l'hémoglobine, ou synthétiques comme le dextran, le ficoll, ou le polyéthylène glycol [159]. Chaque agent d'encombrement possède des propriétés différentes et les plus utilisés sont sans doute le ficoll, un copolymère de saccharose et d'épichlorhydrine, hautement ramifié et peu flexible et le dextran, un polymère de glucose, flexible avec peu de ramifications courtes. Ces deux agents d'encombrement sont très solubles et inertes, ce qui justifie leur utilisation [190].

Un autre point important à prendre en compte est l'hétérogénéité présente dans la cellule au vu de la diversité des macromolécules. Cela peut entrainer des interactions non spécifiques, ou des interactions spécifiques faibles telles que les interactions électrostatiques, hydrophobes et de van der Waals. Les affinités entre deux molécules qui peuvent être très faibles en milieu dilué, peuvent devenir localement fortes en milieu concentré.

1.4.3.2. Cas des IDPs et de la CP12

Les effets d'encombrement moléculaires et d'hétérogénéité sont proposés comme étant très significatifs sur les IDPs à cause de leur fléxibilité, de leurs larges rayons hydrodynamiques, et de leur capacité à former de nombreuses intéractions moléculaires [145]. Néanmoins, l'état désordonné d'un certain nombre de molécules surexprimées marquées à l'isotope ^{15}N dans des cellules *E. coli* a été confirmé [195]. L'exemple le plus connu d'étude d'IDP *in cellula* concerne l'α-synucléine, une protéine présente dans le cerveau humain [123], [11], [37], [195] et [15]. L'état désordonné de cette protéine a aussi été confirmé dans des cellules humaines, en l'insérant dans des cellules de mammifères par électroporation. La relaxation de spin des noyaux ^{15}N de la protéine a également été mesurée et les taux de relaxation étaient plus petits que ceux de la protéine diluée [179]. Ceci indique que la protéine

est dans un environnement contraint, mais qu'elle reste désordonnée. Des profils de distance intramoléculaire ont été également établis et se sont avérés différents de ceux en présence d'agent d'encombrement comme le ficoll qui a provoqué une compaction plus importante que celle observée dans la cellule. Les études récentes révèlent ainsi certaines subtilités présentes uniquement dans la cellule mammifère. Cependant, à ce jour, aucune étude structurale *in-cell* de protéine désordonnée n'a encore été faite dans une cellule végétale [29].

Dans le cas de *C. reinhardtii*, la CP12 est localisée dans le chloroplaste, un environnement hétérogène (Figure 1.13). Outre le pyrénoïde et les membranes des thylacoïdes, des grains d'amidon sont également présents, qui sont une forme de condensat biomoléculaire [46]. L'hétérogénéité du chloroplaste peut également provenir de regroupement de métabolites peu solubles dans un environnement très encombré [87] et [178].

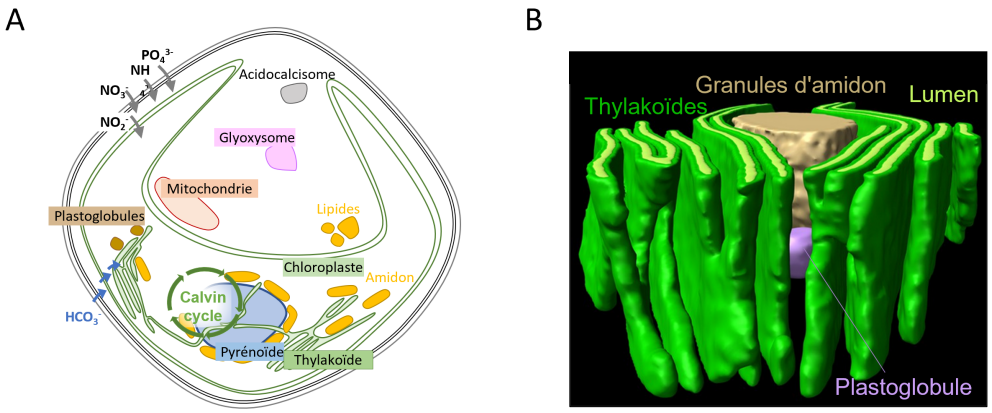


FIGURE 1.13. – **A.** Représentation schématique montrant les principaux organites et structures présents dans la cellule de *C. reinhardtii* et indiquant la localisation du cycle CBB dans celle-ci. **B.** Modélisation tridimentionnelle des empilements de thylacoïdes avec trois phases continues : le lumen (vert clair), la membrane bicouche (vert foncé) et le stroma. De [92]

.

1.5. *Chlamydomonas reinhardtii*, organisme modèle

C. reinhardtii est un organisme photo-autotrophe eucaryote et fait partie des *Archaeplastida*, aussi nommés *Plantae* selon la classification de Thomas Cavalier-Smith. Il s'agit d'un grand groupe monophylétique qui inclut les plantes terrestres (Embryophytes), ainsi que certaines algues. Ce groupe est défini par une caractéristique commune : leurs chloroplastes dérivent d'une unique endosymbiose avec une cyanobactérie. *C. reinhardtii* appartient au groupe des *Chlorophyta* (algues

vertes) partageant des pigments photosynthétiques similaires aux plantes terrestres, principalement la chlorophylle a et b.

Par leur grande diversité, les algues Eucaryotes représentent plus d'un tiers de la production primaire globale [45]. Elles sont extrêmement sensibles à leur environnement donc elles constituent de très bons modèles pour étudier l'adaptation à différents stress. Le séquençage du génome d'organismes clés a été un point crucial dans la compréhension de leurs physiologies dans les années 2000 comme l'algue rouge *Cyanidioschyzon merolae* [120], la diatomée marine *Thalassiosira pseudonana* [2] et l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* [126]. Malgré le nombre impressionnant d'informations génétiques rassemblées au cours de la dernière décennie, notamment grâce au projet Tara Ocean, de nombreuses espèces d'algues ne sont pas cultivables en laboratoire et il est ainsi difficile de les caractériser.

Concernant les microalgues vertes unicellulaires, *C. reinhardtii* en est l'organisme modèle. Au milieu du 20^{ème}siècle, cette espèce est identifiée et nommée par le botaniste ukrainien Ludwig Reinhardt. Par sa croissance haploïde et son cycle de vie court, elle va rapidement devenir une ressource précieuse pour développer des approches génétiques afin de comprendre minutieusement des processus moléculaires et physiologiques. Aujourd'hui, cette microalgue verte reste très utilisée dans le domaine de la recherche fondamentale photosynthétique. En tant qu'organisme photo-autotrophe facultatif, *C. reinhardtii* peut croître en obscurité totale en utilisant comme source de carbone l'acétate lorsque les gènes essentiels à la photosynthèse ne sont pas exprimés. *C. reinhardtii* peut en effet utiliser le dioxyde de carbone (CO_2) comme source de carbone (photo-autotrophie), l'acétate (hétérotrophie) ou les deux (mixotrophie). Cette faculté permet notamment donc d'étudier une large gamme de mutants photosynthétiques viables. Dans le cas de cette thèse, *C. reinhardtii* s'est aussi avéré idéal puisqu'une seule isoforme de la CP12 est présent contrairement à d'autres organismes, facilitant ainsi l'étude de sa fonction.

2. Objectifs du travail de thèse

La protéine CP12 a été étudiée à de nombreuses reprises dans divers organismes, mais ces travaux se sont principalement concentrés sur son rôle régulateur dans le cycle de Calvin-Benson-Bassham. Cette fonction, bien documentée, se manifeste sous des conditions oxydantes, qui correspondent à l'obscurité chez les organismes photosynthétiques. Dans ces circonstances, la protéine est partiellement repliée et interagit avec deux enzymes clés pour la régulation du cycle de Calvin : la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase et la phosphoribulokinase.

Bien que certaines études aient suggéré un rôle plus vaste pour cette protéine, aucune n'a permis d'identifier précisément sa fonction en conditions de lumière. Dans ces conditions où le chloroplaste est un environnement réducteur, la protéine CP12 est décrite comme étant totalement désordonnée et le complexe ternaire (GAPDH-CP12-PRK) se dissocie.

L'objectif principal de cette thèse est d'étudier la fonction de la CP12 dans les conditions physiologiques rencontrées dans le chloroplaste des organismes photosynthétiques durant la journée : c'est-à-dire un état réduit et désordonné. Des travaux fonctionnels et structuraux ont été réalisés pour déchiffrer les relations structure-fonction de la CP12 réduite. Afin d'identifier les fonctions de la CP12 réduite, différentes études biochimiques ont été menées sur des mutants de délétion de la protéine. Par ailleurs, afin de comprendre comment les propensions structurales de la CP12 répondent à l'environnement cellulaire, des études de biologie structurales ont été réalisées dans des conditions mimant l'environnement physiologique.

La première partie des résultats, présentée au chapitre 4, constitue la première étude d'une souche de *C. reinhardtii* dans laquelle la protéine CP12 n'est pas présente, car le gène codant cette protéine a été muté. Pour cette approche, les conditions de cultures ont été réalisées dans diverses conditions de lumière (continue, alternante, de haute intensité), dans le but d'explorer de nouvelles fonctions potentielles de la protéine CP12. Son impact a été étudié, non seulement sur les protéines PRK et GAPDH, mais également sur l'ensemble du protéome.

Les résultats de ce premier article ont permis d'émettre des hypothèses de travail dont une concernant l'interaction entre la CP12 et la PRK en conditions réductrices et ceci a fait l'objet du chapitre 5. De la même façon, les résultats de la protéomique quantitative relative ont révélé l'augmentation d'une protéine impliquée dans les mécanismes de concentration de CO_2 : EPYC. L'effet de la CP12 sur l'acquisition du carbone minéral a donc été exploré à différente pression partielle de CO_2 et ces résultats sont présentés dans le chapitre 6.

Une dernière partie de ce manuscrit décrit les propriétés structurales de la protéine CP12 en conditions réductrices. Dans des conditions non physiologiques,

la protéine a été décrite comme étant une "random coil" en solution. Le but de ces recherches était de se rapprocher des conditions physiologiques dans lesquelles se trouve la protéine. Pour ce faire, la protéine a été purifiée et obtenue sous sa forme mature puis étudiée grâce à la RMN. Le milieu dans lequel se trouvait la protéine a été complexifié de plus en plus afin de comprendre quels paramètres physico-chimiques pouvaient avoir un impact sur ses propriétés structurales. Ces résultats sont décrits dans le chapitre 7. La description de l'échantillonnage non aléatoire de la CP12 réduite permet de comprendre à quels stimuli elle est sensible, et permet de rationaliser sa faculté à avoir de nombreuses fonctions.

3. Matériels et méthodes

3.1. Matériels

3.1.1. *Chlamydomonas reinhardtii*

3.1.1.1. Souches

La souche contrôle de *C. reinhardtii*, nommée par la suite, wild-type (WT), correspond à la souche CC4349 cw15 mt+ (Goodenough 330A) provenant du "Chlamydomonas Resource Center" de l'université du Minnesota aux États-Unis.

Cette même souche a été dépourvue de la protéine CP12, (notée Δ*CP12*) par la méthode Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats (CRISPR)-Cas9 ribonucleoprotéine (RNP) couramment utilisée pour l'édition génomique. Dans ce cas, il s'agit de mutants "*knock-in*" dans lequel le gène de résistance aux antibiotiques est inséré dans le site cible de l'ARN guide qui se trouve au niveau du gène *CP12*. Cela permet de générer un codon stop précoce ou une protéine tronquée non fonctionnelle.

La génération de ces mutants est le fruit du travail de nos collaborateurs EonSeon JIN et Kwang SUK CHANGN, chercheurs à l'université de Séoul (Corée du Sud).

Toutes les souches sont maintenues dans le milieu Tris Acétate Phosphate (TAP), supplémenté d'agar à une concentration de $15\,\mathrm{g\,L^{-1}}$ avec l'antibiotique correspondant pour les souches mutantes : l'hygromycine à $30\,\mu\mathrm{g\,mL^{-1}}$ µg/mL et le paromomycine à $30\,\mu\mathrm{g\,mL^{-1}}$.

3.1.1.2. Conditions de culture

Les pré-cultures sont réalisées en milieu TAP avec $30\,\mu\mathrm{g\,mL^{-1}}$ µg/mL d'hygromycine pour les souches mutantes dépourvues de la protéine CP12 et $30\,\mu\mathrm{g\,mL^{-1}}$ µg/mL de paromycine pour les souches mutantes complémentées. Les cellules sont ensuite cultivées dans un milieu contenant du MOPS 20 mM ; KH_2PO_4 0,4 mM ; K_2HPO_4 0,6 mM ; une solution "Beijerinck salts" avec NH_4Cl 7,5 mM ; $MgSO_4$ 0,4 mM ; $CaCl_2$ 0,34 mM et une solution de métaux "Hutner's trace elements" [84]. Les cultures sont illuminées en continu (LED blanches, 4000 k) à 110 µmol de photons m^2 s^{-1}, à une température de 23 °C, agitées à 110 rpm. Les concentrations de CO_2 sont modulées à l'aide d'un débitmètre El-Flow Bronkhorst pour des hautes concentrations en CO_2 correspondant à 20 000 partie par million (ppm). Pour la carence en CO_2, de la chaux sodée est utilisée afin d'absorber le CO_2 avant que le flux d'air n'arrive aux cultures (Figure 3.1).

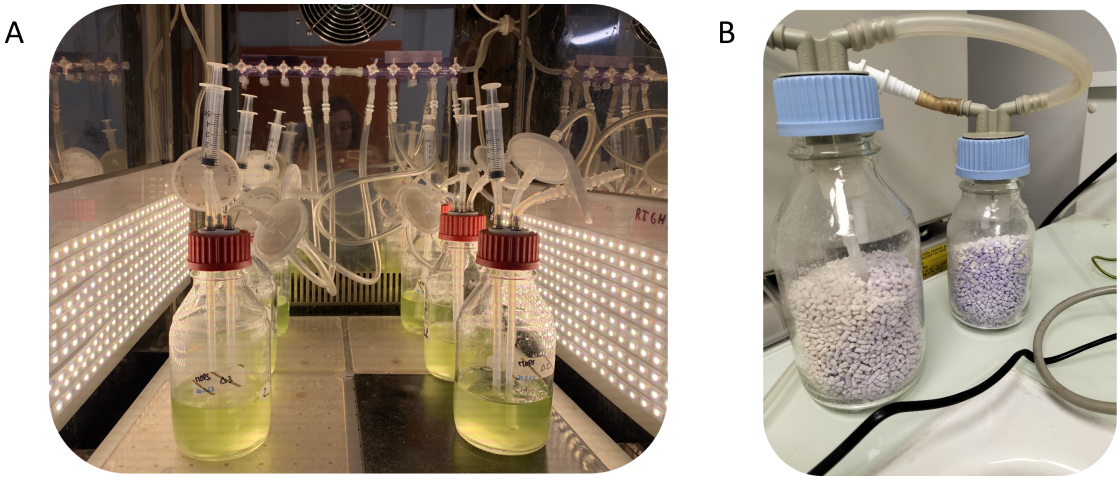


FIGURE 3.1. – Photographies illustrant le système de contrôle de CO_2. A. Système de bullage. B. Chaux sodée placée en amont du flux d'air et permettant l'absorption du CO_2.

3.1.2. *Escherichia coli*

L'amplification des différents plasmides est réalisée dans la souche de *E. coli* DH5α. Les protéines recombinantes sont exprimées dans la souche chimio-compétente C41 (DE3). Il s'agit d'une souche dérivée de la souche BL21 capable de produire des protéines fonctionnelles qui pourraient être toxiques pour la cellule. Celle-ci exprime l'ARN polymérase du bactériophage T7 placé sous le contrôle d'un promoteur lac inductible par Isopropyl-1-thio-β-D-galactopyranoside (IPTG). Ces cellules permettent ainsi, en présence IPTG, la surexpression de protéines dont la séquence codante est placée sous le contrôle d'un promoteur T7.

3.1.3. Plasmides

La séquence codant la protéine CP12 de *C. reinhardtii* a été clonée dans un plasmide pET16b dans le cadre de la thèse d'Emmanuelle Graciet [64] [66].

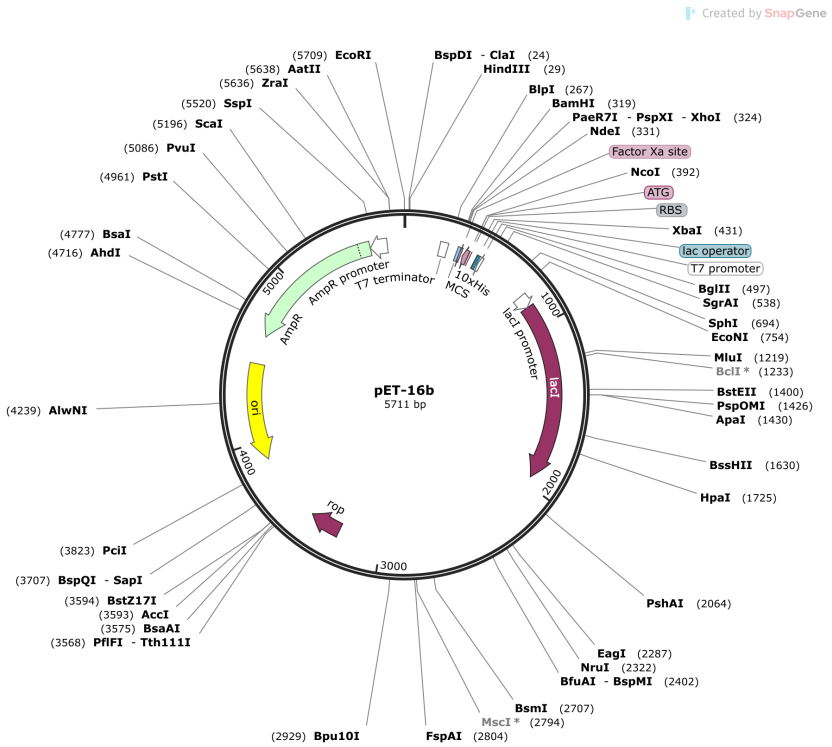
En résumé de son travail, la banque d'ADNc utilisée a été donnée par Norbert Wedel (Botanisches Institut der Christian Albrechts Universität, Kiel - Allemagne). Elle a été construite à partir d'ADNc provenant de la souche cw15 de *C. reinhardtii*. Deux couples d'amorces ont été utilisés pour réaliser une PCR sur cette banque d'ADNc. Le premier a été construit à partir de la séquence d'une EST (AV 634344) [3]. Le deuxième a été dessiné à partir d'une séquence partielle publiée par N. Wedel [197]. Les séquences des amorces utilisées pour obtenir la CP12 de *C. reinhardtii* sont décrites dans le tableau 3.1. Par la suite, ce produit a été cloné dans un vecteur pGEM−T (Promega). Des amorces contenant les sites de restriction *NdeI* et *XhoI* ont été utilisées pour amplifier et cloner l'ADNc mature de la CP12 dans le vecteur d'expression pET16b (amorce sens CATATGAGCGGCCAGCCCG et antisens GAGCTCAATTAGGAGCATCTGC).

TABLEAU 3.1. – Séquence des amorces utilisées pour obtenir la CP12 de *C. reinhardtii*.

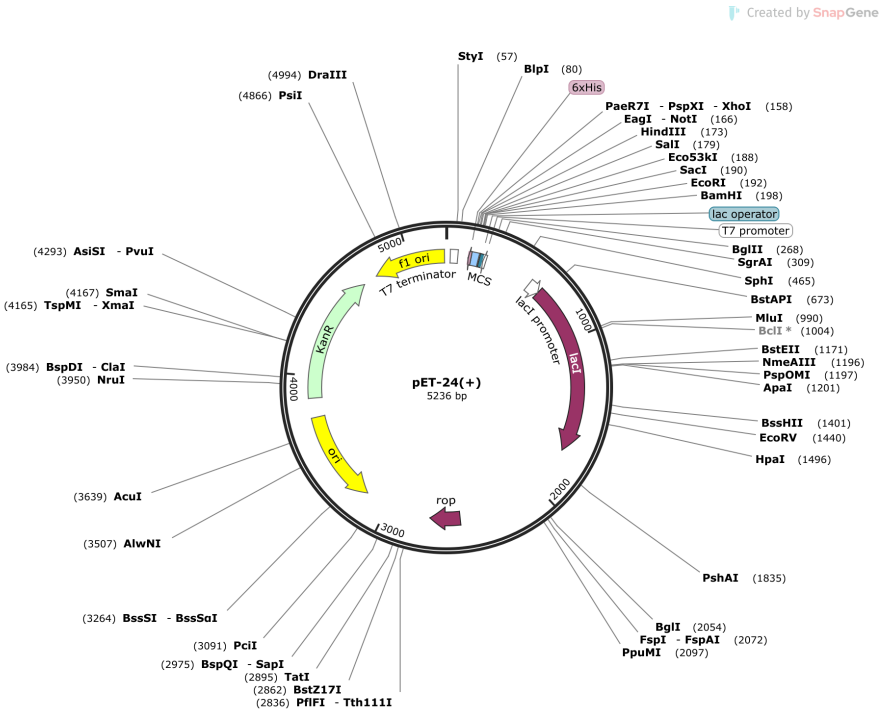
AV634344	5'-CTAGCGGCCAGCCCGCTGTG-3'
AV634344 rev	5'-CTTAATCCTCGTAGACGCGGC-3'
CP12 Wedel	5'-CCGGTTAGTGGAGAATGCG-3'
CP12 Wedel rev	5'-GGTTATCCTTACAGTAATCC-3'

Concernant ce dernier, il s'agit d'un vecteur bactérien pour l'expression inductible de protéines fusionnées en position N-terminale avec une étiquette poly-histidine (10xHis) et un site de coupure au Facteur Xa. Celui-ci permettra la purification de la protéine CP12.

Concernant l'expérience "RMN dans la cellule" décrite par la suite 3.2.16.2, le plasmide pET24 dont lequel le gène codant pour la CP12 de *C. reinhardtii* a été cloné (par la société GeneCust) est utilisé (Figure 3.2).



(a)



(b)

FIGURE 3.2. – Cartes de restriction des plasmides utilisés. a) pET-16b b) pET-24(+).

3.2. Méthodes

3.2.1. Suivi de croissance de *Chlamydomonas reinhardtii*

La densité optique est mesurée à 680 nm. Le nombre de cellules ainsi que leur taille sont estimés grâce au compteur cellulaire automatique Luna II.

3.2.2. Extraction d'ADN et amplification par PCR

Afin de vérifier la stabilité des mutants de *Chlamydomonas reinhardtii* dans le temps, l'ADN est extrait grâce à une résine Chelex 100. Pour cela, une pointe de cellules est prélevée et diluée dans 10 µL d'eau stérile. 10 µL d'éthanol sont ajoutés et incubés 5 min à température ambiante. Après avoir mélangé au vortex, 80 µL de solution "Chelex 100" 5% sont ajoutés et une incubation de 8 min à 95°C est réalisée. Rapidement, les échantillons sont mélangés au vortex et laissés à température ambiante afin de faire évaporer l'éthanol. Le surnageant, contenant l'ADN est ensuite récupéré et utilisé comme ADN matrice pour l'amplification par PCR (Amplification en Chaîne par Polymérase) avec l'amorce sens GCTGACCGTCTTCAGCGGCCTA et l'amorce antisens TTGTGCAAGCGAAGGGAGCGGT. Le Mix Green Taq (Vazyme) contenant l'ADN polymérase (*Taq polymérase*), le tampon de réaction avec le magnésium, cofacteur de la Taq-polymérase, et le mélange des desoxynucléotides triphosphates (dNTPs) est utilisé pour l'amplification. À ce mélange, sont ajoutées les amorces, 2 µL de chaque à une concentration de 10 µM et l'ADN matrice (5 ng). Le volume final est de 50 µL. L'amplification est réalisée avec un thermocycleur (BIO-RAD) qui permet la dénaturation de l'ADN à 95°C pendant 1 min en un cycle, suivi par 36 cycles de 45 sec à 95°C, 45 sec à 57°C pour hybrider les amorces à la matrice, 2 min 55 à 72°C pour la polymérisation. L'analyse des amplicons est réalisée après migration électrophorétique sur gel d'agarose 1% par application d'un champ électrique dans du tampon Tris-Borate-EDTA 0,5X afin de séparer les acides nucléiques en fonction de leur masse moléculaire. La visualisation des produits PCR se fait après révélation du gel sous UV grâce à un intercalant de l'ADN, le bromure d'éthidium (BET).

3.2.3. Extraction des protéines

Les cellules en phase exponentielle sont prélevées et centrifugées à 4°C à 2000 g pendant 10 min puis lavées dans un tampon Tris 10 mM pH 8 avec un cocktail d'inhibiteur de protéases (Sigma P2714-1BTL). Le culot cellulaire est re-suspendu dans un volume de 1 mL dans ce même tampon puis une sonication est réalisée avec 6 cycles de 30 sec et une intensité de 40%.

3.2.4. Dosage de la concentration des protéines

La concentration des protéines en solution est déterminée par la méthode de Bradford avec l'albumine de sérum bovin (BSA) comme protéine standard [22].

3.2.5. Extraction des métabolites

5 mL de culture de *Chlamydomonas reinhardtii* en phase exponentielle sont prélevés et mélangés à 10 mL d'une solution 70% Méthanol afin de figer le métabolome le plus rapidement possible. Un bain contenant un mélange éthanol/glycol permettant d'atteindre une température d'environ -20 -30°C est utilisé pour refroidir les solutions ainsi que les échantillons durant toute l'extraction. 1 mL de chloroforme est ensuite ajouté à 5 mL du mélange culture / solution de méthanol. Le tout est homogénéisé grâce à un potter puis 3 cycles de congélation/décongélation sont effectués afin de garantir la lyse totale des cellules. Une étape de centrifugation est réalisée à 2851 g à 4°C pendant 10 min afin de récolter les phases aqueuses contenant les métabolites. La phase organique est lavée deux fois avec de l'eau glacée et les phases aqueuses sont rassemblées à la fin de l'expérience pour être lyophilisées jusqu'à quantification des métabolites.

3.2.6. Quantification des lipides

3.2.6.1. Extraction lipidique

L'extraction lipidique se fait par une double extraction organique. Pour chaque échantillon correspondant à un culot de 10^7 cellules de *C. reinhardtii* en phase exponentielle, 500 µL de HCl (acide chlorhydrique) 1 M et 3 mL de $CHCl_3$/MeOH 2 :1 (v/v) (Chloroforme-Méthanol) sont ajoutés pour assurer l'inactivation des lipases endogènes. Les échantillons sont ensuite congelés à -20°C jusqu'à la suite de l'extraction afin de garantir. Cette étape de congélation/ décongélation permettra la lyse des cellules. Après avoir mélangé vigoureusement au vortex, 3 mL d'eau MilliQ sont ajoutés. Cette étape est suivie d'une centrifugation à 1000 g à 4°C pendant 10 min pour obtenir une séparation de phases. La phase organique reste en dessous des débris cellulaires et de la phase aqueuse, et est collectée et transférée dans un nouveau tube. 3 mL de $CHCl_3$/MeOH 2 :1 (v/v) sont ajoutés à la phase aqueuse, les étapes de centrifugation et d'extraction sont répétées. Les phases organiques sont réunies dans un nouveau tube, 3 mL d'eau MilliQ saturée en NaCl (chlorure de sodium) sont ajoutés pour laver les fractions. Après mélange et centrifugation à 500 g pendant 10 min à 4°C, la phase aqueuse est jetée. Quelques pincées de sulfate de magnésium anhydre sont ajoutées pour piéger l'eau résiduelle, et une dernière centrifugation à 1000 g est réalisée avant de conserver la phase organique à -20°C.

3.2.6.2. Chromatographie sur couche mince

Afin d'analyser la composition de la fraction organique après l'extraction des lipides, la chromatographie sur couche mince (CCM) est utilisée. Les extraits lipidiques et les étalons de référence (Figure 3.3) sont déposés sur des plaques CCM en gel de silice 60 (10 X 20 cm, de Merck-Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) à l'aide d'un déposeur d'échantillon Linomat IV (Camag, Muttenz, Suisse) équipé d'une seringue Hamilton.

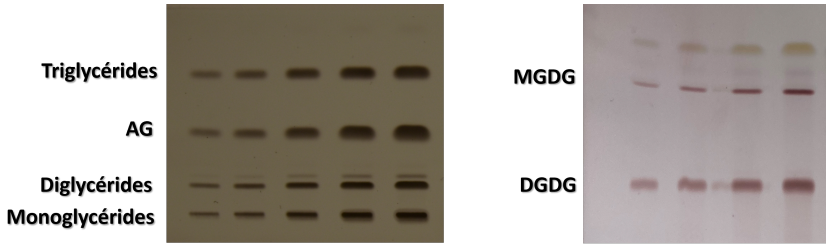


FIGURE 3.3. – Plaques CCM de référence utilisées pour la quantification des lipides neutres (1, 2, 5, 10 et 15 µg) (à gauche) et des galactolipides, avec 0,5 mg/mL C18-MGDG (2,4,8 et 16 µg), 0,25 mg/mL de DGDG (1,2,4 et 8 µg) (à droite). Acides gras (AG), monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et digalactosyldiacylglycérol (DGDG).

Pour la visualisation des galactolipides présents dans les échantillons, la migration est effectuée en utilisant du chloroforme : méthanol : Eau (47,5 : 10 : 1,25 v/v/v) comme éluant pour les lipides polaires. La plaque est ensuite séchée pendant 10 min à température ambiante. Dans l'étape suivante, la plaque est plongée dans la solution de coloration, en l'occurrence un réactif à base de thymol et d'acide sulfurique, à l'aide d'un dispositif d'immersion de chromatogramme 3 (Camag, Muttenz, Suisse). Après avoir été séchée de nouveau à température ambiante, la plaque est placée dans un four à 100°C pendant 10 min. Une fois la plaque retirée, une photo a été prise pour effectuer une analyse par densitométrie optique. La densitométrie des différentes quantités d'étalons a permis d'établir des courbes d'étalonnage pour le monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et le digalactosyldiacylglycérol (DGDG).

Pour l'analyse des lipides neutres, la même procédure est reproduite. La migration de la plaque CCM est cependant réalisée dans un mélange d'Heptane : Ether diéthylique : Acide formique (55 : 45 : 1 v/v/v). Après migration et séchage de la plaque, celle-ci est plongée dans la solution de coloration, un mélange 50 : 50 (v/v) de solution d'acétate de cuivre saturée dans l'eau et d'acide phosphorique à 85,5 %, en utilisant un dispositif d'immersion de chromatogramme.

3.2.7. Extraction et quantification de la chlorophylle

Les cellules sont centrifugées à 2000 g pendant 5 min à 4°C puis le culot cellulaire est repris dans de l'eau distillée avant d'être de nouveau centrifugé dans les mêmes

conditions. Après élimination du surnageant, les culots sont re-suspendus dans 2 mL d'acétone 90% et incubés 30 min à 4°C à l'obscurité. Une dernière centrifugation est réalisée pendant 10 min à 10 000 g à 4°C puis l'absorbance du surnageant est mesurée 630 nm, 647 nm et 664 nm. La quantité de chlorophylle a, b, c et totale est calculée à partir de l'équation décrite précédemment [153].

3.2.8. Activité enzymatique de la PRK

La phosphoribulokinase catalyse la conversion du ribulose-5-phosphate (Ru5P) en ribulose-1,5-bisphosphate (RuBP) par l'ATP. L'activité de cette enzyme est mesurée selon la méthode décrite précédemment [60] avec un système couplé à deux autres réactions impliquant la pyruvate kinase (PK) de muscle de lapin et de la lactate deshydrogénase (LDH) de muscle de lapin préalablement déssalée sur PD10 (Figure 3.4). La PK permet de régénérer l'ATP, évitant ainsi toute inhibition des kinases par l'ADP. La LDH permet de suivre l'oxydation du NADH en NAD à 340 nm avec un coefficient d'extinction molaire de 6 220 $M^{-1}.cm^{-1}$. Le milieu réactionnel contient les produits suivants : ATP 1 mM, PEP 1 mM, NADH 0,15 mM, PK 1 U, LDH 2,7 U, ribose 5 phosphate 1 mM et PRI 0.2 U dans un tampon glycyl-glycine 50 mM, EDTA 0.5 mM, KCl 50 mM, $MgCl_2$ 10 mM, pH 7,7.

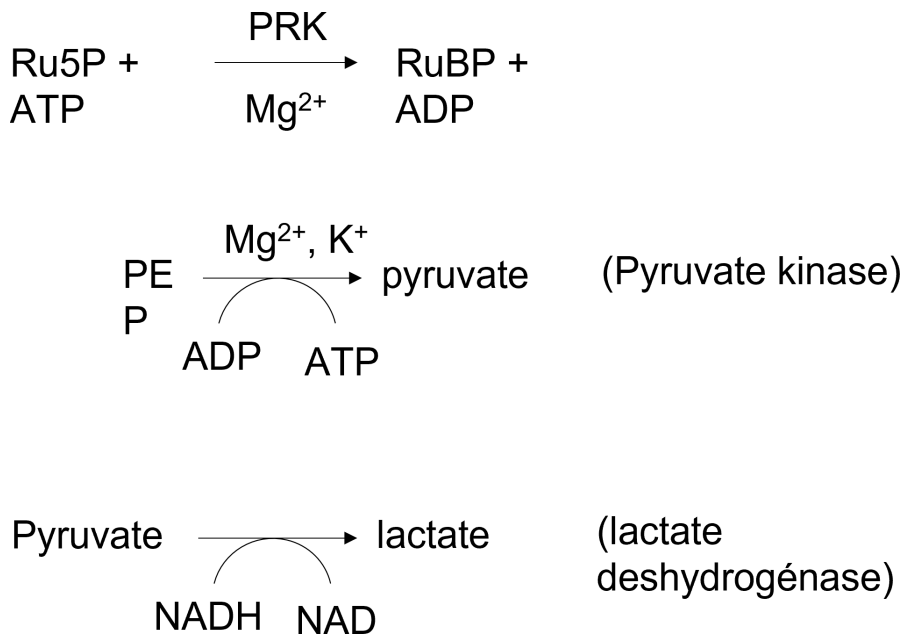


FIGURE 3.4. – Réactions successives permettant le dosage de l'activité de la phosphoribulokinase.

3.2.9. Mesure de la photosynthèse

3.2.9.1. Taux net de la photosynthèse

Le taux net de la photosynthèse est mesuré par l'évolution de O_2 (Oxygraphe ; Hansatech Instruments, UK) en utilisant le logiciel O_2 View. Les cellules en phase exponentielle sont centrifugées à 2000 g pendant 5 min et lavées deux fois avec le milieu de culture à différents pH (6,9 ou 7,9). Elles sont ensuite placées dans la chambre de l'Oxygraphe illuminée à 110 µmol de photons m^2 s^{-1} à 23 °C. Quand le taux de CO_2 est éliminé dans la chambre, c'est-à-dire, quand il y a un arrêt du dégagement d'O_2, des quantités croissantes de bicarbonate de sodium ($NaHCO_3$) sont ajoutées allant de 0,012 mM à 2 mM. Le taux de dégagement de O_2 est mesuré au cours du temps et les cinétiques sont ensuite ajustées par l'équation de Michaelis-Menten. Les différences de proportion de DIC aux deux pH sont utilisées pour discriminer l'absorption du CO_2 ou du bicarbonate (Figure 3.5). Un modèle est utilisé pour séparer et déterminer la consommation de ces deux formes de carbone minéral.

Taux de photosynthèse net :

$$\left(\frac{\alpha \times V\max\left(CO_2 - CP^C\right)}{k^C_{1/2} + (CO_2 - CP^C)}\right) + \left(\frac{(1-a) \times V\max \times \left(HCO_3^- - CP^B\right)}{k^B_{1/2} + (HCO_3^- - CP^B)}\right) \quad (3.1)$$

avec Vmax le taux maximum de la photosynthèse ; α la proportion de Vmax qui résulte de l'absorption du CO_2 ; CO_2 la concentration en CO_2 en µmol L^{-1} ; CP^C la concentration correspondant au point de compensation du CO_2 ; $k^C_{1/2}$ la concentration de CO_2 qui correspond à la moitié de la photosynthèse maximale nette ; HCO_3^- la concentration en bicarbonate en µmol L^{-1} ; CP^B la concentration correspondant au point de compensation du bicarbonate ; $k^B_{1/2}$ la concentration de bicarbonate qui correspond à la moitié de la photosynthèse nette.

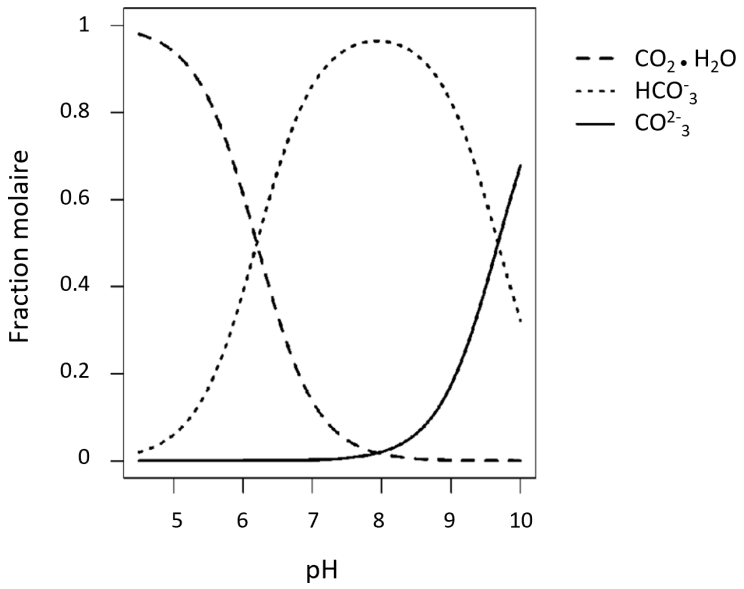


FIGURE 3.5. – Fractions molaires des trois différentes formes de carbone dissous, à savoir l'acide carbonique ($CO_2 \cdot H_2O$), le bicarbonate (HCO_3^-) et le carbonate (CO_3^{2-}), en fonction du pH de la solution [44].

3.2.10. Techniques électrophorétiques

3.2.10.1. Électrophorèse en conditions dénaturantes

Pour toutes les protéines, la séparation est réalisée suivant la méthode de Laemmli [88]. Les protéines totales sont reprises dans du tampon de dénaturation comprenant du sodium dodecyl sulfate (SDS) et, en général, du dithiothreïtol (DTT). Suite à ce traitement, la protéine est chargée négativement et la séparation sur gel ne se fait qu'en fonction de la masse moléculaire. Dans cette méthode, le tampon de migration est le même au niveau de la cathode et de l'anode et est constitué de Tris 3 $g\,L^{-1}$, glycine 38 $g\,L^{-1}$, SDS 0,5 $g\,L^{-1}$. 30 µg de protéines sont chargées sur gel de polyacrylamide de 12% quand il s'agit d'extraits de protéines totales et 4 µg de protéines sur gel de polyacrylamide 15% quand il s'agit de protéines purifiées (e.g. CP12). La migration se fait à 120 V grâce au système Mini-PROTEAN de BIO-RAD. Les protéines sont révélées par coloration au Bleu de Coomassie R250 ou par immunoempreinte.

3.2.10.2. Électrophorèse en conditions natives

Cette technique sépare les protéines sur gel de polyacrylamide sans détruire les interactions entre monomères ou partenaires de complexes macromoléculaires. La migration se fait en fonction de la charge de la protéine et de sa masse moléculaire. Les protéines solubles ne sont soumises à aucun traitement préalable, et les migrations sont réalisées grâce à l'appareil Phast System, sur des gels de gradient

d'acrylamide de 4-15% prêts à l'emploi (GE Healthcare). Les protéines sont révélées par coloration au Bleu de Coomassie R250 ou par immunoempreinte.

3.2.10.3. Technique d'immunoempreinte

Les protéines du gel sont transférées sur membrane PVDF Low fluorescence grâce au système Trans-Blot Turbo de BIO-RAD après une électrophorèse en conditions dénaturantes. Dans le cas d'électrophorèse en conditions natives, un transfert passif sur la nuit est réalisé dans du tampon « phosphate buffer saline » (PBS). Après une heure de blocage (lait 5% dans du tampon PBS-Tween 0,1%), la membrane est incubée toute la nuit à 4°C ou pendant une heure à température ambiante avec un anticorps primaire dirigé contre EPYC1 (Agrisera) dilué au 1 :5000 ou contre PRK dilué au 1 :10000 (anticorps produit dans le cadre de cette étude [20] et gracieusement envoyé par le Dr Julien Henri). Après lavage de la membrane avec du tampon PBS-Tween, celle-ci est incubée avec un anticorps secondaire anti-lapin couplé à l'enzyme peroxydase de raifort « horse radish peroxidase » (HRP) dilué au 1 :10000 pendant une heure à température ambiante. Après un nouveau lavage, le substrat de la HRP (Substrat de transfert Western Pierce™ « enhanced chemiluminescence » (ECL)) est ajouté et la révélation est réalisée par chemiluminescence.

3.2.11. Chromatographie d'affinité

La CP12 recombinante de *C. reinhardtii* a été purifiée comme décrit ici 3.2.13 et a été liée de manière covalente à une colonne d'affinité HiTrap NHS-Activated HP de 5 ml (Cytiva). Le protocole décrit par le fabricant a été suivi pour préparer la colonne, en utilisant la CP12 (19,5 mg). L'efficacité du couplage a été estimée à 88%. La colonne a été équilibrée avec 15 mM Tris, 2 mM EDTA, 20 mM NaCl, pH 7,9 (Buffer A). Les protéines solubles (206 mg) ont été extraites de cellules de *C. reinhardtii* cultivées dans des conditions photoautotrophes à hautes concentrations de CO_2 en utilisant le tampon A complété par du NAD 0,1 mM, du glycérol 10% et du DTT 5 mM. Ces protéines ont été chargées sur la colonne pendant une nuit à 4°C dans un système fermé continuellement recyclé par une pompe péristaltique. La colonne a d'abord été lavée avec 70 ml de tampon A avec 5 mM de DTT. Les protéines liées à la CP12 ont ensuite été éluées en deux étapes avec du tampon A additionné d'abord de 150 puis de 500 mM de NaCl. Toutes les fractions de chaque étape d'élution ont été concentrées (Centricon Spin-X® UF), précipitées avec 20% de l'acide trichloroacétique (TCA) et séparées par SDS-PAGE, suivi d'une immunoempreinte et d'une analyse par spectrométrie de masse pour détecter la présence de PRK.

3.2.12. Protéomique quantitative

Les expériences présentées dans cette section sont réalisées à la plateforme de protéomique de l'Institut de Microbiologie de la Méditerranée avec la collaboration de Régine Lebrun.

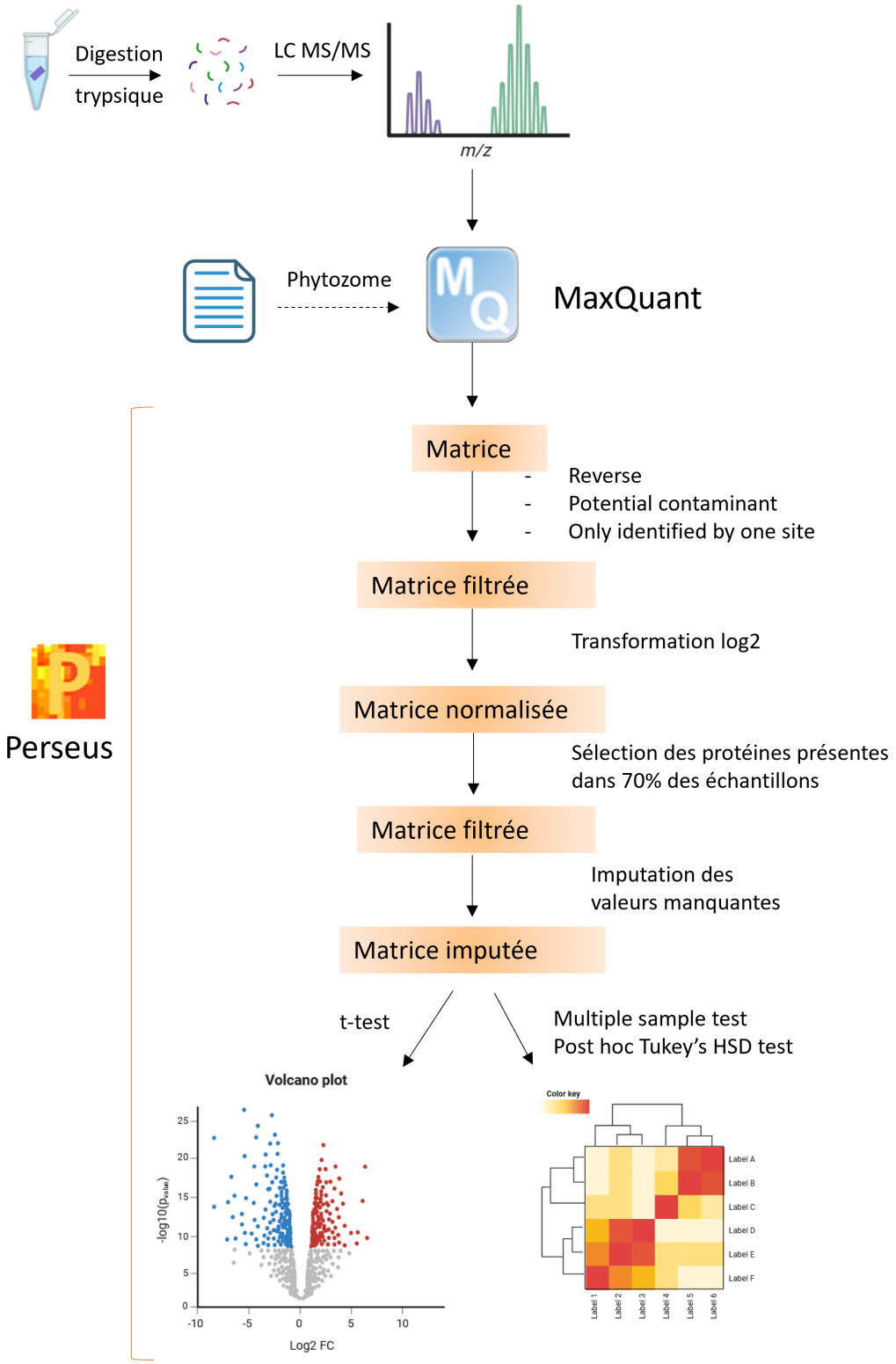


FIGURE 3.6. – Pipeline général de l'analyse protéomique quantitative relative.

3.2.12.1. Préparation des échantillons

Les échantillons sont déposés en triplicats sur gel d'acrylamide 12%. La migration est stoppée juste après l'entrée des échantillons dans le gel de séparation. Après coloration du gel au bleu de Coomassie R250, les bandes correspondantes aux protéines totales sont incisées pour être traitées. Dans un premier temps, elles sont lavées deux fois dans un mélange de NH_4CO_3 100 mM et de CH_3CN pendant 10 min à 37°C avec une agitation de 400 rpm. 80 µL de solution de CH_3CN sont ensuite ajoutés jusqu'à blanchiment des gels. S'ensuit, la réduction des échantillons avec du DTT 10 mM pendant 45 min à 56°C à l'obscurité puis leur alkylation avec une solution de iodoacétamide 55 mM pendant 30 min à température ambiante toujours à l'obscurité. Les bandes sont de nouveau lavées comme décrit précédemment. Après évaporation du CH_3CN, les échantillons sont digérés par de la trypsine/protéase Lys C (v/v) toute la nuit à 37°C. L'extraction se fait par deux lavages des bandes avec 0,1 % à 0,3 % ou 5% d'acide formique et du CH_3CN. Le surnageant est à chaque fois récupéré par centrifugation et enfin, les digestats sont séchés grâce à un vide pendant deux heures.

3.2.12.2. Séparation par chromatographie liquide et analyse par spectrométrie de masse

La séparation des peptides trypsiques par chromatographie liquide est réalisée par la plateforme protéomique de l'IMM, par Christophe Verthuy, Maya Belghazi, ou Régine Lebrun sur une colonne analytique C18 en phase inversée EASY-Spray PepMap Neo en utilisant un gradient linéaire en trois étapes décrit dans cet article [58]. Les peptides séparés sont détectés sur le spectromètre de masse Q Exactive + en mode de fragmentation MS/MS des dix ions les plus intenses (Top 10). Pour la quantification ciblée de la CP12, une liste des peptides de la CP12 a été incluse dans le programme d'acquisition des données MS/MS (Annexe A.2).

3.2.12.3. Identification des protéines

Les données acquises par spectrométrie de masse sont traitées sur des logiciels spécifiques (MaxQuant 2.4.14 ou Proteome Discoverer 3.0, algorithme Sequest HT) permettant l'attribution des peptides aux protéines à partir d'une banque de séquences interrogées (Phytozome *Chlamydomonas reinhardtii* V5.6, 19526 protéines). Le logiciel MaxQuant utilise l'algorithme MaxLFQ (label-free quantification) pour le calcul des intensités relatives des peptides.

3.2.12.4. Analyse des données

Le logiciel Perseus13 (version 1.6.15.0) a été utilisé pour l'analyse statistique. Les données ont été filtrées en éliminant les contaminants, les faux positifs, les protéines qui ne sont identifiées que par des peptides avec un ou plusieurs acides aminés modifiés et en conservant seulement les protéines retrouvées dans 70 % des données

totales. Les intensités LFQ (label-free quantification) ont été transformées en logarithme base 2 pour suivre une distribution normale. Les valeurs manquantes ont été remplacées par des valeurs faibles suivant une distribution normale ("Imputation des valeurs manquantes" Figure 3.6. La quantité différentielle de protéines a été étudiée par des tests de Student. Les tests comparent deux à deux les intensités associées à chaque protéine dans les deux conditions. Un seuil FDR (taux de faux positifs) de 5 % basé sur 250 permutations et un facteur de correction (s0) de 0,1 ont été appliqués.

3.2.13. Production de la protéine recombinante CP12

3.2.13.1. Transformation

La production de la CP12 est réalisée en système recombinant chez *E.coli*. Les cellules C41 sont transformées avec 100 ng de plasmide pET16b-CP12 par choc thermique. Celles-ci sont mises au contact du plasmide pendant 30 min sur glace. Le mélange est ensuite placé à 45 °C pendant 45 s puis est de nouveau mis sur glace pendant 5 min. Afin de régénérer les cellules, 1 mL de milieu Luria Bertani (LB) est ajouté et les cellules sont incubées pendant 1 heure à 37 °C. Elles sont ensuite concentrées puis réparties sur milieu LB Agar ($15\,g\,L^{-1}$) contenant de l'ampicilline $100\,\mu g\,mL^{-1}$ pendant une nuit à 37 °C afin de sélectionner uniquement les transformants. Pour chaque purification, une nouvelle transformation est réalisée.

3.2.13.2. Expression de la protéine CP12 recombinante

Une pré-culture en milieu LB contenant de $100\,\mu g\,mL^{-1}$ d'ampicilline est ensemencée avec plusieurs clones (pET16b-CP12) puis incubée une nuit à 37°C sous agitation à 160 rpm.

Pour une production ne nécessitant pas de marquage à l'azote 15, la pré-culture est utilisée pour ensemencer la culture dans le milieu 2YT (Tryptone $16\,g\,L^{-1}$, Extrait de levure $10\,g\,L^{-1}$, NaCl $5\,g\,L^{-1}$, pH 7,5) avec une densité optique à 600 nm de 0,05. Après incubation à 37°C, quand la DO a atteint une valeur avoisinant 0,6, les cultures sont mises sur glace afin de stopper leur croissance. Après 30 min à basse température, l'expression des protéines recombinantes est induite par l'ajout d'IPTG 1 mM. Les cultures sont ensuite incubées à 30°C sous agitation (160 rpm) toute la nuit. Le lendemain, les cellules sont récoltées par centrifugation à 3500 g pendant 15 min à 4°C et les culots sont conservés à -20°C jusqu'à l'étape de purification.

La production des protéines marquées à l'isotope 15 de l'azote (^{15}N) est réalisé dans du milieu auto-inductible N5052 composé de Na_2HPO_4 50 mM, KH_2PO_4 50 mM, NH_4Cl 50 mM, Na_2SO_4 5 mM, $MgSO_4$ 2 mM, le mélange de métaux II décrit ici [169], avec du glycérol 0.5 %, glucose 0.05 % et lactose 0.02 %. La pré-culture, après centrifugation à 2000g pendant 10 min à 4°C pour éliminer le milieu LB, est utilisée pour ensemencer la culture avec une DO600 nm de départ de 0.05. Les cellules sont incubées à 37°C sous agitation à 160 rpm et récoltées par

centrifugation après 24 heures de culture. La même procédure est effectuée pour un double marquage à ^{13}C ^{15}N avec le milieu auto-inductible C750501 qui a la même composition que le milieu N5052 excepté qu'il s'agit de glycérol comprenant du carbone marqué à l'isotope 13.

La production des protéines est contrôlée par électrophorèse SDS-PAGE.

3.2.14. Purification de la CP12

3.2.14.1. Extraction des protéines solubles et purification par chromatographie d'affinité

Le culot cellulaire est re-suspendu et homogénéisé à l'aide d'un potter dans du tampon de lyse (Tris 50 mM, NaCl 150 mM, $MgCl_2$ 1 mM, Lysozyme 2 µl/ml, Benzonase (Sigma) 0,1 µl/ml et de l'inhibiteur de protéases C0mplete EDTA-free Sigma, pH 7,7). La lyse cellulaire est ensuite réalisée par sonication à raison de 12 cycles de 20 secondes d'ultrasons à une intensité de 60% sur glace. Le lysat est centrifugé à 15000g à 4°C pendant 40 min puis la fraction soluble est récupérée et filtrée avec un filtre de 0,45 µm.

La purification se fait grâce à un système AKTA go par chromatographie d'affinité sur ions métalliques immobilisées (IMAC). La fraction soluble, contenant la protéine d'intérêt, est déposée sur une colonne Ni-NTA de 5 mL qui a été préalablement équilibrée avec du tampon Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,7. La protéine sera fixée à cette dernière grâce à l'interaction entre ses résidus histidine de son étiquette et le nickel présent sur la colonne. Après lavage de la colonne et application d'un gradient d'imidazole jusqu'à une concentration finale de 300 mM, les fractions présentant la plus haute absorbance à 280 nm sont rassemblées et concentrées avec un concentrateur Spin-X® UF de 5 kDa jusqu'à un volume final de 2 mL. L'échantillon est ensuite dialysé à l'aide d'une membrane de 3,5 kDa contre deux litres de tampon Tris 50 mM, NaCl 100 mM, pH 7,7 pour éliminer l'imidazole. La concentration protéique est déterminée par la mesure d'absorbance à 280 nm grâce à la loi de Beer-Lambert en utilisant un NanoDrop.

$$A = \varepsilon \times l \times c \tag{3.2}$$

avec A l'absorbance ; ε le coefficient d'extinction molaire de la protéine d'intérêt (6990 $\mathrm{mol\,L^{-1}\,cm^{-1}}$ pour la CP12 mature réduite) ; C la concentration en $\mathrm{mol\,L^{-1}}$; l est la longueur du trajet optique en cm.

3.2.14.2. Obtention de la protéine CP12 sous sa forme mature

Afin d'obtenir la séquence mature de la protéine, une coupure chimique après l'unique méthionine de la séquence de la CP12 est réalisée [86]. Cela est fait par ajout de 100 mM d'acide chlorhydrique et d'une concentration de bromure de cyanogène 100 fois supérieure par rapport à celle de la protéine. La réaction est réalisée à l'obscurité et à température ambiante pendant la nuit. S'ensuit une étape

de lyophilisation permettant l'élimination du cyanure. La protéine lyophilisée est re-suspendue dans un tampon Tris 100 mM NaCl 150 mM pH 7.9 et introduite via un système AKTA dans une colonne d'exclusion stérique (SEC) High-load Superdex 200. Celle-ci permet une élution en fonction du rayon hydrodynamique de la protéine pour éliminer l'étiquette coupée, mais aussi pour se défaire d'éventuelles contaminations de la coupure chimique et avoir une protéine pure.

3.2.15. Analyse MALDI-ToF

Les expériences de spectrométrie de masse sont réalisées à la plateforme de protéomique de l'Institut de Microbiologie de la Méditerranée avec la collaboration de Régine Lebrun. Les spectres sont enregistrés avec un spectromètre « Matrix Assisted Laser Desorption Ionization - Time of Flight » (MALDI-ToF) Microflex II de la marque Bruker. L'échantillon est déposé sur une plaque, séché, puis la matrice composée d'acide alpha-cyano-4-hydroxycinnamique est ajoutée. Une fois que le mélange est sec, la plaque est prête à être analysée dans le spectromètre. Les molécules présentes dans l'échantillon sont transformées de leur état naturel en ions gazeux pour ainsi obtenir leur masse moléculaire en analysant le rapport masse/charge (m/z).

3.2.16. Spectroscopie RMN

Les expériences de RMN sont réalisées à la plateforme de l'Institut de Microbiologie de la Méditerranée (IMM) avec la collaboration d'Olivier Bornet. Les spectres sont enregistrés sur un spectromètre Bruker Avance III de 600 MHz équipé d'une cryosonde TCI triple résonance (^{1}H ^{13}C^{15}N) et contrôlé par le logiciel TopSpin 3.2. Pour chaque expérience, l'accord de sonde est réalisé et les durées d'impulsions de radio fréquence ^{1}H sont calibrées.

3.2.16.1. Préparation des échantillons

Sauf indication contraire, la CP12 enrichie en isotopes 15 de l'azote et 13 du carbone est à une concentration de 100 µM, dans un tampon Tris 50 mM avec 150 mM de NaCl et 20 mM de DTT, pH 7,9 à une température de 296K (23°C). 5% (vol/vol) de D_2O est ajouté à chaque échantillon ainsi que 10 µM de DSS permettant d'avoir une référence interne à 0 ppm.

3.2.16.2. RMN dans la cellule d'*E. coli*

La souche d'*E. coli* DH5α transformée avec le plasmide pET24 contenant la séquence codante pour la CP12 mature est ensemencée dans un milieu LB contenant 50 µg/mL de Kanamycine. En phase exponentielle, cette culture est utilisée pour ensemencer une nouvelle culture dans le milieu M9 non maquée (KH_2PO_4 15 g/L, NaCl 2.5 g/L, Na_2HPO_4 33.9 g/L, NH_4Cl 5 g/L). Une fois la densité optique à 600 nm avoisinant une valeur de 0,6, les cellules sont transférées, après centrifugation,

dans 50 mL de milieu M9 enrichi en azote 15. Quand la densité optique atteint 1,6, 1 mM d'IPTG est ajouté et les cellules *E. coli* sont incubées pendant deux heures à 37°C. Les cellules sont ensuite concentrées dans 500 µL de milieu M9 non marqué.

3.2.16.3. Préparation du lysat cellulaire de *C. reinhardtii*

Les cellules de *C.reinhardtii* ont été cultivées en illumination continue et récoltées en phase exponentielle. 50 mL de culture (correspondant à $1{,}21.10^7$ cellules par mL) ont été centrifugés à 4°C et 2000 g pendant 15 min. Le milieu de culture a été éliminé et les cellules ont été resuspendues dans un volume de 1,5 mL de tampon Tris 50 mM, NaCl 150 mM, pH 7.9 (supplémenté avec un inhibiteur de protéases COmplete EDTA-free Sigma). Une seconde centrifugation a été réalisée à 2000 g pendant 15 min. Les cellules sont ensuite soniquées (5 fois 15 pulses, correspondant à un temps total de 2 min de sonication) dans la glace. Dans le cas, du blanchiment des cellules, le culot après la seconde centrifugation et avant la sonication, a été chauffé à 85°C pendant 3 min puis placé dans la glace pendant 1 min.

3.2.16.4. 1D ^{1}H

Les expériences 1D permettent d'obtenir des spectres à une dimension pour le proton et sont utilisées dans ces travaux, pour vérifier la présence de la protéine avant d'entreprendre de longues expériences. Elles sont réalisées avec un profil d'excitation adapté à la suppression de l'eau avec la séquence Bruker "zggw5". Le temps d'acquisition est typiquement de 1.2 s, avec une fenêtre spectrale de 20 ppm centrée sur 4.7 ppm (fréquence de résonance de l'eau) et sondée avec 32 768 points discrets. Le nombre de points peut être réduit à 4 096 (temps d'acquisition apparent réduit à 170 ms) lors du traitement pour observer les résonances de la protéine. Le nombre de scans est typiquement 16. Le délai inter-scan est typiquement de 2 s.

3.2.16.5. HSQC ^{1}H ^{15}N

Les spectres ^{1}H ^{15}N-HSQC (Heteronuclear Single Quantum Correlation) sont utilisés pour obtenir l'empreinte de la protéine marquée ^{15}N dans différents environnements physico-chimiques. Chaque pic correspond à l'interaction magnétique entre le proton amide, dont le déplacement chimique est en abscisse, et l'azote attaché, dont le déplacement chimique est en ordonnée. La séquence utilisée est une fast HSQC fnsqcf3gpph de Bruker avec des modifications pour l'optimisation de la correction de phase [133]. Le temps d'acquisition de la dimension ^{1}H est typiquement de 243 ms avec une fenêtre spectrale de 14 ppm centrée sur 4.7 ppm (fréquence de résonance de l'eau) et sondée avec 4096 points discrets. Le temps d'acquisition de la dimension ^{15}N est typiquement de 42 ms, avec une fenêtre spectrale de 25 ppm centrée sur 119 ppm (fréquence de résonance de l'eau) et sondée avec 128 points discrets. Le nombre de scans typiquement 16. Le délai inter-scan est typiquement de 1 s.

3.2.16.6. HNCACB/HN(CO)CACB et HNCA/HN(CO)CA

L'attribution séquentielle des résonances observées est réalisée à l'aide des expériences standard de triple résonance HNCO, HN(Ca)CO, HNCaCb et HN(CO) CaCb [138]. Les mêmes paramètres d'acquisition des dimensions ^{1}H et ^{15}N ont été utilisés qu'au paragraphe précédent.

3.2.16.7. ^{15}N R_1H, ^{15}N R_2H, {^{1}H}-^{15}N het-NOE, CEST

Les mesures de relaxation de spin nucléaire sont couramment utilisées pour l'étude de la dynamique des IDPs. Les mouvements des protéines peuvent être détectés par leur influence sur les paramètres de relaxation R1, R2 et NOE hétéronucléaires (hetNOE) observés sur la liaison amide du squelette protéique. Ces expériences ^{15}N R_1H, ^{15}N R_2H, {^{1}H}-^{15}N het-NOE permettent de mesurer la dynamique d'une protéine sur une échelle de temps de la nanoseconde à la milliseconde.

Le paramètre ^{15}N R_1H, ou constante de relaxation longitudinale, mesure la vitesse avec laquelle les spins nucléaires excités retournent à leur état d'équilibre selon l'axe parallèle au champ magnétique après une impulsion de radiofréquence. Cela se produit en transférant l'énergie des spins aux mouvements thermiques de l'environnement par l'effet du couplage dipolaire et de l'anisotropie du déplacement chimique. La séquence Bruker hsqct1etf3gpsi3d a été utilisée avec les délais de relaxation suivants : 5, 10, 50 ms et 0.1, 0.2, 0.4, 0.6, 0.8, 1, 1.2, 1.6 et 2 s.

Le paramètre ^{15}N R_2H, ou constante de relaxation transversale, mesure la perte de cohérence de phase des spins nucléaires entre eux après une impulsion de radiofréquence. Contrairement à ^{15}N R_1H, qui concerne le retour à l'équilibre énergétique, R2 se réfère à la manière dont les spins se déphasent les uns par rapport aux autres sous l'effet du couplage dipolaire et de l'anisotropie du déplacement chimique. La séquence Bruker hsqct2etf3gpsi3d a été utilisée avec les délais de relaxation suivants : 17.6, 35.2, 52.8, 70.4, 88, 105.6, 123.2, 140.8, 158.4, 176, 35.2, 105.6 ms (les deux derniers délais sont des réplicats).

Le paramètre hétéro-nucléaire NOE entre les spins ^{1}H et ^{15}N ({^{1}H}-^{15}N het-NOE) est basé sur l'effet de la saturation de l'aimantation des protons ^{1}H adjacents sur les noyaux ^{15}N. L'aimantation des protons et déphasée (saturée) par une série d'impulsions de 120° pendant deux secondes, et l'effet de cette saturation sur le signal du ^{15}N est observé.

Le CEST (Chemical Exchange Saturation Transfer) permet de reporter la présence ou non d'échange conformationnel à une échelle de temps de l'ordre de la microseconde à 100 millisecondes. Une série de spectres ^{1}H ^{15}N est enregistrée et pour chaque spectre, une fréquence de saturation sur la dimension ^{15}N avec une fine bande spectrale (intensité du champ de saturation B1 de 25 Hz). Toutes les résonances qui sont sur cette bande spectrale ne sont pas observées, ainsi que les résonances en échange avec celles-ci. Le CEST permet de détecter et de caractériser des états conformationnels transitoires ou faiblement peuplés.

Ces expériences ont été menées avec les séquences classiques de Bruker. Les mêmes paramètres d'acquisition des dimensions ^{1}H et ^{15}N ont été utilisés qu'au

paragraphe précédent.

3.2.16.8. Traitement des données

L'ensemble des données est traité avec NMRPipe [42]. Une fonction d'apodisation de type sinus (fonction SineBell dans NMRpipe) est utilisée dans les deux dimensions, ainsi qu'un "zero filling" qui double le nombre de points. Les intensités sont mesurées avec NMRFAM-Sparky [99]. Ce dernier logiciel a aussi été utilisé pour faire les figures.

4. Effet de la délétion de la protéine CP12 dans le métabolisme de *Chlamydomonas reinhardtii*

4.1. Résumé de la publication

Il est décrit dans la littérature que l'interaction de la CP12 avec la GAPDH et la PRK joue un rôle important dans la régulation lumière/obscurité du cycle de CBB. Cependant, d'autres fonctions ont été proposées pour cette protéine.

L'étude présentée dans la section suivante a constitué la première étude d'une souche mutée sans la protéine CP12 chez les microalgues vertes. La mutation du gène unique CP12 a été réalisée chez *C. reinhardtii* par la méthode CRISPR-Cas9-RNP par Kwang Suk Chang et EonSeon Jin.

Les résultats ont révélé un taux de croissance identique des cellules entre les deux souches en illumination continue à hautes concentrations de CO_2 (HC, P_{CO_2} = 20000 ppm). Dans ces conditions de culture, le chloroplaste est un environnement réducteur. Concernant les partenaires d'interaction du complexe ternaire, la quantité de la protéine GAPDH est restée inchangée, ce qui n'a pas été le cas pour la protéine PRK. Sa quantité ainsi que son activité spécifique étaient significativement réduites dans la souche mutante. De plus, il a été montré par Luisana Avilan que la PRK a perdu son activité de manière irréversible au fil du temps *in vitro*, ce qui n'est pas le cas en présence de CP12 recombinante. Ces résultats suggèrent que la CP12 stabilise la PRK en conditions réduites. Les résidus d'acides aminés de la CP12 nécessaires pour cette nouvelle fonction protectrice préservant l'activité de la PRK ont été identifiés et l'hypothèse d'une interaction entre les deux protéines en conditions réductrices a été proposée.

De plus, afin d'explorer d'autres fonctions de la protéine CP12 en conditions de lumière, une étude de protéomique quantitative relative non ciblée a été menée. Il s'est avéré que de nombreuses protéines impliquées dans diverses voies métaboliques ont été impactées par l'absence de la protéine CP12.

4.2. Article : « Reduction of Phosphoribulokinase Amount and Re-Routing Metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* CP12 Mutants »

International Journal of
Molecular Sciences

MDPI

Article

Reduction in Phosphoribulokinase Amount and Re-Routing Metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* CP12 Mutants

Cassy Gérard [1], Régine Lebrun [2], Erwan Lemesle [1], Luisana Avilan [3], Kwang Suk Chang [4], EonSeon Jin [4], Frédéric Carrière [1], Brigitte Gontero [1,*] and Hélène Launay [1,*]

1 Aix Marseille Univ, CNRS, BIP, UMR 7281, IMM, FR3479, 31 Chemin J. Aiguier, CEDEX 9, 13402 Marseille, France; cgerard@imm.cnrs.fr (C.G.); erwan.lemesle@etu.univ-amu.fr (E.L.); carriere@imm.cnrs.fr (F.C.)
2 Plate-forme Protéomique, Marseille Protéomique (MaP), IMM FR 3479, 31 Chemin Joseph Aiguier, 13009 Marseille, France; rlebrun@imm.cnrs.fr
3 Centre for Enzyme Innovation, School of Biological Sciences, Institute of Biological and Biomedical Sciences, University of Portsmouth, Portsmouth PO1 2DY, UK; luisana.avilan@port.ac.uk
4 Department of Life Science, Research Institute for Natural Sciences, Hanyang University, Seoul 04763, Korea; kschang@hanyang.ac.kr (K.S.C.); esjin@hanyang.ac.kr (E.J.)
* Correspondence: bmeunier@imm.cnrs.fr (B.G.); helene.launay@univ-amu.fr (H.L.)

Abstract: The chloroplast protein CP12 is involved in the dark/light regulation of the Calvin–Benson–Bassham cycle, in particular, in the dark inhibition of two enzymes: glyceraldehyde−3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and phosphoribulokinase (PRK), but other functions related to stress have been proposed. We knocked out the unique *CP12* gene to prevent its expression in *Chlamydomonas reinhardtii* (ΔCP12). The growth rates of both wild-type and ΔCP12 cells were nearly identical, as was the GAPDH protein abundance and activity in both cell lines. On the contrary, the abundance of PRK and its specific activity were significantly reduced in ΔCP12, as revealed by relative quantitative proteomics. Isolated PRK lost irreversibly its activity over-time in vitro, which was prevented in the presence of recombinant CP12 in a redox-independent manner. We have identified amino acid residues in the CP12 protein that are required for this new function preserving PRK activity. Numerous proteins involved in redox homeostasis and stress responses were more abundant and the expressions of various metabolic pathways were also increased or decreased in the absence of CP12. These results highlight CP12 as a moonlighting protein with additional functions beyond its well-known regulatory role in carbon metabolism.

Keywords: Calvin–Benson–Bassham; CP12; enzymatic activity; intrinsically disordered protein; quantitative proteomics; photosynthesis; glyoxylate pathway; carbon allocation; nitrogen uptake

check for updates

Citation: Gérard, C.; Lebrun, R.; Lemesle, E.; Avilan, L.; Chang, K.S.; Jin, E.; Carrière, F.; Gontero, B.; Launay, H. Reduction in Phosphoribulokinase Amount and Re-Routing Metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* CP12 Mutants. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2710. https://doi.org/10.3390/ijms23052710

Academic Editor: Bartolome Sabater

Received: 24 January 2022
Accepted: 25 February 2022
Published: 28 February 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

In all photosynthetic eukaryotes, the Calvin–Benson–Bassham (CBB) cycle involved in CO_2 assimilation is dependent upon reducing power and ATP production from the photochemical phase of photosynthesis. In the absence of light, the CBB cycle is inhibited; a fine regulation of CBB enzymes is achieved by post-translational redox modifications of regulatory cysteine residues [1–3], metabolite concentrations and pH transition in the chloroplast stroma [4]. Protein–protein interactions, involving the CP12 protein and two enzymes belonging to this cycle, namely the phosphoribulokinase (PRK) and the glyceraldehyde−3-phosphate dehydrogenase (GAPDH), also regulate the CBB cycle [5–8].

CP12 is a small chloroplast protein of 8.5 kDa, encoded by the nuclear genome, that is widespread in photosynthetic organisms, such as higher plants, diatoms, and red and green algae, as well as cyanobacteria [9]. This protein has a pair of cysteine residues at the C-terminus and, in Viridiplantae, a second pair at the N-terminal extremity. In the dark, CP12 is oxidized and its cysteine residues form disulfide bridges. In the light, CP12 is

reduced, and its disulfide bridges are disrupted. The reduction in these disulfide bridges triggers conformational changes and leads to a fully disordered CP12, while, under its oxidized state, CP12 oscillates between a disordered and a partly ordered state [10,11]. This redox-dependent conditional disorder, also described for other proteins such as Cox17 and Hsp33 [12], allows the regulation of the CBB cycle and, in particular, of PRK and GAPDH activities. Oxidized CP12 sequentially binds to GAPDH and then PRK [7]. The two enzymes are inhibited within this ternary complex and, thus, the CBB cycle becomes inactive. Upon CP12 reduction, the two enzymes are released from the supramolecular complex and become fully active, thus, allowing the CBB cycle to function.

CP12, similar to many disordered proteins, appears as a moonlighting protein with other functions besides its important regulatory role in the CBB cycle [13]. In cyanobacteria, CP12 was shown to bind NADH and NADPH [14]. In *Chlamydomonas reinhardtii*, CP12 acts as a specific chaperone, being able to protect GAPDH against heat-induced inactivation and aggregation [15] and can bind Cu^{2+} and Ni^{2+} [16,17], while, in the higher plant *Arabidopsis thaliana*, it can bind Ca^{2+} [18]. In *C. reinhardtii*, CP12 can interact with a large number of partners, such as malate dehydrogenase, elongation factor 1α2 and 38 kDa ribosome-associated protein but to a lesser extent than with PRK, GAPDH and another enzyme from the CBB cycle, the aldolase [19]. The function of CP12 in vivo is, thus, broader than initially envisaged. However, the use of approaches to decrease the amount or to delete the expression of CP12 to elucidate its global function has been initiated only on a few photosynthetic organisms. To the best of our knowledge, today, only CP12-transgenic antisense in the tobacco, *Nicotiana tabacum*, in *A. thaliana* plants, in the tropical legume *Stylosanthes guianensis* and a cyanobacterial CP12 insertional mutant (knockout mutant of *Synechococcus elongatus* PCC7942) have been studied [14,20–23].

However, no data are available for green algae; therefore, the aim of the work presented here was to investigate further the role of CP12 in vivo by suppressing its gene expression in *C. reinhardtii*. To achieve this, knock-out mutants of the *CP12* gene coding the unique isoform of CP12 in the cell-wall deficient *C. reinhardtii* line CC4349 were constructed using CRISPR-Cas9 ribonucleoprotein (RNP)-mediated method. We first evaluated the impact of CP12 deletion on the growth rates and PRK and GAPDH activities in cell extracts. We completed these targeted investigations with a global untargeted quantitative proteomic analysis to evaluate the effect of CP12 deletion on the whole *C. reinhardtii* proteome. In parallel, the effect of CP12 on the protection of PRK activity against irreversible damage was monitored in vitro; the amino acid residues in CP12 involved in this protection were identified using CP12 protein mutants.

2. Results

2.1. The Absence of CP12 Protein Has No Effect on C. reinhardtii Growth

The genomic sequence of knock-out mutants (ΔCP12-Cr) revealed that the gRNA binding site of *CP12* was mutated. This mutation resulted in an early stop codon induced by co-transformations of CRISPR-Cas9-RNP and the aminoglycoside phosphotransferase from *Streptomyces hygroscopicus* (*aph7*) gene expression cassette at the target site (Figure S1).

Once the targeted mutation of the *CP12* gene was confirmed, we tested the growth of wild-type (WT) CC4349 *C. reinhardtii* (named WT-Cr hereafter) and ΔCP12-Cr strains. Under continuous light or under a dark/light cycle, the growth curves of WT-Cr and ΔCP12-Cr were similar (Figure 1), indicating that the absence of the CP12 protein did not impair the growth of *C. reinhardtii*.

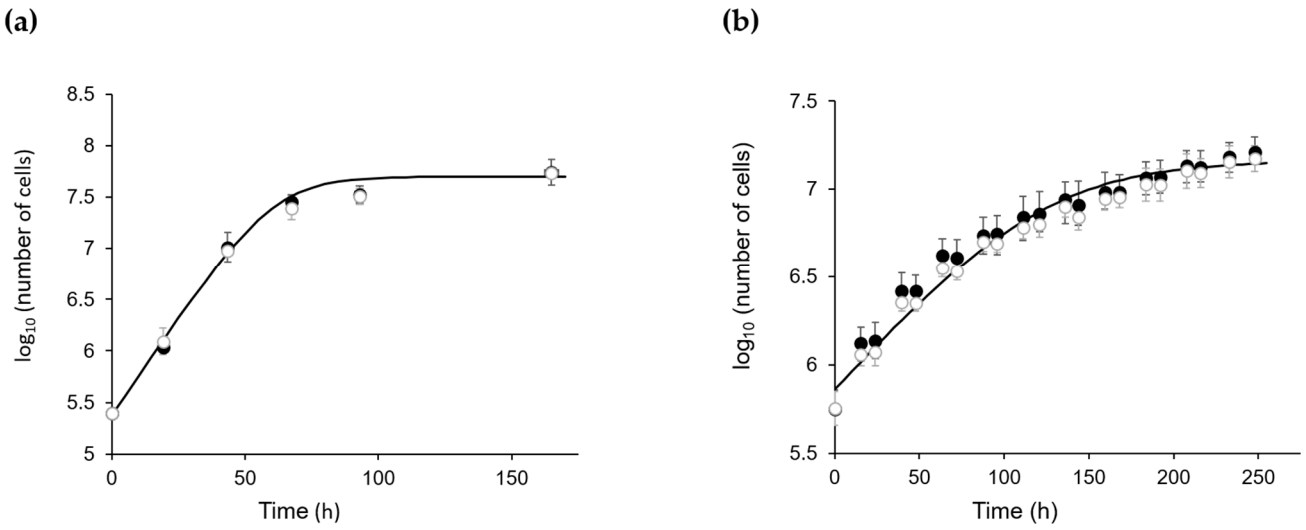


Figure 1. Growth of ΔCP12-Cr (white circle) and WT-Cr (black circle). (**a**) photo-autotrophic and continuous moderate light conditions, 120 µmol of photons·m^2·s^{-1}, 23 °C, 110 rpm and 2% CO_2. (**b**) photo-autotrophic and dark/light conditions: 50 µmol of photons·m^2·s^{-1}, 8.5 h dark / 15.5 h light, 23 °C, 110 rpm and 2% CO_2. Growth curves were fitted to data point with Equation (1) (Materials and Methods) [24].

2.2. Absence of CP12 Abolishes GAPDH Regulation

In order to determine the effect of the absence of CP12 protein on the GAPDH activity, we measured, continuously, the NADPH-dependent activity of GAPDH in cell extracts from WT-Cr and ΔCP12-Cr strains after their reduction with dithiothreitol (DTT). The steady-state activity of GAPDH was 212 ± 73 µM·min^{-1} per mg of protein in the cell extract of WT-Cr and 332 ± 47 µM·min^{-1} per mg of protein in the cell extract of ΔCP12-Cr (Table 1). The NADPH-dependent steady-state activity of GAPDH was slightly higher (1.5-fold) in the ΔCP12-Cr than in WT-Cr.

Table 1. NADPH-dependent GAPDH and PRK activity per mg of total proteins in cell extracts treated with a reducing agent and in untreated cell extracts of ΔCP12-Cr and WT-Cr strains. Standard deviation of three biological replicates is indicated except for GAPDH activity in reduced cell extracts for which standard deviation of three biological replicates plus two technical replicates are indicated. The total protein amount in the PRK activity assays ranged from 27 to 60 µg WT-Cr cell extracts and from 9 to 35 µg ΔCP12-Cr cell extracts. The total protein amount in the GAPDH activity assays ranged from 54 to 120 µg for WT-Cr cell extracts and from 18 to 70 µg for ΔCP12-Cr cell extracts.

	NADPH-Dependent GAPDH Activity (µM.min^{-1})		**PRK Activity (µM.min^{-1})**	
	Reduced Cell Extract [1]	**Untreated [2]**	**Reduced Cell Extract [1]**	**Untreated [2]**
WT-Cr	212 ± 73	168 ± 47	1143 ± 328	940 ± 309
ΔCP12-Cr	332 ± 47	320 ± 61	430 ± 94	395 ± 99

[1] Cell extracts were reduced with 20 mM DTT for 20 min before the assay. [2] The activity corresponds to the linear phase of the progress curves.

When the activity of GAPDH enzyme from the untreated WT-Cr cell extract was continuously monitored, the progress curve displayed a lag phase of about 1 min and a linear phase that corresponds to an activity of 168 ± 47 µM·min^{-1}·mg^{-1} of proteins (Figure 2a and Table 1). The activity of the enzyme of the untreated samples was slightly lower (1.3-fold) than the one obtained with a pre-treatment of the cell extracts with 20 mM DTT (Table 1).

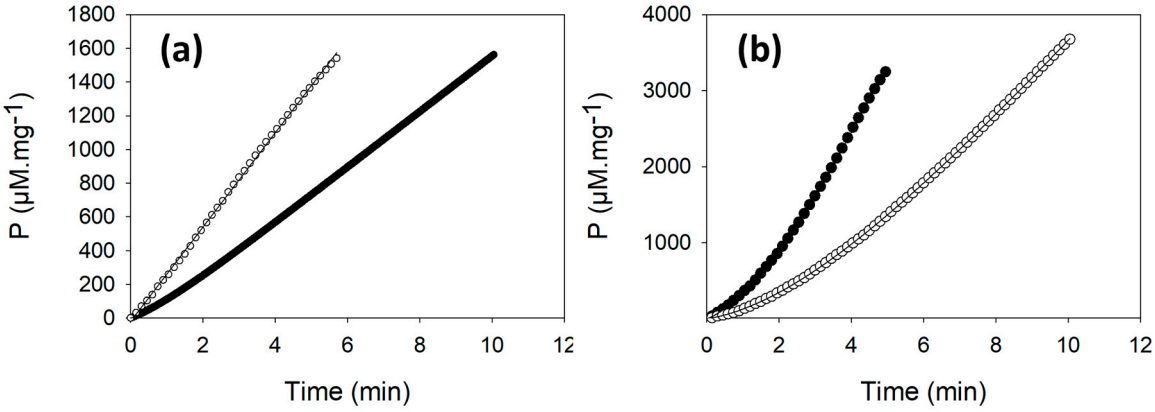


Figure 2. Representative progress curves of appearance of the product of the NADPH dependent GAPDH (**a**) and PRK (**b**) activities. The activity of the two enzymes was measured in the crude extract of WT-Cr (full circles) or of ΔCP12-Cr (empty circles) cells without pre-treatment with DTT. P corresponds to the product concentration in µmol·L^{-1} per mg of total proteins (µM·mg^{-1}) in cell extracts. The quantity of proteins from WT-Cr and ΔCP12-Cr cell extracts used in the GAPDH activity assays were, respectively, 84 and 64 µg. In the shown PRK activity assays, 43 and 34 µg of proteins from WT-Cr and ΔCP12-Cr cell extracts were used. The experimental results are fitted to Equation (2) (Materials and Methods), except for the NADPH dependent GAPDH activity progress curve from the ΔCP12-Cr cell extract that is fitted to a straight line.

In contrast, in the ΔCP12-Cr cell extracts, the NADPH-dependent activity of GAPDH displayed a linear curve regardless of DTT (Table 1 and Figure 2a).

2.3. PRK Activity Is Lower in ΔCP12-Cr Compared to WT-Cr

We also measured, continuously, the PRK activity in cell extracts that were pre-treated with 20 mM DTT; the activity was 1143 ± 328 µM·min^{-1} per mg of protein in the cell extract of WT-Cr and 430 ± 94 µM·min^{-1} per mg of protein in the cell extract of ΔCP12-Cr (Table 1). The steady-state PRK activity in ΔCP12-Cr cell extracts was 3-fold lower than in WT-Cr cell extracts (Student *t*-test, $p = 0.0004$).

As observed for GAPDH, the activity of PRK in the untreated WT-Cr sample displayed a lag (Figure 2b). The average activity PRK was 940 ± 309 µM·min^{-1} per mg of protein in the cell extract (Table 1). This activity was slightly lower than the activity measured on reduced WT-Cr cell extract (1.2-fold).

In the untreated ΔCP12-Cr cell extracts, PRK activity progress curves also displayed a lag slightly higher (about 3 min) than the lag observed in the WT-Cr strain (about 2 min) (Figure 2b).

2.4. Lower PRK Abundance in ΔCP12-Cr Compared to WT-Cr

To get a more complete view of the differentially expressed proteins, in addition to PRK and GAPDH, we used untargeted quantitative proteomics with three biological replicates of ΔCP12-Cr and WT-Cr cell extracts, and two technical replicates. A total of 4170 proteins could be identified, from which 2524 proteins were kept for the quantitative analysis (Materials and Methods). Most of these proteins were in similar amount in ΔCP12-Cr and WT-Cr (Figure 3 and Tables S1 and S2), as evidenced by the quantification of their peptides. However, applying a two-sample *t*-test with a permutation-based false discovery rate (FDR) set at 0.01, the difference in abundance of 130 proteins was observed as statistically significant; 95 proteins were more abundant and 35 proteins less abundant in ΔCP12-Cr than in WT-Cr strains.

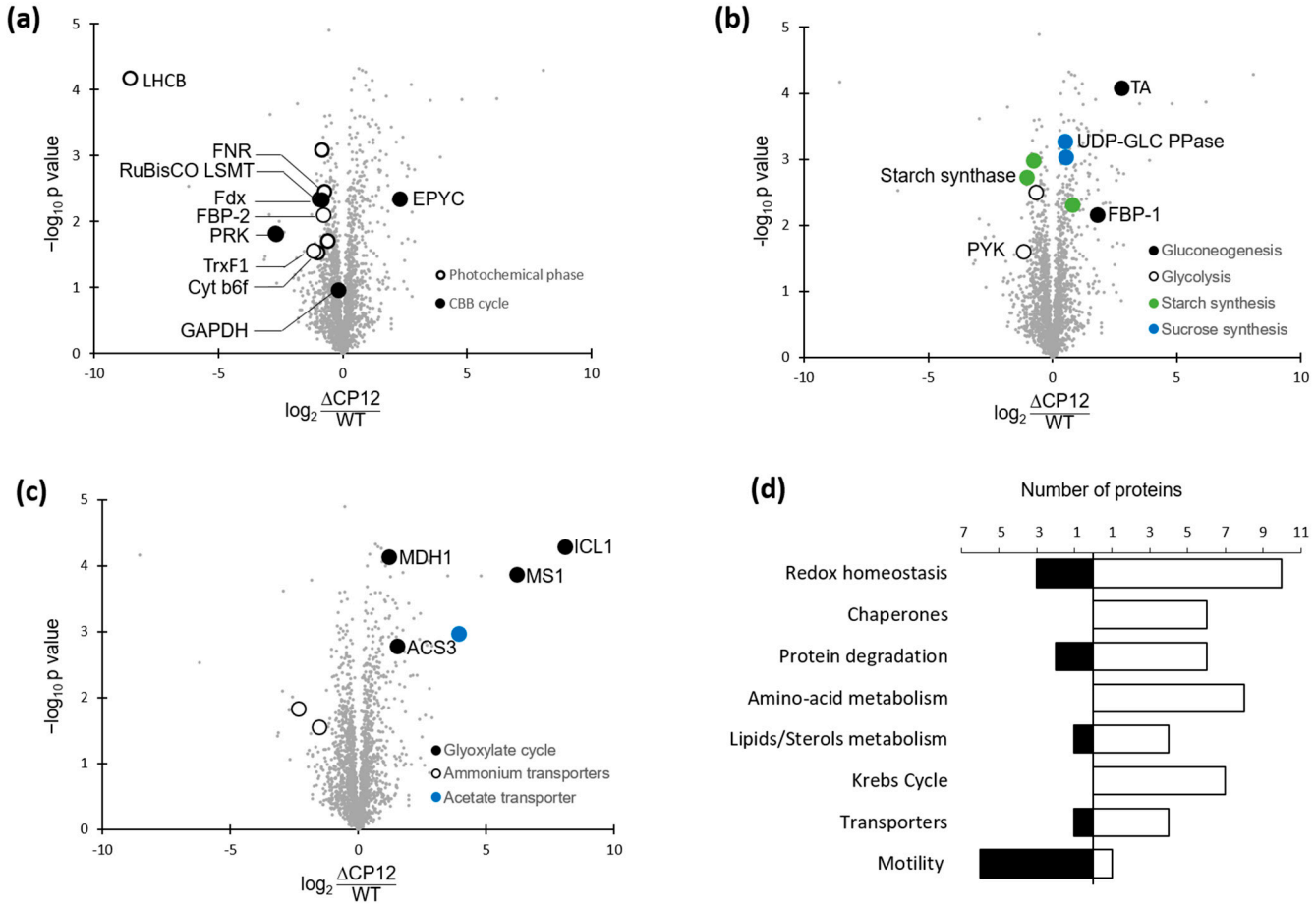


Figure 3. Differentially expressed proteins in ΔCP12-Cr vs WT-Cr strain. (**a**) Plot highlighting proteins related to photosynthesis metabolic pathways. The plot represents the fold changes in protein abundance. The x-axis shows difference of protein abundance in ΔCP12-Cr vs Wt-Cr (in $\log_2$). The y-axis shows the -$\log_{10}$ p value. The Volcano plot is available in Figure S2. (**b**) Plot highlighting proteins involved in carbohydrates related pathways. (**c**) Plot highlighting other metabolic pathways. (**d**) Number of proteins increasing or decreasing in abundance in ΔCP12-Cr strain, classified by selected metabolic pathways. The proteins that are more abundant in ΔCP12-Cr compared to WT-Cr are counted in the white bars, the proteins that are less abundant are counted in the dark bars. All the metabolic pathways are shown in Figure S3. LHCB, light-harvesting chlorophyll a/b-binding; FNR, Ferredoxin NADP$^+$ Reductase; RuBisCO LSMT, RuBisCO large subunit methyltransferase; Fdx, ferredoxin; FBP, Fructose-1,6-bisphosphatase; TrxF1, Thioredoxin F1; Cyt b6 f, Cytochrome b6 f complex; EPYC, essential pyrenoid component 1; TA, transaldolase; UDP-GLC PPase, UDP-glucose pyrophosphorylase; PYK, pyruvate kinase; ICL1, Isocitrate Lyase 1; MS1, Malate synthase 1; MDH1, Malate dehydrogenase 1; ACS3, Acetyl-CoA synthetase 3.

As a first analysis, we looked for the relative amount of GAPDH (Cre01.g010900) and PRK (Cre12.g554800) in the ΔCP12-Cr and WT-Cr strains. No significant difference was observed for the GAPDH amount, whereas a significant difference was observed for PRK amount, with a 6.5-fold decrease of PRK amount in ΔCP12-Cr compared to the WT-Cr strain (Figure 3a). Other enzymes of the CBB cycle, the fructose−1,6-bisphosphatase 2 (FBP−2, Cre12.g510650) and the RuBisCO large subunit methyltransferase (Cre09.g388500) were both slightly reduced (1.7-fold and 1.8-fold, respectively) in the ΔCP12-Cr compared to the WT-Cr strain. In contrast, the EPYC1 (essential pyrenoid component 1) protein (Cre10.g436550), was more abundant (4.9-fold) in the ΔCP12-Cr compared to the WT-Cr strain.

The abundances that were the most decreased correspond to proteins involved in the photochemical phase of photosynthesis. For example, the chlorophyll a/b binding protein of photosystem II (Cre17.g720250) decreased 375-fold. Proteins involved in electron transfer from photosynthesis to CBB cycle were also reduced, such as the ferredoxin $NADP^+$ reductase (Cre11.g476750, 1.65-fold), the chloroplast ferredoxin (Cre14.g626700, 0.5-fold) and the thioredoxin F1 (Cre05.g243050, 2.26-fold).

2.5. Differential Levels of Proteins Associated with Various Pathways in ΔCP12-Cr vs. WT-Cr

The deletion of CP12 induced changes in the abundance of proteins beyond those involved in the photosynthesis pathways. Relative quantitative proteomic analysis revealed that, in ΔCP12-Cr cells, other metabolic pathways were affected, in particular, carbohydrate-related pathways (Figure 3b). Key proteins involved in gluconeogenesis were more abundant, such as transaldolase (Cre01.g032650, 6-fold) and the fructose−1,6-bisphosphatase 1, FBP−1 (Cre07.g338451, 3.5-fold), whereas pyruvate kinase 1 and 5 (Cre12.g533550 and Cre02.g147900), related to glycolysis, were less abundant in ΔCP12-Cr cells (1.6 and 2.2-fold). The starch synthesis also seemed to be affected, with a decrease in soluble starch synthase I (Cre04.g215150) and in the starch branching enzyme (Cre10.g444700) by, respectively, 2.1- and 1.7-fold. On the contrary, sucrose synthesis seems to be favored since the amount of UDP-glucose pyrophosphorylase (Cre04.g229700) was higher (1.4-fold) in ΔCP12-Cr cells.

Proteins related to the glyoxylate and to the Krebs cycle were significantly more abundant in ΔCP12-Cr cells compared to WT-Cr cells (Figure 3c and Tables S1 and S2). The proteins that showed the highest increase fold in the ΔCP12-Cr line compared to WT-Cr line were the isocitrate lyase 1 (Cre06.g282800) and the malate synthase (Cre03.g144807) (270- and 73-fold respectively); together, they belong to the glyoxylate pathway with two other proteins, which are also more abundant [25,26]. The glyoxylate cycle is localized in the glyoxysome (a specialized peroxisome) of *C. reinhardtii*; the peroxisomal biogenesis factor 11 (Cre06.g263300, 2.5-fold) was also more abundant in ΔCP12-Cr cells. Isocitrate lyase and malate synthase belong to the same group of co-expressed genes with an intracellular acetate transporter (Cre17.g700750, 15-fold), which was also significantly more abundant in ΔCP12-Cr cells compared to the WT-Cr cells. Seven enzymes of the Krebs cycle were also more abundant in the ΔCP12-Cr line (increase from 1.4- to 3-fold). With a two-sample *t*-test with permutation-based FDR set at 0.05, two ammonium transporters (Cre03.g159254 and Cre13.g569850) were les abundant (5-fold and 2.9-fold respectively) in ΔCP12-Cr vs WT-Cr cell lines.

There are also proteins involved in a wide range of general cellular processes, such as amino acid metabolism, transcription, and translation, which were affected (Figure 3d and Tables S1 and S2). Changes related to stress response occurred in ΔCP12-Cr compared to WT-Cr with an increase of six chaperones and thirteen proteins linked to redox homeostasis and responses to the accumulation of reactive oxygen species (ROS). Several proteins involved in lipid metabolism were differently present. Lastly, the abundance of six proteins (mostly flagellar associated proteins and radial spoke proteins) involved in *C. reinhardtii* motility was lower in ΔCP12-Cr.

2.6. CP12 Protein Protects PRK from Irreversible Inactivation In Vitro

Since the absence of CP12 in the ΔCP12-Cr cells was associated with a reduction in PRK amount and activity, we tested in vitro the effect of CP12 on PRK activity. We monitored the activity of PRK upon oxidation, both in the absence and in the presence of CP12. Under aerobic conditions, PRK activity decreased over time faster in the absence of CP12 than in the presence of CP12 (Figure 4a). The inhibition of PRK is triggered by its oxidation through the formation of disulfide bridge between C16 and C55, with a redox mid-potential at pH 7.9 of −333 mV [27]; this oxidation is dependent on the redox potential of the solution. Since CP12 is a redox mediator with two redox mid-potentials (−343 and −356 mV at pH 7.9) lower than that of PRK, we hypothesized that the presence of CP12

in the solution could result in a slower oxidation of the solution and, thus, in a slower inactivation of PRK.

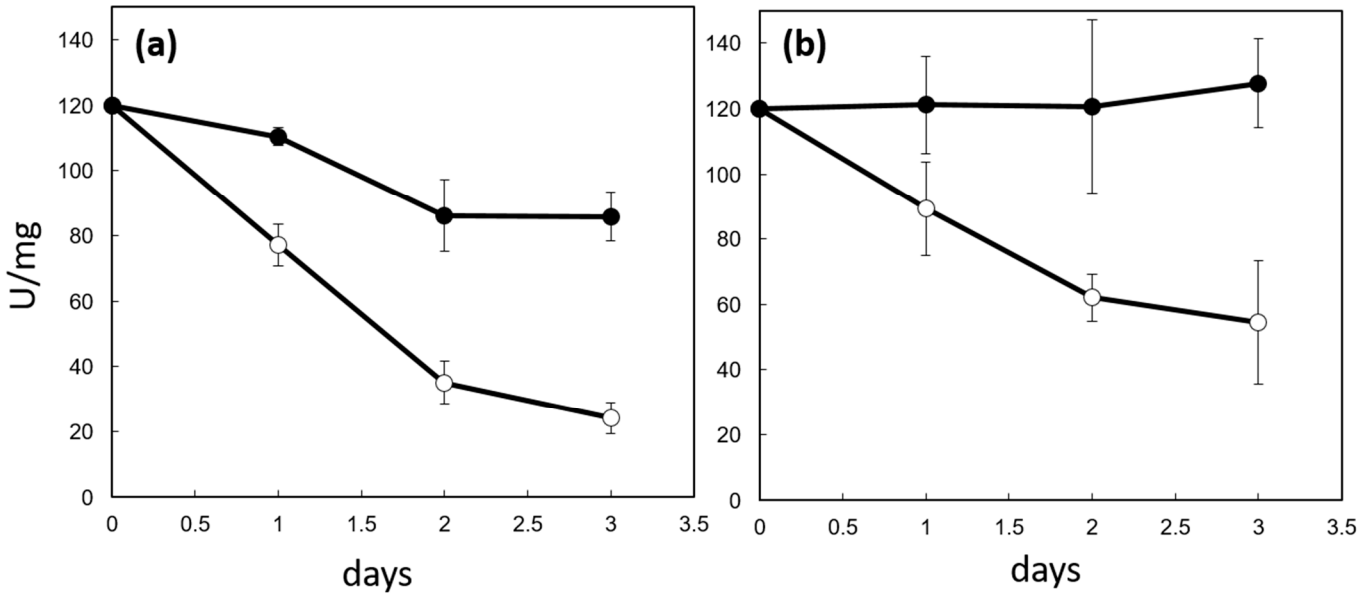


Figure 4. Effects of CP12 on PRK activity. Mixtures (1:1 molar ratio) of CP12 and PRK (black circle) and PRK (white circle) were incubated at 4 °C and PRK activity was measured at four time points (**a**). The same samples were also reduced with 20 mM DTT for 1 h prior activity measurement (**b**). The PRK activity is reported as units per mg of PRK. One unit (U) is the amount of enzyme that catalyzes the reaction of one µmol of substrate per minute.

The oxidative inhibition of PRK is reversible upon addition of DTT [28]. However, in the absence of CP12, reduction in the samples by DTT failed to restore the initial activity of PRK (Figure 4b). This suggests that irreversible damage occurred on PRK beyond the formation of the inhibitory and reversible C16-C55 disulfide bridge, and that PRK irreversible inhibition is not linked to its redox state. On the contrary, in the presence of CP12, the addition of DTT restored the initial PRK activity, indicating that CP12 prevented this irreversible inactivation.

2.7. Identification of CP12 Residues Involved in PRK Protection

It is known that CP12 interacts with PRK within the ternary GAPDH-CP12-PRK complex [7]; this interaction involves CP12 residues A34 to H47 in higher plants and cyanobacteria based on structural data [29–31] (Figure 5b). Using site-directed mutagenesis, we investigated the contribution of the corresponding region and other residues in *C. reinhardtii* CP12 to the protection of PRK against irreversible inactivation. Point mutations on CP12 (W35A, D36K, E39A, E39K, E40K, H47L) and double mutations (E39A/E40A; E39K/E40K) in the consensus core sequence rendered CP12 mutants unable to protect PRK activity; E40A and H47N mutants only partially protected PRK activity, while all other mutations, including mutation of the N-terminal cysteine residue 23, did not change the protective effect of CP12 (Figure 5a).

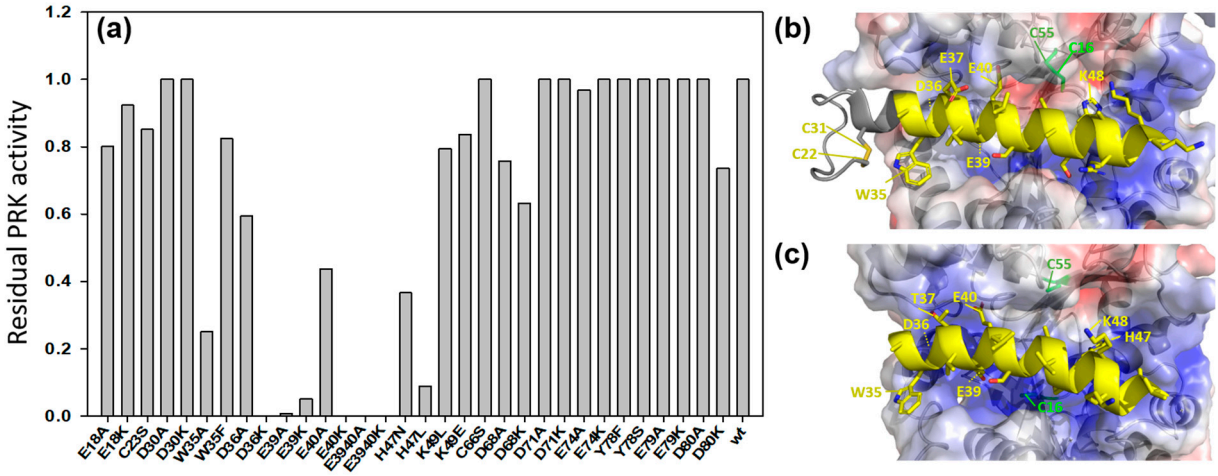


Figure 5. (**a**) Residual activity of PRK recovered after incubation with various CP12 mutants during three days at 4 °C (the absolute PRK activity without incubation is reported in Figure 4 and was 120 U· mg^{-1}). The PRK activity was measured and compared with PRK activity of the enzyme incubated without CP12. Residual activity was determined as the ratio of the difference between PRK activity of the PRK-mutated CP12 mixture and of PRK alone. (**b**) Crystallographic structure of oxidized and inactive PRK in complex with CP12 in the ternary complex of *A. thaliana* GAPDH-CP12-PRK (pdb: 6 KEZ) [29]. (**c**) Structural model of A34–H47 helix from the *C. reinhardtii* CP12 (DOI: 10.5452/ma-cr3 y1) [32] docked onto the crystallographic structure of reduced and active *C. reinhardtii* PRK (pdb: 6 H7 G; [30]), based on the *A. thaliana* ternary complex (pdb:6 KEZ) as template. Blue: positively charged surface. Red: negatively charged surface.

From the above-mentioned crystallographic structures, these residues are located at the CP12-PRK interface in the ternary complex (Figure 5b). Some conservative mutations such as W35F did not prevent protection, consistent with the large aromatic nature of both W and F side chains. Mutation of the negatively charged D36, E39 and E40 residues into neutral A residues or positively charged K residues resulted in irreversible PRK damage (Figure 5a).

3. Discussion

The scope of functions of the CP12 proteins is constantly increasing, supporting their definition as moonlighting proteins. The dark down-regulation of GAPDH and PRK activities by CP12 was confirmed by CP12 disruption mutants in *S. elongatus* PCC7942 grown under dark/light conditions, and by the presence of the supramolecular GAPDH-CP12-PRK complex in dark-treated *S. elongatus* PCC7942 cells but not in light-exposed cells [14]. However, the affinity of CP12 for GAPDH and PRK differs between species, and the GAPDH-CP12-PRK complex stability in dark-treated leaves is weak in *N. tabacum* and *A. thaliana* [33]. In *N. tabacum* and in the tropical legume *S. guianensis,* decreasing the amount of CP12 was associated with a moderate reduction in maximum activity for PRK and GAPDH compared to WT leaves [20,22]. Reversely, a higher level of CP12 in *S. guianensis* was associated with higher maximum activities of GAPDH and PRK [23]. In *A. thaliana*, decreasing the CP12 level only reduced the maximum activity of PRK, while the level of GAPDH activity remained stable [22]. These results puzzle the mechanism by which CP12 regulates GAPDH and PRK.

These and other in vivo studies have also suggested other functions for CP12. A role in the protection against ROS damage caused by high light has been proposed in *S. elongatus* PCC7942 [34]; roles in carbon partitioning, malate valve capacity and redox homeostasis and carbon/nitrogen homeostasis have been proposed in *N. tabacum* [20]; a role in the photosynthesis efficiency has been proposed in *N. tabacum*, *A. thaliana* and

S. guianensis [21–23]; this list is not exhaustive. The numerous in vitro studies also indicated that CP12 could be considered as a moonlighting protein (Introduction) [13].

In higher plants, CP12 proteins are encoded by small multigene families; it is a challenge to decipher the importance of each individual *CP12* gene in vivo [22]. As cyanobacteria, the green alga *C. reinhardtii* possesses a unique isoform of CP12 that eases the investigation of CP12 function in vivo. The growth of *S. elongatus* PCC7942 CP12 deletion mutants (ΔCP12-Sc) under continuous low light (40 µmol photon·m^2·s^{-1}) is not affected by CP12 deletion, but under continuous high light (100 µmol photon·m^2·s^{-1}) or under dark/light cycles, CP12-deleted mutants showed altered growth [14,34]. The cyanobacterial CP12 does not possess the N-terminal disulfide bridge of the canonical CP12; therefore, *C. reinhardtii* having a unique form of CP12 with N-terminal and C-terminal bridges is a better model to study the multiple functions of CP12 [9]. Contrary to what was observed in cyanobacteria, deletion of CP12 in *C. reinhardtii* did not impair growth under continuous high light (120 µmol photons·m^2·s^{-1}). Our quantitative proteomic analysis of ΔCP12-Cr cells indicated, however, that the amount of a large number of proteins involved in ROS protection was higher compared to WT-Cr cells; these proteins are localized in other organelles than the chloroplast. This proteomics analysis is in agreement with the results from Tamoi et al. [34], suggesting that, under 100 µmol photons·m^2·s^{-1}, the mutant cell lines were more susceptible to oxidative damage.

Under phototrophic conditions, in ΔCP12-Cr, we observed a higher amount of enzymes of the glyoxylate pathway that is involved in acetate assimilation and that occurs in the glyoxysome (Figure 6) [26]. Pre-cultures were performed under mixotrophic conditions, where the presence of this pathway is relevant. We had, therefore, quantified acetate in the pre-culture medium after five days by nuclear magnetic resonance (Supplementary Figure S4); only traces of acetate remained present in the phototrophic culture. We would, thus, anticipate that the glyoxylate pathway should be absent in *C. reinhardtii* WT cells when shifting their culture from mixotrophic to phototrophic conditions. From the presence of the glyoxylate pathway enzymes in ΔCP12-Cr cells, we, therefore, hypothesized that these cells are unable to turn off this cycle in the absence of CP12. Metabolites of this pathway are also involved in the Krebs cycle that occurs in the mitochondrion; enzymes of this pathway are also present in higher amount in ΔCP12-Cr compared to WT-Cr cells. The Krebs cycle metabolites such as malate and fumarate were shown to be significantly higher in *N. tabacum* antisense CP12-disrupted leaves (ΔCP12-Nt), whereas isocitrate and 2-oxoglutarate were significantly lower [20]. These metabolites (except 2-oxoglutarate) are shared by both the Krebs and glyoxylate pathways, and could feed both cycles [35].

Interestingly, in ΔCP12-Nt, the activity of the NADP-malate dehydrogenase (NADP-MDH) was lower than in wild-type plants; however, the protein amount was unchanged [20]. This enzyme is involved in the regulation of the NAD(P)H/NAD(P) ratio; NAD(P)H is known to be an important regulatory metabolite. In particular, the CBB cycle requires a finely tuned energetic balance between NADPH and ATP. CP12 is a conductor of this cycle by regulating the unique reduction step of the CBB, i.e., the NADPH-dependent GAPDH activity, together with one of the two ATP-dependent phosphorylation reactions [1]. In this work, we showed that GAPDH activity displayed a lag in untreated WT-Cr cell extracts, consistent with the presence of an inactive GAPDH-CP12-PRK complex that dissociates into active forms in the reaction mixture, as previously described [7]. In the reduced WT-Cr cell extracts, this lag disappeared, consistent with the dissociation of the complex prior to assay. In the absence of CP12 (ΔCP12-Cr cell extracts), this lag was absent; this is in good agreement with the absence of the ternary complex and the absence of autonomous GAPDH regulation. In the green algae, the unique homotetrameric isoform of GAPDH (A4) in contrast to the heterotetrameric isoform of higher plants (A2B2) does not possess the regulatory cysteine residues; its regulation is strictly dependent upon the formation of the GAPDH-CP12-PRK complex [36].

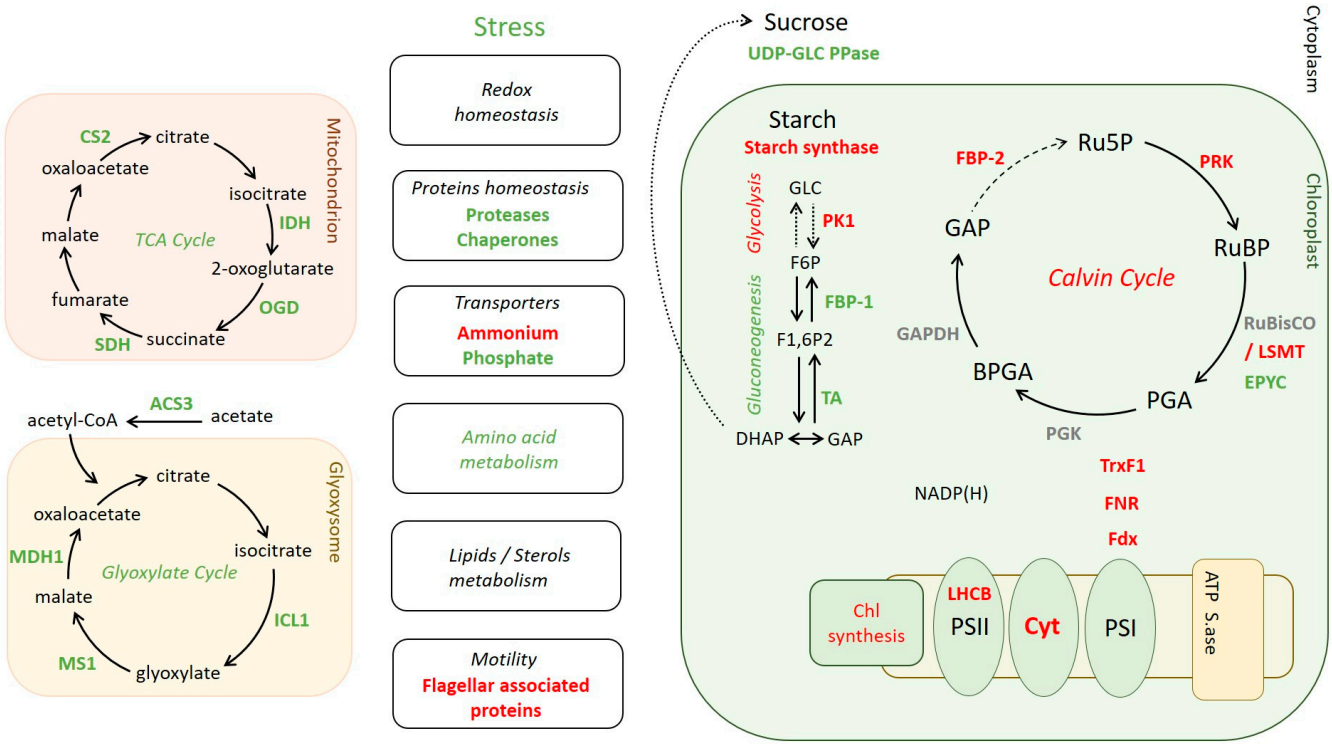


Figure 6. Effect of CP12 deletion on *C. reinhardtii* protein amounts. Green: higher amount in ΔCP12-Cr compared to WT-Cr. Red: lower amount in ΔCP12-Cr compared to WT-Cr. Gray: no change. LHCB, Light-harvesting chlorophyll a/b-binding; Cyt, Cytochrome b6 f; PS, photosystem; ATP S.ase, ATP synthase; Fdx, ferredoxin; FNR, Ferredoxin NADP $^{+}$ reductase; TrxF1, thioredoxin F1; PGK, Phosphoglycerate kinase; BPGA, 1,3-bisphosphoglycerate; GAP, Glyceraldehyde−3-phosphate; GAPDH, Glyceraldehyde−3-phosphate dehydrogenase; PGA, 3-phosphoglycerate; FBP, Fructose−1,6-bisphosphatase; Ru5 P, Ribulose 5-phosphate; PRK, phosphoribulokinase; RuBP, Ribulose−1,5- bisphosphate; RuBisCO LSMT, RuBisCO large subunit methyltransferase; EPYC, essential pyrenoid component; UDP-GLC PPase, UDP-glucose pyrophosphorylase; PK1, Pyruvate kinase 1; TA, transaldolase; F6 P, fructose−6-phosphate; F1,6 P2, Fructose−1,6-bisphosphate; DHAP, Dihydroxyacetone phosphate; IDH, Isocitrate dehydrogenase; OGD, 2-oxoglutarate dehydrogenase; SDH, Succinate dehydrogenase; CS2, citrate synthase 2; ACS3, Acetyl-CoA synthetase 3; ICL1, Isocitrate Lyase 1; MS1, Malate synthase 1; MDH1, Malate dehydrogenase 1.

Similarly, PRK activity displayed a lag in untreated WT-Cr cell extracts. The regulation of PRK is more complex, PRK possesses regulatory cysteine residues C16 and C55 that are targets of thioredoxin F1 [37]; PRK is, thus, redox autonomously regulated. It is also inhibited in the ternary complex. The association of CP12 with PRK was shown to ease its reducing activation; we have confirmed that, in the presence of CP12, PRK activation within the supramolecular complex is faster than in the absence of CP12 [38]. Indeed, in our activity assays, in the absence of CP12, this lag phase lasted longer than in the WT-Cr cell extracts. The regulation of GAPDH and PRK in *C. reinhardtii* WT-Cr and ΔCP12-Cr cell extracts is, thus, consistent with the literature.

The maximum activity of GAPDH was identical in both WT-Cr and ΔCP12-Cr cells, as it was observed in *A. thaliana* CP12-disrupted mutant; this suggests that, even in the absence of its specific chaperone, GAPDH was stable [15]. On the contrary, we observed that both the PRK maximum activity and protein amount were decreased. The growth of ΔCP12-Cr cells was not affected, however, which is consistent with the fact that reduction in photosynthesis in *N. tabacum* PRK antisense plants is only evident in plants with $\leq$ 20% of wild-type PRK levels [39,40]. Lopez-Calcagno et al. have shown that the low PRK amount was not correlated to a decrease of mRNA; this indicated that the regulation is at the translational or

post-translational level. Here, we showed in vitro that PRK activity is irreversibly damaged in the absence of CP12; therefore, CP12 can protect PRK from inactivation. Moreover, our quantitative proteomic results suggest that PRK is also protected by CP12 from degradation under continuous light in WT-Cr, whereas absence of CP12 results in much lower (6-fold) levels of PRK. The mechanism by which PRK is degraded has not been explored yet, but one can speculate that the interaction between PRK and CP12, which exists in the cell, prevents PRK from proteolytic degradation. The absolute concentration of CP12 remains to be determined, but is sufficient for the formation of the ternary complex that we observed in our activity assays. Under continuous light, the reducing power of photosynthesis results in reducing condition for both PRK and CP12. In vitro, we confirmed that the protection of PRK is not dependent on the redox state of CP12 since it was also observed with the CP12 C23A mutant. Increasing evidence suggests that the CP12-PRK interaction is not dependent on the formation of the N-terminal disulfide bridge (Figure 5b,c). Indeed, in the CP12 proteins from the cyanobacterium *S. elongatus PCC7942* and the red alga *Galderia sulphuraria*, the N-terminal cysteine residues are missing [9], but the ternary complex exists [14,41]. In the available crystallographic structures of the *A. thaliana* GAPDH-CP12-PRK complex [29], the CP12 N-terminal cysteine residues pair does not participate in the CP12-PRK interaction (Figure 5b), suggesting that the CP12 N-terminal disulfide is not involved in the PRK protection against irreversible damage. All these arguments rather suggest that CP12-PRK interaction is mostly dependent on the structuration of the A34–H47 region into an α-helix. The crystallographic structure of light-active PRK indicated that the groove of the active site is large enough to accommodate the A34-H47 helix, with a positively charged surface (in blue) facing the negatively charged surface (in red) of the helix (Figure 5c). Besides, we have shown that, in the reduced state, a small proportion of pre-formed helix exists in the disordered CP12, though in very low proportion (below 20%) [10]. We hypothesized that the presence of a small amount of pre-formed helical motifs in reduced CP12 drives the formation of a low affinity complex with PRK [42]. Intrinsically disordered proteins such as CP12 have been shown to form physiologically relevant low affinity complex [43]. PRK shielding against irreversible damage by CP12 could be related to a low affinity complex between these two proteins. This new function for light-reduced CP12 is probably not exclusive [34].

The relative quantitative proteomic analysis showed that the abundance of proteins related to the photochemical phase of photosynthesis was significantly decreased in the absence of CP12, in particular, those of the light harvesting complex. Previous data on *N. tabacum*, *A. thaliana* and *S. guianensis* with deleted CP12 showed that they have a reduced photosynthetic efficiency [21–23]. Downstream of the photochemical phase of photosynthesis, the electron flux also seemed reduced because the cytochrome b6 f, the ferredoxin and the $NADP^+$ ferredoxin reductase were also in a lower amount in the ΔCP12-Cr line. The CBB cycle is dependent on reduced NADPH produced from the photochemical phase; two key enzymes that catalyze irreversible reactions of the CBB decreased: the PRK and the FBP−2. The redox regulation of CBB enzymes is mediated by thioredoxin F1 among others [44]; it also decreased in ΔCP12-Cr cells.

One of the proteins that was the most increased in ΔCP12-Cr is the intrinsically disordered EPYC1 protein, which clusters RuBisCO in the pyrenoid at low CO_2 concentrations [45,46]. This is a key actor for the constitution of the pyrenoid as a separate liquid phase or membrane-less organelle—however, in our conditions at 2% CO_2 concentration, we do not expect the presence of a pyrenoid. Indeed, photorespiration enzymes were not differentially expressed (except the glycerate kinase) [47], confirming that ΔCP12-Cr cells were not CO_2 limited. Interestingly, RuBisCO LSMT was present at a lower amount in ΔCP12-Cr compared to WT-Cr. RuBisCO LSMT methylates the Lys at position 14 on the large subunit of RuBisCO [48]. A down-regulation of the CBB aldolase has been reported upon methylation [49]. Though the impact of this methylation on RuBisCO activity remains unknown to the best of our knowledge, the lower amount of the RuBisCO LSMT could be related to a modification of RuBisCO regulation. In the context of a lower amount of PRK,

a reduction in the RuBisCO substrate, RuBP, is also anticipated. Analogous to a deficiency of CO_2, deficiency of RuBP may be compensated by an adapted regulation of methylated RuBisCO that could be sequestrated by EPYC1 [50].

In *C. reinhardtii*, products of the CBB can feed: (i) the gluconeogenesis pathway to produce starch, (ii) the glycolysis pathway that promotes fatty acid synthesis [35] or (iii) the oxidative pentose phosphate pathway that is inhibited in the light (reducing conditions) in the chloroplast to avoid futile cycle [3]. In the absence of CP12, two enzymes of the gluconeogenesis pathway were slightly more abundant than in the presence of CP12; the starch synthase was less abundant. One enzyme of the glycolysis pathway was less abundant, suggesting that CP12 is involved in the gluconeogenesis/glycolysis balance. Our results confirm that the algal CP12 is a key regulator of the carbon partitioning, as shown in higher plants [20]. Level of glucose−6-phosphate and its metabolization by carbohydrate pathways are important regulators for nitrogen uptake in *A. thaliana* plants [51], together with the redox homeostasis [52]. In *C. reinhardtii*, a decrease of the nitrogen metabolism is also observed upon deletion of CP12; this could be an indirect consequence of the induced modification of the carbon metabolic partitioning, redox homeostasis and increase of ROS-protective enzymes.

4. Materials and Methods

4.1. Algal Strains and Culture Conditions

C. reinhardtii CC4349 (purchased from Chlamydomonas Resource Center, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA) was maintained in Tris-Acetic acid-Phosphate (TAP) medium supplemented with agar (15 $g \cdot L^{-1}$) and Hygromycin (30 $\mu g \cdot mL^{-1}$) for the transformant lines. These cells are cell-wall-less and widely used in *C. reinhardtii* fields. It is on this strain that the CRISPR-Cas9 method has been developed [53,54].

To generate knock-out ΔCP12-Cr mutants, CRISPR-Cas9 RNP based genome editing method was used as described previously with a few modifications. To increase the efficiency and easy selection of knockouts, the gene disruption by insertion of exogenous DNA (knock-in) was combined. Therefore, the *aph7* gene expression cassette was co–transformed with the CRISPR/Cas9-RNP complex. The sgRNA sequence for the mutant implementation using CRISPR-Cas9 was designed by Cas-Designer (http://www.rgenome.net/cas-designer/, accessed on 1 October 2019). In the *CP12* gene (Cre08.g380250), the sgRNA target was selected as 5′-CCA TGC AGC CCG CTG CGA GCC GGC AA−3′. The sgRNA was synthesized using GeneArt™ Precision gRNA Synthesis Kit (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA). DNA fragment for knock-in, *aph7* gene (aminoglycoside phosphotransferase7, resistance against hygromycin B) was amplified by PCR (1.6 kb) and was purified by agarose gel extraction. The 400×10^4 cells were incubated with the RNP complex and 1 μg of *aph7* for 5 min and transformed with a Gene Pulser Xcell Electroporation System (Bio-Rad, CA, USA). After transformation, the antibiotic resistance colonies were obtained. These pre-selected colonies were further subjected to PCR with specific primers adjacent to sgRNA target sites in *cp12* (F: 5′-GCT GAC CGT CTT CAG CGG CCT A−3′, R: 5′-TTG TGC AAG CGA AGG GAG CGG T−3′) for confirming the targeted mutation of the *cp12* gene. ΔCP12-Cr lines were finally obtained.

4.2. Growth Measurements

WT-Cr and ΔCP12-Cr cells were grown in 20 mL TAP medium (supplemented with 30 $\mu g \cdot mL^{-1}$ hygromycin for ΔCP12-Cr) under 50 μmol photons$\cdot m^2 \cdot s^{-1}$ 8.5 h dark/15.5 h light at 23°C and 110 rpm agitation. A few mL was added in a hermetically closed bottle of 500 mL with 200 mL MOPS culture medium to reach an OD at 680 nm of 0.05. The MOPS culture medium was: 20 mM MOPS, 1 mM KPi, Beijering Salts (7.5 mM NH_4 Cl, 0.4 mM $MgSO_4$ and 0.34 mM $CaCl_2$) and Hutner's trace elements [55] at pH 7.4. Cultures were grown under continuous light, 120 μmol photons$\cdot m^2 \cdot s^{-1}$, 110 rpm at 25 °C; 2% CO_2 were bubbled during growth via El-Flow Bronkhurst manometres.

Concerning growth monitoring under dark/light conditions, a few mL were added from continuous light culture to reach an OD at 680 nm of 0.1. WT-Cr and ΔCP12-Cr were grown phototrophically under 50 µmol of photons·m^2·s^{-1}, 8.5 h dark / 15.5 h light, at 23 °C, 110 rpm and 2% CO_2.

The culture density was monitored by absorbance at 680 nm; the number of cells was counted using a Neubauer cell on a microscope Motic BA310 E.

The growth curves were fitted to the following equation [24]:

$$Number\ of\ cells = \frac{A}{1 + exp^{\frac{4\mu}{A} \times (\lambda - t) + 2}} \quad (1)$$

where A is analogous to the asymptote, μ is analogous to the maximum growth rate; λ is analogous to the lag phase time.

4.3. Sample Preparation for Relative Quantitative Proteomic Experiments

A total of 10^9 cells in the stationary phase of the growth were collected in biological triplicates, for the two conditions—the one where CP12 was not expressed (ΔCP12-Cr cells) versus the control where it was (WT-Cr cells) —then pelleted and kept in ice. Following the manufacturer Protifi's protocol for digestion on S-Trap™ Micro Spin columns (Protifi, NY, USA), we extracted the proteins, reduced them by DTT, alkylated them by iodoacetamide and digested them by trypsin/Lys C protease, including 0.025% ProteaseMax Surfactant Trypsin Enhancer (v/v), as previously described [56].

Tryptic peptide aliquots of 1 µg were used for LC-MSMS analysis on an ESI-Q-Exactive Plus mass spectrometer (Thermo Scientific, San Diego, CA, USA) coupled to a nano liquid chromatography Ultimate 3000 (Thermo Scientific). Separation by LC was performed on an analytical C18 reversed phase EASY-Spray column (PepMaP™ RSLC, C18, 2 µm, 100 Å, 75 µm ID × 50 cm, Thermo Fisher Scientific), using a three step-linear gradient from 2% to 30% of mobile phase B (0.1% v/v formic acid (FA)/ 80% v/v acetonitrile) in mobile phase A (0.1% v/v FA) for 90 min, a second step from 30% to 50% of B in A for 17 min, and a third step from 50% to 80% in 8 min, followed by a chase step at 95% of B and an equilibration of the column at 2% of B. Mass spectral data were acquired using a top 10 data-dependent acquisition mode with a dynamic exclusion of 30 s, in a 350–1900 m/z range for the full MS (resolution 70,000 at m/z 200), and MS/MS acquisition at resolution 17,500 at m/z 200. For peptide ionization in the nanosource EASY-Spray, voltage was set at 1.9 kV and the capillary temperature at 250 °C.

4.4. Relative Quantitative Proteomic Data Analysis

The data were analyzed by the MaxQuant computational proteomics platform (version 1.6.5.0) used for protein identification and quantification [57] and the Perseus statistical platform (version 1.6.5.0) [58], as previously described in [56]. The database of *C. reinhardtii* v5.6 extracted from Phytozome v13 (19526 entries) was used for the search, supplemented with a set of 245 frequently observed contaminants. The following criteria were used for peptide search: (i) trypsin cleavage authorized before proline with two missed cleavages allowed; (ii) monoisotopic precursor tolerance of 20 ppm in the first search used for recalibration, followed by 4.5 ppm for the main search and 0.5 Da for fragment ions from MS/MS; (iii) cysteine carbamidomethylation (+57.025) as a fixed modification and methionine oxidation (+15.999), serine, threonine and tyrosine phosphorylation (+79.996) and N-terminal acetylation (+42.011) as variable modifications; (iv) a maximum of five modifications per peptide allowed and (v) minimum peptide length was 7 amino acids and a maximum mass of 4600 Da. Spectral alignment was performed; the "Match between runs" option allowed for the transfer of identifications between LC-MS/MS, based on the m/z and the retention time by using the default settings. The false-discovery rate (FDR) on the identification at the peptide and protein levels was set to 1% and determined by searching a reverse database. For protein quantification, unique and razor peptides

were used, and considered irrespectively of their modification state mentioned above. The statistical analysis was carried out with the Perseus program. The LFQ normalized intensities were transformed by a base logarithm of 2 to obtain a normal distribution. A minimum of one peptide without any modification was considered to identify and quantify a protein. Quantifiable proteins (valid values) were defined as those detected in 66% of the total group (WT and ΔCP12): 2524 proteins were kept for the statistical test without replacing missing values. To determine whether a given detected protein was present in significantly different amounts, a two-sample *t*-test was applied using a permutation-based FDR-controlled at 0.01 or at 0.05 (250 permutations). The results were illustrated in a Volcano plot, where p values (the probability that the difference in abundance is null) are plotted against the difference in protein amount. The p value was adjusted using a scaling factor s0 to a value of 0.1.

4.5. Activity Measurements

Cells (10^9) of *C. reinhardtii* WT or ΔCP12 strains were centrifuged for 10 min at 2000 g and resuspended in 20 mL of lysis buffer (20 mM Tris pH 7.9, 4 mM EDTA, 5 mM cysteine, 0.1 mM NAD in the presence of protease inhibitors (0.5 µg mL^{-1} cocktail, Sigma Inc., Saint Louis, MO, USA)). Cell lysis was performed by sonication (Sonic Ruptor 250, on ice, 4 cycles, 1 min sonication and 1 min rest) and the membrane fraction was removed by 10 min centrifugation at 10,000 g. Only the soluble fraction (hereafter mentioned as cell extract) was used for activity assay.

GAPDH activity was monitored with 0.2 mM NADPH plus 1 mM of 1, 3-bisphosphoglycerate (BPGA) that was synthesized according to [59]. PRK activity was measured as previously described [60]. Both activities were followed with NAD(P)H disappearance at 340 nm, using a Lambda 25 UV Vis spectrophotometer (Perkin Elmer, PTP−6 Peltier System). All activities were measured in the presence of 5 mM dithiothreitol (DTT) in the assay cuvette. Activity was measured in three biological replicates, both for the WT-Cr and for the ΔCP12-Cr strains. All reagents for enzyme activity measurements were from Sigma Inc. Crude extracts were also incubated on ice for 20 min with 20 mM DTT, before PRK and GAPDH activity were measured. Aliquots from the mixtures were withdrawn after 20 min, and the activities of PRK and GAPDH were measured. For untreated GAPDH, reduced and untreated PRK, one technical replicate was analyzed for each biological replicate, while two technical replicates were analyzed for each biological replicate for reduced GAPDH.

4.6. Progress Curve Analysis

Curve fittings were performed with Sigma Plot software (v. 14.0, Systat Software GmbH, Erkrath, Germany) using the following equation based on the one given by Neet and similar to the one used by Lebreton et al. [61,62]:

$$P = p(1) \times t\left[\frac{p(1) - p(2)}{k}\left(1 - e^{-kt}\right)\right] \quad (2)$$

where P is the product appearance, $p(1)$ and $p(2)$ stand for the stationary-state and the pre-steady-state apparent rate constant, respectively, and t is the reaction time. The parameter k represents the interconversion of a less active form present during the lag phase into a more active form present in the steady-state [61,62]. When the curves were linear, fitting was performed using the equation of a straight line.

4.7. Assay of PRK Protection against Irreversible Inhibition by CP12

Recombinant PRK (0.09 nmol (dimer)) was incubated in the presence of wild-type CP12 (0.18 nmol) in a reconstitution buffer (30 mM Tris-HCl, pH 7.9, 4 mM EDTA, 0.1 mM NAD and 5 mM cysteine) in a 30 mL final volume for three days at 4 °C. PRK activity was measured, at different days, as previously described, but using 5 U of spinach phosphoribose isomerase (Sigma) [60] in the mixture and compared with the PRK alone

(control). All activities were measured without addition of dithiothreitol (DTT) in the assay cuvette. Recombinant PRK was obtained as described previously [36].

5. Conclusions

Deletion of CP12 in *C. reinhardtii* has direct and/or indirect consequences on key cellular processes such as photosynthesis, redox homeostasis, carbon allocation, mineral nutriments import and proteostasis, as indicated by quantitative proteomics. Above all, our results showed that CP12 is a master of the CBB cycle; beyond this role, it is also able to protect PRK from irreversible inactivation. These findings highlighted CP12 as moonlighting functions of CP12 which are still under investigations. Nevertheless, deletion of CP12 does not impair optimal growth in our present culture conditions, which suggests a re-routing of the microalgae metabolism. The decrease in PRK amount and its lower activity are, thus, possibly compensated by specific cellular adaptations. To conclude, despite its small size, CP12 plays diverse and important roles in algal metabolism.

Supplementary Materials: The following are available online at https://www.mdpi.com/article/10.3390/ijms23052710/s1.

Author Contributions: Conceptualization, B.G., H.L., F.C., E.J. and L.A.; methodology, B.G., H.L., L.A., K.S.C., C.G., R.L. and E.J.; validation, B.G., H.L., F.C., C.G. and R.L.; formal analysis, C.G., R.L., B.G. and H.L.; investigation, E.L., C.G., L.A., K.S.C., R.L., H.L.; resources, R.L., E.J., K.S.C., E.L., C.G.; data curation, B.G., H.L., C.G., R.L., L.A. and F.C.; writing—original draft preparation, B.G., H.L. and C.G.; writing—review and editing, F.C., L.A., R.L., E.J., B.G., H.L. and C.G.; supervision, E.J., H.L., B.G. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: C.G.'s studentship (ED62) is supported by the Ministère de la Recherche, de l'Enseignement supérieur et de l'Innovation. E.L. studentship was supported by IM2 B—AMIDEX fellowship AAP-IM2 B-NE−2020–02-Launay. BG, HL, FC: this research was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Aix-Marseille Université. HL: HL acknowledges the FEBS for the research grant Launay Excellence Award, 2021. ES. J.: This research was funded by the Basic Science Research Program (NRF−2020 R1 A2 C2011998) and the "Carbon to X Project" (2020 M3 H7 A1098294) of the National Research Foundation (NRF) of Korea. Marseille Protéomique (MaP) is a proteomic platform IBiSA- and Aix-Marseille Université labelled.

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: The mass spectrometry proteomics data have been deposited to the ProteomeXchange Consortium via the PRIDE [63] partner repository (http://www.ebi.ac.uk/pride) with the dataset identifier PXD031803, accepted on the 19 February 2022.

Acknowledgments: We acknowledge Stephen Maberly and Pascal Mansuelle for fruitful discussions.

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Gurrieri, L.; Fermani, S.; Zaffagnini, M.; Sparla, F.; Trost, P. Calvin–Benson Cycle Regulation Is Getting Complex. *Trends Plant Sci.* **2021**, *26*, 898–912. [CrossRef] [PubMed]
2. Cejudo, F.J.; Ojeda, V.; Delgado-Requerey, V.; González, M.; Pérez-Ruiz, J.M. Chloroplast Redox Regulatory Mechanisms in Plant Adaptation to Light and Darkness. *Front. Plant Sci.* **2019**, *10*, 380. [CrossRef] [PubMed]
3. Yoshida, K.; Hisabori, T. Biochemical Basis for Redox Regulation of Chloroplast-Localized Phosphofructokinase from *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol.* **2021**, *62*, 401–410. [CrossRef]
4. Fridlyand, L.E.; Scheibe, R. Regulation of the Calvin Cycle for CO2 Fixation as an Example for General Control Mechanisms in Metabolic Cycles. *Biosystems* **1999**, *51*, 79–93. [CrossRef]
5. Gontero, B.; Salvucci, M.E. Regulation of Photosynthetic Carbon Metabolism in Aquatic and Terrestrial Organisms by RuBisCO Activase, Redox-Modulation and CP12. *Aquat. Bot.* **2014**, *118*, 14–23. [CrossRef]
6. Graciet, E.; Lebreton, S.; Gontero, B. Emergence of New Regulatory Mechanisms in the Benson-Calvin Pathway via Protein-Protein Interactions: A Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase/CP12/Phosphoribulokinase Complex. *J. Exp. Bot.* **2004**, *55*, 1245–1254. [CrossRef] [PubMed]

7. Lebreton, S.; Graciet, E.; Gontero, B. Modulation, via Protein-Protein Interactions, of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Activity through Redox Phosphoribulokinase Regulation. *J. Biol. Chem.* **2003**, *278*, 12078–12084. [CrossRef]
8. Wedel, N.; Soll, J. Evolutionary Conserved Light Regulation of Calvin Cycle Activity by NADPH-Mediated Reversible Phosphoribulokinase/CP12/ Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Complex Dissociation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9699–9704. [CrossRef]
9. Groben, R.; Kaloudas, D.; Raines, C.A.; Offmann, B.; Maberly, S.C.; Gontero, B. Comparative Sequence Analysis of CP12, a Small Protein Involved in the Formation of a Calvin Cycle Complex in Photosynthetic Organisms. *Photosynth. Res.* **2010**, *103*, 183–194. [CrossRef]
10. Launay, H.; Barré, P.; Puppo, C.; Manneville, S.; Gontero, B.; Receveur-Bréchot, V. Absence of Residual Structure in the Intrinsically Disordered Regulatory Protein CP12 in Its Reduced State. *BBRC* **2016**, *477*, 20–26. [CrossRef]
11. Launay, H.; Barré, P.; Puppo, C.; Zhang, Y.; Maneville, S.; Gontero, B.; Receveur-Bréchot, V. Cryptic Disorder out of Disorder: Encounter between Conditionally Disordered CP12 and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 1218–1234. [CrossRef] [PubMed]
12. Reichmann, D.; Jakob, U. The Roles of Conditional Disorder in Redox Proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, *23*, 436–442. [CrossRef] [PubMed]
13. Gontero, B.; Maberly, S.C. An Intrinsically Disordered Protein, CP12: Jack of All Trades and Master of the Calvin Cycle. *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40*, 995–999. [CrossRef]
14. Tamoi, M.; Miyazaki, T.; Fukamizo, T.; Shigeoka, S. The Calvin Cycle in Cyanobacteria Is Regulated by CP12 via the NAD(H)/NADP(H) Ratio under Light/Dark Conditions. *Plant J.* **2005**, *42*, 504–513. [CrossRef]
15. Erales, J.; Lignon, S.; Gontero, B. CP12 from *Chlamydomonas reinhardtii*, a Permanent Specific "Chaperone-like" Protein of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 12735–12744. [CrossRef]
16. Delobel, A.; Graciet, E.; Andreescu, S.; Gontero, B.; Halgand, F.; Laprévote, O. Mass Spectrometric Analysis of the Interactions between CP12, a Chloroplast Protein, and Metal Ions: A Possible Regulatory Role within a PRK/GAPDH/CP12 Complex. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 3379–3388. [CrossRef]
17. Erales, J.; Gontero, B.; Whitelegge, J.; Halgand, F. Mapping of a Copper-Binding Site on the Small CP12 Chloroplastic Protein of *Chlamydomonas reinhardtii* Using Top-down Mass Spectrometry and Site-Directed Mutagenesis. *Biochem. J.* **2009**, *419*, 75–82. [CrossRef] [PubMed]
18. Rocha, A.G.; Vothknecht, U.C. Identification of CP12 as a Novel Calcium-Binding Protein in Chloroplasts. *Plants* **2013**, *2*, 530–540. [CrossRef] [PubMed]
19. Erales, J.; Avilan, L.; Lebreton, S.; Gontero, B. Exploring CP12 Binding Proteins Revealed Aldolase as a New Partner for the Phosphoribulokinase/Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase/CP12 Complex—Purification and Kinetic Characterization of This Enzyme from *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS J.* **2008**, *275*, 1248–1259. [CrossRef]
20. Howard, T.P.; Fryer, M.J.; Singh, P.; Metodiev, M.; Lytovchenko, A.; Obata, T.; Fernie, A.R.; Kruger, N.J.; Quick, W.P.; Lloyd, J.C.; et al. Antisense Suppression of the Small Chloroplast Protein CP12 in Tobacco Alters Carbon Partitioning and Severely Restricts Growth. *Plant Physiol.* **2011**, *157*, 620–631. [CrossRef]
21. Howard, T.P.; Upton, G.J.G.; Lloyd, J.C.; Raines, C.A. Antisense Suppression of the Small Chloroplast Protein CP12 in Tobacco: A Transcriptional Viewpoint. *Plant Signal Behav.* **2011**, *6*, 2026–2030. [CrossRef] [PubMed]
22. López-Calcagno, P.E.; Abuzaid, O.; Lawson, T.; Raines, C.A. Arabidopsis CP12 Mutants Have Reduced Levels of Phosphoribulokinase and Impaired Function of the Calvin–Benson Cycle. *J. Exp. Bot.* **2017**, *68*, 2285–2298. [CrossRef]
23. Li, K.; Qiu, H.; Zhou, M.; Lin, Y.; Guo, Z.; Lu, S. Chloroplast Protein 12 Expression Alters Growth and Chilling Tolerance in Tropical Forage *Stylosanthes guianensis* (Aublet) Sw. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1319. [CrossRef]
24. Zwietering, M.H.; Jongenburger, I.; Rombouts, F.M.; van 't Riet, K. Modeling of the Bacterial Growth Curve. *Appl. Environ. Microbiol.* **1990**, *56*, 1875–1881. [CrossRef]
25. Plancke, C.; Vigeolas, H.; Höhner, R.; Roberty, S.; Emonds-Alt, B.; Larosa, V.; Willamme, R.; Duby, F.; Onga Dhali, D.; Thonart, P.; et al. Lack of Isocitrate Lyase in Chlamydomonas Leads to Changes in Carbon Metabolism and in the Response to Oxidative Stress under Mixotrophic Growth. *Plant J.* **2014**, *77*, 404–417. [CrossRef] [PubMed]
26. Lauersen, K.J.; Willamme, R.; Coosemans, N.; Joris, M.; Kruse, O.; Remacle, C. Peroxisomal Microbodies Are at the Crossroads of Acetate Assimilation in the Green Microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal. Res.* **2016**, *16*, 266–274. [CrossRef]
27. Marri, L.; Zaffagnini, M.; Collin, V.; Issakidis-Bourguet, E.; Lemaire, S.D.; Pupillo, P.; Sparla, F.; Miginiac-Maslow, M.; Trost, P. Prompt and Easy Activation by Specific Thioredoxins of Calvin Cycle Enzymes of *Arabidopsis thaliana* Associated in the GAPDH/CP12/PRK Supramolecular Complex. *Mol. Plant* **2009**, *2*, 259–269. [CrossRef]
28. Thieulin-Pardo, G.; Remy, T.; Lignon, S.; Lebrun, R.; Gontero, B. Phosphoribulokinase from *Chlamydomonas reinhardtii*: A Benson-Calvin Cycle Enzyme Enslaved to Its Cysteine Residues. *Mol. Biosyst.* **2015**, *11*, 1134–1145. [CrossRef]
29. Yu, A.; Xie, Y.; Pan, X.; Zhang, H.; Cao, P.; Su, X.; Chang, W.; Li, M. Photosynthetic Phosphoribulokinase Structures: Enzymatic Mechanisms and the Redox Regulation of the Calvin-Benson-Bassham Cycle. *Plant Cell* **2020**, *32*, 1556–1573. [CrossRef]
30. Gurrieri, L.; Del Giudice, A.; Demitri, N.; Falini, G.; Pavel, N.V.; Zaffagnini, M.; Polentarutti, M.; Crozet, P.; Marchand, C.H.; Henri, J.; et al. Arabidopsis and Chlamydomonas Phosphoribulokinase Crystal Structures Complete the Redox Structural Proteome of the Calvin-Benson Cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 8048–8053. [CrossRef]

31. Mcfarlane, C.; Shah, N.; Kabasakal, B.V.; Cotton, C.A.R.; Bubeck, D.; Murray, J.W. Structural Basis of Light-Induced Redox Regulation in the Calvin Cycle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 20984–20990. [CrossRef]
32. Gardebien, F.; Thangudu, R.R.; Gontero, B.; Offmann, B. Construction of a 3D Model of CP12, a Protein Linker. *J. Mol. Graph. Model.* **2006**, *25*, 186–195. [CrossRef]
33. Howard, T.P.; Lloyd, J.C.; Raines, C.A. Inter-Species Variation in the Oligomeric States of the Higher Plant Calvin Cycle Enzymes Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and Phosphoribulokinase. *J. Exp. Bot.* **2011**, *62*, 3799–3805. [CrossRef]
34. Tamoi, M.; Shigeoka, S. CP12 Is Involved in Protection against High Light Intensity by Suppressing the ROS Generation in *Synechococcus elongatus* PCC7942. *Plants* **2021**, *10*, 1275. [CrossRef] [PubMed]
35. Johnson, X.; Alric, J. Central Carbon Metabolism and Electron Transport in *Chlamydomonas reinhardtii*: Metabolic Constraints for Carbon Partitioning between Oil and Starch. *Eukaryot. Cell* **2013**, *12*, 776–793. [CrossRef] [PubMed]
36. Avilan, L.; Puppo, C.; Erales, J.; Woudstra, M.; Lebrun, R.; Gontero, B. CP12 Residues Involved in the Formation and Regulation of the Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase-CP12-Phosphoribulokinase Complex in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Biosyst.* **2012**, *8*, 2994–3002. [CrossRef] [PubMed]
37. Porter, M.A.; Stringer, C.D.; Hartman, F.C. Characterization of the Regulatory Thioredoxin Site of Phosphoribulokinase. *J. Biol. Chem.* **1988**, *263*, 123–129. [CrossRef]
38. Avilan, L.; Lebreton, S.; Gontero, B. Thioredoxin Activation of Phosphoribulokinase in a Bi-Enzyme Complex from *Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 9447–9451. [CrossRef] [PubMed]
39. Paul, M.J.; Knight, J.S.; Habash, D.; Parry, M.A.J.; Lawlor, D.W.; Barnes, S.A.; Loynes, A.; Gray, J.C. Reduction in Phosphoribulokinase Activity by Antisense RNA in Transgenic Tobacco: Effect on CO_2 Assimilation and Growth in Low Irradiance. *Plant J.* **1995**, *7*, 535–542. [CrossRef]
40. Habash, D.Z.; Parry, M.A.; Parmar, S.; Paul, M.J.; Driscoll, S.; Knight, J.; Gray, J.C.; Lawlor, D.W. The Regulation of Component Processes of Photosynthesis in Transgenic Tobacco with Decreased Phosphoribulokinase Activity. *Photosynth. Res.* **1996**, *49*, 159–167. [CrossRef] [PubMed]
41. Oesterhelt, C.; Klocke, S.; Holtgrefe, S.; Linke, V.; Weber, A.P.M.; Scheibe, R. Redox Regulation of Chloroplast Enzymes in Galdieria Sulphuraria in View of Eukaryotic Evolution. *Plant Cell Physiol.* **2007**, *48*, 1359–1373. [CrossRef] [PubMed]
42. Arai, M.; Sugase, K.; Dyson, H.J.; Wright, P.E. Conformational Propensities of Intrinsically Disordered Proteins Influence the Mechanism of Binding and Folding. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2015**, *112*, 9614–9619. [CrossRef] [PubMed]
43. Habchi, J.; Tompa, P.; Longhi, S.; Uversky, V.N. Introducing Protein Intrinsic Disorder. *Chem. Rev.* **2014**, *114*, 6561–6588. [CrossRef] [PubMed]
44. Buchanan, B.B. The Ferredoxin/Thioredoxin System: A Key Element in the Regulatory Function of Light in Photosynthesis. *Bioscience* **1984**, *34*, 378–383. [CrossRef] [PubMed]
45. Wunder, T.; Cheng, S.L.H.; Lai, S.-K.; Li, H.-Y.; Mueller-Cajar, O. The Phase Separation Underlying the Pyrenoid-Based Microalgal RuBisCO Supercharger. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 1–10. [CrossRef] [PubMed]
46. Mackinder, L.C.M.; Meyer, M.T.; Mettler-Altmann, T.; Chen, V.K.; Mitchell, M.C.; Caspari, O.; Freeman Rosenzweig, E.S.; Pallesen, L.; Reeves, G.; Itakura, A.; et al. A Repeat Protein Links RuBisCO to Form the Eukaryotic Carbon-Concentrating Organelle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 5958–5963. [CrossRef]
47. Santhanagopalan, I.; Wong, R.; Mathur, T.; Griffiths, H. Orchestral Manoeuvres in the Light: Crosstalk Needed for Regulation of the Chlamydomonas Carbon Concentration Mechanism. *J. Exp. Bot.* **2021**, *72*, 4604–4624. [CrossRef]
48. Trievel, R.C.; Flynn, E.M.; Houtz, R.L.; Hurley, J.H. Mechanism of Multiple Lysine Methylation by the SET Domain Enzyme RuBisCO LSMT. *Nat. Struct. Biol.* **2003**, *10*, 545–552. [CrossRef]
49. Mininno, M.; Brugière, S.; Pautre, V.; Gilgen, A.; Ma, S.; Ferro, M.; Tardif, M.; Alban, C.; Ravanel, S. Characterization of Chloroplastic Fructose 1,6-Bisphosphate Aldolases as Lysine-Methylated Proteins in Plants. *J. Biol. Chem.* **2012**, *287*, 21034–21044. [CrossRef]
50. Küken, A.; Sommer, F.; Yaneva-Roder, L.; Mackinder, L.C.; Höhne, M.; Geimer, S.; Jonikas, M.C.; Schroda, M.; Stitt, M.; Nikoloski, Z.; et al. Effects of Microcompartmentation on Flux Distribution and Metabolic Pools in *Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplasts. *eLife* **2018**, *7*, e37960. [CrossRef]
51. Lejay, L.; Wirth, J.; Pervent, M.; Cross, J.M.-F.; Tillard, P.; Gojon, A. Oxidative Pentose Phosphate Pathway-Dependent Sugar Sensing as a Mechanism for Regulation of Root Ion Transporters by Photosynthesis. *Plant Physiol.* **2008**, *146*, 2036–2053. [CrossRef] [PubMed]
52. Chaput, V.; Martin, A.; Lejay, L. Redox Metabolism: The Hidden Player in Carbon and Nitrogen Signaling? *J. Exp. Bot.* **2020**, *71*, 3816–3826. [CrossRef] [PubMed]
53. Chang, K.S.; Kim, J.; Park, H.; Hong, S.-J.; Lee, C.-G.; Jin, E. Enhanced Lipid Productivity in AGP Knockout Marine Microalga Tetraselmis Sp. Using a DNA-Free CRISPR-Cas9 RNP Method. *Bioresour. Technol.* **2020**, *303*, 122932. [CrossRef]
54. Song, I.; Kim, J.; Baek, K.; Choi, Y.; Shin, B.; Jin, E. The Generation of Metabolic Changes for the Production of High-Purity Zeaxanthin Mediated by CRISPR-Cas9 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Microb. Cell Fact* **2020**, *19*, 220. [CrossRef]
55. Gorman, D.S.; Levine, R.P. Cytochrome f and Plastocyanin: Their Sequence in the Photosynthetic Electron Transport Chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1965**, *54*, 1665–1669. [CrossRef] [PubMed]
56. Avilan, L.; Lebrun, R.; Puppo, C.; Citerne, S.; Cuiné, S.; Li-Beisson, Y.; Menand, B.; Field, B.; Gontero, B. ppGpp Influences Protein Protection, Growth and Photosynthesis in Phaeodactylum tricornutum. *New Phytologist.* **2021**, *230*, 1517–1532. [CrossRef]

57. Cox, J.; Neuhauser, N.; Michalski, A.; Scheltema, R.A.; Olsen, J.V.; Mann, M. Andromeda: A Peptide Search Engine Integrated into the MaxQuant Environment. *J. Proteome Res.* **2011**, *10*, 1794–1805. [CrossRef] [PubMed]
58. Tyanova, S.; Temu, T.; Sinitcyn, P.; Carlson, A.; Hein, M.Y.; Geiger, T.; Mann, M.; Cox, J. The Perseus Computational Platform for Comprehensive Analysis of (Prote)Omics Data. *Nat. Methods* **2016**, *13*, 731–740. [CrossRef]
59. Graciet, E.; Gans, P.; Wedel, N.; Lebreton, S.; Camadro, J.-M.; Gontero, B. The Small Protein CP12: A Protein Linker for Supramolecular Complex Assembly. *Biochemistry* **2003**, *42*, 8163–8170. [CrossRef]
60. Gontero, B.; Cárdenas, M.L.; Ricard, J. A Functional Five-Enzyme Complex of Chloroplasts Involved in the Calvin Cycle. *Eur. J. Biochem.* **1988**, *173*, 437–443. [CrossRef]
61. Neet, K.E.; Ainslie, G.R. Hysteretic Enzymes. *Methods Enzymol.* **1980**, *64*, 192–226. [CrossRef] [PubMed]
62. Lebreton, S.; Gontero, B.; Avilan, L.; Ricard, J. Information Transfer in Multienzyme Complexes–1. Thermodynamics of Conformational Constraints and Memory Effects in the Bienzyme Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase-Phosphoribulokinase Complex of *Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 286–295. [CrossRef] [PubMed]
63. Perez-Riverol, Y.; Csordas, A.; Bai, J.; Bernal-Llinares, M.; Hewapathirana, S.; Kundu, D.J.; Inuganti, A.; Griss, J.; Mayer, G.; Eisenacher, M.; et al. The PRIDE database and related tools and resources in 2019: Improving support for quantification data. *Nucleic Acids Res.* **2019**, *47*, D442–D450. [CrossRef] [PubMed]

Supplementary Material

(a)

```
ATCACTTGAGCAAACGAAATGCCTCAGAAAAACGCTGACCGTCTTCAGCGGCCTATCGAAAAAAGCGGGTCCCTCTCGCGAGCAT
TTCGCAAACGCTTAAACTCCAACCAGCTCGTCGGTCTCGCCGCAAGCGCCCAGCGAGCGGGCGCCTTACTCAACCGGCTGCCACG
CCTGCGTTTTAGCCCCTACGCCACTGGTTGCGACCCCTTATCGCTAAGACGTACGGCCGGCCCATGCAGCCCGCTGCGAGCCGGT
                                                                  M  Q  P  A  A  S  R
TGATAAAGAAGTTCCGCACCGTGCCCGGCGACAAACACACTATTACAAAAATGATGCTCACTAAGTCCGTTGTTATTAGCCGGCC
L  I  K  K  F  R  T  V  P  G  D  K  H  T  I  T  K  M  M  L  T  K  S  V  V  I  S  R  P
GGCCGTGCGCCCTGTCTCCACCCGCCGCGCGGTGGTGGTCCGCGCTAGCGGCCAGCCCGCTGTGGACCTGAACAAGAAGGTTCAG
  A  V  R  P  V  S  T  R  R  A  V  V  V  R  A  S  G  Q  P  A  V  D  L  N  K  K  V  Q
GACGCCGTGAAGGAGGCTGAGGACGCTTGCGCCAAGGGCACCTCCGCGGTGAGGCGTTACTACTAGTCGCTTCAGTGGGGGCCAC
 D  A  V  K  E  A  E  D  A  C  A  K  G  T  S  A
ATCATCGGGCTTGAAAGGATCCTGGCTCGTCGGAACGCTTGCGCACACCCAGTTGGTGTTTCTCCGCGTCCTGATCCCAGCTAGG
CTTCATTTCAGTGTGTTACGATCAAGGAGACAGTAGATCACGCGGCGCTCGGCCTGGCAGTGGTCGATATATCGCGGACCGCTCC
CTTCGCTTGCACAACGTTGCGTCTTGTTTTTCTTGACTCGAGCCTAAACACGCTCCTGTATTTTCATATACAGGACTGCGCCGTG
                                                                              D  C  A  V
GCCTGGGACACCGTTGAGGAGCTCAGCGCTGCTGTCTCGCACAAGAAGGATGCCGTCAAGGCCGACGTCACCCTGACCGACCCCC
 A  W  D  T  V  E  E  L  S  A  A  V  S  H  K  K  D  A  V  K  A  D  V  T  L  T  D  P
TGGAGGCTTTCTGCAAGGATGCCCCCGATGCCGATGAGTGCCGGTGAGTAGCCGGCCTGAATTGTCGCTCTGCGCGTGTCGGCAT
L  E  A  F  C  K  D  A  P  D  A  D  E  C  R
TCGATCGCTCAGAAGTTCTCCCACATTTCCGAGACGACCTGCCTGAACAGCACCTCCTGGCTGCATCACATGCCAGTGATAGCTG
TGAATGCGTATTCGCTGGGTTGAGGTCTCGACTCAAGGGTGTTGCACCCCGGCCACCACTAGGGTTCCGTTCGGGCGCCTGGGAC
CCAGCCAACGCGCTTGCCGCATACCAACAGCGGCGTAACCTGCTCTCAATCTGTATGGCTGTCGTGACCCGTGTGTTTTCCTCTC
CCCGGTGCCCTGCCCCAACAGCGTCTACGAGGATTAAGCAGCTCACCCAACACGCTTTGGGCGGGCGGCAAGGCCTCGTGGCAGC
                          V  Y  E  D  *
AGCGGCGCTAGTGCAGCACGTTGGTGCCTTGAGGAAGGACAACTAGGTGGTTGAGTGGCGCACGGTATGGCGGGTTGCACAATGC
AACCGGCCAGCTGGGCGAAGGGAGTTCGAGCGGTGCAGGTGTGTGGGAGCCTGGAGCCCGCGTTCCGTCGGACGTTCGCCGCGTG
CAGATTTGCGCAGCTGGCGCTTCTTTTCGGAGTTTTCGGGCTAGGATAGGACCAGCCCTTGATCGTGGCAGACCCGAGCAGTTCG
GAGCGATGTGGTGAGCAGCAGGGCCGGGCCGGGCGTCCGGCTCCGTGTCCTGTAGTTTTGGTGTGGGGCACTGTTTGGCCCCGCT
TGTACCGGTTTCCCCTGTTGTACAGAGTCGTCGGTGTCGACACATGATGAAAGGAATTCATGCATCATGGTACAAAATAATGAAT
GTAACGGCGCAAGCCGTGCACGCACAAGCTGTCCTGATGATAGCGTAATGGTTTCAATGCGGGCTGCCGTTCATGAGGATGGGTT
CAGTGACAATCTGGGTGGGCAGCGCATGGAGCGTGAAGAAATAGCAGTGACCAGCCAGCAGGAAAACTCCTGCCTACGGGAATCT
CAGCCAAGGAATGCGGCATGGCGAAGCCTGTCAGCAACCCGACACGGCGAAGCAGTGACCACGGCCAAGCTACAGCGGCTCAGTA
GCACGATTAGCTTTTGCGCCAGGCGCACGTGAGCGCACTGCTTTGTATTCACGCCTGCTATCTGTTTCCACACTTGCCTTCGCCC
ACGCCTTCACCTGCAACTTCCGTGTTCGTCAAC
```

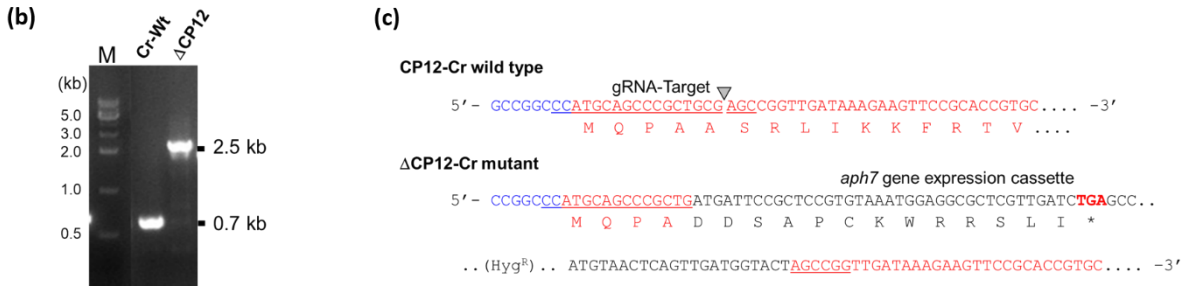


Figure S1: The analysis of the genome sequence ΔCP12-Cr and WT-Cr (**a**) The genomic sequence (Cre08.g380250) of WT-Cr. Blue and black letters indicate the untranslated region and intron sequence, respectively, and red letters represent exon and amino acid sequences. The underline indicates the twenty bp-long gRNA target sequence. (**b**) To confirm targeted mutation of the CP12 gene, cells were subjected to genomic PCR with specific primers adjacent to sgRNA target sites in wild type and ΔCP12-Cr. (**c**) The edited genome sequence of a ΔCP12-Cr . The genotype of CP12 was determined by Sanger sequencing. The ΔCP12-Cr has a DNA fragment of the *aph7* gene expression cassette inserted within the gRNA target sequence.

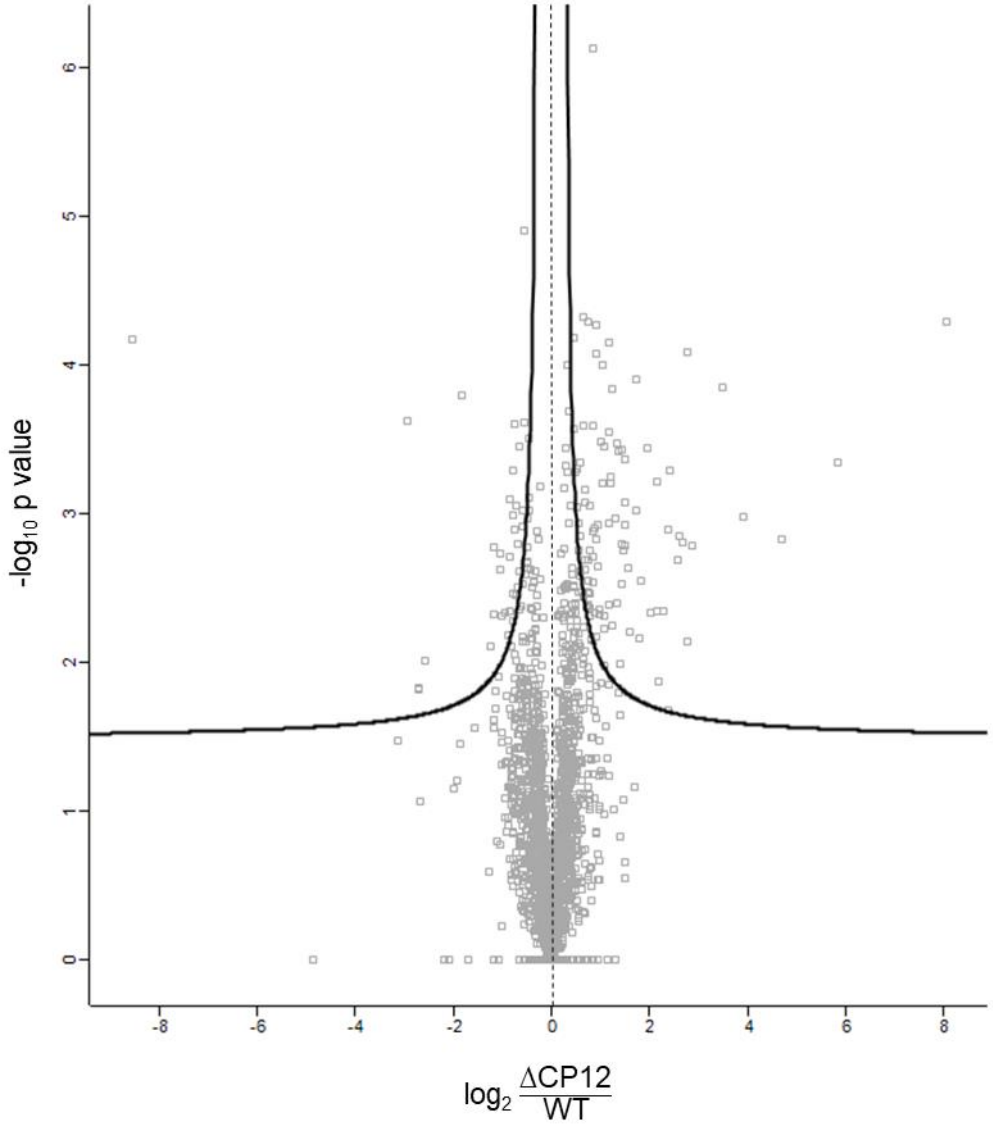


Figure S2: Volcano plot of the proteomic data. The plot represents the fold changes in relative abundance for each protein (empty square). The x-axis shows difference of protein abundance in ΔCP12-Cr versus WT-Cr (in $\log_2$). The y-axis shows the $-\log_{10} p$ value. The dotted vertical line indicates unchanged protein amount. The continuous lines show the threshold above which the proteins are in statistically significant differential amount (two-sample *t*-test with a permutation-based false discovery rate set at 0.01 and *p*-value adjusted using a scaling factor s0 to a value of 0.1) that are on the two top left and top right corners.

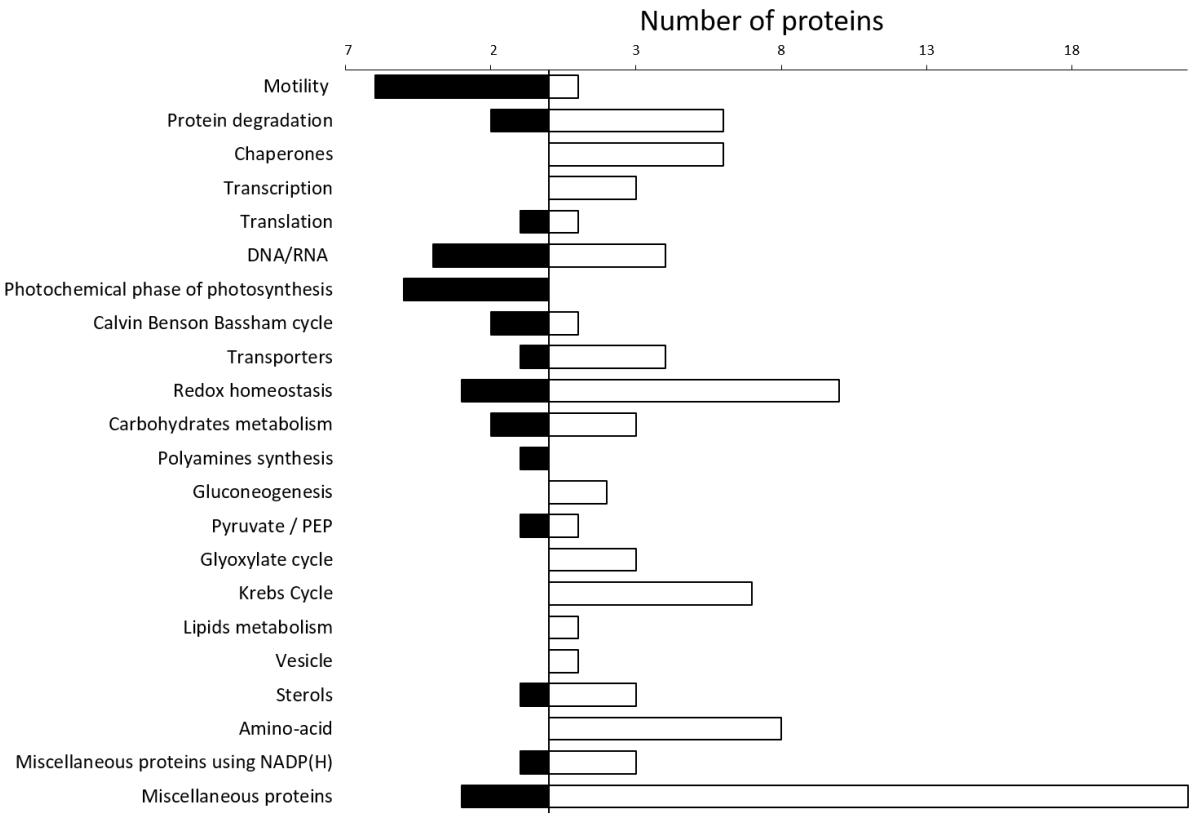


Figure S3: Number of proteins increasing or decreasing in ΔCP12-Cr strain, all metabolic pathways are shown. The proteins that are more abundant in ΔCP12-Cr compared to WT-Cr are counted in the white bars, the protein that are less abundant in ΔCP12-Cr compared to WT-Cr are counted in the dark bars.

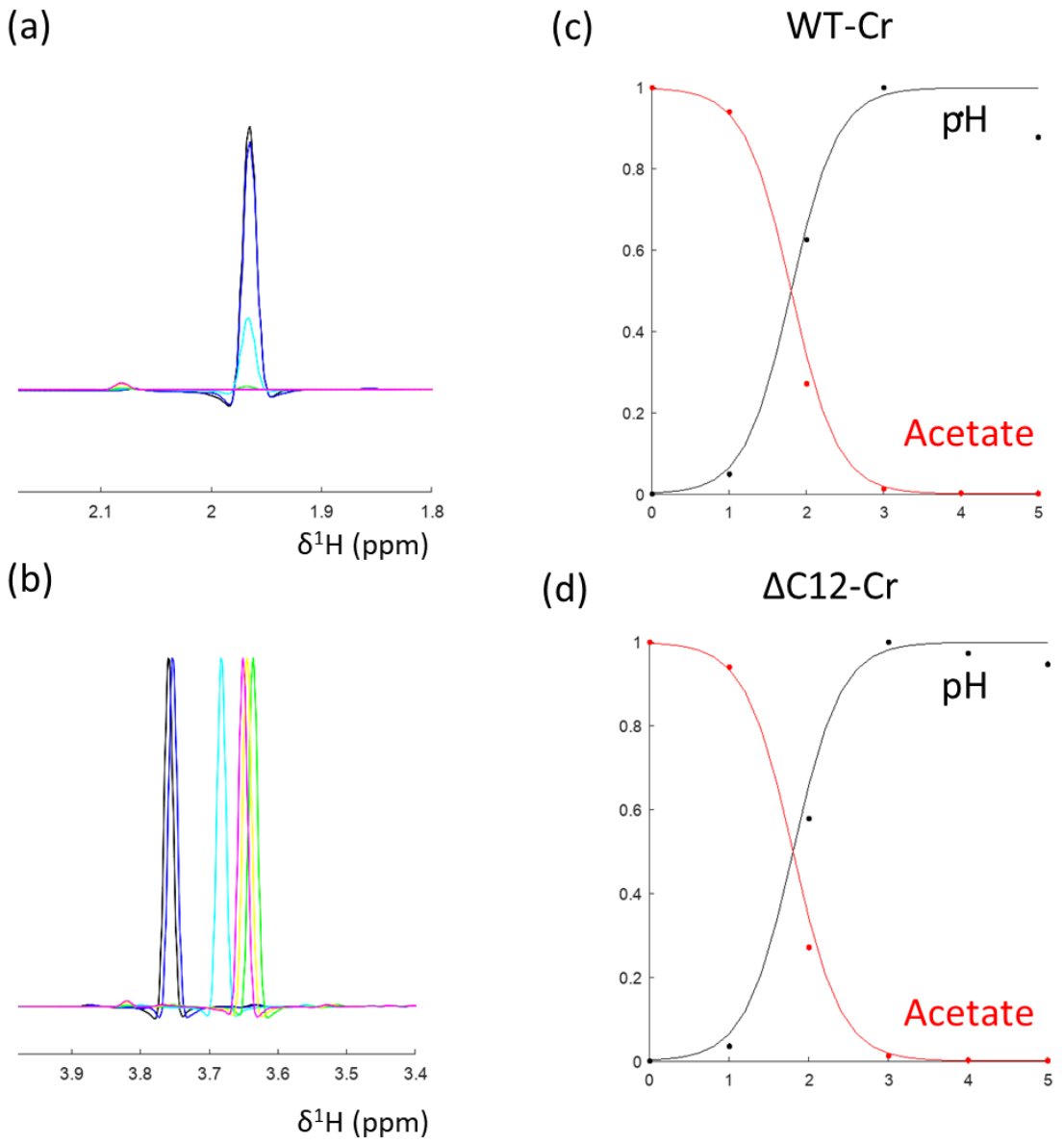


Figure S4: Acetate concentration and pH variation in mixotrophic precultures. (**a** and **b**) Superimposition of ^{1}H 1D NMR spectra of culture medium collected at time 0 (black), and after 1, 2, 3, 4 and 5 days of pre-culture (in blue, cyan, green, yellow and magenta respectively). In (**a**), the region of the acetate methyl resonance is shown. The decrease in intensity of this resonance is related to the consumption of actetate during mixotrophic growth. In (**b**), the region of the Tris(hydroxymethyl)aminomethane methylene resonance is shown. The shift of this resonance is related to a variation of pH from 7.4 to a more basic value because of photosynthesis CO_2 consumption during mixotrophic growth. (**c** and **d**) Relative acetate amount and pH variation during mixtrophic growth of WT-Cr (**c**) and ΔCP12-Cr (**d**). After four days of pre-culture, the acetate has been consumed from the medium. We collected these cultures after five days, when no acetate is left in the medium, and then subcultured them in phototrophic condtions.

4.3. Résultats complémentaires

4.3.1. Caractérisation des souches Δ*CP12* et Δ*CP12* complémentées

L'insertion de la cassette du gène codant la résistance à l'hygromycine dans le gène *CP12* a été vérifiée dans trois souches Δ*CP12*. Comme l'indiquent les résultats de la PCR, l'amplicon est de 0,66 kb pour la souche WT, correspondant à la taille du gène *CP12*. Il est de 2,53 kb pour la souche mutante, ce qui correspond à la somme de la taille du gène *CP12* et du gène de résistance (1,87 kb). Ce résultat confirme pour chacun des mutants l'insertion de la cassette conduisant à la mutation du gène *CP12* à différents endroits (Figure 4.1A).

Afin de confirmer l'absence de la protéine CP12 dans les souches mutantes, plusieurs approches ont été développées. Cependant, la présence de la protéine CP12 est difficile à révéler par les méthodes classiques d'immunoempreinte, sûrement du fait de sa faible abondance. Un enrichissement en protéines intrinsèquement désordonnées a donc été nécessaire en amont de l'immunoempreinte et a permis de confirmer la présence de la protéine CP12 dans la souche WT et son absence dans les trois souches mutantes Δ*CP12* (Figure 4.1B).



FIGURE 4.1. – **A**. PCR indiquant l'insertion de la cassette de résistance. Les amorces hybridant le début et la fin du gène codant la CP12 ont été utilisées pour vérifier que la cassette du gène codant pour la résistance à l'hygromycine soit bien située dans le loci CP12 dans les trois souches mutantes. **B**. Immunoempreinte de 30 µg d'extraits enrichis en protéines intrinsèquement désordonnées (selon le protocole décrit dans [205]) prélevés en phase exponentielle à partir de cultures des souches WT et Δ*CP12* ayant poussé en conditions photo-autotrophiques à hautes concentrations de CO_2, P_{CO_2} 20 000 ppm. Les protéines sont séparées par SDS/PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose suivie d'une hybridation avec un anticorps dirigé contre la CP12.

Afin de confirmer que les phénotypes observés sont bien liés à l'absence de la CP12, une complémentation du mutant Δ*CP12* a été réalisée en réintroduisant le gène codant pour la CP12 (décrit dans le chapitre 6). Pour vérifier que le gène du

plasmide est bien transcrit et traduit, la quantité de protéine a été déterminée avec la protéomique quantitative, qui est plus fiable que la méthode décrite au-dessus. Une méthode ciblée pour la protéine CP12 et non ciblée ont été réalisées. Cette dernière a permis d'obtenir un nombre de Peptide Spectral Match (PSM) jusqu'à 309 contre 13 auparavant pour la souche WT (Figure 4.2). Avec cela, il a été possible de confirmer l'absence de peptides dans les mutants, mais également leur présence pour les souches complémentées avec un nombre de PSM de 165. Néanmoins, la quantité de CP12 dans les cellules complémentées est inférieure à celle dans le WT.

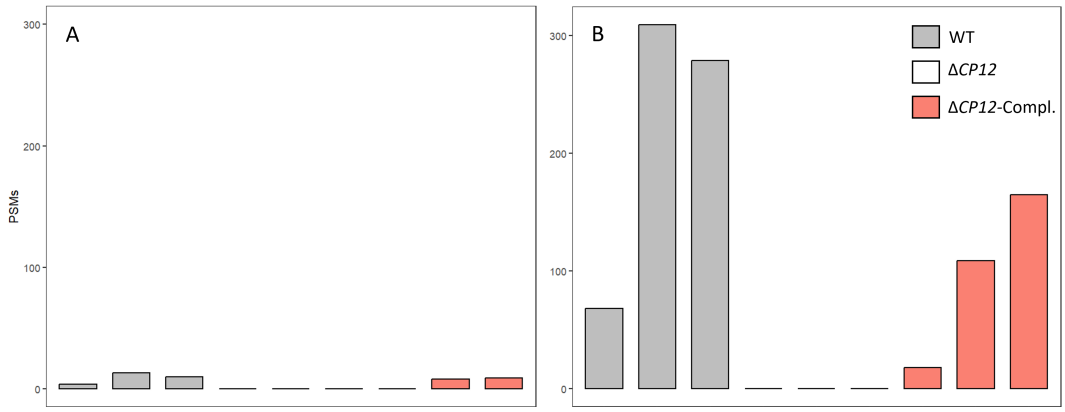


FIGURE 4.2. – Peptide Spectral Match (PSM) correspondant à la protéine CP12 (Cre08.g380250) obtenu par une méthode non ciblée (**A**) et ciblée (**B**). Les extraits protéiques de 30 µg ont été obtenus à partir de cultures des souches WT, Δ*CP12*, Δ*CP12* complémentées prélevées en phase exponentielle (conditions photo-autotrophiques et 20 000 ppm de CO_2).

Une autre manière de s'assurer de la présence ou de l'absence dans les différentes souches de l'étude a été d'évaluer la capacité à former le complexe ternaire GAPDH/CP12/PRK. La formation de ce complexe est visualisée par immunoempreinte, en utilisant un anticorps anti-PRK, après électrophorèse en conditions natives avec ou sans incubation avec du DTT. En présence de DTT, le complexe se dissocie et la PRK est reconnue à la migration du dimère de PRK pour les souches WT et Δ*CP12*-1 (Figure 4.3) [4]. En conditions oxydantes, la PRK est reconnue à la migration du complexe ternaire dans les souches WT et Δ*CP12*-Compl, mais à la taille du dimère dans la souche Δ*CP12*-1. En effet, le complexe n'est pas capable de se former dans la souche mutante Δ*CP12*-1, mais retrouve la capacité de formation dans la souche Δ*CP12*-Compl (Figure 4.3). C'était d'ailleurs la première fois qu'*in vivo* chez *C. reinhardtii*, la CP12 a été montrée indispensable pour la formation du complexe.

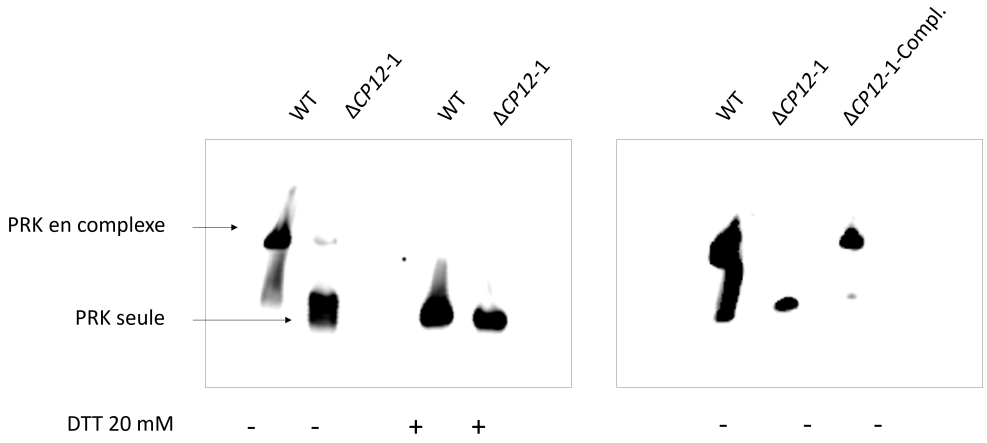


FIGURE 4.3. – Immunoempreinte après électrophorèse en conditions natives, révélée par des anticorps anti-PRK. 10 µg de protéines solubles sont incubées avec ou sans 20 mM de DTT.

Enfin, il a été également vérifié que la croissance des différentes souches est identique (Figure 4.4).

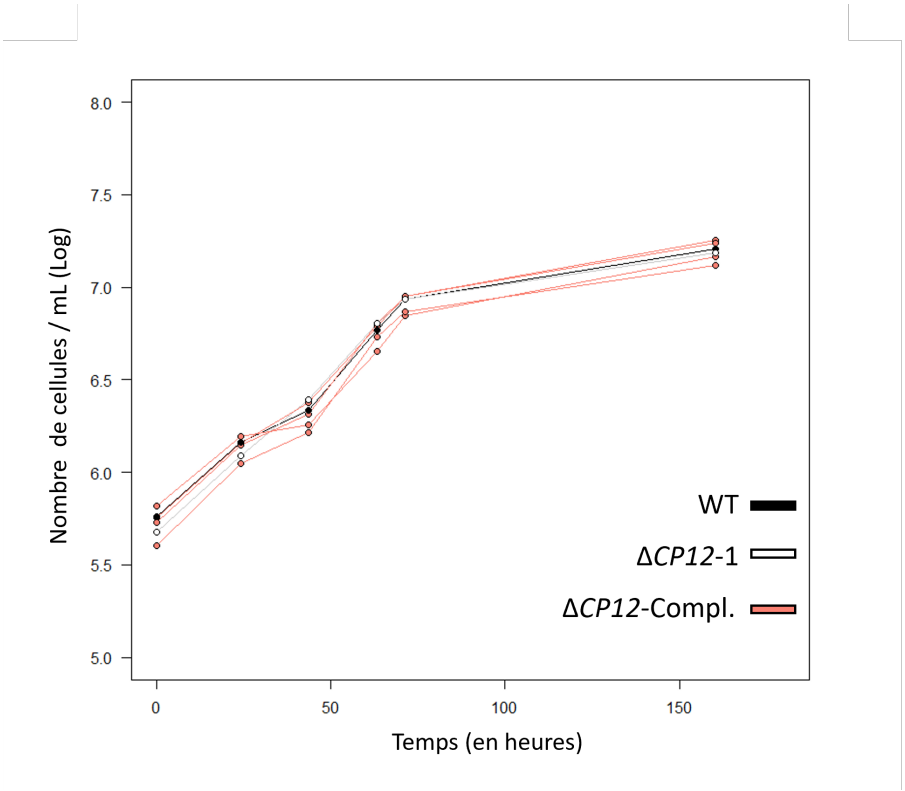


FIGURE 4.4. – Comparaison des courbes de croissance des souches WT (noir), Δ*CP12* (blanc), Δ*CP12* complémentées avec la CP12 (saumon) en lumière continue et à haute concentration de CO_2.

4.3.2. Recherche de phénotype pour le mutant Δ*CP12*

4.3.2.1. Courbes de croissance

Comme le suggère la littérature, la CP12 aurait d'autres fonctions directes ou indirectes dans le métabolisme des organismes photosynthétiques. L'étude de protéomique non ciblée appuyant cette hypothèse, la croissance de la souche WT en comparaison avec la souche mutante a été étudiée dans différentes conditions.

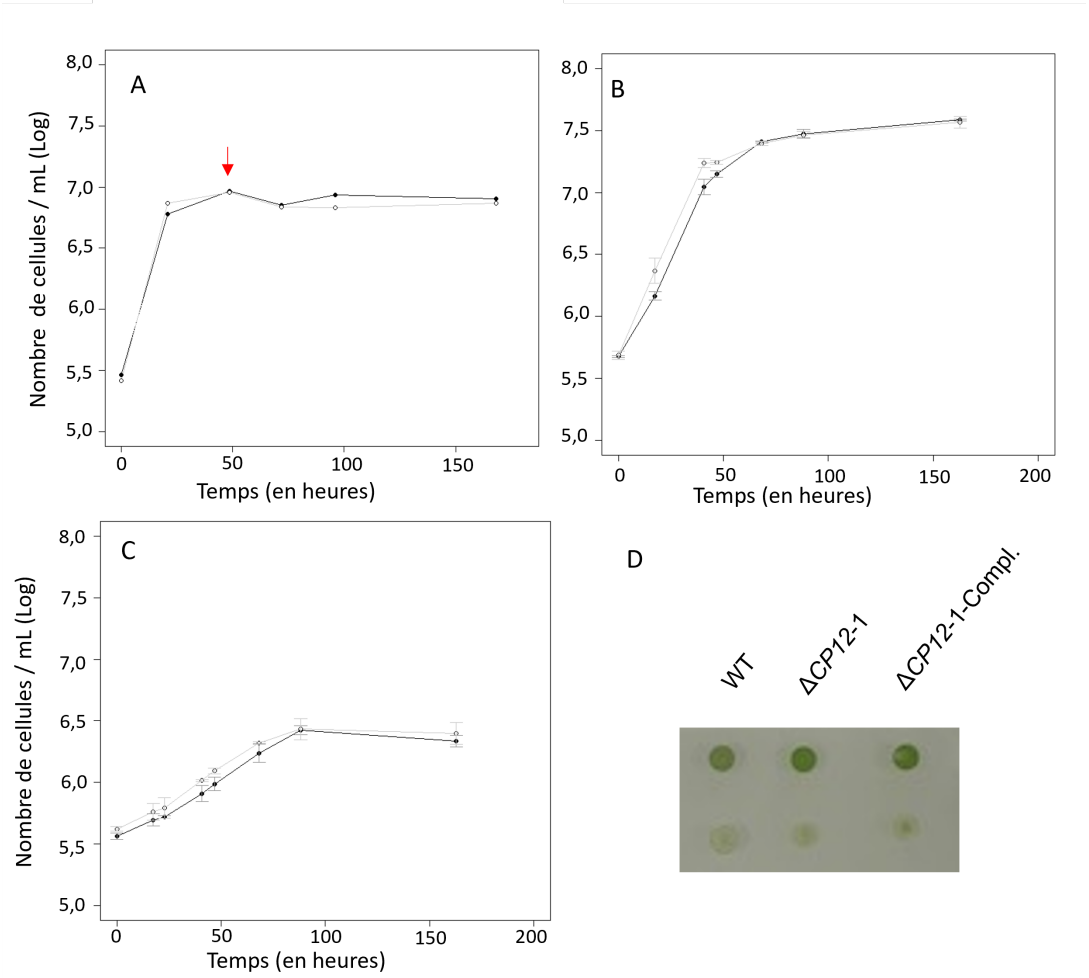


FIGURE 4.5. – Comparaison des courbes de croissance des souches WT (en noir) et Δ*CP12* (en gris) en conditions photo-autotrophiques à hautes concentrations de CO_2 à (110 µmol de photons m^2 s^{-1}) **(A)** en lumière continue à 300 µmol de photons m^2 s^{-1} **(B)** en conditions hétérotrophiques (obscurité) **(C)**. Comparaison de la croissance en milieu solide ("Spot test") réalisés avec des conditions de lumière fluctuante par cycles de 5 minutes de lumière et 1 minute d'obscurité **(D)**. Les données représentées sont le résultat d'une moyenne de triplicats biologiques.

L'effet de la lumière sur la croissance de *C. reinhardtii* sans la CP12 a été évaluée en alternance jour/nuit, haute intensité lumineuse, obscurité totale et lumière fluctuante. La littérature décrit une exaspération des phénotypes en cultures solides par comparaison avec les cultures liquides [40], ainsi ces conditions ont aussi été testées. Le nombre de cellules en fonction du temps chez la souche WT et la souche mutante Δ*CP12* dans ces différentes conditions est similaire (Figure 4.5). L'impact d'un stress, tels que la carence en azote, a également été étudiée après que *C. reinhardtii* ait atteint la phase exponentielle dans des conditions optimales et n'a pas eu d'effet sur la croissance (Figure 4.5A). La diminution de la protéine PRK a été un phénotype observable chez la souche de *C. reinhardtii* sans la protéine CP12 dans les conditions de hautes concentrations de CO_2 en comparaison avec la souche WT. Il s'est avéré que cette diminution entre les deux souches est également observable dans ces conditions de stress (Figure 4.6). De plus, la quantité de protéine PRK diminue au cours du temps en carence d'azote ou à l'obscurité par rapport aux protéines totales chez la souche WT.

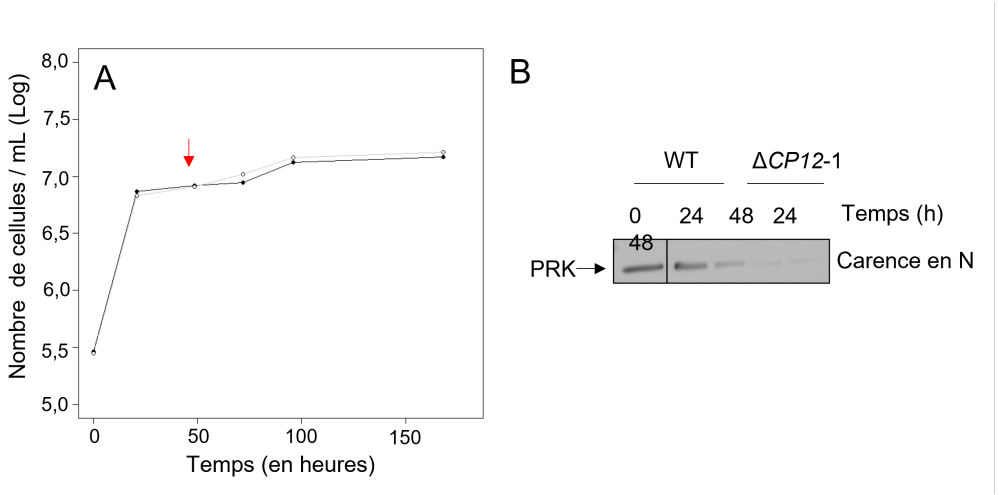


FIGURE 4.6. – **A**. Comparaison des courbes de croissance des souches WT (noir) et Δ*CP12* (blanc) avant et après en conditions photo-autotrophiques à hautes concentrations de CO_2. La flèche rouge indique le moment où la carence en azote. **B.** Immunoempreinte de 30 µg d'extraits de protéines totales prélevés avant et après 24h ou 48h de conditions de stress à partir de cultures des souches WT et Δ*CP12*. Les protéines sont séparées par SDS/PAGE, transférées sur membrane de nitrocellulose suivie d'une hybridation avec un anticorps dirigé contre la PRK.

4.3.2.2. Efficacité de la photosynthèse en présence de quantité de CO_2 saturante

L'efficacité de la photosynthèse en fonction de l'intensité lumineuse a également été étudiée dans des conditions dans lesquelles le CO_2 était saturant pour que

celui-ci ne soit pas limitant. Le taux d'oxygène a été mesuré à l'aide d'une électrode à oxygène (Oxygraph) et a été normalisé par le taux de chlorophylle a en émettant l'hypothèse que le rapport antennes collectrices/PS II soit constant. Il est représenté en fonction de l'intensité lumineuse. Les résultats révèlent que l'efficacité photosynthétique n'est pas significativement différente entre les deux souches (Figure 4.7).

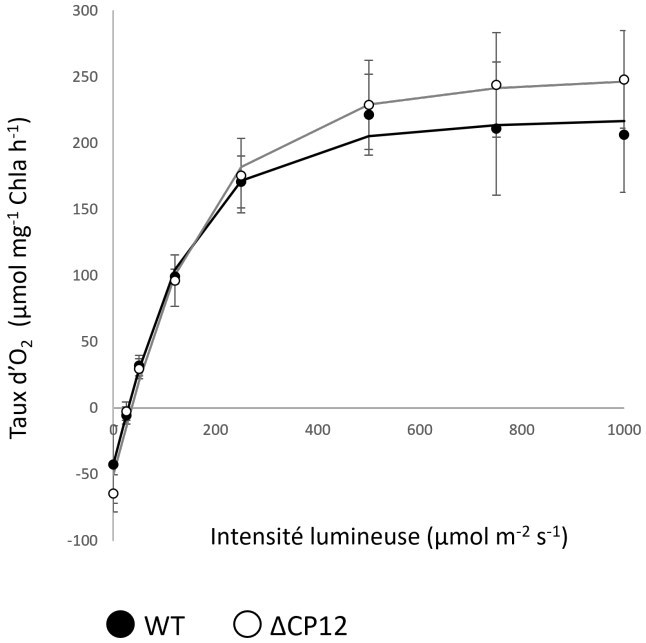


FIGURE 4.7. – Mesure l'efficacité photosynthétique en fonction de l'intensité lumineuse. Le taux d'oxygène en fonction de l'intensité lumineuse a été rapporté par la quantité de chlorophylle a. Les souches WT (en noir) et Δ*CP12* (en blanc) ont été prélevés en phase exponentielle et ont poussé dans des conditions photoautotrophiques en hautes concentrations de CO_2.

4.3.2.3. Métabolisme des lipides

L'étude de protéomique quantitative a également révélé que la quantité de certaines protéines impliquées dans le métabolisme des lipides étaient affectées. De plus, une étude chez *Synechocystis* sans la CP12 a montré l'implication de la protéine dans le métabolisme des terpènes [17]. La suppression du gène codant pour le CP12 dans des souches de la cyanobactérie augmente leur production de limonène et de bisabolène. Afin d'explorer une potentielle fonction de la CP12 sur le métabolisme des lipides chez *C. reinhardtii*, une quantification des galactolipides, des acides gras libres ainsi que des mono, di et triglycérides a été faite. Bien que des tendances soient observables comme une augmentation des galactolipides (monogalactosyldiacylglycérol (MGDG) et digalactosyldiacylglycérol (DGDG)) et une diminution des triglycérides chez le mutant par rapport à la souche WT,

celles-ci ne se sont pas révélées significativement différentes (test de Student) (4.8).

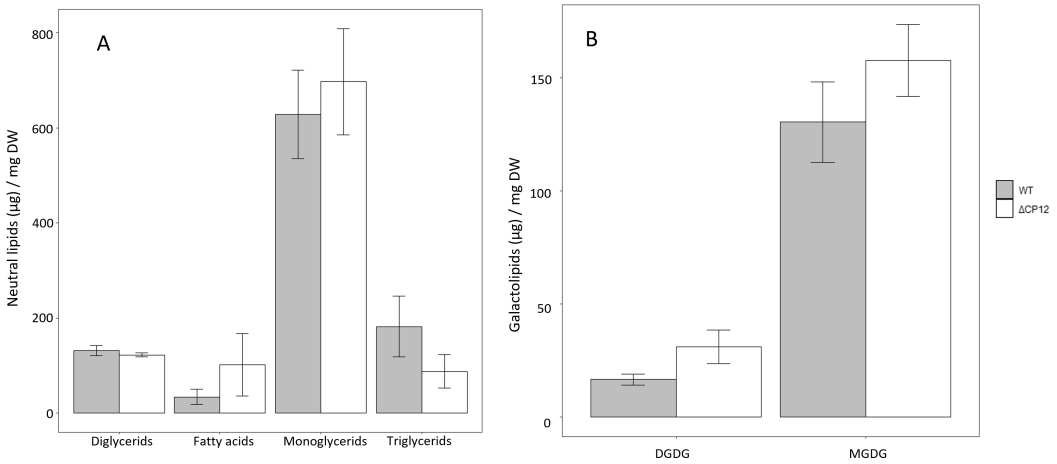


FIGURE 4.8. – Comparaison des quantités de lipides neutres (**A**) et galactolipides (**B**) entre les souches WT et Δ*CP12*. La quantité de lipides est calculée grâce à une gamme étalon de référence et rapporté par mg de poids sec des cellules de *C. reinhardtii* ; monogalactosyldiacylglycérol (MGDG). digalactosyldiacylglycérol (DGDG)

4.4. Discussion

Ces travaux ont permis de produire des souches de *C. reinhardtii* délétées de la CP12, et complémentées. Dans des conditions optimales de croissance, c'est-à-dire en lumière continue et modérée 110 µmol de photons m^2 s^{-1} avec des hautes concentrations de CO_2, la croissance de *C. reinhardtii* sans la protéine CP12 n'est pas affectée. Cependant, la quantité de nombreuses protéines impliquées dans diverses voies métaboliques chez la souche mutante a été observée, traduisant un remodelage métabolique important. La première observation est la quantité de PRK qui diminue dans la souche Δ*CP12*. Les chapitres 5 et 6 reviennent sur ce résultat. Les travaux menés n'ont pas réussi à identifier un phénotype de croissance. Bien que chez les cyanobactéries, une souche sans la CP12 avait une croissance ralentie par rapport à la souche sauvage, en conditions de hautes intensités lumineuses, mais également en alternance lumière/obscurité, ce n'a pas été le cas chez *C. reinhardtii*. La microalgue verte possède de nombreuses voies métaboliques de compensation qui pourraient expliquer cette absence de phénotype de croissance.

L'effet de la suppression de la CP12 a aussi été étudiée sur la quantité de lipides afin d'évaluer si les dynamiques énergétiques subcellulaires et les mécanismes de stockage du carbone étaient affectés [25]. Cependant, nos résultats montrent qu'il n'y a pas de différence entre les souches Δ*CP12* et WT, mais il serait pertinent de quantifier l'amidon.

5. Interaction entre la CP12 et la PRK en conditions réductrices

5.1. Introduction

La protection de l'activité enzymatique de la PRK par la protéine CP12 en conditions réductrices a été montrée *in vitro* dans le chapitre précédent. Une interaction entre ces deux protéines a été suggérée pour expliquer cette fonction protectrice par la CP12. Des études précédentes avaient émis l'hypothèse du rôle de la CP12 dans la stabilité de la protéine PRK dans des conditions de lumière. Une étude a montré que la quantité de PRK diminue en l'absence de la CP12 chez *A. thaliana*, mais pas la quantité d'ARNm [105]. De plus, une étude récente a également confirmé cette diminution chez *C. reinhardtii* [177], en plus de nos travaux précédents [58].

Afin d'explorer ces hypothèses, une expérience de chromatographie d'affinité avec la CP12 comme appât a été réalisée pour révéler ses interactants dans des conditions réductrices. Des expériences de résonance plasmonique de surface (SPR) ont également été réalisées pour évaluer s'il s'agissait d'une interaction directe. Le rôle de la protection de la PRK par la CP12 *in vivo* a aussi été testée.

5.2. Résultats

5.2.1. Une interaction directe entre CP12 et PRK dans des conditions réductrices

Les protéines solubles extraites de lysat de cellules de *C. reinhardtii* cultivées à une concentration élevée de CO_2 (HC, P_{CO_2} : 20 000 ppm) sont chargées dans des conditions réductrices (Figure 5.1A) sur une colonne d'affinité pour la CP12. Il s'agit d'une colonne d'affinité "HiTrap NHS-Activated HP", où la protéine CP12 purifiée est fixée. La majorité des protéines PRK reste liée à la colonne lors d'une étape de lavage sans sel et est éluée avec 150 et 500 mM de NaCl (Figure 5.1A). La présence de la PRK a été confirmée dans ces mêmes fractions par spectrométrie de masse (Figure 5.1B). Lorsque la CP12 n'est pas fixée sur le gel (contrôle), la PRK est absente de toutes les fractions éluées et n'est donc pas retenue (Annexe A.3).

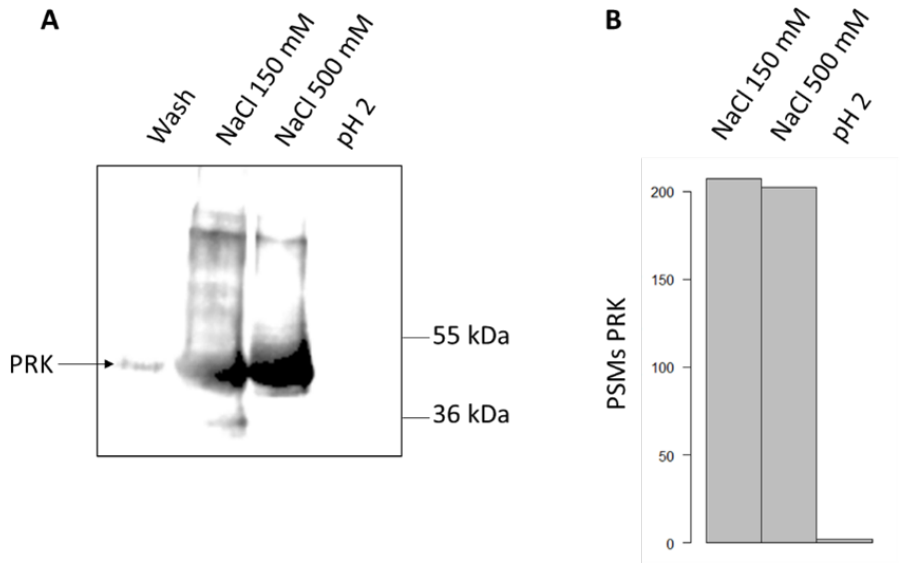


FIGURE 5.1. – Expérience de pull-down avec la CP12 comme appât. **A**. Immunoempreinte des protéines totales présentes dans les étapes de lavage (Wash) ou d'élution (150 et 500 mM NaCl, pH 2). Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE puis transférées sur membrane de nitrocellulose qui a été hybridée avec un anticorps dirigé contre la PRK. **B**. Peptide Score Match (PSMs) correspondant à la PRK (Cre12.g554800) présente dans les différentes fractions.

Les mesures de résonance plasmonique de surface (SPR) avec la CP12 purifiée immobilisée (ligand) et différentes concentrations de PRK native purifiée (analyte) ont montré que, dans des conditions réductrices, l'interaction entre CP12 et PRK était directe (Figure 5.2). La constante de dissociation (K_D) du complexe CP12/PRK réduites était de 570 nM.

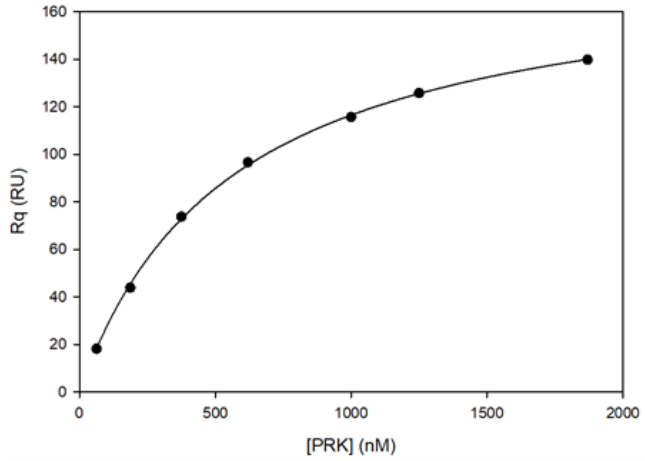


FIGURE 5.2. – Interaction directe par résonance plasmonique de surface (SPR). La réponse à l'équilibre Req (en unité de résonance (RU)) a été tracée en fonction de concentrations croissantes de PRK en tant qu'analyte. La CP12 a été utilisée comme ligand. Les erreurs sur les paramètres estimés étaient inférieures à 10% dans tous les cas.

5.2.2. Protection *in vivo* de la PRK par la CP12

Dans le Chapitre 1, il a été décrit que dans les mutants dans lesquels la CP12 était absente, l'activité et la quantité de PRK étaient plus faibles que dans la souche WT, ce qui a été attribué à la protection de la PRK par la CP12 [58]. Pour étudier cette fonction *in vivo*, les cellules de *C. reinhardtii* ont été incubées avec un inhibiteur de la traduction, le cycloheximide (CHX). La diminution de la quantité totale de protéines au cours du temps après ajout de CHX a été observée dans les deux souches. Normalisée par la quantité totale de protéines, la quantité de PRK était plus élevée dans la souche WT que dans la souche mutante. De plus, au cours du temps, la proportion de PRK par rapport aux protéines totales a augmenté dans la souche WT mais est restée inchangée dans la souche mutante (Figure 5.3).

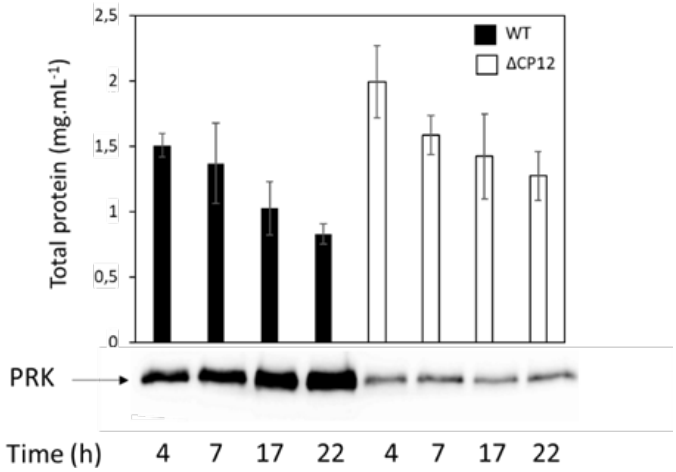


FIGURE 5.3. – Protection *in vivo* de la PRK par la CP12. Quantité de protéines totales en fonction du temps d'incubation du cycloheximide (CHX, 10 µg mL-1) (n=3). Western blot de 15 µg de protéines totales séparées par SDS/PAGE, utilisant un anticorps dirigé contre la PRK.

5.2.3. De la détermination d'un K_D *in vitro* à la présence d'un complexe CP12-PRK *in vivo*

La quantité de CP12 par cellule dans nos conditions d'étude, c'est-à-dire en lumière continue, en conditions réductrices, est très faible (Chapitre 1). Compte tenu de la faible affinité de la CP12 réduite pour la PRK réduite déterminée par SPR, la présence du complexe CP12-PRK dans la cellule n'est pas évidente au vu des faibles concentrations intracellulaires des deux partenaires. Les concentrations intracellulaires des deux partenaires, PRK et CP12 ont été estimées en s'appuyant sur les données décrites dans la littérature sur le complexe GAPDH-CP12-PRK. En considérant un volume du chloroplaste de *C. reinhardtii* de 2.10^{-8} µl (Harris, 1989) et d'après les calculs effectués pendant la thèse de Luisana Avilan [4] à partir de l'activité enzymatique dans un extrait brut, de la concentration de protéines, de l'activité spécifique et le nombre de cellules, la concentration de PRK dimérique est estimée à 43 ± 5 µM et à 49 ± 10 µM pour la GAPDH tétramérique dans le chloroplaste. Pour estimer la concentration de CP12, la stœchiométrie du complexe en conditions oxydantes est utilisée. Pour un complexe ternaire GAPDH-CP12-PRK, il y a quatre moles de CP12, quatre moles de PRK (deux dimères), huit moles de GAPDH (deux tétramères). Les gels natifs présentés dans la figure 4.3 montrent que la cellule possède suffisamment de CP12 pour associer toutes les protéines PRK et GAPDH dans le lysat cellulaire oxydé. Ainsi, une concentration minimale de CP12 peut être estimée à 80 µM. À partir de ces données et du K_D obtenu pour l'interaction entre la PRK et la CP12 réduites, il est possible d'estimer la proportion de CP12 libre et celle en complexe avec la PRK dans le chloroplaste en conditions réductrices.

$$[PL] = \frac{(Pt + Lt + K_d) - \sqrt{(Pt + Lt + (K_d)^2 - 4PtP_0)}}{2} \tag{5.1}$$

K_D	0,6 µM
$[P]_{\text{initiale}} = P_0$	80 µM
$[Lig]_{\text{initiale}} = L_0$	42 µM
$[PL]$	41,36 µM
$[PL]$ fraction	51,70 %
$[P]$ fraction	48,3 %

TABLEAU 5.1. – Estimation de la quantité de la CP12 en conditions réductrices

Si on considère un K_D de 0,6 µM (données expérimentales de SPR), la concentration du complexe CP12-PRK en conditions réductrices serait de 41,4 µM. La concentration de la CP12 libre dans ces conditions serait donc de 60 µM par cellule.

5.3. Discussion

L'interaction entre la PRK et la CP12 dans le cadre de la formation du complexe ternaire GAPDH/CP12/PRK est bien établie aujourd'hui et ce, dans plusieurs organismes photosynthétiques. Cette interaction a lieu dans des conditions oxydantes où la protéine CP12 est partiellement repliée, mais aucune n'a été reportée dans des conditions réductrices lorsque la CP12 est désordonnée. Nos résultats ont démontré que cette interaction entre la CP12 et la PRK dans des conditions réductrices était possible, mais il s'agirait d'une interaction plus faible que celle observée en conditions oxydantes avec la GAPDH [66]. En effet, la constante de dissociation pour cette interaction, déterminée par SPR est de 570 nM contre 62 nM pour l'interaction entre le sous-complexe GAPDH-CP12 et la PRK en conditions oxydantes [97]. Même si l'affinité entre les partenaires de l'interaction est plus bien plus faible dans des conditions réduites que dans des conditions oxydantes, une proportion significative de CP12 réduite peut être en interaction avec la PRK dans le chloroplaste. Ce type d'interaction de faible affinité est retrouvé chez plusieurs protéines intrinsèquement désordonnées et est souvent liée à une fonction de stabilisation (chaperon) ou de régulation. De plus, même si ces valeurs permettent de comparer les K_Ds obtenus dans des conditions identiques, ces résultats sont empiriques, car les conditions expérimentales sont bien sûr éloignées des conditions physiologiques.

La CP12 des cyanobactéries *S. elongatus* PCC7942 et celle des algues rouges *Galderia sulphuraria* ne possèdent pas le pont disulfure N-terminal de la CP12 canonique, contrairement à la CP12 de *C. reinhardtii* ayant une isoforme unique de CP12 avec des ponts N-terminal et C-terminal. Or, le complexe ternaire

GAPDH/CP12/PRK existe aussi chez ces organismes [139] [175], ce qui indique que la formation du pont disulfure n'est pas indispensable pour une interaction entre la PRK et la CP12.

D'autres études ont supporté la potentielle existence d'un complexe PRK-CP12 en montrant que la PRK présente dans le complexe est à la fois à l'état réduit et à l'état oxydé [81]. De plus, les auteurs d'une autre étude ont constaté que la PRK peut être complètement réduite et que le complexe reste intact. Il est donc peu probable qu'un changement dans l'état d'oxydoréduction de la PRK soit à lui seul responsable de la dissociation du complexe [97].

Des méthodes, comme la RMN, peuvent être envisagées pour caractériser cette interaction. Des spectres à deux dimensions ^{1}H-^{15}N HSQC de la CP12 uniformément marquée à l'azote ^{15}N en absence et en présence de la protéine PRK ont été enregistrés. Les résultats n'ont pas été reproductibles. Un premier set d'expérience a montré une diminution uniforme des intensités des résonances de la CP12, ce qui n'a pas permis de cartographier la zone d'interaction. Une deuxième série d'expériences n'ont pas montré d'influence de la présence de PRK sur le spectre de la CP12. Ces expériences seront répétées avec un meilleur contrôle de la stabilité des protéines (notamment de la PRK).

6. Étude de la fonction de la protéine CP12 sur l'acquisition du carbone minéral chez *Chlamydomonas reinhardtii*

6.1. Résumé de la publication

La fixation du CO_2 par la RuBisCO dans le cycle de CBB est modulée par la protéine régulatrice CP12. Chez la microalgue verte *C. reinhardtii*, les mécanismes de concentration du CO_2 s'activent lorsque la concentration de CO_2 est faible, augmentant ainsi l'apport de CO_2 au site de fixation de la RuBisCO. Ce mécanisme repose sur une activité accrue des transporteurs de bicarbonate, des anhydrases carbonique, ainsi que sur la condensation de la RuBisCO dans le pyrénoïde, via son interaction avec EPYC1, une protéine d'échafaudage essentielle à cette organisation.

La suppression de CP12 chez *C. reinhardtii* entraîne une augmentation de l'expression d'EPYC1, même en présence de niveaux élevés de CO_2. Ce phénomène est accompagné d'une condensation de la RuBisCO dans le pyrénoïde, et d'une plus grande affinité pour le carbone inorganique par rapport aux cellules de type sauvage (WT) exposées aux mêmes conditions de CO_2. La condensation de la RuBisCO est réversible dans les cellules où la CP12 est réintroduite, mais elle n'est pas liée à l'induction d'autres composantes des CCM.

En parallèle, la délétion de CP12 entraîne une réduction de la phosphoribulokinase (PRK), enzyme responsable de la production de RuBP, substrat de la RuBisCO. En conséquence, la concentration de RuBP diminue également. Toutefois, dans les cellules où la CP12 est restaurée, les niveaux de PRK et de RuBP reviennent à des valeurs similaires à celles observées chez le mutant. En revanche, la distribution de la RuBisCO dans ces cellules est comparable à celle du type sauvage, ce qui suggère que la localisation de la RuBisCO n'est pas directement influencée par la quantité de RuBP dans le mutant.

Cette étude révèle ainsi une nouvelle fonction de la CP12, qui joue un rôle clé dans la régulation, directe ou indirecte, de l'acquisition du CO_2 chez *C. reinhardtii*.

6.2. Article

Effects of CP12 on inorganic carbon acquisition and assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*

Cassy Gérard[1], Régine Lebrun[2], Christophe Verthuy[2], Hugo Le Guenno[3], Artemis Kosta[3], Florence Guérard[4], Bertrand Gakière[4], EonSeon Jin[5], Kwang Suk Chang[5], Luisana Avilan[1], Stephen Maberly[6], Brigitte Gontero[1*], Hélène Launay[1*]

[1]Aix Marseille Univ, CNRS, BIP, UMR 7281, IMM, FR3479, 31 Chemin J. Aiguier, 13 402 Marseille Cedex 20, 6 France

[2]Plate-forme Protéomique, Marseille Protéomique (MaP), IMM FR 3479, 31 Chemin Joseph Aiguier 13009 Marseille, France

[3]Microscopy Core Facility, Institut de Microbiologie de la Méditerranée (FR3479), CNRS, Aix-Marseille Université, Marseille, France

[4]Plateforme Métabolisme-Métabolome, Institute of Plant Sciences Paris-Saclay IPS2, CNRS, INRAE, Univ Paris Sud, Univ Evry, Univ Paris-Diderot, Sorbonne Paris-Cité, Université Paris-Saclay, Bâtiment 360, Avenue des sciences, 91192 Gif sur Yvette, France

[5]Department of Life Science, Research Institute for Natural Sciences, Hanyang University, Seoul, 04763, Republic of Korea

[6]Lake Ecosystems Group, UK Centre for Ecology & Hydrology, Lancaster Environment Centre, Lancaster LA1 4AP UK

* hlaunay@imm.cnrs.fr; bmeunier@imm.cnrs.fr

Word, figures and table counts:

Words counts: Summary, 194 words; Introduction, 594 words; Material and Methods, 2162 words; Results, 1248 words; Discussion, 916 words; Acknowledgments, 85 words; Supplementary material, 107 words; References, 1780 words. Number of figures: 5 (fig. 1 and 3 with color). Number of table: 1. Supplementary materials contain 3 tables and 4 figures.

Summary

- *Chlamydomonas reinhardtii* has a CO_2 concentrating mechanism when grown under very low CO_2 concentration that increases the supply of CO_2 to ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase-oxygenase (RuBisCO). Fixation of CO_2 by RuBisCO within the Calvin-Benson-Basham cycle is regulated by CP12 and therefore the role of CP12 on the CCM was investigated.
- Location of RuBisCO was probed by electron microscopy on *CP12* deletion mutants, *CP12*-complemented and WT cells. Presence of CO_2 concentrating mechanism components and net photosynthesis efficiency were probed at high CO_2 and very low CO_2 concentrations. Because CP12 regulates phosphoribulokinase (PRK), levels of PRK and its product, ribulose 1,5 bisphosphate (RuBP), the substrate for RuBisCO, was also assessed.
- Absence of CP12 induced an increase of essential pyrenoid component 1 (EPYC1), a condensation of RuBisCO in the pyrenoid and a lower $K_{1/2}$ for inorganic carbon at high CO_2. Surprisingly, this was not correlated with an induction of other CCM hallmarks such as bicarbonate transporters or carbonic anhydrase and was not dependent on the amount of RuBP.
- The results suggest that CP12 modulates carbon acquisition by influencing the amount of EPYC1 protein and RuBisCO condensation in the pyrenoid. This novel regulatory role of CP12 expands the list of its moonlighting functions.

Keywords:

CO_2 concentration mechanisms, Electron microscopy, Intrinsically disordered proteins, Microalgae, Pyrenoid, Quantitative proteomic, RuBisCO condensation

Introduction

In photosynthetic organisms, CO_2 fixation through the Calvin-Benson-Bassham (CBB) cycle involves the carboxylation of ribulose 1,5 bisphosphate (RuBP) by the Ribulose 1,5 bisphosphate Carboxylase/Oxygenase (RuBisCO) (Bassham *et al.*, 1950; Andersson & Backlund, 2008). RuBisCO can also catalyse an oxygenation reaction leading to photorespiration that reduces productivity (Bowes & Ogren, 1972). In aquatic phototrophs, the slow diffusion of gases in water can lead to a low ratio of CO_2 to O_2 at the active site of RuBisCO, reducing carboxylation. To circumvent this effect, many aquatic photosynthetic organisms have evolved specific biophysical CO_2 concentrating mechanisms (CCMs) (Kaplan & Reinhold, 1999; Giordano *et al.*, 2005; Moroney & Ynalvez, 2007; Long *et al.*, 2024). This

involves bicarbonate transporters (Duanmu *et al.*, 2009a), carbonic anhydrase (Duanmu *et al.*, 2009b; Kasili *et al.*, 2023) and condensation of RubisCO in a specific cellular compartment: the pyrenoid in microalgae (Atkinson *et al.*, 2016; Fei *et al.*, 2022a) and the carboxysome in cyanobacteria (Rae *et al.*, 2013; Meyer, 2022).

The pyrenoid is a membrane-less organelle found in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii* where RuBisCO is condensed through its interaction with the disordered Essential Pyrenoid Component 1 (EPYC1) (Mackinder *et al.*, 2016; He *et al.*, 2020). The amount of EPYC1, and thus the proportion of RuBisCO in the pyrenoid, increases with lower partial pressure of CO_2 (LC, P_{CO2} = 400 ppm or very low CO_2, VLC, P_{CO2} = 50 ppm) (He *et al.*, 2023) or higher partial pressure of O_2 (P_{O2} = 95%) (Neofotis *et al.*, 2021). The deletion of the CP12 protein, a well-known regulator of CBB cycle (Gontero & Maberly, 2012), led to a higher amount of EPYC1 compared to wild type *C. reinhardtii* cells, even when grown under high partial pressure of CO_2 (HC, P_{CO2} = 20 000 ppm) (Gérard *et al.*, 2022b).

The canonical CP12 is a conditionally disordered protein (Graciet *et al.*, 2003; Launay *et al.*, 2021) that possesses four regulatory cysteine residues that are targets of the ferredoxin-thioredoxin network. In the dark, they form two disulphide bridges, that induce the formation of a well described ternary complex between glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) and phosphoribulokinase (PRK) (Avilan *et al.*, 1997; Wedel *et al.*, 1997; Lebreton *et al.*, 2003; Oesterhelt *et al.*, 2007; Marri *et al.*, 2009; Erales *et al.*, 2011). In the complex, the activity of GAPDH and PRK is significantly decreased compared to that of the free reduced enzymes in *C. reinhardtii*. In addition to the regulation of PRK activity, the absence of CP12 results in a decrease of the amount of PRK protein in *Arabidopsis thaliana* (López-Calcagno *et al.*, 2017). This decrease is also observed in *C. reinhardtii* under conditions where the ternary complex is not formed, i.e. under continuous light (Gérard *et al.*, 2022b; Teh *et al.*, 2023). In the cyanobacterium *Synechocystis* sp. PCC 6803 under continuous light, deletion of the unique canonical *CP12* gene resulted in a greater amount of RuBP compared to WT upon a transition from high-CO_2 (P_{CO2} = 50 000 ppm) to LC (Lucius *et al.*, 2022). This suggests that CP12 performs other functions in continuous light in addition to dark inhibition of CBB enzymes (Gontero & Maberly, 2012; Gérard *et al.*, 2022a).

C. reinhardtii was chosen as a model organism thanks to the extensive background information available and because it contains only a single copy of the *CP12*. *CP12* deleted mutants from this alga were thus used to investigate if and how CP12 regulates the carbon acquisition and assimilation. This involved physiological, biochemical, proteomic and biophysical approaches on wild-type (WT) and *CP12* mutants of *C. reinhardtii* cells grown at HC or VLC.

Material and Methods

Algal strains and culture conditions

C. reinhardtii strain CC4543 (purchased from the Chlamydomonas Resource Center, University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA) and *ΔCP12*, (CC4543 deleted from the protein CP12) described in (Gérard *et al.*, 2022b) were maintained on Agar TAP (Tris Acetate Phosphate) media, supplemented with hygromycin (30 µg/µL) for the mutant strain *ΔCP12*. Cells were grown photoautotrophycally in minimal medium at pH 7.4 (20 mM MOPS, 0.4 mM KH_2PO_4, 0.6 mM K_2HPO_4, Beijerinck salts solution containing 7.5 mM NH_4Cl, 0.4 mM $MgSO_4$ and 0.34 mM $CaCl_2$ and Hutner's trace elements (Hutner *et al.*, 1950)) under continuous illumination of 110 µmol photon m^2 s^{-1}, photosynthetically available radiation at 23°C, constantly shaken at 110 rpm. 200 mL cultures in 1 L bottles were bubbled with air enriched with CO_2 at P_{CO2} = 20 000 ppm of CO_2 resulting in [CO_2] = 720 µM (HC, High CO_2) using a El-Flow Bronkhorst flowmeter. For very low CO_2 conditions (VLC), the air flow was passed through soda lime to absorb CO_2 before being bubbled to the culture, resulting to [CO_2] = 1.8 µM.

Generation and characterization of a complemented strain of the Δ*CP12* mutant

To restore *CP12* gene expression in the Δ*CP12* mutant, a transgenic vector for *CP12* overexpression was constructed. The pOpt-mVenus-Paro vector was procured from the Chlamydomonas Resource Center (MN, USA) and utilized as the backbone of the vector for overexpression. The vector contains the paromomycin resistance gene, aphVIII, which functions as a selection marker, and the AR promoter for robust expression. The mVenus gene was excised using *Nde I* and *EcoR I* enzymes. Subsequently, a PCR product of the complete *CP12* gene (Cre08.g380250) comprising two introns was generated using KOD Plus (TOYOBO, Japan), and introduced into the mVenus removal site (Fig. S1a). The primers employed are presented in Table S1. Nuclear random transformation was performed via electroporation in accordance with the previously described procedure (Kim *et al.*, 2019), utilizing a linearized plasmid that had been digested with the *Pvu II* enzyme. Following transformation, the transformants were selected on TAP agar plates containing paromomycin (10 mg/L). The suspension of transformed cells was used as a template for PCR with primers specific to proAR::*CP12* (see Table S1) using KOD One master mix (TOYOBO, Japan).

RNA extraction and quantitative RT-PCR were conducted in accordance with the previously described procedure (Seo *et al.*, 2015). Total RNA was extracted using the Hybrid-R RNA purification kit (GeneAll, Korea). cDNA was prepared using the Reverse Transcription Master Premix (ELPIS, Korea). The data are presented as the mean of two technical replicates for each independently prepared biological sample (n

= 3), with standard deviation (SD). *CP12* transcript levels were normalized to the expression of the gene encoding RACK1.

Cell extract, SDS-PAGE and immunoblotting

Cells in exponential phase were harvested and centrifuged at 4°C at 2000 g for 10 min, then washed in 10 mM Tris buffer pH 8, containing a protease inhibitor cocktail (Sigma P2714-1BTL). The cell pellet was re-suspended in 1 mL of the same buffer, followed by sonication with 6 cycles of 30 sec and an intensity of 40%. Protein concentration in solution was determined by the Bradford method (Bradford, 1976), using bovine serum albumin (BSA) as the standard. The proteins were denatured in a buffer including 0.5% of SDS and 20 mM DTT and 30 or 15 µg were loaded onto a 12% SDS polyacrylamide gel. Migration was performed at 120 V using a Bio-Rad Mini-PROTEAN system. Proteins were then transferred to a nitrocellulose membrane (Trans-Blot Turbo Transfer pack) using a Bio-Rad Trans-Blot Turbo system. After one hour of blocking (5% fat free milk in 0.1% PBS-Tween 20 buffer), the membrane was incubated overnight with primary antibodies against EPYC1 (Agrisera, diluted 1:5000) or against PRK (antibodies kindly provided by Dr Pierre Crozet (Boisset *et al.*, 2023), diluted 1:10000). After washing with PBS-Tween buffer, the membrane was incubated for one hour with a horseradish peroxidase (HRP) enzyme-coupled anti-rabbit secondary antibodies (diluted 1:10000). After washing, the HRP substrate (WesternPierce™ ECL Transfer Substrate) was added, and chemiluminescence was detected using a ImageQuant LAS 4000 mini.

Extraction of metabolites

The extraction protocol is the same as described in (Saint-Sorny *et al.*, 2022), with a few modifications. 25 mL of *C. reinhardtii* culture in exponential phase were quenched in 50 mL of cold 70% methanol. All steps of the extraction process were done in an ethylene glycol/ethanol solution (80/20) bath at -20°C. 5 mL of chloroform was then added to 25 mL of the quenched culture. A Potter glass homogeniser was used to homogenize the mixture, followed by three freeze/thaw cycles to ensure complete cell lysis. The extracts were centrifuged at 2851 g at 4°C for 10 min to collect the aqueous phases containing metabolites. The organic phase was washed twice with ice-cold water, and these washing fractions were combined with the aqueous phase to be lyophilized until metabolites were quantified.

The freeze-dried fractions were taken up in 1.5 mL H_2O. The resulting supernatant was cleaned up with two solid-phase extractions, using the columns Strata-C and Strata-X-AW (Phenomenex, Le Pecq, France). 10 µL H_3PO_4 50% were added to the extract that was then loaded on the Strata-X-C column (flow rate 1 mL/min) after conditioning with methanol and water. The loading fraction was collected in

a tube. The column was washed with 1 mL H_3PO_4 0.1% and the washing fraction was collected. Elution was carried out with NH_3/MeOH/ H_2O (0.5 mL5/25/70 v/v/v, 0.5 mL 10/25/65, 1 mL 20/25/55; flow rate 1 mL/min). The eluate was collected in an Eppendorf tube. Both loading and washing fractions were gathered and 500 mL phosphate buffer (0.01 mol/L) were added. The resulting buffered fraction was loaded (1 mL/min) on the Strata-X-AW column after conditioning with pure methanol, methanol/formic acid/water (2/25/73 v/v/v) and then phosphate buffer. The column was then washed with 1 mL phosphate buffer. Elution was carried out with NH_3/MeOH/ H_2O (0.5 mL 5/25/70 v/v/v, 0.5 mL 10/25/65, 1 mL 20/ 25/55; flow rate 1 mL/min). The eluate was collected in an Eppendorf tube. The two eluates (C and AW) were spin-dried (speed-vac) and used immediately for LC-TOF analysis.

RuBP quantification

For LC-TOF analyses (Guérard *et al.*, 2011), the spin-dried extracts were resuspended in 100 µL milli-Q water, centrifuged (8000 g, 4 °C, 20 min) and the supernatant was transferred in a glass vial. Samples were injected in the UHPLC 1290 infinity II (Agilent Technologies, Les Ulis, France) equipped with the column UPLC-HSS T3 (2.1 x 100 mm, 1.8 mm) (Waters, Guyancourt, France) under an ammonium acetate/methanol gradient (99/1-0/100%, 6 min). The UHPLC was connected to the injection orifice of the mass spectrometer via a capillary tube. The flow rate was 0.4 mL/min.

Electrospray (Jet Stream Technology Ion Source) mass spectrometry was carried out with the 6540 Q-TOF (Agilent Technologies, Les Ulis, France) with N2 as a spray gas, at 325 °C (Gas Temp), 10 L/min (Drying Gas), 33 psi (Nebulizer), 400 °C (Sheat Gas Temp) and 12 L/min (Sheath Gas Flow), upon negative source ionization (3500 V capillary voltage). Resolution parameters were adjusted to achieve optimal mass resolution in the mass range 50-1100 amu. Mass spectra were recorded with an acquisition rate of 2 spectra/s and acquisition time 500 ms/spectrum. Data were acquired and processed using the software MassHunter Data Acquisition, MassHunter Qualitative Analysis and MassHunter Quantitative Analysis. All compounds analysed here were measured and calibrated with pure standards purchased at Sigma-Aldrich/Fluka (Saint-Quentin Fallavier, France).

Electron Microscopy and image analysis

Chlamydomonas cells were pelleted, high pressure frozen, freeze substituted and embedded in LR White resin (Hard Grade), according to (McDonald, 2014). Ultrathin sections were prepared with an ultracryomicrotome (EM UC7 Leica), and immunogold labelling was performed (O'Toole, 2010). The samples were analysed using a Tecnai 200KV electron microscope (Thermofisher Scientific), and digital acquisitions were made with a numeric camera (Oneview, Gatan).

On cell images, the Weka plugin from Fiji was used to train a model capable of recognizing gold particles. For *n* images, a mask of the particles was generated. A Fiji macro was then designed to allow the user to define the pyrenoid region and the entire cell area. The number of particles within these regions was counted, and ultimately, the ratio of particles in these areas was measured.

Photosynthetic activity

The net rate of photosynthesis was measured by the evolution of oxygen (Oxygraph; Hansatech Instruments, UK) using the Oxygen View software. Cells in exponential phase were centrifuged at 2000 g for 5 min and washed twice with the culture medium described above (20 mM MOPS, 0.4 mM KH_2PO_4, 0.6 mM K_2HPO_4, Beijerinck salts solution containing 7.5 mM NH_4Cl, 0.4 mM $MgSO_4$ and 0.34 mM $CaCl_2$ and Hutner's trace elements) at pH 6.9 or 7.9 and degassed by flushing with N_2. At pH 6.9, the ratio of $[CO_2]$ to $[HCO_3^-]$ is 0.25 according to (Dickson & Millero, 1987), and it decreases to 0.025 at pH 7.9. Cells (2 mL) were placed in the Oxygraph chamber and illuminated with 110 µmol photon m^2 s^{-1}, at 23° C. When the release of O_2 stopped, increasing amounts of sodium bicarbonate ($NaHCO_3$) were added to produce a range of DIC, from 0.012 to 2 mM. The rate of O_2 released was measured for each concentration and the data, triplicated for each condition, were fitted to a pseudo Michaelis-Menten equation using SigmaPlot v14.

$$Rate\ of\ O_2\ evolution = \frac{pseudo\ Vmax\ [DIC]}{K_{\frac{1}{2}} + [DIC]} \quad (1)$$

Differences in the proportions of CO_2 and HCO_3- at the two pH values were used to discriminate between uptake of these two forms using a model (Clement *et al.*, 2016).

$$Rate\ of\ O_2\ evolution = \alpha\ \frac{pseudo\ Vmax\ [CO_2]}{K_{\frac{1}{2}} + [CO_2]} + (1 - \alpha)\frac{pseudo\ Vmax'[HCO_3^-]}{K'_{\frac{1}{2}} + [HCO_3^-]} \quad (2)$$

The rates were normalised by the amount of chlorophyll *a*. Cells were placed in 90% of acetone, incubated for 30 min at 4°C in the dark and centrifuged for 10 min at 10,000 g at 4°C. Absorbance of the supernatant was measured at 630 nm, 647 nm and 664 nm and chlorophyll *a* quantified using the equations of (Ritchie, 2008).

Label free relative quantitative proteomics

Six biological replicates of 30 µg of extracted proteins from WT or deleted *CP12* mutants of *C. reinhardtii* grown at HC or VLC conditions were used for proteomic analysis. They were loaded onto a 12% SDS polyacrylamide gel (Bio-Rad Mini-PROTEAN system). Migration was stopped just after the samples

entered the separation gel. After staining the gel with Coomassie Blue R250, the bands containing the total proteins were cut and washed twice in a mixture of 100 mM NH_4CO_3 and CH_3CN (50/50, v/v) for 10 min at 37°C with 400 rpm agitation. The samples were then reduced with 10 mM DTT for 45 min at 56°C in the dark, followed by alkylation with a solution of 55 mM iodoacetamide for 30 min at room temperature in the dark. The bands were washed again as described above. Then, 80 µL of CH_3CN solution was added until the bands became white. After evaporation of the CH_3CN, the samples were digested with trypsin/protease Lys C (10 to 20 ng in 25 mM NH_4CO_3) overnight at 37°C. The tryptic peptides were extracted twice with 0.1% TFA in water/ CH_3CN (50/50, v/v). The supernatants containing tryptic peptides were recovered by centrifugation, pooled and dried under vacuum for 2 h, at 45 °C. About 1 µg of digested peptides from each condition was injected on a nanoliquid chromatography coupled to Q-Exactive plus mass spectrometer (Thermo Electron) as previously described in (Gérard *et al.*, 2022b) except for the nanochromatography which is a NeoVanquish system from Thermofisher and a separation of peptides on a Neopepmap C18 high pressure 15 cm column length, 20µm ID, 100A) using a similar gradient. The same Top 10 Data dependent acquisition workflow was applied. Data were processed by both Proteome Discoverer 3.0 (Thermofisher) and the computational proteomics platform MaxQuant (version 2.4.14) for protein identification and quantification as previously described in (Gérard *et al.*, 2022b) with the database of *C. reinhardtii* v5.6 extracted from Phytozome v13. Perseus software (version 1.6.15.0) was used for statistical analysis. The data were filtered to eliminate contaminants, false positives, proteins that are only identified by peptides that carry one or more modified amino acids and proteins only found in 70% of total data. LFQ (label-free quantification) intensities were transformed to logarithm base 2 (log2) to follow a normal distribution. Missing values were replaced by low values following a normal distribution. Multiple-sample tests were performed using one-way ANOVA to determine statistically significant differences between groups (FDR = 0.05). Post hoc comparisons were carried out with Tukey's HSD test to further explore pairwise group differences (FDR = 0.05). Prior to statistical analyses, Z-score normalization was applied to the data to ensure comparability across samples.

For targeted quantification of CP12, a list of CP12 tryptic peptide m/z was included in the MS/MS data acquisition program (Table S2), to focus on only CP12. The data acquired by mass spectrometry was processed on Proteome Discoverer 3.0 (Sequest HT algorithm), enabling peptides to be assigned to proteins and quantification of CP12 was performed by spectral counting based on Peptide Spectral Matches.

Results

Effect of *CP12* deletion on the amount of EPYC1

The presence of EPYC1 was evaluated in three independent mutants (Δ*CP12*-a, b and c) and in the Δ*CP12*-a mutant complemented with *CP12* (Fig. S2) from *C. reinhardtii* grown under different partial pressure of CO_2. In the wild-type (WT), the amount of EPYC1 was higher at VLC compared to HC. However, this difference was less pronounced in the mutant strains (Fig. **1a**). In the mutant Δ*CP12*-a complemented with *CP12*, the amount of EPYC1 was similar to the WT at HC (Fig. **1b**).

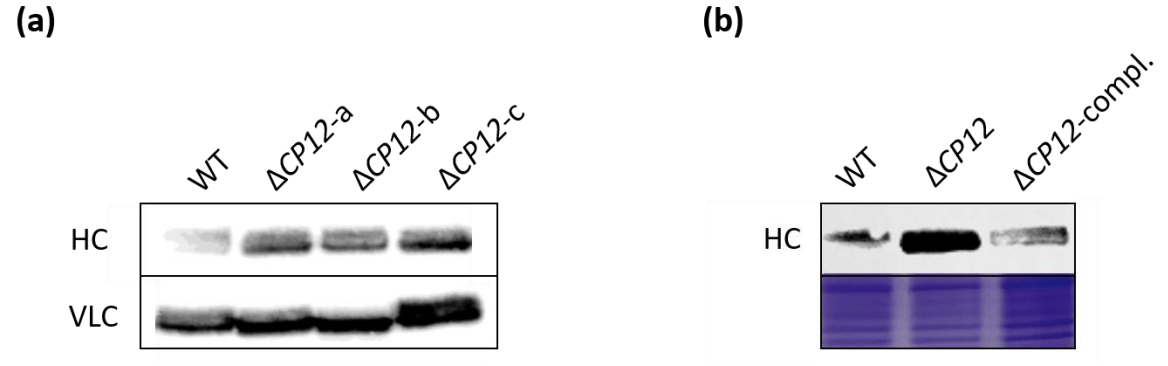


Fig. 1 Western Blot of total proteins (30 µg) extracts obtained from cells grown at HC and shifted to VLC for 24 h (a) or grown at HC (b). Δ*CP12*-a, b and c were three independent mutants and Δ*CP12*-compl. is Δ*CP12*-a complemented with *CP12*. Coomassie blue staining of 12% SDS-PAGE was used to check protein loading.

Effect of *CP12* deletion on RuBisCO location

The location of RuBisCO was investigated at HC and VLC in WT, *CP12*-deleted and complemented cells to check if it was linked to the EPYC1 amount. Transmission Electronic Microscopy (TEM) images showed that the pyrenoid of the WT was smaller and the starch sheath was less continuous when the cells were grown at HC compared to VLC. In contrast, for the Δ*CP12* cells, the size of the pyrenoid was slightly greater in HC compared to VLC and the starch sheaths were continuous in both conditions (Fig. **2a**). In WT cells grown under HC, the density of nanoparticles corresponding to RuBisCO was 6.4-fold higher inside the pyrenoid than outside. As expected, after WT cells were transferred into VLC for 24 h, the ratio between the density of RuBisCO inside and outside the pyrenoid increased to 40.0 ($p < 0.0001$). Similarly for the complemented strain Δ*CP12*-compl., this ratio increased to 28.8 ($p < 0.0001$). In contrast, for the Δ*CP12* strain grown at HC, RuBisCO was localized inside the pyrenoid and the ratio between inside and outside the pyrenoid was higher than for WT cells grown at HC (15.1 vs 6.4, $p < 0.0001$). The shift from HC to VLC did not affect the location of RuBisCO in Δ*CP12* mutant cells ($p > 0.05$) (Fig. **2b**).

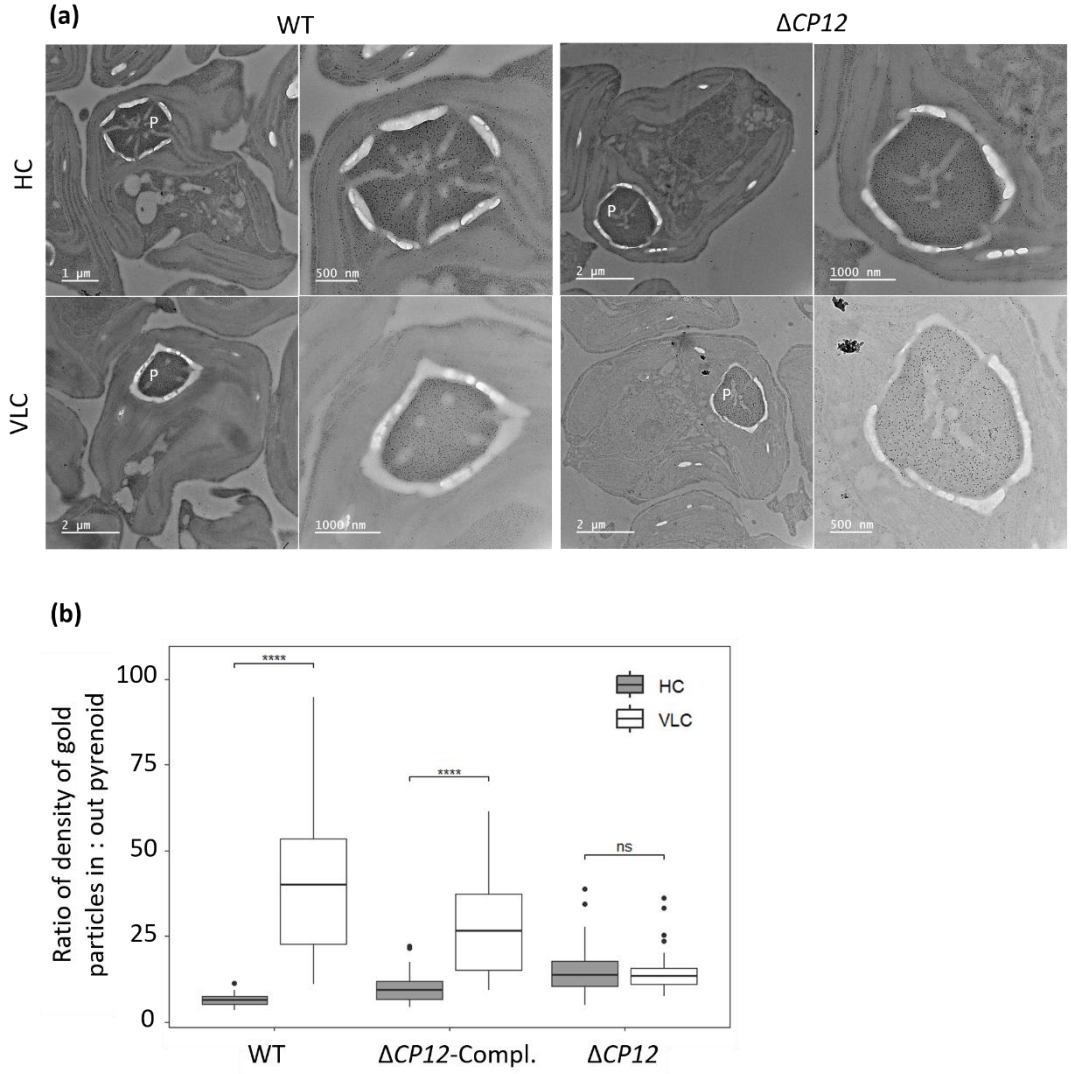


Fig. 2 Pyrenoid morphology and RuBisCO density at HC and VLC in the WT, Δ*CP12*-compl. and Δ*CP12* mutants. (a) TEM images of immunogold labelled RuBisCO, black dots are immunogold labelling (Primary antibody RuBisCO and secondary Aurion Protein G conjugated to 10 nm gold particles) and the starch sheath appears white. (b) Ratio of the density of gold particles inside and outside the pyrenoid. The statistical significance was computed by t-tests (ns, $p > 0.05$ and ****, $p < 0.0001$). The lower and upper hinges correspond to the first and third quartiles. The upper and lower whiskers extend from the hinge to 1.5 times the inter-quartile range. Data beyond the end of the whiskers (outsiders) are plotted individually (n averages 53 and ranges from 35 to 61). HC: High CO_2, VLC: Very low CO_2, P: Pyrenoid.

CCM activation upon transition from HC to VLC in WT and Δ*CP12* strains

Since EPYC1 was more abundant at HC in the mutant Δ*CP12* compared to the WT, other well-known CCM components (*The Chlamydomonas Sourcebook*, 2023) were quantified using label-free relative

quantitative proteomics. Upon transition from HC to VLC, the abundance of many proteins (291 proteins for WT and 152 proteins for Δ*CP12*) was significantly altered (Table S3). Proteins known to be markers of the CCM were more abundant under VLC compared to HC in WT and Δ*CP12* strains, except HLA8 protein for the mutant (Fig. 3 and Fig. S3).

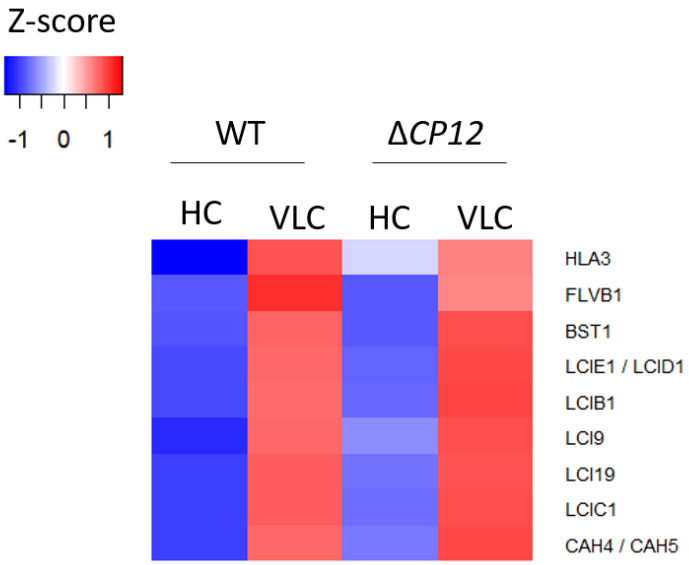


Fig. 3 Heatmap based on Z-score displaying the CCM proteins differently expressed under HC and VLC for WT and Δ*CP12* strains. The intensity of the colour represents the magnitude of the Z-score (from -1 to 1). CAH: carbonic anhydrase, LCI: low-CO_2 inducible protein, HLA: high light-activated, FLVB: thylakoid flavodiiron protein B, BST: bestrophin. Results are based on six biological replicates.

To evaluate if the amount of CP12 is responding to CO_2 conditions, targeted proteomic on CP12 was performed on WT cells. The peptide spectral match (PSM) did not change significantly in cells acclimated to HC or VLC (Fig. S4).

Effect of *CP12* deletion on the parameters of inorganic carbon acquisition

The rates of photosynthesis of *C. reinhardtii* grown under HC or VLC in response to dissolved inorganic carbon (DIC) were measured at pH 6.9 and pH 7.9 (**Fig. 4**). For WT *C. reinhardtii*, the pseudo-V_{max} was the same at HC and VLC but the $K_{1/2}$ for DIC was lower at VLC (Table 1). $K_{1/2}$ decreased by a factor of almost two at pH 6.9 and 7.9 values. At HC, the pseudo-V_{max} was unchanged significantly between WT and Δ*CP12* strains at different pH values, while $K_{1/2}$ at pH 7.9 was significantly 2-fold higher ($p<0.05$) for Δ*CP12* compared to WT. Slopes at both pH values were significantly different: 1.9-fold higher at pH 6.9 ($p<0.05$) and 1.8-fold higher at pH 7.9 ($p<0.001$) for the Δ*CP12* compared to the WT (Table 1). For the

culture grown under VLC, except the $K_{1/2}$ measured at 6.9 which was 1.5-fold lower in the Δ*CP12* compared to the WT, other kinetic parameters were not significantly different. A Fisher test showed that the overall responses of the two strains were different under HC ($p < 0.01$) but not under VLC. To further analyse this difference at HC, kinetic parameters were also modelled as a function of CO_2 and HCO_3^- concentration and the $K_{1/2}$ for HCO_3^- decreased from 84.0 µM for the WT to 0.1 µM for the Δ*CP12* (**Table S3**).

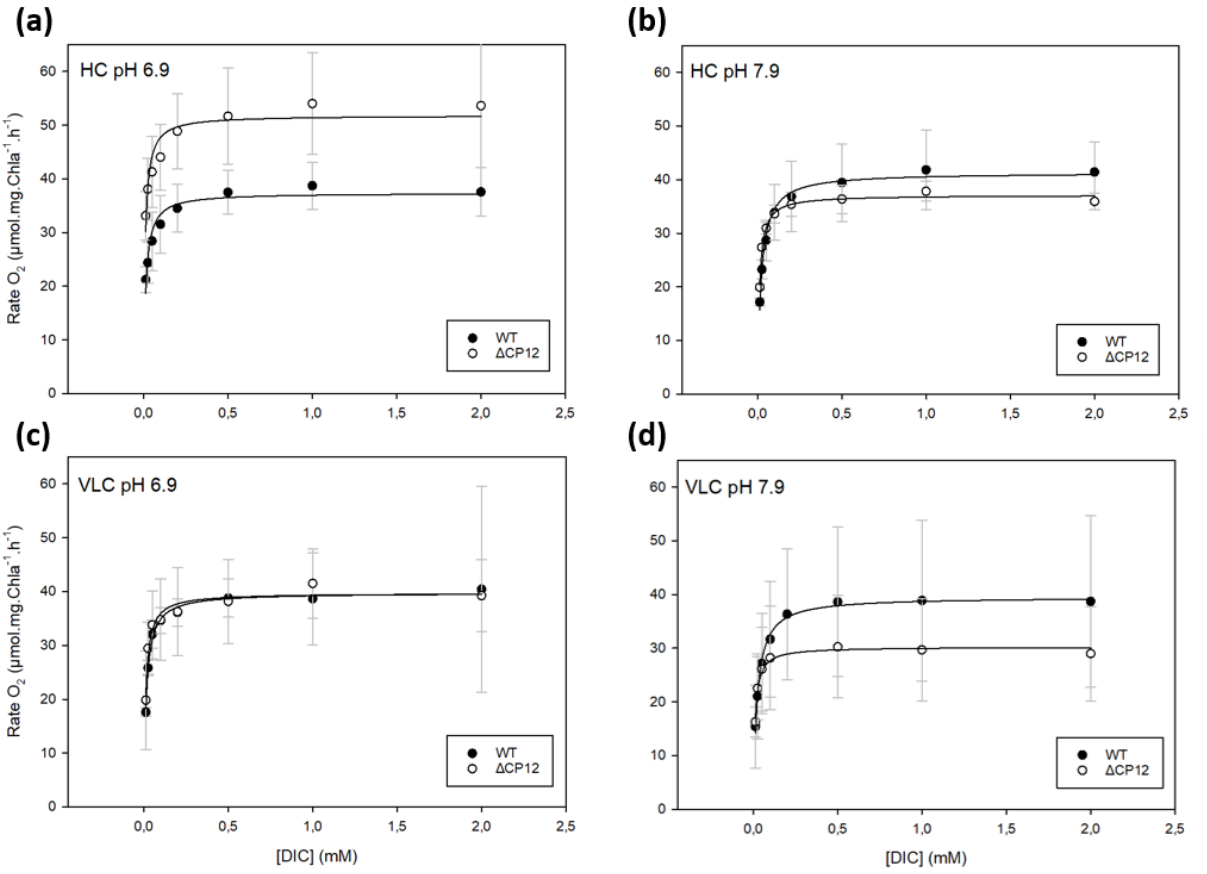


Fig. 4 Rate of net photosynthesis at pH 6.9 and at pH 7.9 grown at HC (a and b) and after switching to VLC (c and d) for the WT (black circles) and the mutant Δ*CP12* (empty circles) strains (n=3). The experimental data were fitted to a Michaelis–Menten equation (equation 1).

Table 1 Kinetics of photosynthesis of WT and Δ*CP12* strains grown at HC or VLC from fitting the data in Fig. 4 to equation 1. Values are the mean of three technical replicates with standard deviation in parentheses. $K_{1/2}$ is the half-saturation concentration of dissolved inorganic carbon. Pseudo-V_{max} is the maximum rate of net photosynthesis, the slope is the ratio of pseudo-V_{max} to $K_{1/2}$. The statistical significance of the difference between the Δ*CP12* and the WT cells grown under the same conditions are computed by t-tests. ns, $p \geq 0.05$; *, $p < 0.05$; **, $p < 0.01$; ***, $p < 0.001$. n=3.

		pseudo-V_{max} (µmol O_2 mg^{-1} Chla h^{-1})		$K_{1/2}$ (µM)		Slope (µmol O_2 mg^{-1} Chla h^{-1} mM^{-1})	
CO_2	pH	WT	Δ*CP12*	WT	Δ*CP12*	WT	Δ*CP12*
HC	6.9	37.7 (4.5)	52.0 (8.7) ^{ns}	26 (7)	18 (3) ^{ns}	1556 (521)	2970 (446) *
HC	7.9	41.0 (6.9)	36.6 (2.1) ^{ns}	38 (7)	19 (2) *	1093 (68)	1967 (136) ***
VLC	6.9	39.3 (4.7)	40.0 (5.3) ^{ns}	14 (5)	9 (6) *	2882 (583)	6122 (4143) ^{ns}
VLC	7.9	40 (15.1)	30.3 (10.2) ^{ns}	22 (10)	9 (4) ^{ns}	1933 (925)	3612 (1187) ^{ns}

RuBP and PRK quantification

A lower amount of PRK in Δ*CP12* compared to WT strain in *C. reinhardtii* has been reported (Gérard *et al.*, 2022b). In the complemented strain, the amount of PRK was not restored to the level of the WT and remained the same as in the Δ*CP12* (Fig. 5a). The amount of the PRK product, RuBP, is lower in Δ*CP12* than in the WT (78.7 vs 152.2 pmol per mg of dry weight) (Fig. 5b). The amount of RuBP in the complemented strain was 69.6 pmol per mg of dry weight, similar to that of Δ*CP12* and consistent with the amount of PRK.

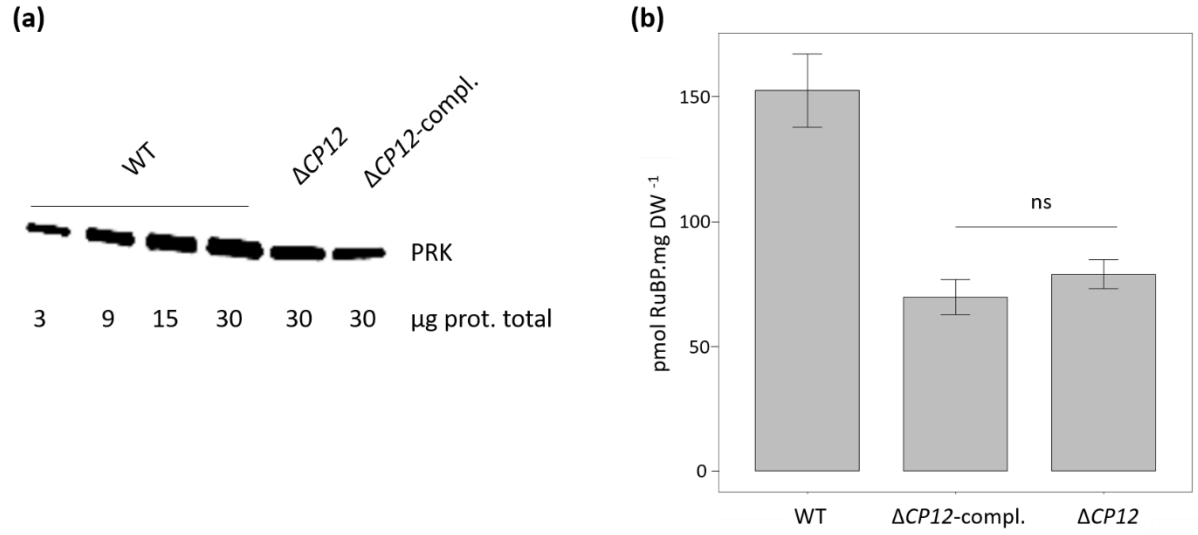


Fig. 5 Amount of PRK and RuBP in the WT, Δ*CP12*-compl. and Δ*CP12* strains. (a) Western Blot of total proteins extracts obtained from cells grown at HC. (b) The amounts of RuBP quantified by LC-MS/MS from WT, Δ*CP12*-compl. and mutant Δ*CP12* grown at HC. RuBP levels are mean values ± standard deviations from three replicates.

Discussion

C. reinhardtii is the traditional model for CCM and pyrenoid studies and its CCM components have been well described (Mackinder, 2018). The CCM can involve several bicarbonate transporters (Duanmu et al., 2009a) and carbonic anhydrase (Duanmu et al., 2009b; Kasili et al., 2023) that together lead to the transport of inorganic carbon towards to the pyrenoid and concentrate CO_2 at the active site of RuBisCO. RuBisCO can occur both in the stroma and the pyrenoid and at VLC, it is mostly present in the pyrenoid (Borkhsenious *et al.*, 1998). As a consequence of these changes, the $K_{1/2}$ for DIC decreases from HC to VLC and its value at VLC is around 20 µM (Borkhsenious *et al.*, 1998; Yamano *et al.*, 2015) and less than 10 µM (Findinier *et al.*, 2024). These values were confirmed here for the WT with the $K_{1/2}$ of DIC that decreases to 14-22 µM on transfer from HC to VLC. Most of the CCM components were more abundant at VLC compared to HC and RuBisCO relocates into the pyrenoid. The *CP12* deletion mutant strain was able to use HCO_3^- and CO_2 at HC but had a lower $K_{1/2}$ for HCO_3^- while the WT had a lower $K_{1/2}$ for CO_2. To shed light on the function of CP12 on the adaptation to HC or VLC, the amount of CP12 protein in these two conditions were probed and did not change significantly. This is consistent with transcriptomic data upon transition from HC to VLC (Fang *et al.*, 2012).

Deletion of *CP12* did not prevent the induction of the CCM at VLC. Compared to HC, VLC triggers, for both WT and Δ*CP12*, the increase of hallmarks of CCM induction in VLC: HLA3 and the complex LCIB/C. The amount of CAH3 also increases in VLC albeit not significantly. Other proteins are also in a higher amount including bicarbonate transporter BST and carbonic anhydrases CAH4 and CAH5. HLA3 works cooperatively with LCIA, but the latter was not found in our proteomics data in any conditions (Wang *et al.*, 2015; Yamano *et al.*, 2015; Mackinder, 2018).

Unexpectedly, at HC, the absence of CP12 induced an increase of EPYC1, the scaffold protein of RuBisCO in the pyrenoid (Gérard *et al.*, 2022b). Here we showed that in these conditions, RuBisCO was already condensed in the pyrenoid and this is consistent with the increase of the "molecular glue", EPYC1 (Santhanagopalan *et al.*, 2021). Moreover, at HC in Δ*CP12* strain, a $K_{1/2}$ for DIC was similar to typical VLC values. As a result of the comparison between WT and Δ*CP12* at HC, it appears that this low $K_{1/2}$ is a consequence of a greater amount of EPYC1 and RuBisCO located in the pyrenoid, rather than to a large increase in the amount of bicarbonate transporters and carbonic anhydrase. For the first time, the lack of correlation between RuBisCO condensation in the pyrenoid and the induction of other CCM component was observed in Δ*CP12* strain at HC. These experimental data are in line with the theoretical modelling of contribution of different CCM components in *C. reinhardtii* (Fei *et al.*, 2022b).

The question remains, however, how inorganic carbon is transported to the pyrenoid, and how this is energised when CCM components are not induced. The complete re-routing of the *C. reinhardtii* metabolism in the Δ*CP12* strain observed previously at HC (Gérard *et al.*, 2022b) could contribute to this adaptation.

The large increase in mitochondrial carbonic anhydrase CAH4,5 that we observed has been suggested as an important cross-compartment coordination between mitochondria and chloroplasts (Burlacot & Peltier, 2023; Wang *et al.*, 2023a; Findinier *et al.*, 2024). Moreover, the induction of CCM induced a mitochondrial relocation (Findinier *et al.*, 2024) that is absent in a deficient *prk* mutant strain (Boisset *et al.*, 2023).

Interestingly, the absence of CP12 led to a decrease in PRK that resulted in a reduction of RuBP concentration but this did not alter the phenotype. This is in line with previous studies that indicated that a reduction of PRK amount or activity is not detrimental to photosynthetic growth (Paul *et al.*, 1995; Boisset *et al.*, 2023). The amount of CP12 present in the complemented strain did not reach the WT level (Fig. S2) and appears insufficient to stabilize PRK and to restore RuBP levels. The stabilisation of PRK by CP12 has been proposed in *A. thaliana* (López-Calcagno *et al.*, 2017) and was supported by previous studies in *C. reinhardtii* (Gérard *et al.*, 2022b; Teh *et al.*, 2023). We initially hypothesised that a decrease of RuBP might induce a RuBisCO condensation in the pyrenoid, as does a decrease of CO_2. However, the amounts of EPYC1 and RuBP change differently in response to the amount of CP12. In the complemented strain, even though RuBP was lower than the WT, the EPYC1 level and the RuBisCO location were the same as the WT, ruling out this hypothesis. CP12 is involved in the CCM by maintaining a low level of EPYC1 at HC while the absence of CP12 results in a compensation response and an increase of EPYC1. This is therefore a new indirect functional interaction between CP12 and EPYC1 affecting the CCM. Interestingly, CP12 is not uniformly distributed in the chloroplast and forms punctate structures (Wang *et al.*, 2023b) and their functions are still enigmatic. CP12 is an intrinsically disordered protein (IDP), like EPYC1. IDPs have multiple functions hence they are referred to moonlighting proteins. In this study, we showed that beside this function, it also has a role in regulating carbon acquisition and assimilation.

Acknowledgments

The technical service of the Institut de Microbiologie de la Méditerranée is thanks for their precious helps: Jean-Michel Kaplansky, Alain Grossi, Evangelos Ailamakis, Gilles Kaczmarek. ES. J. research was supported by the National Research Foundation (NRF) funded by the Korean government (MSIT) RS-2024-00458958. C.G., A. L., B. G. and H.L. research was funding by the CNRS and by fundings from the

Agence National de la Recheche ANR-22-CE44-0031 and ANR-22-PEBB-0002, as well as from the FEBS excellence award LAUNAY-2021. C. G. is founded by Aix-Marseille University.

Supplementary materials

Supplementary materials are compiled in a separate pdf file that includes: **Table S1:** List of primers used for genomic PCR; **Fig. S1:** Details of the molecular biology used for the generation of *CP12*-complemented transgenic strain; **Fig. S2:** Quantification of CP12 in WT, ΔCP12 and ΔCP12-comp strains; **Table S2**: List of CP12 peptides used for the quantification of CP12; **Fig. S3:** Heatmap of fold change of selected protein amount from HC to VLC for WT and ΔCP12 strains; **Fig. S4:** Quantification of CP12 in WT acclimated to HC and VLC; **Table S3** Modelled kinetics of CO_2-dependent and HCO_3^--dependent photosynthesis by WT and Δ*CP12* strains grown at HC.

References

Andersson I, Backlund A. 2008. Structure and function of Rubisco. *Plant Physiology and Biochemistry* **46**: 275–291.

Atkinson N, Feike D, Mackinder LCM, Meyer MT, Griffiths H, Jonikas MC, Smith AM, McCormick AJ. 2016. Introducing an algal carbon-concentrating mechanism into higher plants: location and incorporation of key components. *Plant Biotechnology Journal* **14**: 1302–1315.

Avilan L, Gontero B, Lebreton S, Ricard J. 1997. Memory and Imprinting Effects in Multienzyme Complexes. *European Journal of Biochemistry* **246**: 78–84.

Bassham JA, Benson AA, Calvin M. 1950. The path of carbon in photosynthesis. *The Journal of Biological Chemistry* **185**: 781–787.

Boisset ND, Favoino G, Meloni M, Jomat L, Cassier-Chauvat C, Zaffagnini M, Lemaire SD, Crozet P. 2023. Phosphoribulokinase abundance is not limiting the Calvin-Benson-Bassham cycle in Chlamydomonas reinhardtii. *Frontiers in Plant Science* **14**.

Borkhsenious ON, Mason CB, Moroney JV. 1998. The intracellular localization of ribulose-1,5-bisphosphate Carboxylase/Oxygenase in chlamydomonas reinhardtii. *Plant Physiology* **116**: 1585–1591.

Bowes G, Ogren WL. 1972. Oxygen inhibition and other properties of soybean ribulose 1,5-diphosphate carboxylase. *The Journal of Biological Chemistry* **247**: 2171–2176.

Bradford MM. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* **72**: 248–254.

Burlacot A, Peltier G. 2023. Energy crosstalk between photosynthesis and the algal CO2-concentrating mechanisms. *Trends in Plant Science* **28**: 795–807.

Clement R, Dimnet L, Maberly SC, Gontero B. 2016. The nature of the CO2-concentrating mechanisms in a marine diatom, Thalassiosira pseudonana. *The New Phytologist* **209**: 1417–1427.

Dickson AG, Millero FJ. 1987. A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media. *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers* **34**: 1733–1743.

Duanmu D, Miller AR, Horken KM, Weeks DP, Spalding MH. 2009a. Knockdown of limiting-CO_2–induced gene HLA_3 decreases HCO_3– transport and photosynthetic Ci affinity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **106**: 5990–5995.

Duanmu D, Wang Y, Spalding MH. 2009b. Thylakoid lumen carbonic anhydrase (CAH3) mutation suppresses air-Dier phenotype of LCIB mutant in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Physiology* **149**: 929–937.

Erales J, Mekhalfi M, Woudstra M, Gontero B. 2011. Molecular mechanism of NADPH-glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase regulation through the C-terminus of CP12 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry* **50**: 2881–2888.

Fang W, Si Y, Douglass S, Casero D, Merchant SS, Pellegrini M, Ladunga I, Liu P, Spalding MH. 2012. Transcriptome-Wide Changes in Chlamydomonas reinhardtii Gene Expression Regulated by Carbon Dioxide and the CO2-Concentrating Mechanism Regulator CIA5/CCM1. *The Plant Cell* **24**: 1876–1893.

Fei C, Wilson AT, Mangan NM, Wingreen NS, Jonikas MC. 2022a. Modelling the pyrenoid-based CO_2-concentrating mechanism provides insights into its operating principles and a roadmap for its engineering into crops. *Nature Plants* **8**: 583–595.

Fei C, Wilson AT, Mangan NM, Wingreen NS, Jonikas MC. 2022b. Modelling the pyrenoid-based CO2-concentrating mechanism provides insights into its operating principles and a roadmap for its engineering into crops. *Nature Plants* **8**: 583–595.

Findinier J, Joubert L-M, Schmid MF, Malkovskiy A, Chiu W, Burlacot A, Grossman AR. 2024. Dramatic Changes in Mitochondrial Subcellular Location and Morphology Accompany Activation of the CO2 Concentrating Mechanism. : 2024.03.25.586705.

Gérard C, Carrière F, Receveur-Bréchot V, Launay H, Gontero B. 2022a. A trajectory of discovery: metabolic regulation by the conditionally disordered chloroplast protein, CP12. *Biomolecules* **12**: 1047.

Gérard C, Lebrun R, Lemesle E, Avilan L, Chang KS, Jin E, Carrière F, Gontero B, Launay H. 2022b. Reduction in phosphoribulokinase amount and re-routing metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* CP12 mutants. *International Journal of Molecular Sciences* **23**: 2710.

Giordano M, Beardall J, Raven JA. 2005. CO_2 concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annual Review of Plant Biology* **56**: 99–131.

Gontero B, Maberly SC. 2012. An intrinsically disordered protein, CP12: jack of all trades and master of the Calvin cycle. *Biochemical Society Transactions* **40**: 995–999.

Graciet E, Lebreton S, Camadro J-M, Gontero B. 2003. Characterization of native and recombinant A4 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Kinetic evidence for confromation changes upon association with the small protein CP12. *European Journal of Biochemistry* **270**: 129–136.

Guérard F, Pétriacq P, Gakière B, Tcherkez G. 2011. Liquid chromatography/time-of-flight mass spectrometry for the analysis of plant samples: a method for simultaneous screening of common

cofactors or nucleotides and application to an engineered plant line. *Plant physiology and biochemistry: PPB* **49**: 1117–1125.

He S, Chou H-T, Matthies D, Wunder T, Meyer MT, Atkinson N, Martinez-Sanchez A, Jeffrey PD, Port SA, Patena W, *et al.* 2020. The structural basis of RuBisCO phase separation in the pyrenoid. *Nature Plants* **6**: 1480–1490.

He S, Crans VL, Jonikas MC. 2023. The pyrenoid: the eukaryotic CO2-concentrating organelle. *The Plant Cell* **35**: 3236–3259.

Hutner SH, Provasoli L, Schatz A, Haskins CP. 1950. Some Approaches to the Study of the Role of Metals in the Metabolism of Microorganisms. *Proceedings of the American Philosophical Society* **94**: 152–170.

Kaplan A, Reinhold L. 1999. CO_2 concentrating mechanisms in photosynthetic microorganisms. *Annual Review of Plant Physiology and Plant Molecular Biology* **50**: 539–570.

Kasili RW, Rai AK, Moroney JV. 2023. LCIB functions as a carbonic anhydrase: evidence from yeast and Arabidopsis carbonic anhydrase knockout mutants. *Photosynthesis Research* **156**: 193–204.

Kim J, Kwak HS, Sim SJ, Jin E. 2019. Overexpression of malic enzyme isoform 2 in Chlamydomonas reinhardtii PTS42 increases lipid production. *Bioresource Technology Reports* **7**: 100239.

Launay H, Shao H, Bornet O, Cantrelle F-X, Lebrun R, Receveur-Brechot V, Gontero B. 2021. Flexibility of Oxidized and Reduced States of the Chloroplast Regulatory Protein CP12 in Isolation and in Cell Extracts. *Biomolecules* **11**: 701.

Lebreton S, Graciet E, Gontero B. 2003. Modulation, via protein-protein interactions, of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity through redox phosphoribulokinase regulation. *The Journal of Biological Chemistry* **278**: 12078–12084.

Long BM, Matsuda Y, Moroney JV. 2024. Algal chloroplast pyrenoids: Evidence for convergent evolution. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **121**: e2402546121.

López-Calcagno PE, Omar Abuzaid A, Lawson T, Anne Raines C. 2017. Arabidopsis CP12 mutants have reduced levels of phosphoribulokinase and impaired function of the Calvin-Benson cycle. *Journal of Experimental Botany* **68**: 2285–2298.

Lucius S, Theune M, Arrivault S, Hildebrandt S, Mullineaux CW, Gutekunst K, Hagemann M. 2022. CP12 fine-tunes the Calvin-Benson cycle and carbohydrate metabolism in cyanobacteria. *Frontiers in Plant Science* **13**.

Mackinder LCM. 2018. The Chlamydomonas CO2-concentrating mechanism and its potential for engineering photosynthesis in plants. *New Phytologist* **217**: 54–61.

Mackinder LCM, Meyer MT, Mettler-Altmann T, Chen VK, Mitchell MC, Caspari O, Freeman Rosenzweig ES, Pallesen L, Reeves G, Itakura A, *et al.* 2016. A repeat protein links Rubisco to form the eukaryotic carbon-concentrating organelle. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **113**: 5958–5963.

Marri L, Zaffagnini M, Collin V, Issakidis-Bourguet E, Lemaire SD, Pupillo P, Sparla F, Miginiac-Maslow M, Trost P. 2009. Prompt and easy activation by specific thioredoxins of Calvin cycle enzymes of *Arabidopsis thaliana* associated in the GAPDH/CP12/PRK supramolecular complex. *Molecular Plant* **2**: 259–269.

McDonald KL. 2014. Rapid embedding methods into epoxy and LR White resins for morphological and immunological analysis of cryofixed biological specimens. *Microscopy and Microanalysis: The Official Journal of Microscopy Society of America, Microbeam Analysis Society, Microscopical Society of Canada* **20**: 152–163.

Meyer MT. 2022. Rubisco Microcompartments: The Function of Carboxysomes and Pyrenoids in Aquatic CO 2-Concentrating Mechanisms. In: Blue Planet, Red and Green Photosynthesis. John Wiley & Sons, Ltd, 197–224.

Moroney JV, Ynalvez RA. 2007. Proposed Carbon Dioxide Concentrating Mechanism in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryotic Cell* **6**: 1251–1259.

Neofotis P, Temple J, Tessmer OL, Bibik J, Norris N, Pollner E, Lucker B, Weraduwage SM, Withrow A, Sears B, *et al.* 2021. The induction of pyrenoid synthesis by hyperoxia and its implications for the natural diversity of photosynthetic responses in Chlamydomonas. *eLife* **10**: e67565.

Oesterhelt C, Klocke S, Holtgrefe S, Linke V, Weber APM, Scheibe R. 2007. Redox regulation of chloroplast enzymes in *Galdieria sulphuraria* in view of eukaryotic evolution. *Plant & Cell Physiology* **48**: 1359–1373.

O'Toole ET. 2010. Chlamydomonas cryopreparation methods for the 3-D analysis of cellular organelles. *Methods in Cell Biology* **96**: 71–91.

Paul MJ, Knight JS, Habash D, Parry MAJ, Lawlor DW, Barnes SA, Loynes A, Gray JC. 1995. Reduction in phosphoribulokinase activity by antisense RNA in transgenic tobacco: effect on CO2 assimilation and growth in low irradiance. *The Plant Journal* **7**: 535–542.

Rae BD, Long BM, Badger MR, Price GD. 2013. Functions, compositions, and evolution of the two types of carboxysomes: polyhedral microcompartments that facilitate CO2 fixation in cyanobacteria and some proteobacteria. *Microbiology and molecular biology reviews: MMBR* **77**: 357–379.

Ritchie RJ. 2008. Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents. *Photosynthetica* **46**: 115–126.

Saint-Sorny M, Brzezowski P, Arrivault S, Alric J, Johnson X. 2022. Interactions Between Carbon Metabolism and Photosynthetic Electron Transport in a Chlamydomonas reinhardtii Mutant Without CO2 Fixation by RuBisCO. *Frontiers in Plant Science* **13**: 876439.

Santhanagopalan I, Wong R, Mathur T, Griffiths H. 2021. Orchestral manoeuvres in the light: crosstalk needed for regulation of the Chlamydomonas carbon concentration mechanism. *Journal of Experimental Botany* **72**: 4604–4624.

Seo S, Jeon H, Hwang S, Jin E, Chang KS. 2015. Development of a new constitutive expression system for the transformation of the diatom Phaeodactylum tricornutum. *Algal Research* **11**: 50–54.

Teh JT, Leitz V, Holzer VJC, Neusius D, Marino G, Meitzel T, García-Cerdán JG, Dent RM, Niyogi KK, Geigenberger P, *et al.* 2023. NTRC regulates CP12 to activate Calvin–Benson cycle during cold acclimation. *Proceedings of the National Academy of Sciences* **120**: e2306338120.

The Chlamydomonas Sourcebook. 2023.

554 Wang L, Patena W, Van Baalen KA, Xie Y, Singer ER, Gavrilenko S, Warren-Williams M, Han L, Harrigan HR,
555 Hartz LD, *et al.* 2023a. A chloroplast protein atlas reveals punctate structures and spatial organization
556 of biosynthetic pathways. *Cell* 186: 3499-3518.e14.

557 Wang L, Patena W, Van Baalen KA, Xie Y, Singer ER, Gavrilenko S, Warren-Williams M, Han L, Harrigan HR,
558 Hartz LD, *et al.* 2023b. A chloroplast protein atlas reveals punctate structures and spatial organization
559 of biosynthetic pathways. *Cell* 186: 3499-3518.e14.

560 Wang Y, Stessman DJ, Spalding MH. 2015. The CO_2 concentrating mechanism and photosynthetic
561 carbon assimilation in limiting CO2 : how Chlamydomonas works against the gradient. *The Plant*
562 *Journal: For Cell and Molecular Biology* 82: 429–448.

563 Wedel N, Soll J, Paap BK. 1997. CP12 provides a new mode of light regulation of Calvin cycle activity in
564 higher plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:
565 10479–10484.

566 Yamano T, Sato E, Iguchi H, Fukuda Y, Fukuzawa H. 2015. Characterization of cooperative bicarbonate
567 uptake into chloroplast stroma in the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proceedings of the*
568 *National Academy of Sciences* 112: 7315–7320.

569

Effects of CP12 on inorganic carbon acquisition and assimilation in *Chlamydomonas reinhardtii*

Cassy Gérard[1], Régine Lebrun[2], Christophe Verthuy[2], Hugo Le Guenno[3], Artemis Kosta[3], Florence Guérard[4], Bertrand Gakière[4], EonSeon Jin[5], Kwang Suk Chang[5], Luisana Avilan[1], Stephen Maberly[6], Brigitte Gontero[1*], Hélène Launay[1*]

Supplementary materials

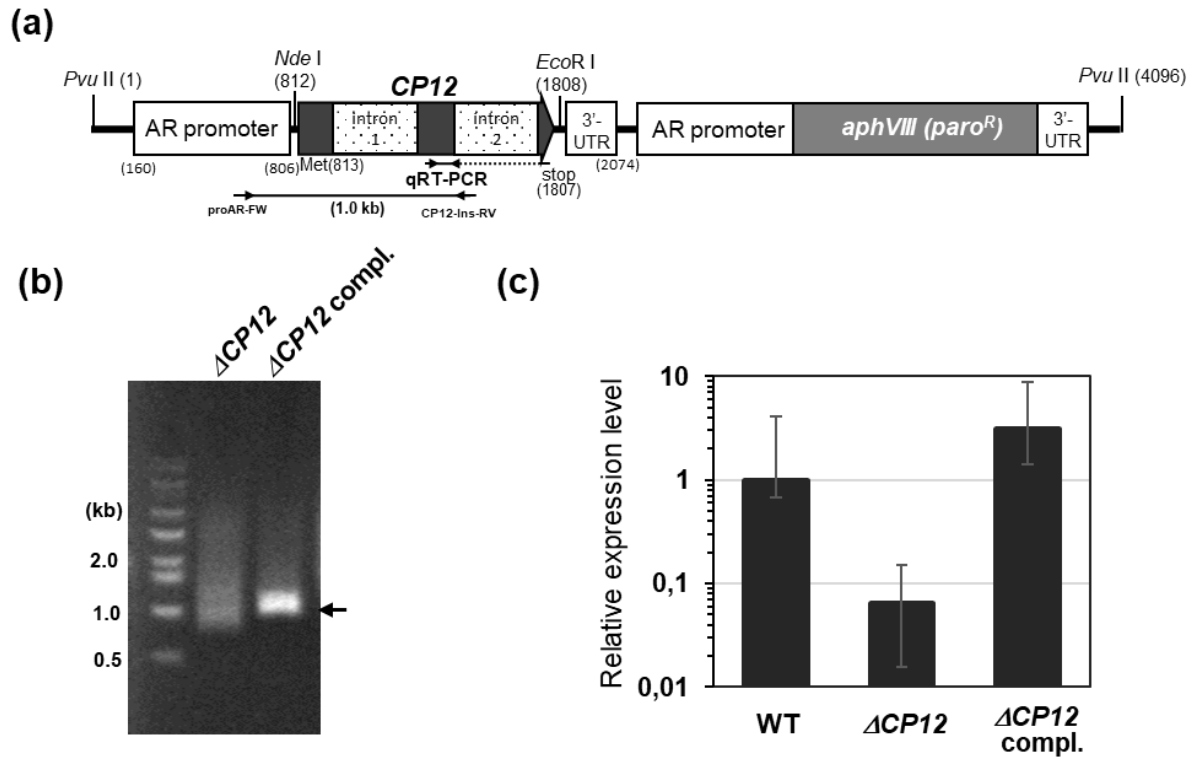
Table S1. List of primers used for genomic PCR and quantitative real-time PCR in CrCP12 gene.

Genomic PCR analysis

PCR for genomic DNA of CrCP12	CP12-NdeI-FW	5′-caggatgcatATGCAGCCCGCTGCGAG -3′
	CP12-EcoRI-RV	5′-ccagaattcTTAATCCTCGTAGACGCT -3′
PCR of exogenous proAR::CrCP12	proAR-FW	5′- CTTATCCGGAAGCCCCCTGG -3′
	CP12_Ins-RV	5′- GCAGAGCGACAATTCAGGCC -3′

Quantitative real-time PCR

CrCP12	CP12-qRT-FW	5′- GCTGTCTCGCACAAGAAGGA -3′
	CP12-qRT-RV	5′- TTAATCCTCGTAGACGCGGC -3′
RACK1 (internal reference gene)	CrRACK1-qRT-FW	5′-GGCTGGGACAAGATGGTCAA-3′
	CrRACK1-qRT-RV	5′-GAGAAGCACAGGCAGTGGAT-3′



14

15 **Fig. S1** Generation of *CP12*-complemented transgenic strain and analysis of the genomic and
16 transcriptional expression levels of *CP12*. (a) Schematic map of the *CrCP12* overexpression cassette for
17 transformation into the *CP12* knockout mutant (Δ*CP12*). The genomic sequence *CP12* (Cre08.g380250)
18 of *C. reinhardtii*. Black and dotted boxes indicate the translated region and the intron sequence,
19 respectively. The underline indicates the genomic PCR with specific primers adjacent to the AR promoter
20 and *CP12* gene. The cassette contains a DNA fragment of the *aph8* gene expression cassette for
21 paromomycin selection. (b) Genomic PCR of the Δ*CP12* mutant and complemented strain. To confirm
22 *CP12*-complemented transgenic strain, cells were subjected to genomic PCR with specific primers
23 (proAR-FW and CP12-Ins-RV). Arrow shows the obtained amplicon (c) Relative mRNA quantity of *CP12*
24 in wild type (WT), Δ*CP12* mutant, and transgenic complemented *CP12* strain. Error bars represent the
25 mean value from three independent experiments.

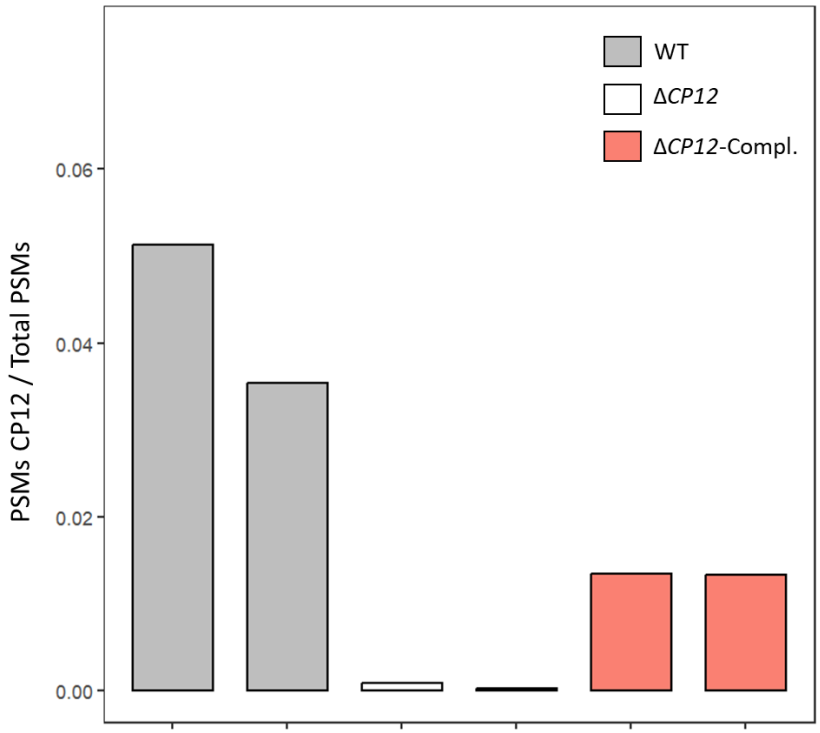


Fig. S2 Peptide Spectral Match (PSM) corresponding to m/z list of tryptic peptides of CP12 (Supplementary Table 2). Protein extracts of 30 µg were obtained from cultures of WT, Δ*CP12*, complemented Δ*CP12* strains (duplicates) harvested in exponential phase at HC. PSMs of CP12 were obtained with a targeted acquisition and targeted data analysis by mass spectrometry and divided by the total PSMs.

Table S2. List of m/z and charge state (CS) of tryptic peptides of CP12 included in the MS/MS data acquisition programme for targeted quantification of CP12.

Mass [m/z]	CS [z]
496,1929	2
524,7036	2
550,2907	2
614,3382	2
738,8536	2
749,2935	2
761,8765	2
767,3643	2
777,8043	2
790,3872	2
802,901	2
831,4118	2
934,5154	2

968,4902	2
997,0009	2
1032,5377	2
1061,0484	2
1174,0471	2
1202,5579	2
1238,0946	2
1248,0568	2
1266,6053	2
1305,0783	2
1444,7083	2
1454,6706	2
1473,2191	2
1501,1575	2
1511,692	2
1558,1789	2
1582,7109	2
1639,7324	2
1646,7584	2
1703,7799	2
1902,8881	2
1959,9096	2
492,9048	3
499,8648	3
508,2534	3
511,9119	3
518,8719	3
527,2606	3
535,6031	3
554,6103	3
623,346	3
645,9959	3
665,003	3
688,6942	3
707,7014	3
783,0338	3
802,041	3
825,7322	3
832,3737	3
844,7393	3
870,388	3
963,4746	3
970,1161	3

982,4818	3
1001,1074	3
1008,1304	3
1039,1217	3
1055,4764	3
1093,4907	3
1098,1747	3
1136,189	3
1268,9279	3
1306,9422	3
498,996825	4
516,7652	4
531,020575	4
587,519925	4
601,7753	4
619,543675	4
624,524775	4
633,79905	4
653,035525	4
722,850525	4
727,83165	4
737,1059	4
751,0751	4
756,342375	4
779,585825	4
791,851825	4
820,362575	4
823,875575	4
852,3863	4
951,940425	4
980,451175	4

35

36

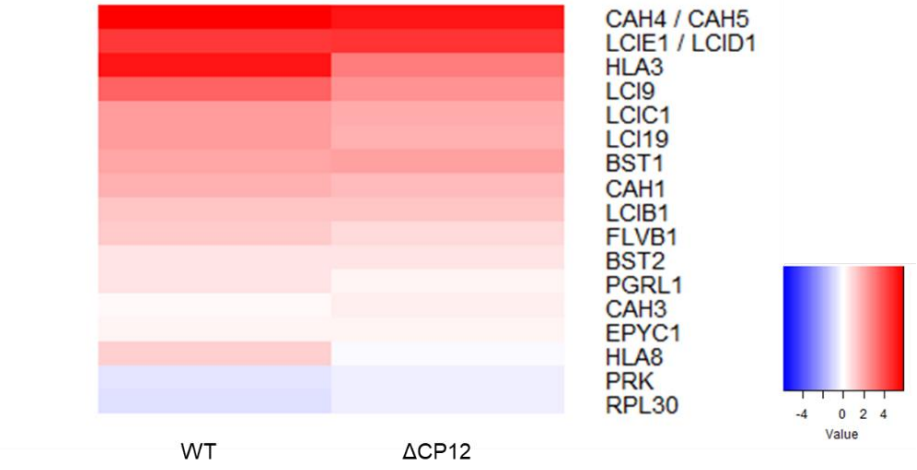


Fig. S3 Heatmap based on log2 transformed fold change of protein amount from HC to VLC for WT and ΔCP12 strains. Proteins fold change was obtained using t-tests comparing HC and VLC conditions for each strain. An FDR (false positive rate) threshold of 5% based on 250 permutations and a fudge factor (s0) of 0.1 were applied. CAH: carbonic anhydrase, LCI: low-CO_2 inducible protein, HLA: high light-activated, PGRL: proton-gradient related-like, FLVB: thylakoid flavodiiron protein B, BST: bestrophin, EPYC1: Essential Pyrenoid Component 1, PRK: phosphoribulokinase, RPL30: Ribosomal Protein L30. Results are based on six biological replicates.

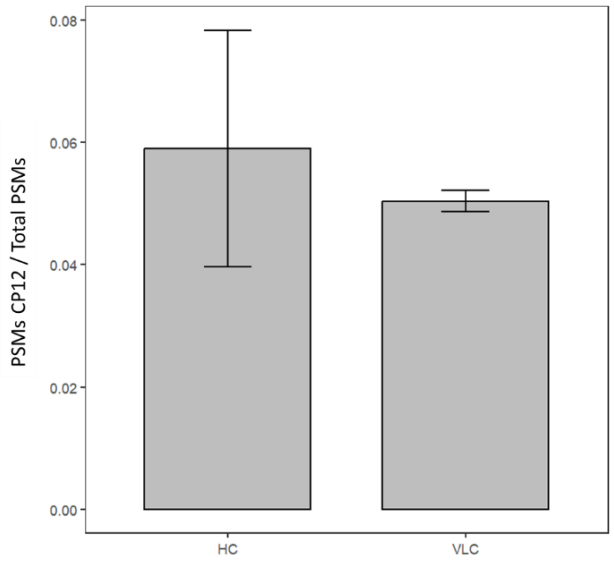


Fig. S4 Peptide Spectral Match (PSM) corresponding to m/z list of tryptic peptides of CP12 (Supplementary Table 2). Proteins (30 µg) were obtained from lysates of cultures of WT strain at HC and VLC. PSMs of CP12 were obtained with a targeted acquisition and targeted data analysis by mass spectrometry and divided by the total PSMs. The statistical significance was computed by t-tests (ns, $p > 0.05$). n = 3.

Table S3 Modelled kinetics of CO_2-dependent and HCO_3^--dependent photosynthesis by WT and Δ*CP12* strains grown at HC using equation 2 from the main text. Pseudo-V_{max}, indicating $Vmax_{-CO2}$ and $Vmax_{-HCO3-}$, are the maximum rate of net photosynthesis, Slope, the ratio of pseudo-V_{max} to $K_{1/2}$.

	pseudo-V_{max} (μmol O_2 mg^{-1} Chla h^{-1})		**$K_{1/2}$ (μM)**		**Slope (μmol O_2 mg^{-1} Chla h^{-1} mM^{-1})**		**R^2**	
	WT	Δ*CP12*	WT	Δ*CP12*	WT	Δ*CP12*	WT	Δ*CP12*
CO_2	17.1	27.8	0.2	23.0	85500	1209	0.98	0.88
HCO_3^-	23.3	26.0	84.0	0.1	277	260000		

7. Étude de l'ensemble conformationnel de la CP12 en conditions réductrices

7.1. Introduction

La CP12, en conditions réductrices, est décrite comme une protéine intrinsèquement désordonnée de type "random coil" [90], [91] et [89], c'est-à-dire ayant la même probabilité d'adopter chacune des conformations aléatoires possibles. Ces études ont été réalisées en solution, dans des conditions optimales pour l'étude des IDPs par RMN et avec l'étiquette histidine utilisé pour la purification. L'objectif des travaux menés dans ce chapitre est d'étudier les propriétés structurales de la protéine mature dans son environnement natif, c'est-à-dire dans le chloroplaste de *C. reinhardtii*, un environnement complexe et encombré. Cependant, cette tâche n'est pas aisée. Le milieu dans lequel se trouve la CP12 a donc été complexifié petit à petit, en modifiant les paramètres physico-chimiques, puis en mimant le milieu cellulaire, afin de déterminer quel paramètre pouvait contribuer le plus à des changements conformationnels.

7.2. Purification de la forme mature de la CP12

La production de la CP12 a été réalisée de façon hétérologue chez *E. coli* cultivée en milieu auto-inductible supplémenté en isotope lourd ^{15}N. La protéine a été sur-produite comme l'indique la figure 7.1.A. Après purification par chromatographie d'affinité (7.1.B), la protéine est clivée avec du bromure de cyanogène après l'unique résidu méthionine en position N-terminale (Figure 7.2). Une étape de chromatographie d'exclusion stérique a été réalisée pour éliminer l'étiquette histidine clivée ainsi que les potentiels contaminants résiduels.

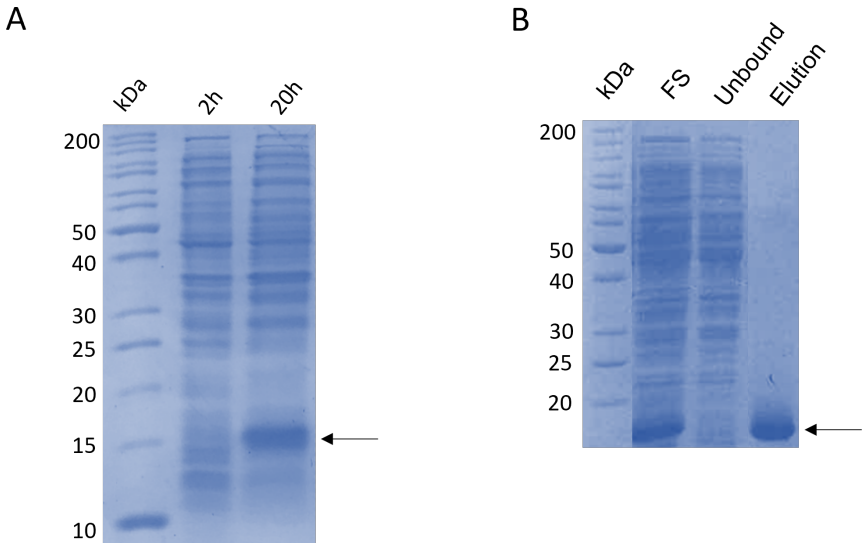


FIGURE 7.1. – SDS-PAGE à différentes étapes de production et de purification de la CP12. Les protéines sont séparées par gel de polyacrylamide de 15% en conditions dénaturantes et colorées au bleu de Coomassie. **A**. Protéines totales d'*E. coli* après 2 et 20 heures de culture en milieu auto-inductible. La flèche indique la présence de la protéine CP12. **B**. Protéines présentes dans les différentes fractions de la purification par chromatographie d'affinité (IMAC). FS : Fraction soluble injectée sur la colonne. "Unbound" : protéines non retenues par la colonne. Élution avec 210 mM d'imidazole.

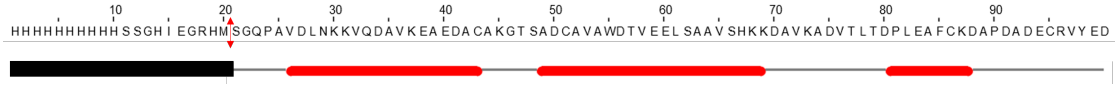


FIGURE 7.2. – Séquence protéique de la CP12 avec son étiquette histidine, représentée par un rectangle noir. La prédiction de structures secondaires (selon Jpred4) est représentée en rouge. La flèche rouge indique le site de coupure de la protéine par le bromure de cyanogène.

Afin d'analyser la pureté de la protéine et de vérifier sa masse moléculaire, une analyse par MALDI-ToF a été réalisée. La protéine avant et après avoir été clivée présente une masse moléculaire de 11 125 et de 8 568 Da respectivement (Figure 7.3.A) indiquant la coupure de l'étiquette histidine. Les valeurs théoriques (Expasy - ProtParam) étaient de 11 078 Da pour la protéine avec l'étiquette histidine et de 8 567 Da sans l'étiquette pour la protéine enrichie en isotope 15 de l'azote. La CP12 recombinante produite (non marquée cette fois-ci) a également été comparée à la protéine CP12 native purifiée à partir de culture de *C. reinhardtii*. L'analyse révèle des profils similaires avec la présence de deux pics : 8 467 Da ± 1 et un deuxième à 8 506 ± 5 Da (Figure 7.3.B). La valeur théorique attendue pour la CP12 mature étant de 8 470 Da, l'hypothèse émise a été la présence d'une modification

post-traductionnelle comme la trimethylysine correspondant à 42 Da. L'hypothèse de la présence de métaux a été vérifiée et écartée, car la différence de masse était également présente en présence d'EDTA, un chélateur de métaux. Cette différence était également présente, qu'il s'agisse de l'état oxydé ou réduit de la protéine.

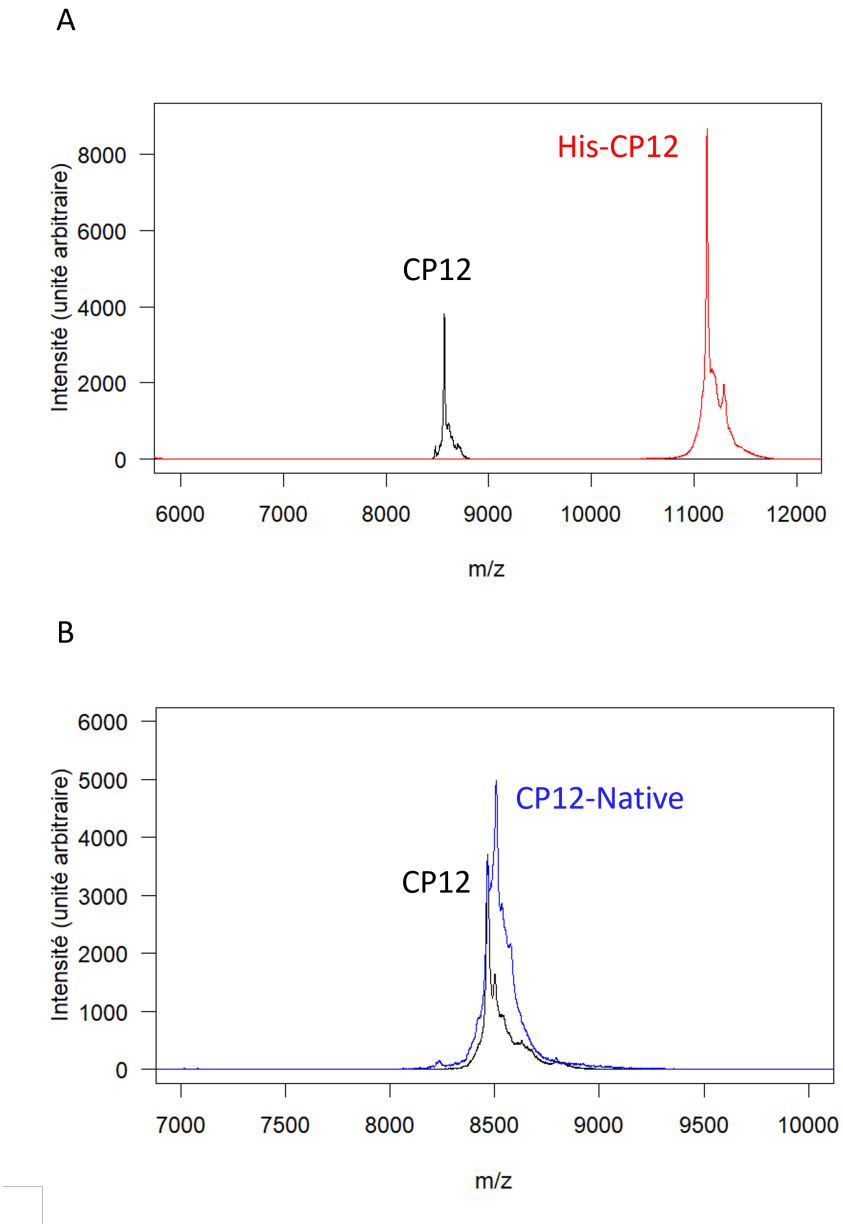


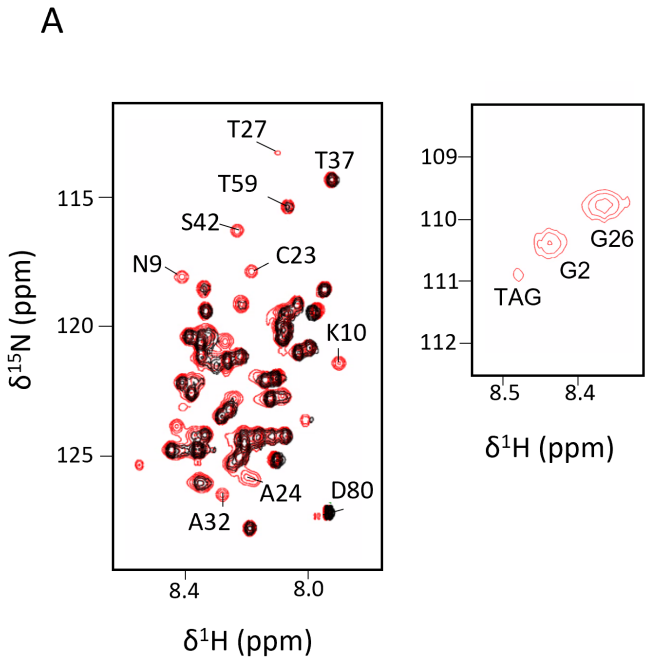
FIGURE 7.3. – Spectre de masse MALDI-ToF de la CP12 purifiée marquée en azote 15 avec et sans étiquette histidine (**A**). Comparaison de la protéine recombinante non marquée et la protéine native de *C. reinhardtii* (**B**).

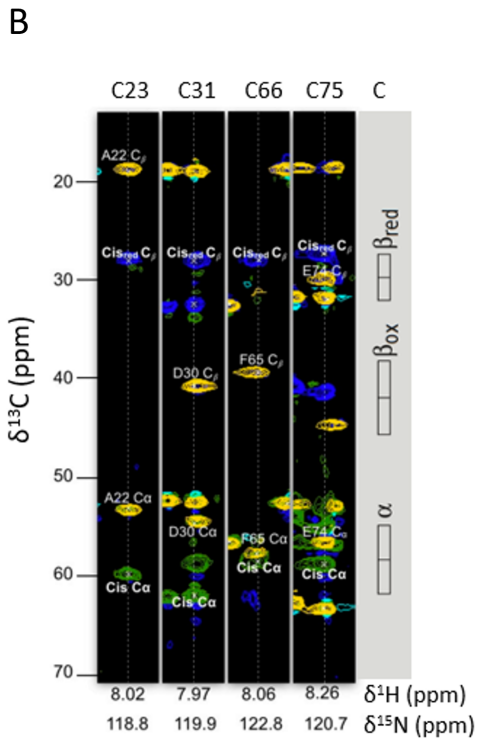
	1		2	
	[CP12](mg) / L	%	[CP12] (mg) / L	%
Ni-NTA	53,5	100	43,93	100
Après coupure	22,05	46,82	30,80	70,11
Exclusion stérique	12,22	22,8	25,30	57,59

TABLEAU 7.1. – Rendements de purification de la protéine CP12 en mg par L de culture d'*E.coli* avant **(1)** et après **(2)** optimisation du protocole de clivage au N-terminal.

Le défi associé à la production de la CP12 réside en la nécessité de produire la protéine avec sa séquence mature sans acide-aminé excédentaire dans la partie N-terminal. La présence d'un unique résidu méthionine en N-1 du résidu N-terminal a permis d'utiliser le protocole de la coupure au bromure de cyanogène [191]. Ce protocole a fait l'objet d'optimisation sur les conditions de coupure (tampon utilisé, conditions d'incubation) afin d'éviter la formation de précipité de protéine. Le rendement final de production atteint 25 mg de protéine mature par litre de culture d'*E. coli* (Tableau 7.1). En vue d'expériences de RMN 3D permettant l'attribution de la protéine, la protéine a également été produite en milieu doublement et uniformément marqué avec les isotopes lourds des atomes d'azote et de carbone (^{15}N, ^{13}C).

Des expériences ^{1}H ^{15}N HSQC ont été menées pour comparer la protéine avec l'étiquette histidine et sous sa forme mature. Le spectre HSQC de chacune des deux formes présente une densité spectrale importante avec des résonances distribuées sur une largeur spectrale très étroite. Les valeurs de déplacements chimiques de ces résonances sont réparties entre 8,6 et 7,6 ppm (Figure 7.4A), caractéristiques des protéines désordonnées, comme dans le cas de la CP12 portant l'étiquette histidine [90]. Cependant, bien que les spectres soient superposables, il s'est avéré que la CP12 mature en conditions réductrices se comporte différemment de la protéine recombinante possédant l'étiquette histidine. Plusieurs résonances sont élargies en deçà du niveau de bruit dans le spectre CP12 ^{1}H-^{15}N mature qui étaient visibles au-delà de la limite signal sur bruit dans le spectre CP12 possédant l'étiquette, en particulier le résidu glycine en position 2 (G2) ou les résidus G26, T27, N9 (Figures 7.4 A et B). De façon surprenante, une augmentation de l'intensité du signal de presque tous les résidus est observée pour la forme étiquetée par rapport à la forme mature et pas uniquement en partie N-terminale (Figures 7.4 C et D).


A
T27
T37
T59
S42
N9
C23
K10
A24
D80
A32
115
120
125
δ15N (ppm)
8.4
8.0
δ1H (ppm)
109
110
111
112
G26
G2
TAG
8.5
8.4
δ1H (ppm)


B
C23
C31
C66
C75
C
A22 Cβ
Cisred Cβ
D30 Cβ
F65 Cβ
E74 Cβ
A22 Cα
D30 Cα
F65 Cα
E74 Cα
Cis Cα
20
30
40
50
60
70
δ13C (ppm)
βred
βox
α
8.02
7.97
8.06
8.26
δ1H (ppm)
118.8
119.9
122.8
120.7
δ15N (ppm)

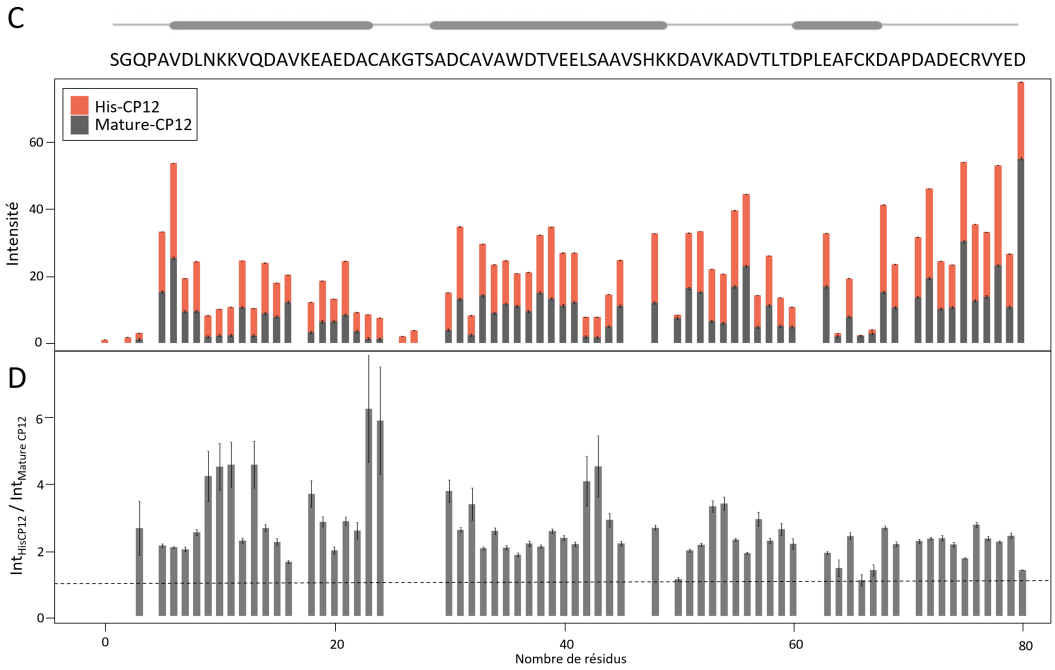


FIGURE 7.4. – **A**. Spectre ^{1}H ^{15}N HSQC de CP12 à 100 µM avec l'étiquette histidine (en rouge) ou sans cette étiquette (en noir) à 292K, pH 7,9 avec 150 mM NaCl et 20 mM DTT et zoom des intensités correspondantes à un résidu de l'étiquette histidine et aux résidus G2 et G26. **B** Coupes ^{1}H ^{15}N^{13}C des spectres HNCACB montrant les résonances Cβ (en bleu) et Cα (en vert) des résidus cystéine. En jaune, est indiqué la superposition des spectres HNcoCACB montrant les résidus Cα et Cβ des résidus précédents. Le Cβ d'un groupe thiol de cystéine devrait être de 28 ± 2ppm, tandis qu'il devrait être de 41 ± 4 ppm pour une cystéine oxydée. Les intensités correspondantes, normalisées par la concentration de la protéine, le nombre de scans et le gain, figurent en **C** et le ratio de ces intensités en **D**. La séquence de la CP12 mature correspondant à l'axe x et la prédiction de ses structures secondaires (selon Jpred4, en gris), sont situés en haut des histogrammes.

7.3. Étude de la dynamique de la CP12 en se rapprochant des conditions physiologiques

Dans un premier temps, il a été question d'étudier les paramètres dynamiques de la protéine CP12 sous sa forme mature dans des conditions plus physiologiques que lors des études précédentes. Les propriétés structurales de la protéine ont déjà

été étudiées, mais les conditions étaient optimisées pour faciliter l'attribution des résonances RMN aux résidus de la protéine désordonnée, c'est-à-dire à pH 6, en faible concentration de sels (50 mM de NaCl) et à basse température [90]. Le défi de l'étude par RMN des IDP réside dans le fait que leurs protons amides, labiles dans l'eau, ne sont pas protégés par des structures secondaires ou tertiaires. Cet échange entre les protons amides et les protons de l'eau induit une diminution d'intensité des résonances ^{1}H-^{15}N et cet échange est ralenti à pH acide et à basse température. Néanmoins, ces conditions ne représentent pas les conditions physiologiques que connait la CP12 dans la cellule de *C. reinhardtii*. Dans l'optique de se rapprocher des conditions du chloroplaste, où la CP12 est localisée [193], il a été décidé de travailler à pH 7.9, pH correspondant aux conditions de lumière pour la microalgue, à une concentration de sels plus élevée, soit 150 mM de NaCl et une température de 19°C (292K), plus proche des conditions réelles de culture (23°C soit 296K).

Afin d'étudier la propensité de la CP12 à former des structures secondaires transitoires, les coefficients de température des déplacements chimiques des protons amides ont été mesurés. En effet, la variation du déplacement chimique en fonction de la température peut suggérer la présence de liaisons hydrogène. Des expériences HSQC ^{1}H-^{15}N ont été réalisées à différentes températures (274, 282, 292, 302 et 312K, soit 1°C, 9°C, 19°C, 29°C et 39°C) (Figure 7.5). Ce gradient de température a été effectué dans les deux sens et l'effet est réversible. Les déplacements chimiques de la plupart des protons amides de la CP12 suivent une dépendance linéaire avec une pente négative, ce qui est attendu pour une protéine désordonnée [32]. Néanmoins, la pente n'est pas identique pour l'ensemble des résidus (Annexe A.5). Pour 68 résidus analysables, 7 ont des coefficients de variation de température supérieurs à -4,6 ppb/K. Ces résidus sont localisés dans les hélices putatives N-terminales. L'analyse des autres résidus montre que les protons amides ont des coefficients de température inférieurs à -4,6 ppb/K, valeur indicative pour montrer l'implication dans des liaisons hydrogène stables ou transitoires.

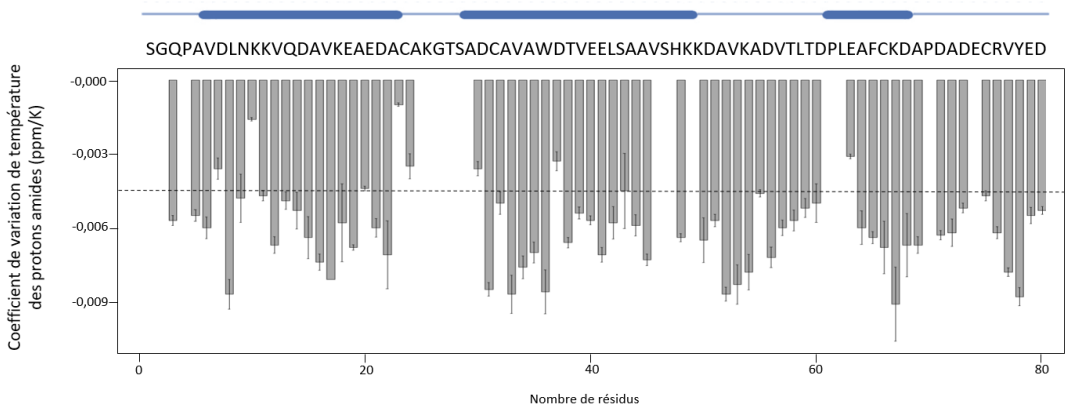


FIGURE 7.5. – Coefficient de variation de température des protons amides (ppm/K) (pente correspondant au déplacement chimique ^{1}H en fonction de la température pour chaque résidu). La barre horizontale à -0.0046 ppm/K indique la valeur seuil déterminée par des données empiriques basées sur des études de protéines avec des structures bien caractérisées [32]. Les coefficients de température des protons amides libres (non liés par des liaisons hydrogène stables) tendent à être plus négatifs que ce seuil. La prédiction de structures secondaires (selon Jpred4) est représentée en bleu en haut des histogrammes.

Les coefficients de variation de température n'étant pas homogènes pour tous les résidus de la séquence protéique, l'hypothèse d'une variation dans la dynamique de la CP12 a été émise. Afin d'aller plus loin dans cette étude, des expériences de relaxation de spin nucléaire ont été enregistrées et ont permis d'extraire les paramètres ^{15}N R_1, ^{15}N R_2, et $\{^{1}H\}$-^{15}N het-NOE. Ces expériences permettent d'étudier les mouvements des protéines dans l'échelle de temps, de la picoseconde (ps) à la milliseconde (ms).

Les valeurs des paramètres ^{15}N R_1 et ^{15}N R_2 sont typiques des IDPs et uniformes pour toutes les résonances observées de la protéine. Néanmoins, certaines résonances sont absentes de l'analyse, car leurs intensités étaient trop faibles. Cela indique qu'il y aurait une autre contribution à la dynamique que le caractère désordonné. Ces résonances correspondent aux résidus situés en partie N-terminale et dans la région entre les deux hélices α prédites. Les valeurs de $\{^{1}H\}$-^{15}N het-NOE montrent une certaine variation selon les résidus de la protéine. Ces valeurs sont négatives pour tous les résidus, hormis certains résidus majoritairement localisés en partie N-terminale de la première hélice putative (N9, K10, V12, Q13, D14). À l'inverse, les trois résidus C-terminaux présentent des valeurs plus négatives que le reste de la protéine. Les valeurs $\{^{1}H\}$-^{15}N het-NOE négatives indiquent que la protéine possède une dynamique conformationnelle plus rapide que la ns, ce qui est attendu pour une IDP. Ceci était attendu du fait de la flexibilité intrinsèque des régions terminales des protéines.

Une expérience CEST a également été réalisée, permettant de reporter la pré-

sence ou non d'échange conformationnel à une échelle de temps de l'ordre de la microseconde à 100 millisecondes. Les résultats montrent un seul ensemble de conformation pour chaque résidu (Annexe A.6).

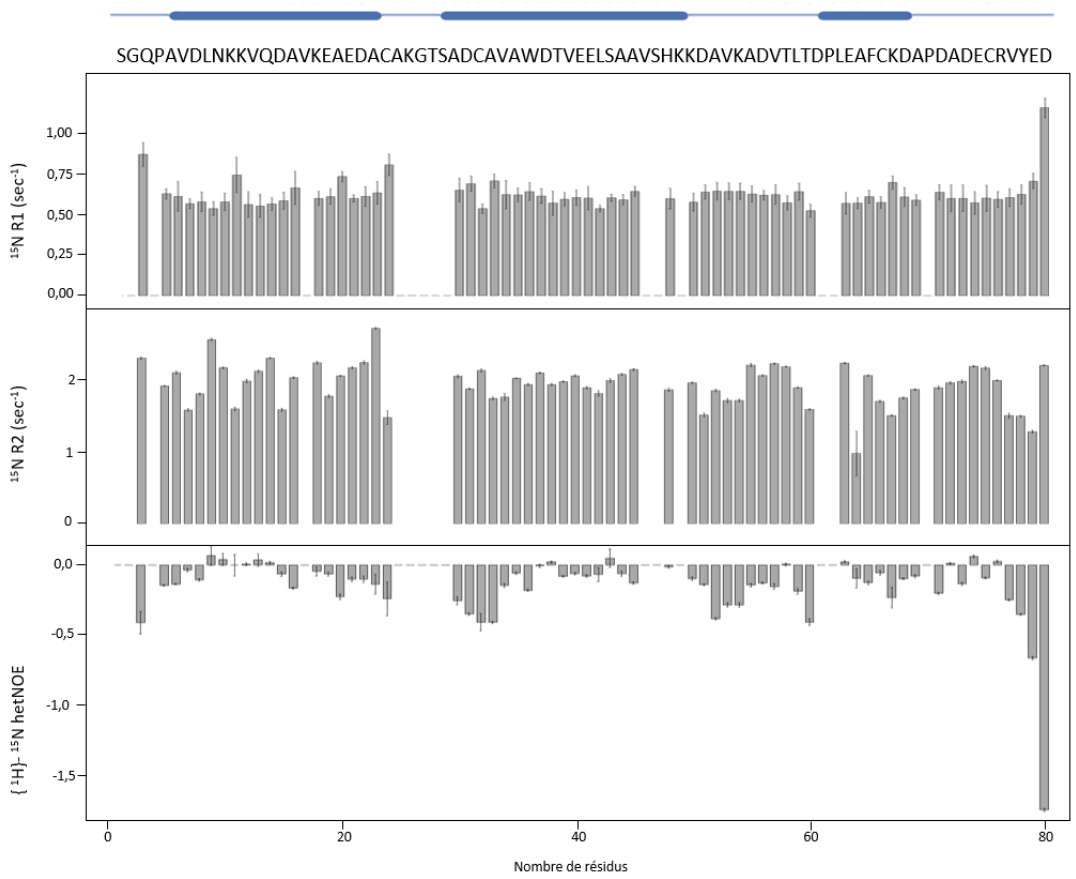


FIGURE 7.6. – Paramètres de relaxation ^{15}N R1, ^{15}N R2, et $\{^{1}H\}$-^{15}N het-NOE pour chaque résidu de la CP12. La prédiction de structures secondaires (selon Jpred4) est représentée en bleu en haut des histogrammes.

7.4. Corrélation entre les propriétés structurelles de la CP12 et les paramètres physico-chimiques

7.4.1. le pH

L'effet du pH sur la protéine CP12 en conditions réductrices a été étudiée grâce à des expériences ^{1}H-^{15}N HSQC. L'intensité de chaque résonance a été analysée en fonction du pH à trois valeurs différentes : pH 7,9 ; pH 7 et pH 6. Selon la figure 7.7, plus le pH est bas, plus les intensités des résidus augmentent (Figure 7.7). Ce phénomène est attendu pour les IDPs pour lesquelles les protons amides ne sont

pas protégés de l'échange avec les protons de l'eau (contrairement aux protéines globulaires). En milieu alcalin, cet échange est plus favorable qu'en milieu acide, ce qui induit une diminution de l'intensité des résonances ^{1}H ^{15}N à pH basique par rapport aux pH acides.

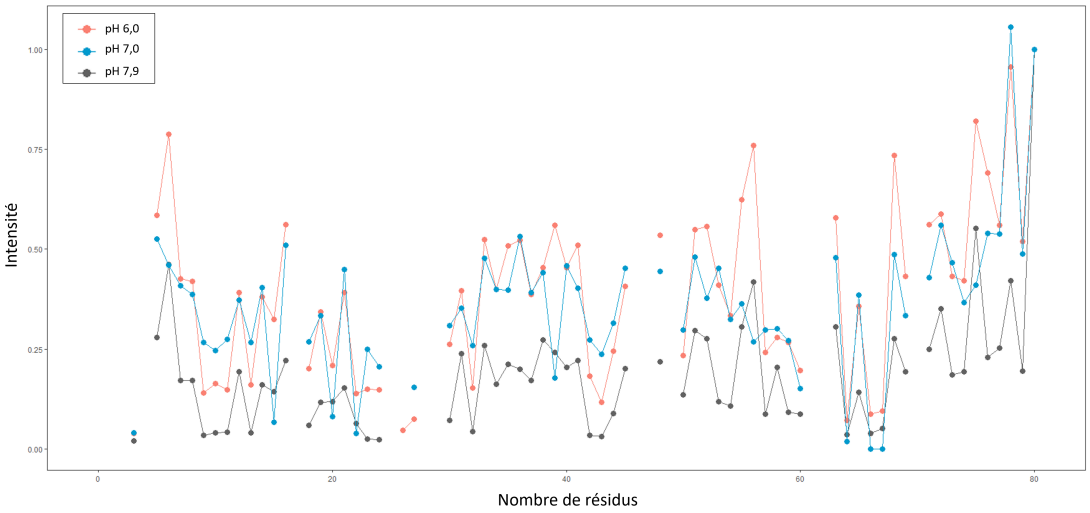


FIGURE 7.7. – Intensité relative des signaux correspondant à la CP12 en conditions réductrices en fonction du pH pour chaque résidu de la protéine. Les intensités ont été normalisées pour le résidu D80.

En abaissant le pH à 6, les déplacements chimiques des protons amides de la protéine restent inchangées hormis un faible déplacement dans l'axe des protons pour les résidus V45, V52 et C31 (Figure 7.8). Un affinement des raies est visible avec l'apparition de résidus qui étaient de très basses intensités quand le pH était de 7,9 (région N-terminale et région entre les hélices).

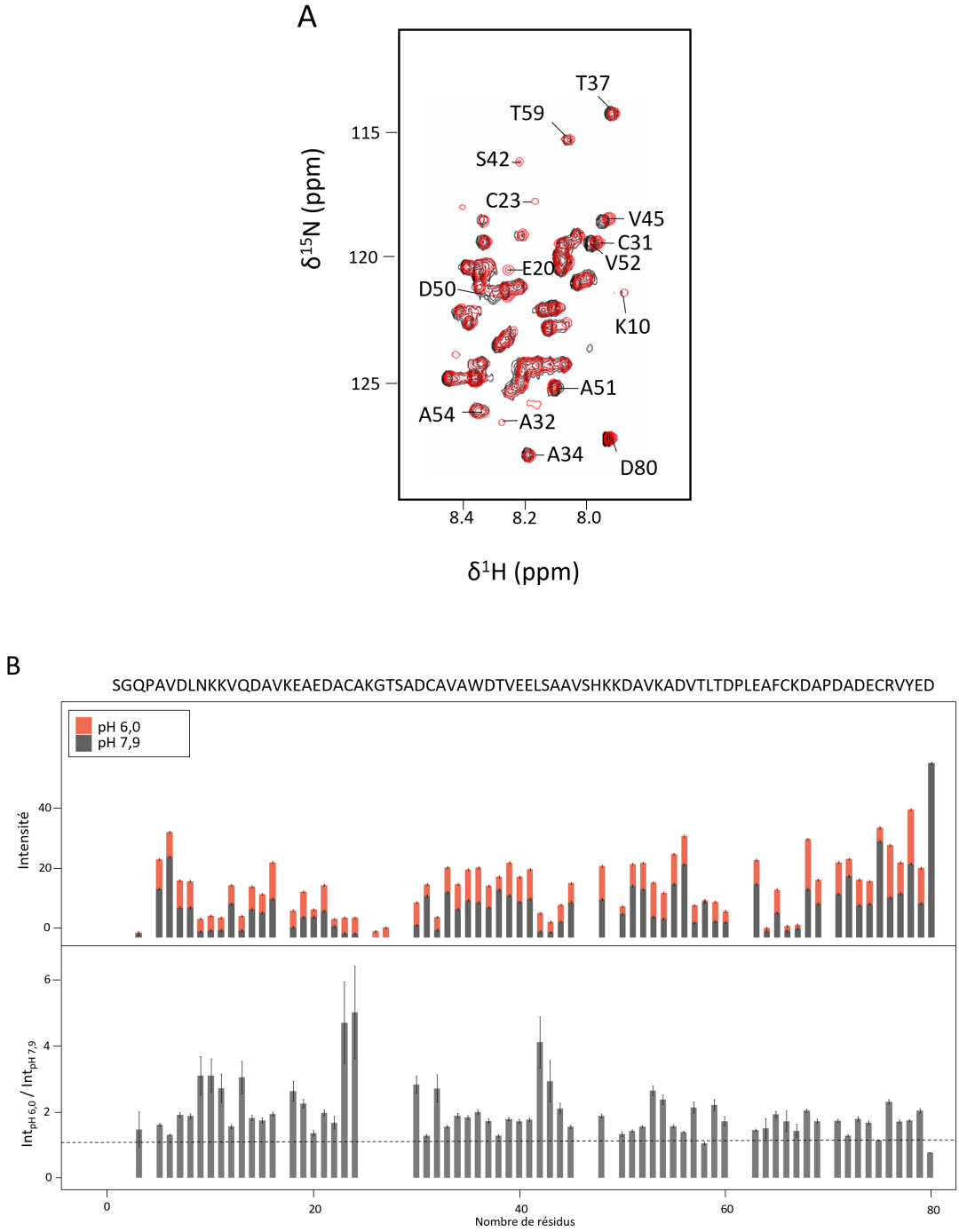


FIGURE 7.8. – **A.** Spectre ^{1}H ^{15}N HSQC de la CP12 (100 µM) à pH 7,9 à 292K, avec 150 mM de NaCl et 20 mM de DTT (en noir) superposé à l'HSQC de la CP12 dans les mêmes conditions excepté le pH qui est de 6 (en rouge). **B.** Intensités correspondantes au spectre ^{1}H ^{15}N HSQC **(A)**, normalisées par la concentration de la protéine, le nombre de scans et le gain et le ratio de ces intensités.

Avec une condition extrême, à pH 3,8, l'affinement des résonances est encore plus visible, dont notamment ceux des résidus G26, G2 et T27 (Figure 7.9A). De plus, le nombre de résonances visibles (164) est bien supérieur au nombre de résonances attendues (78), suggérant la présence d'au moins deux conformations.

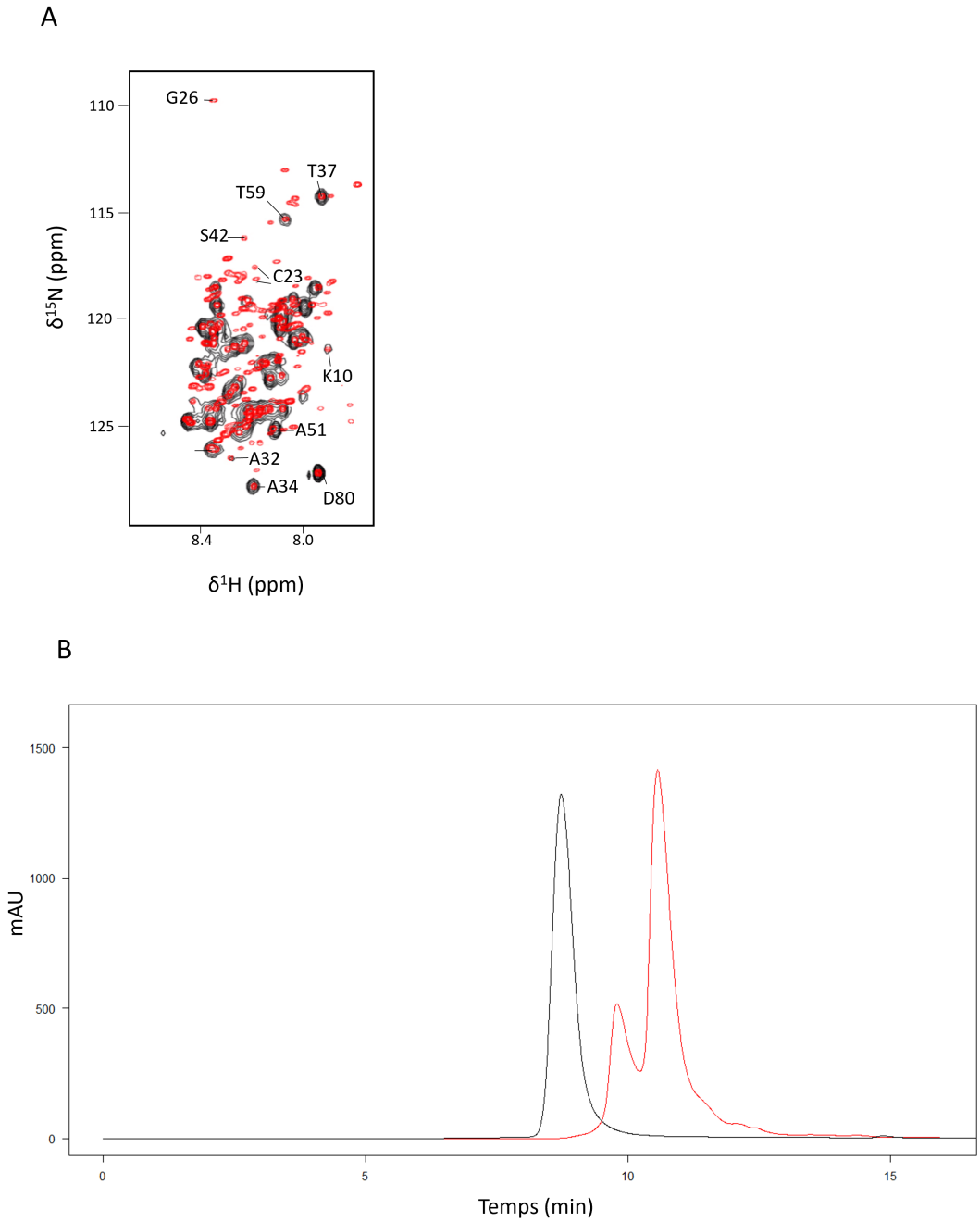


FIGURE 7.9. – Superposition des spectres ^{1}H ^{15}N HSQC de CP12 à pH 3.8 (rouge) et à pH 7.9 (noire) **(A)**. Chromatogramme (obtenu par chromatographie en phase liquide à haute performance (HPLC))**(B)** de l'élution de la CP12 dans ces conditions : 292K, avec 150 mM NaCl et 20 mM DTT à pH 7,9 (en noir) ou à pH 3,8 (en rouge).

Par chromatographie, la présence d'une seule espèce à pH 7,9 est distinguable alors que deux pics d'élution ont été observés (à 9,82 min et 10,60 min) sur le spectre du même échantillon élué à pH 3,8 (Figure 7.9B). Une analyse en SAXS

correspondant au premier pic d'élution de l'échantillon à pH 3.8 a indiqué la présence d'une population avec un Rayon de giration (Rg) de 29,16 ± 0,21 Å et une distance inter-atomique intramoléculaire maximale (Dmax) de 135 ± 10 Å, identiques au Rg et Dmax de la protéine obtenus à pH 7,9. Le deuxième pic d'élution plus intense lui présente une population avec un Rg plus petit de 27,16 ± 0,30 Å et un Dmax de 122 ± 10 Å selon les analyses SAXS (Annexe). Des expérimentations supplémentaires en spectrométrie de masse (non présentées ici) ont démontré que la présence de ces deux populations n'était pas due à un clivage partiel de la protéine. Ces analyses suggèrent plutôt que ce comportement serait dû à un échange entre deux états préférentiels de la protéine. L'interconversion entre ces deux conformations serait lente à pH acide, mais rapide à pH 7,9. Le premier pic d'élution de la protéine éluée dans un tampon à pH 3.8 possède les mêmes propriétés que la protéine retrouvée à pH 7,9 d'après les analyses SAXS. Cependant, à pH 3,8, une deuxième population peut être distinguée, probablement parce que l'échange conformationnel est ralenti sur la colonne (Figure 7.9B).

7.4.2. Concentration et nature des sels

Un autre paramètre qui a été étudié est la concentration et la nature des sels. Plusieurs concentrations de sels ont été testées. Il s'avère que plus la concentration en NaCl est basse, plus les intensités des résonances ^{1}H ^{15}N augmentent de manière non homogène (Figure 7.10). En comparant les intensités des spectres ^{1}H-^{15}N HSQC pour la CP12 avec 11 et 100 mM de NaCl, cette augmentation d'intensité est présente pour tous les résidus et est particulièrement marquée pour le résidu A43 (6 fois supérieure). L'apparition du résidu G26 à 11 mM est également visible (Figure 7.11).

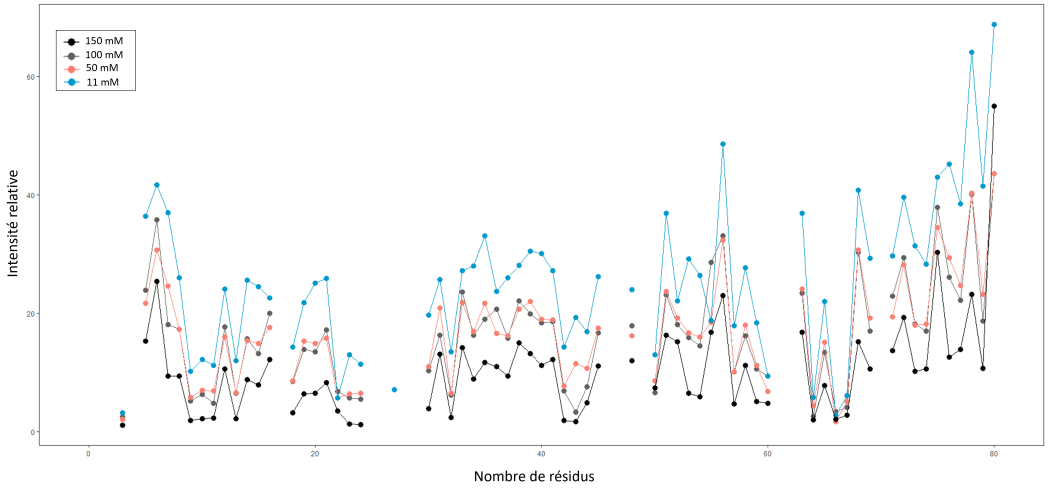


FIGURE 7.10. – Intensité des signaux correspondant à la CP12 en conditions réductrices en fonction de la concentration en NaCl pour chaque résidu de la protéine.

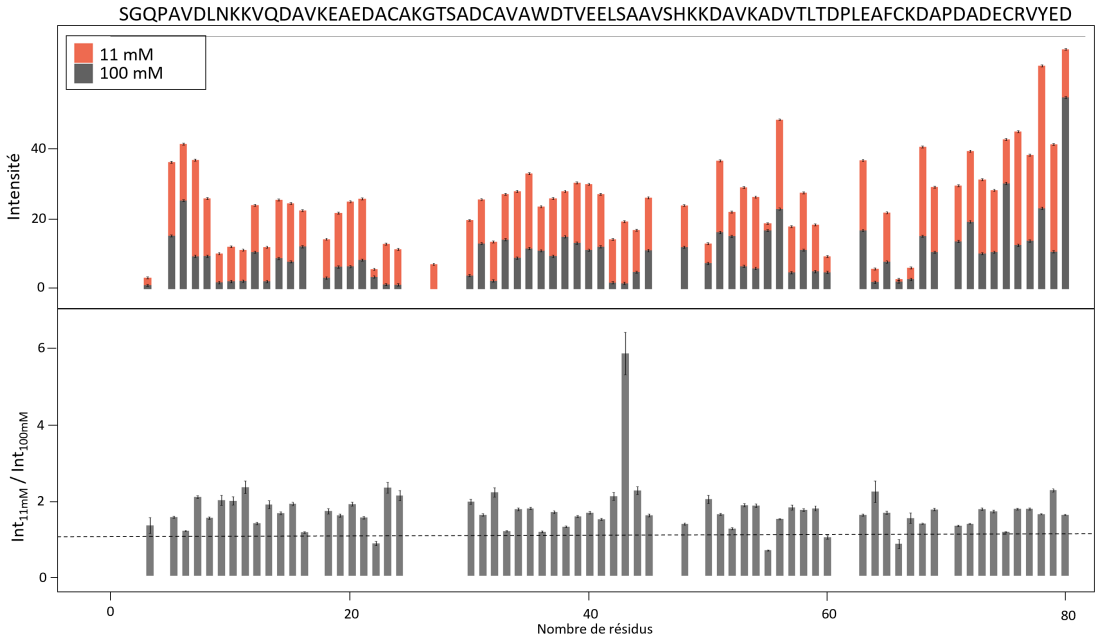


FIGURE 7.11. – Intensités correspondantes aux expériences HSQC de la protéine CP12 en conditions réductrices avec une concentration de NaCl de 11 mM (en rouge) ou de 100 mM (en noir) avec le ratio de ces intensités. La séquence de la CP12, correspondant à l'axe x, est indiquée en haut des histogrammes.

Les propriétés dynamiques de la protéine en fonction de la concentration de NaCl ont été évaluées avec une expérience $\{^1H\}$-^{15}N het-NOE. Globalement, toutes les valeurs de $\{^1H\}$-^{15}N het-NOE à 11 mM de NaCl sont inférieures à celle mesurées avec 150 mM NaCl. À 11 mM NaCl, seuls les résidus N9 et K10 présentent des valeurs de $\{^1H\}$-^{15}N het-NOE positifs alors qu'ils étaient sept à 150 mM. Avec cette faible concentration de sels, les valeurs sont encore plus négatives pour la protéine et cela est particulièrement marqué pour les résidus V12 (-0,52 contre 0,0075 à 150 mM de NaCl) et L41 (-0,92 contre -0,066) (Figure 7.12). Cela suggère que la protéine reste désordonnée, peu importe la concentration de sels, mais que l'échange conformationnel est plus rapide pour certains résidus à 11 mM de NaCl.

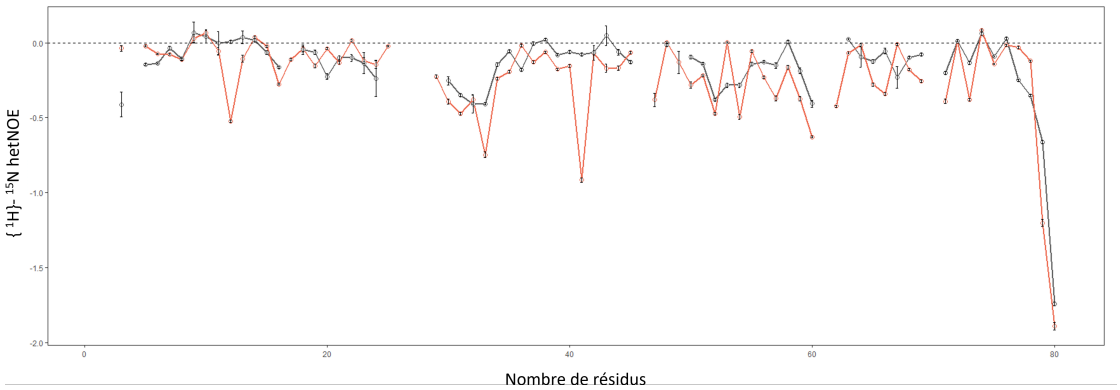


FIGURE 7.12. – Paramètre de relaxation $\{^1H\}$-^{15}N het-NOE pour chaque résidu de la CP12 avec une concentration de 11 mM de NaCl (en rouge) ou de 150 mM de NaCl (en noir).

Afin d'étudier les propriétés structurales de la CP12 avec un sel plus présent dans la cellule de *C. reinhardtii*, le chlorure de potassium (KCl) a été utilisé. En effet, le potassium est le cation présent dans la cellule, alors que le sodium est plus présent en milieu extra-cellulaire. Le changement de la nature du cation de sodium à potassium n'a eu aucun effet sur la protéine CP12 (Figure 7.13A).

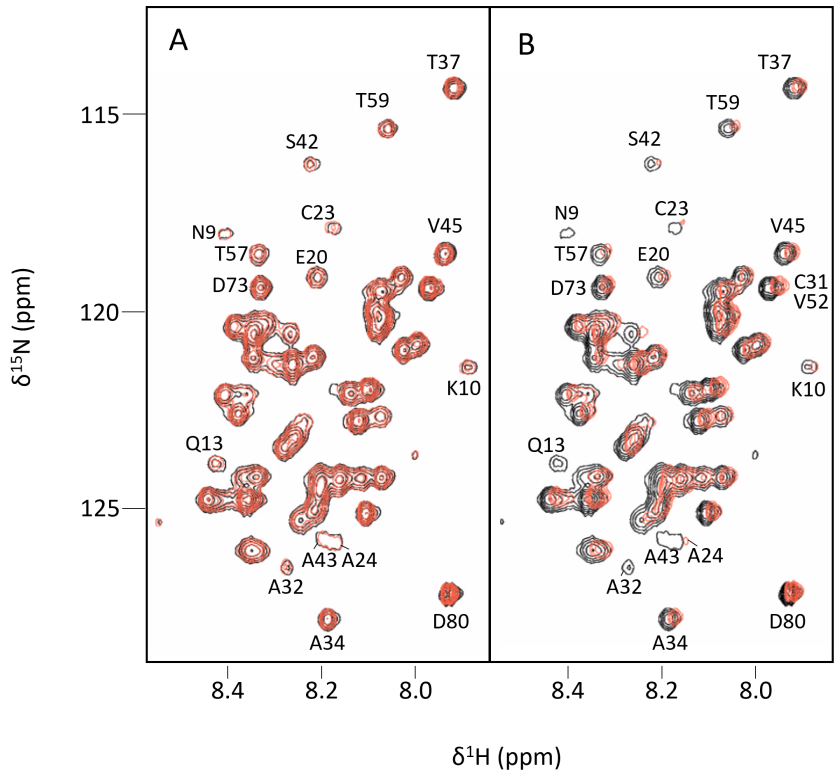


FIGURE 7.13. – Superposition de ^{1}H ^{15}N HSQC de 100 µM de CP12 à 292K, 20 mM DTT à pH 7,9 avec 100 mM de NaCl (en noir) ou avec 100 de KCl (en rouge) (**A**) ou 50 mM d'arginine et 50 mM de glutamate **(B)**.

7.4.3. Ajout d'un mélange d'acide aminé

L'ajout d'acides aminés tels que le glutamate et l'arginine est connu pour améliorer la stabilité des protéines [59]. Ce mélange de molécules chargées et de taille intermédiaire entre les sels et la protéine peut contribuer à modifier les propriétés hydrodynamiques des protéines [162]. La présence de ces deux molécules induit certains changements dans le spectre ^{1}H ^{15}N de la CP12 en conditions réductrices. Par exemple, la disparition des signaux correspondant aux résidus N9, Q13 et A32 ou encore la diminution de l'intensité des signaux correspondant aux résidus E20, C23, S42, T59, sont remarquables (Figure 7.13B). Les résidus affectés se situent dans la région N-terminale et la région entre les deux hélices. Ces régions correspondent aux résonances qui ont les plus grandes largeurs de raies dans les conditions de référence (150 mM de NaCl) et qui sont aussi affectées par le pH. Ces données suggèrent un changement de la dynamique de ces régions en fonction de la modification des charges.

7.4.4. Encombrement moléculaire

Pour évaluer l'impact de l'encombrement moléculaire sur la protéine en conditions réductrices, des expériences de CD en présence de trois agents d'encombrement inertes (le Dextran 40, le Ficoll 70, le PEG 20) ont été réalisées. Ces molécules ont été choisies, car elles ont un rayon hydrodynamique (Rh, mesure de la taille effective de la molécule en solution) similaire à celui de la protéine étudiée et cela permet d'augmenter l'efficacité de l'encombrement [161]. Il faut choisir une concentration en agent d'encombrement suffisante pour voir un effet, mais il convient de noter qu'une concentration excessive peut engendrer des interactions intersolutées imprévues.

L'ajout des trois agents d'encombrement n'a eu aucun effet significatif dans le spectre CD, ce qui démontre l'absence de formation de structures secondaires en leur présence (Annexe). Afin de confirmer cette tendance globale par une analyse à l'échelle des résidus, des expériences par RMN ont été menées et l'analyse a été focalisée sur l'effet du Dextran 40. Les intensités des résonances ^{1}H ^{15}N de chaque résidu dans les spectres ^{1}H ^{15}N HSQC enregistrés avec ou sans Dextran 40 à une concentration de 200 mg/mL restent inchangées (Figure 7.14) à l'exception des résidus V12 et C31. Les valeurs $\{^{1}H\}$-^{15}N het-NOE sont plus élevées de manière homogène (Figure 7.15). Cette augmentation très légère du $\{^{1}H\}$-^{15}N het-NOE, qui est sensible au coefficient de diffusion rotationnelle, peut être mise en perspective d'une potentielle augmentation de la viscosité suite à l'ajout de 200 mg/mL de Dextran, et indique que la protéine reste dans un état désordonné.

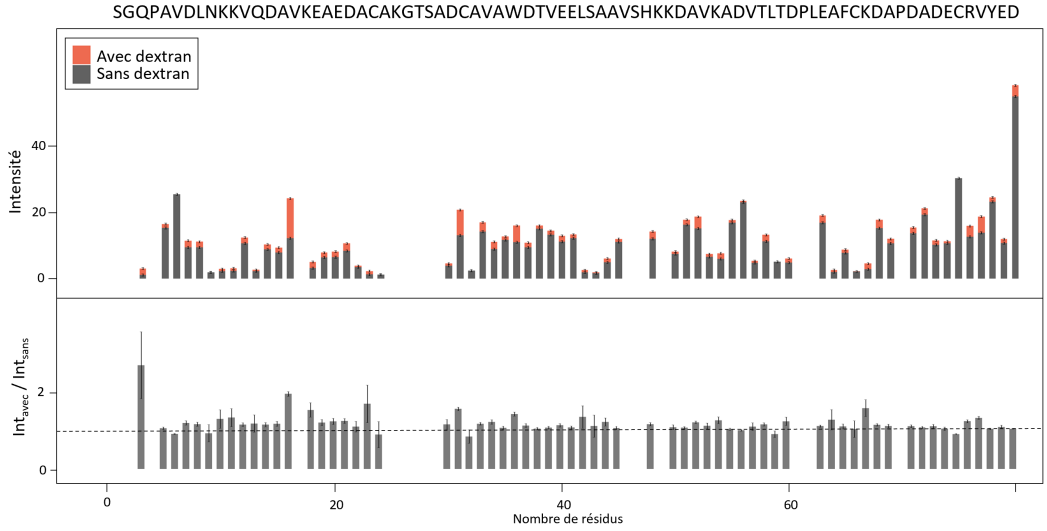


FIGURE 7.14. – Intensités correspondantes aux expériences HSQC de la protéine CP12 en conditions réductrices avec (en rouge) ou sans (en noir) Dextran 40 à une concentration de 200 mg/mL. Le ratio de ces intensités est présenté dans la figure du bas. La séquence de la CP12, correspondant à l'axe x, est indiquée en haut des histogrammes.

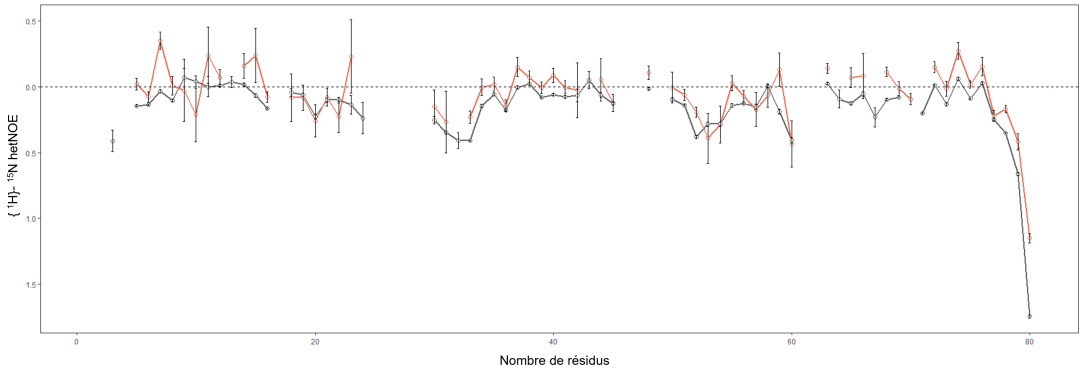


FIGURE 7.15. – Paramètre de relaxation $\{^1H\}$-^{15}N het-NOE pour chaque résidu de la CP12 avec (en rouge) ou sans (en noir) présence de Dextran 40 à une concentration de 200 mg/mL.

7.5. Étude des propriétés structurales de la CP12 en milieu mimant le milieu cellulaire

7.5.1. Propriétés structurales dans les cellules d'*E. coli*

Dans une première tentative pour imiter l'encombrement cellulaire présent dans une cellule de *C. reinhardtii*, des acquisitions de spectre de corrélation ^{1}H-^{15}N de la CP12 dans des cellules d'*E. coli* ont été réalisées. Grâce à un filtre de diffusion qui élimine les résonances provenant des macromolécules à diffusion libre, il a été vérifié que les corrélations ^{1}H ^{15}N enregistrées proviennent exclusivement des protéines localisées dans la cellule (expérience diffusion-weighted ^{1}H-^{15}N HSQC, [196]). Un gel SDS-PAGE a aussi été réalisé pour vérifier la sur-expression de la CP12 dans *E. coli* (Figure 7.16A). Le spectre est caractéristique d'un état désordonné avec de faible dispersion chimique des fréquences ^{1}H. Les résonances des résidus C23, C31, C66 et C75 sont présentes dans le massif aux fréquences observées pour la CP12 isolée réduite, et absente aux fréquences observées pour la CP12 isolée oxydée (Figure 7.16C). Ces résultats confirment que la CP12 est réduite et désordonnée dans les cellules d'*E. coli*. Une analyse plus détaillée révèle que dans le spectre de la CP12 d'*E. coli*, plusieurs résonances apparaissent qui n'ont pas été observées dans celui de la CP12 en solution. C'est le cas pour la résonance de la région N-terminale G2 ainsi que les résonances des résidus G26 et T27 (Figure 7.16B).

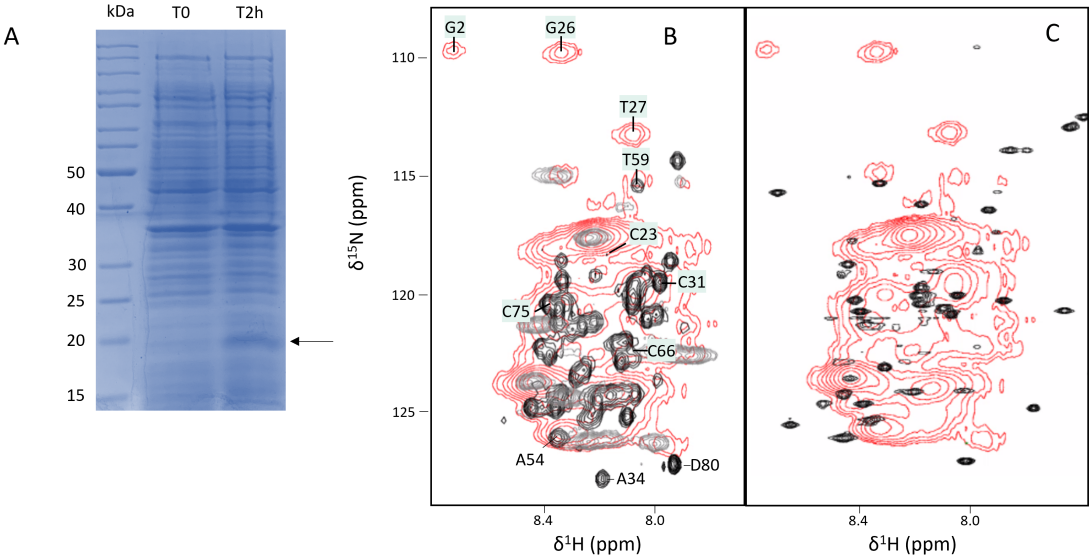


FIGURE 7.16. – **A.** SDS-PAGE des protéines totales d'*E. coli* avant et deux heures après l'ajout d'IPTG permettant la surproduction de la CP12. La flèche noire indique la migration de la CP12 sur le gel de polyacrylamide de 15% en conditions dénaturantes et coloré au bleu de Coomassie. **B** et **C** Spectres ^{1}H ^{15}N HSQC de la CP12 réduite (B) ou oxydée (C) en solution (en noir) et de la CP12 dans des cellules *E. coli* (en rouge). Le spectre gris est obtenu avec des cellules d'*E. coli* sans induire la production de la CP12. Les spectres ont été enregistrés avec un gradient puissant de diffusion qui ne permet pas d'obtenir de signal de molécules libres.

7.5.2. Propriétés structurales dans des cellules lysées de *C. reinhardtii*

Comme deuxième tentative pour reproduire l'environnement chloroplastique de *C. reinhardtii*, l'effet sur la protéine d'un lysat cellulaire concentré et soniqué de la microalgue a été étudié. La CP12 marquée ^{15}N a été ajoutée dans le lysat cellulaire obtenu à partir de 10^9 cellules de *C. reinhardtii* sans la CP12 native, permettant d'obtenir une concentration élevée en protéines totales dans l'échantillon de l'ordre de 15 à 20 mg/mL. Deux stratégies de préparation ont été employées pour la préparation de l'échantillon. Dans le premier cas, le lysat cellulaire total a été blanchi pour inactiver les enzymes (protéases, lipases, et autres) et conserver la présence de tous les métabolites et macromolécules présents dans la cellule. Néanmoins, cette étape de blanchiment détruit leur organisation supramoléculaire : les protéines sont dénaturées, les complexes macromoléculaires sont dissociés et les membranes lipidiques réorganisées en micelles et liposomes (Figure 7.17A). Dans la deuxième stratégie, le lysat cellulaire total est non blanchi (Figure 7.17B).

Le repliement des protéines et l'organisation supramoléculaire des lipides sont conservés, mais les enzymes sont actives, et l'état métabolique du lysat cellulaire est instable dans le temps. Les deux lysats cellulaires totaux présentent une grande hétérogénéité qui induit un élargissement des résonances. Cet élargissement est encore plus marqué pour le spectre de la figure 7.17B où les cellules ne sont pas blanchies. Le spectre RMN de la CP12 mélangé au lysat cellulaire soniqué et blanchi ressemble à celui en solution. Aucun changement significatif n'est observé sur les déplacements chimiques sur le spectre de la figure 7.17A.

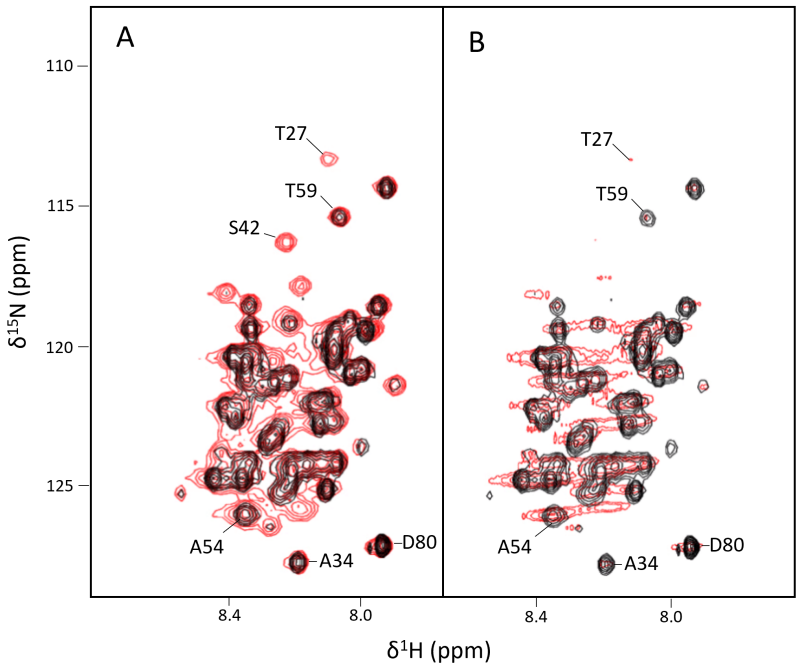


FIGURE 7.17. – Spectre ^{1}H ^{15}N HSQC de la CP12 en solution (en noir) et superposé (en rouge) avec en **A**, un lysat de cellules de *C. reinhardtii* blanchies, sans la CP12 native, et, en **B**, ce même lysat de cellules non blanchies

7.6. Discussion

La CP12, en conditions réductrices, a été décrite comme étant une protéine intrinsèquement désordonnée "random coil" [90], [91] et [89]. Le caractère désordonné a été confirmé, et cela, peu importe les conditions physico-chimiques testées. Les expériences HSQC réalisées sous différentes conditions (pH, concentration de sels, présence ou absence d'étiquette histidine, ou encore en présence d'encombrements moléculaires) présentent toutes un spectre typique d'une protéine désordonnée, ce qui se traduit par une faible dispersion des fréquences des protons amides. L'étude de la dynamique de la protéine a également permis de confirmer un échange

conformationnel rapide, de l'ordre de la nanoseconde. Cependant, il semblerait que la CP12 native ne soit pas un polymère "random coil" au vu de préférences conformationnelles mises en évidence dans certaines conditions.

L'étude a été faite dans des conditions plus physiologiques que les études précédentes : séquence mature ; présence de la même modification post-traductionnelle que la protéine native ; pH 7,9 ; 150 mM de NaCl ; 19°C. Cependant, il est à noter que la CP12 possède une phosphorylation [70], qui n'est pas retrouvée dans notre étude. Dans nos conditions, la protéine présente des intensités de résonances et des largeurs de raies hétérogènes. En particulier, plusieurs résonances situées entre les deux hélices prédites (région K25-S28) sont élargies dramatiquement et sont noyées dans le niveau de bruit. De plus, la perturbation de déplacement chimique en fonction de la température n'est pas homogène pour tous les résidus. Les protons amides de sept résidus, en particulier les résidus voisins de la région K25-S28 et certains de la région N-terminale, ont des coefficients de température inférieure à -4,6 ppb/K indiquant que ces résidus sont, de manière transitoire, impliqués dans des liaisons hydrogène. Au contraire, pour tous les autres résidus, cette valeur est plus négative que -4,6 ppb/K. Cette valeur de coefficient de température des protons amides indique qu'ils sont libres ou exposés au solvant [32]. L'hypothèse de l'existence de "pre-formed motif" pourrait être envisagée pour la région A22-D29. Les valeurs obtenues par le $\{^{1}H\}$-^{15}N het-NOE sont également différentes pour chaque résidu, indiquant une hétérogénéité dans la dynamique de la protéine à l'échelle de temps de la ns.

De plus, la diminution du pH a révélé un changement des propriétés structurales de la CP12. Bien que l'affinement des raies était attendu à pH acide, puisque l'échange des protons amide avec les protons de l'eau diminue quand l'acidité augmente, la présence de plus d'un ensemble conformationnel à 3,8 était surprenante. En effet, le spectre RMN de la CP12 dans un milieu tamponné à pH 3,8 a montré un dédoublement de signal pour plusieurs résidus, comme pour le résidu T59. La présence de deux espèces qui présentent des rayons hydrodynamiques différents a été confirmée dans le profil d'élution HPLC et l'analyse SAXS de chacun de ces pics a révélé la présence de deux populations, et présentant des conformations étendues caractéristiques des IDPs pour les deux cas.

Le spectre ^{1}H-^{15}N de CP12 dans la cellule d'*E. coli* ressemble de manière surprenante à celui observé à pH 3.8, avec l'apparition des résidus G2, G26 et T27. Bien que le spectre de la CP12 enregistré directement dans la cellule d'*E.coli* apporte des informations non négligeables, notamment sur l'influence de l'encombrement cellulaire sur la protéine désordonnée, les conditions physico-chimiques ne sont pas similaires à celles présentes dans le chloroplaste de *C. reinhardtii*. C'est pour cela qu'un lysat cellulaire de *C. reinhardtii* a été utilisé afin de se rapprocher de l'environnement natif de la protéine. Même si l'encombrement cellulaire réel n'est pas mimé, car un facteur de dilution non négligeable a été inévitable pour lyser les cellules, et que la compartimentalisation des cellules a été perturbée par la sonication, le lysat cellulaire blanchi comporte toutes les macromolécules présentes dans la cellule de *C. reinhardtii*. Néanmoins, leur organisation supramoléculaire et

leur conformation est perturbée. Ce lysat cellulaire ne permet donc pas de sonder les potentielles interactions avec des partenaires protéiques. De plus, la dénaturation des protéines va entraîner une augmentation de l'hydrophobicité de l'échantillon.

Sans le blanchiment des cellules de la microalgue, la composition moléculaire du lysat est difficilement maitrisé et n'est pas reproductible et l'hétérogénéité présente rend le spectre RMN de la CP12 très difficile à analyser. Au vu de la diversité des macromolécules présentes dans le lysat, il parait difficile d'interpréter explicitement les résultats du spectre de la CP12 dans ce milieu. Dans l'optique de comprendre quels paramètres sont à l'origine de ces changements de propriétés structurales de la protéine dans la cellule, plusieurs variables ont été étudiées séparément.

Là où l'effet du dextran a été moindre sur les propriétés structurales de la CP12, même si la dynamique semble être ralentie d'après les résultats de l'$\{^{1}H\}$-^{15}N het-NOE, ce n'est peut-être pas le cas pour d'autres agents d'encombrement. L'effet de l'encombrement macromoléculaire sur les propriétés conformationnelles des IDPs est assez hétérogène et, en général, il dépend de chaque combinaison IDP-encombrement [8] [33]. Il a été suggéré que cette variabilité n'est pas seulement due à l'effet de volume exclu, mais que d'autres variables, telles que la charge macromoléculaire, pourraient également jouer un rôle [18].

La concentration en NaCl a montré des effets locaux sur la CP12, les résidus leucine 41 (plus dynamique) et l'alanine 43 (plus intense), sont particulièrement affectés. De plus, à une concentration de 11 mM de NaCl, la protéine semble adopter des échanges conformationnels plus rapides.

L'effet du KCl et du NaCl pour une concentration de 100 mM est similaire, ce qui n'est pas tant surprenant puisque le nombre de charges électrostatiques est le même, bien que les ions des deux sels puissent avoir des capacités variables à lier les fonctions des résidus de la protéine [111]. En augmentant la concentration de sels, la possibilité de neutraliser les charges de la protéine augmente. Les sels peuvent faire "écrans" pour favoriser ou non certaines conformations. Il a été décrit que le sel pouvait modifier la conformation des IDP par deux mécanismes différents : à faible concentration de sel, le criblage électrostatique et à hautes concentrations de sels, l'effet de "salting-out" [200].

En ajoutant de l'arginine et du glutamate, des effets locaux sont remarquables sur la protéine, mais difficilement interprétables. En effet, ces deux molécules sont à la fois des agents d'encombrement de taille intermédiaire, et présentent plusieurs charges. Étant donné la composition en acides aminés de la CP12, qui présente beaucoup de résidus chargés (Figure 1.11), il n'est pas surprenant que l'effet de charges ait une influence sur ses propriétés structurales. Selon CIDER, qui fournit un ensemble de paramètres qui peuvent aider à évaluer, de manière approximative, les types de conformations qu'une IDP peut adopter [79], la fraction de résidus chargés (FCR) est de 0,35 (Figure 7.18). Il s'agit donc d'un polyampholyte qualifié de "fort" [41]. Concernant la charge nette par résidu (NCPR), elle est de -0,125. Selon la littérature, les IDPs polyelectrolytiques ayant un NCPR inférieur à 0,25 adoptent des conformations compactes et globulaires [41]. Cependant, selon les expériences menées, ces charges induisent juste un biais dans l'échantillonnage, et

ne permettent pas de stabiliser une ou quelques formations, alors il est difficile de décrire les interactions moléculaires mises en jeu.

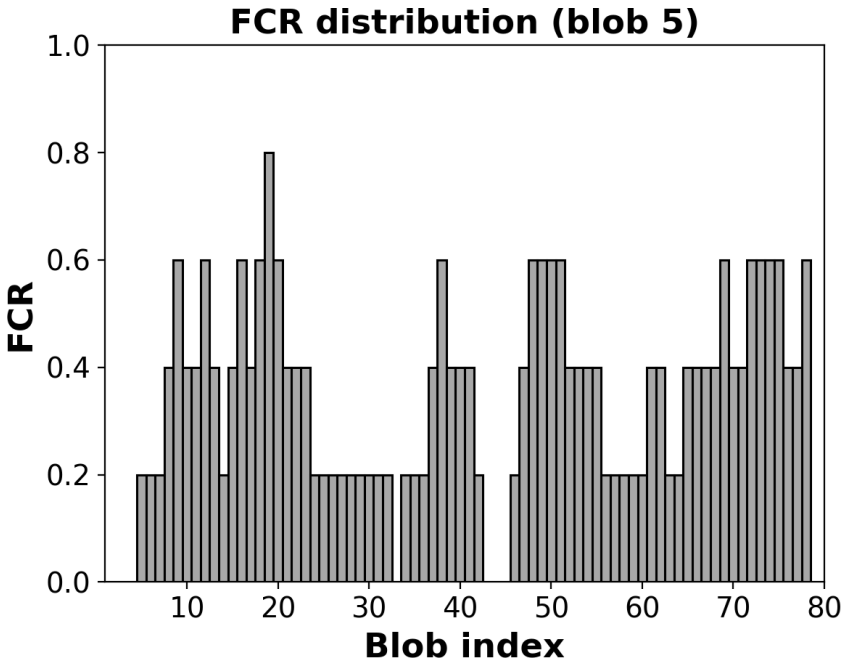


FIGURE 7.18. – La fraction de résidus chargés (FCR, somme de la fraction des résidus chargés positivement et de la fraction des résidus chargés négativement) pour chaque région de cinq acides aminés, de la partie N-terminale à C-terminale. Un blob correspond au nombre de résidus au-delà duquel l'équilibre des énergies chaîne-chaîne, chaîne-solvant et solvant-solvant est de l'ordre de kT, T représentant la température et k la constante de Boltzmann.

L'ensemble des données de RMN confirment que la CP12 est bien désordonnée dans des lysats de cellules de *C. reinhardtii* et dans la cellule d'*E. coli*. Des expériences de « Small Angle Neutron Scattering » (SANS), diffusion de neutrons aux petits angles, par variation de contraste menés au laboratoire ont montré des courbes identiques pour la CP12 en solution et en présence de lysat cellulaire de *C. reinhardtii* avec un Rg identique indiquant qu'il n'y pas de changements de conformations (Annexe A.7).

Cependant, l'analyse approfondie de l'ensemble des données RMN a permis de mettre en évidence des zones avec plus de contraintes structurales que les études précédentes sur la CP12 avec l'étiquette histidine à pH acide (pH 6) et en solution diluée. Les effets physico-chimiques tels que les charges ou le pH modulent l'échantillonnage conformationnel de la protéine, en particulier celui de la région N-terminale et des bordures des deux hélices prédites. Ces observations sont en cohérence avec celles réalisées sur d'autres protéines désordonnées dans la cellule, et permettent d'émettre l'hypothèse que les IDPs sont aussi des "senseurs" des conditions physico-chimiques [101], [136] et [38].

8. Conclusions et perspectives

8.1. De nouveaux partenaires pour la CP12 à l'état désordonné

La protéine CP12, en raison de son caractère désordonné, est capable de multiplier ses partenaires d'interaction. Les travaux antérieurs ont bien décrit que, dans des conditions oxydantes, la CP12 se lie à la PRK dans le cadre de la formation du complexe ternaire avec la GAPDH ([65] [198]). La bibliographie de ces travaux a été révisée dans la revue Gérard et al, 2022 (Annexe B.1) ([57]). Toutefois, dans des conditions réductrices, bien que l'interaction soit de plus faible affinité que dans le complexe, une proportion significative de la CP12 peut interagir de manière transitoire avec la PRK.

Les résultats décrits dans le chapitre 7 suggèrent que la CP12 n'adopte pas un ensemble de conformations "random coil" (bobine aléatoire) dans des conditions cellulaires puisqu'un biais dans son échantillonnage conformationnel est observé. Ces préférences conformationnelles pourraient lui permettre d'interagir avec d'autres protéines, dont la PRK mais pas seulement.

D'autres potentiels interactants de la CP12 ont été mis en évidence lors des expériences de chromatographie d'affinité, comme décrit au chapitre 5. Il serait pertinent de répéter cette expérience avec une analyse protéomique couplée avec une approche statistique rigoureuse afin d'identifier les protéines significativement présentes dans la fraction d'élution à pH 2, traduisant une interaction forte. Par la suite, une purification des protéines d'intérêt permettrait de déterminer s'il s'agit d'interactions directes ou non.

Des prédictions de réseaux d'interaction existent qui agrègent des informations provenant de (i) données transcriptomiques, (ii) du contexte génomique, (iii) de données d'expériences d'interaction à haut débit et (iv) de la littérature ([172]). C'est le cas de la base de données STRING (Figure 8.1) qui fournit des informations sur des prédictions d'interactome d'une protéine. Dans le cas de la CP12, sans surprise, l'interaction GAPDH-CP12-PRK est présente dans ce réseau. L'interaction avec l'ADK3, qui interagit avec la GAPDH, est également retrouvée ([206]). La sédoheptulose-bisphosphatase (SEBP1), du cycle CBB, est également prédite dans ce réseau d'interaction. De manière anecdotique, la PRK et la SEBP1 sont les deux seules enzymes impliquées exclusivement dans le cycle CBB, et elles possèdent toutes les deux des paires de résidus cystéine régulatrices ([131]). Un lien fonctionnel entre ces protéines n'est donc pas surprenant.

Les gènes CPLD5 et CPLD10 sont également présents dans le réseau d'interac-

tion, et ont des schémas d'apparition similaires que celui de la CP12 (cooccurrence). CPLD5 (Cre01.g039150), également appelé protéine Tic20-like, est décrite comme étant impliquée dans l'importation de protéines dans le chloroplaste. Cette protéine qui est conservée a été identifiée dans une fraction enrichie en thylacoïdes par spectrométrie de masse. Un mutant de cette protéine est disponible, dans la collection de mutants CLiP ([36]), ce qui pourrait faciliter l'étude du rôle physiologique de cette protéine.

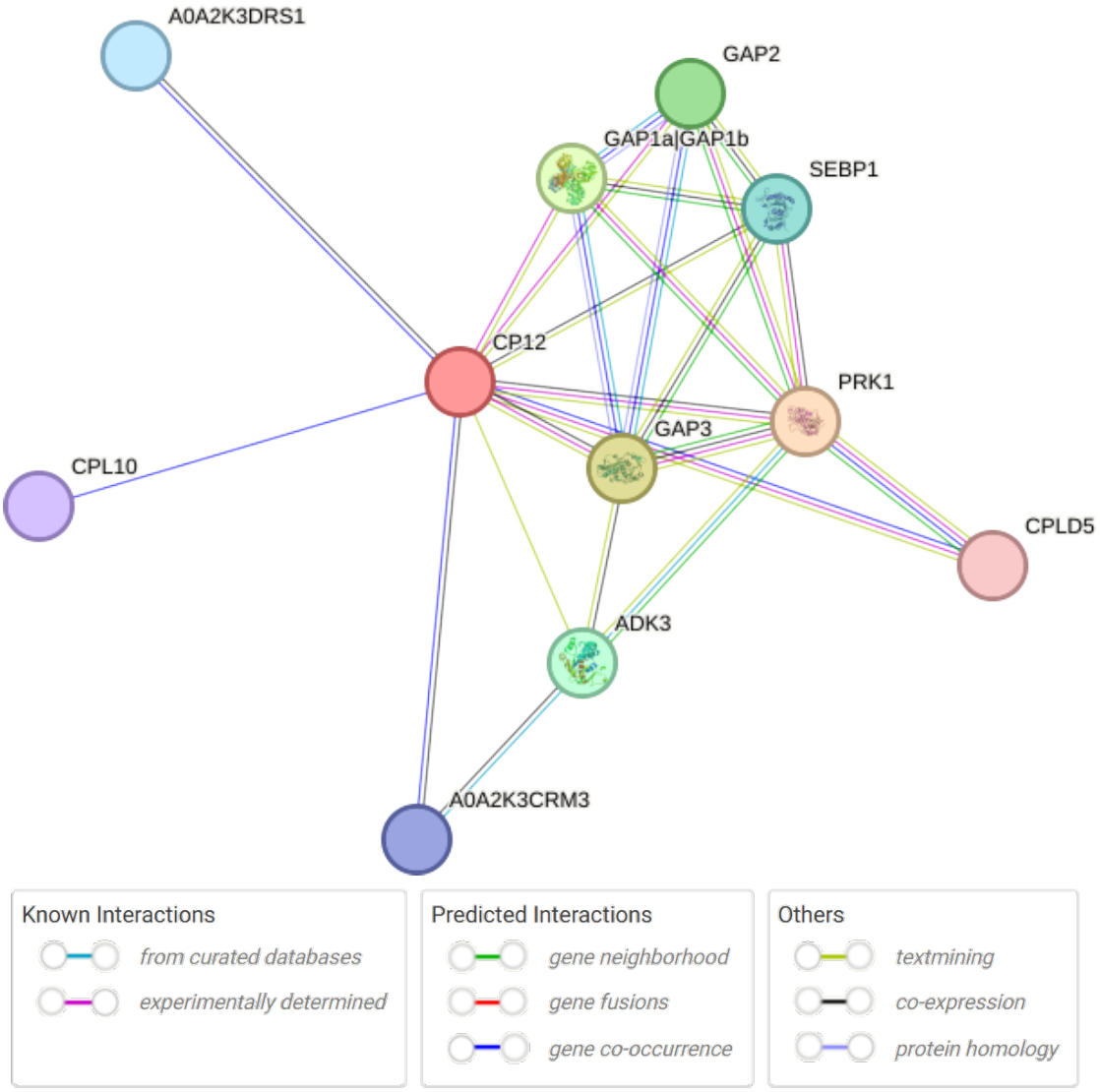


FIGURE 8.1. – Réseau d'interaction protéine-protéine STRING interrogé avec la protéine CP12. Les nœuds du réseau représentent les protéines et les arêtes, les associations protéine-protéine. Les associations sont censées être spécifiques et significatives, c'est-à-dire que les protéines contribuent conjointement à une fonction commune ; cela ne signifie pas nécessairement qu'elles se lient physiquement l'une à l'autre. Les résultats sont présentés pour un niveau de confiance moyen (0,4) avec un maximum de 10 interactants.

Il est à noter que cette protéine n'a pas été retrouvée lors de l'expérience de chromatographie d'affinité pour la CP12, mais il est possible que les conditions de culture et d'extractions des protéines n'aient pas été optimales pour observer une interaction. En effet, nous avons travaillé avec des protéines solubles et cette protéine semble être associée aux thylacoïdes.

Chez *A. thaliana*, d'après la base de données TAIR (The Arabidopsis Information Resource, [82]), l'homologue de CPLD5 est un composant du complexe TIC (translocon de la membrane interne des chloroplastes), impliqué dans la translocation des protéines à travers l'enveloppe interne des plastides. Chez *C. reinhardtii*, l'interaction putative CPLD5-CP12 pourrait être en lien avec la translocation de la CP12, traduite dans le cytoplasme, vers le chloroplaste.

8.2. Un lien avec la phase photochimique ?

Si le rôle de la CP12 dans la régulation du cycle de Calvin est bien établi, il est possible que la phase photochimique de la photosynthèse soit également influencée par cette protéine. Bien qu'aucun phénotype de croissance n'ait été observé en lumière fluctuante, une condition connue pour affecter certaines voies photochimiques, cette piste reste intéressante à approfondir. Les microalgues sont connues pour posséder de nombreux mécanismes de régulations compensatoires, et il faut parfois affecter plusieurs voies métaboliques pour observer un phénotype (par exemple [155]).

Parmi les interactants identifiés par spectrométrie de masse dans l'expérience de chromatographie d'affinité pour la CP12, une sous unité d'une protéine au cœur de la phase photochimique a été retrouvée. Il s'agit de la sous-unité γ de l'ATP synthase chloroplastique (Cre06.g259900) qui a été élué à pH 2 pendant l'expérience, ce qui traduit une interaction forte. Cependant, seules les protéines solubles ont été extraites, il faudrait donc analyser la fraction membranaire du fait de la localisation de l'ATP synthase, mais cette tâche n'est pas aisée. Par la suite, il serait pertinent d'explorer s'il s'agit d'une interaction directe entre la CP12 et cette sous-unité ou si cette interaction se fait de manière indirecte par l'intermédiaire d'une autre protéine. Le lien fonctionnel entre la CP12 et l'ATP synthase est d'autant plus intéressant à étudier du fait que cette dernière soit régulée par les TRXs f et m, tout comme le complexe ternaire GAPDH-CP12-PRK. Une hypothèse pourrait être que l'interaction entre la CP12 et la sous unité γ de l'ATP synthase permettrait une exposition des résidus cystéine (199 et 205) ([158]) au solvant et ainsi une activation plus rapide. Pour vérifier cette hypothèse, nous avons regardé l'exposition des résidus cystéine et il s'avère qu'elles sont déjà accessibles (Figure 8.2).

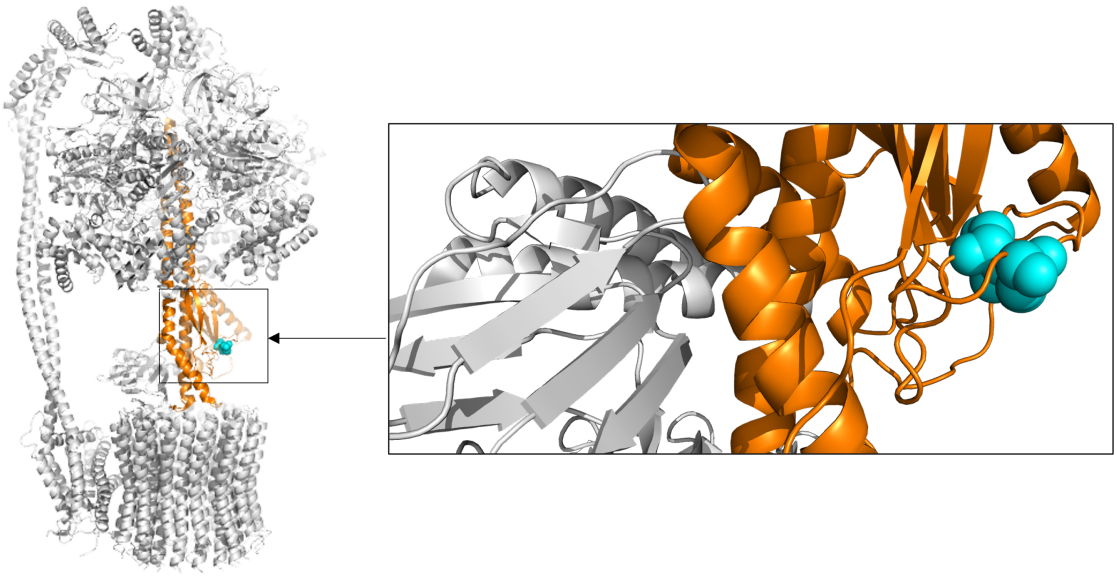


FIGURE 8.2. – Structure PDB de l'ATP synthase de *Spinacia oleracea*. En orange, est représentée la sous unité γ et en cyan, les résidus cystéine.

Des résultats préliminaires, obtenus en collaboration avec Alix Boulouis, du laboratoire IBPC (Institut de Biologie Physico-Chimique, à Paris) ont mis en évidence des différences entre les souches de *C. reinhardtii* avec et sans la protéine CP12. Ces différences apparaissent surtout lorsque les cultures ont poussé avec des concentrations élevées de CO_2, et non à de faibles concentrations de CO_2. La principale différence réside dans le développement du NPQ (quenching non photochimique) à la lumière. Chez les souches de génotype sauvage (WT et mutant complémenté), le NPQ atteint une valeur de 0,4 après deux secondes de lumière forte (710 µmol de photons m^2 s^{-1}), alors que le mutant sans CP12 n'accumule aucun NPQ dans ces conditions. Cela pourrait être lié à une diminution d'accumulation LHCRS1 observée en protéomique chez le mutant par rapport à la souche sauvage. Cette protéine participe à la partie énergétique du NPQ. Pour explorer ce phénotype, ces expériences pourraient être reproduites à différentes intensités lumineuses et la croissance des souches pourraient être suivie en condition de forte lumière.

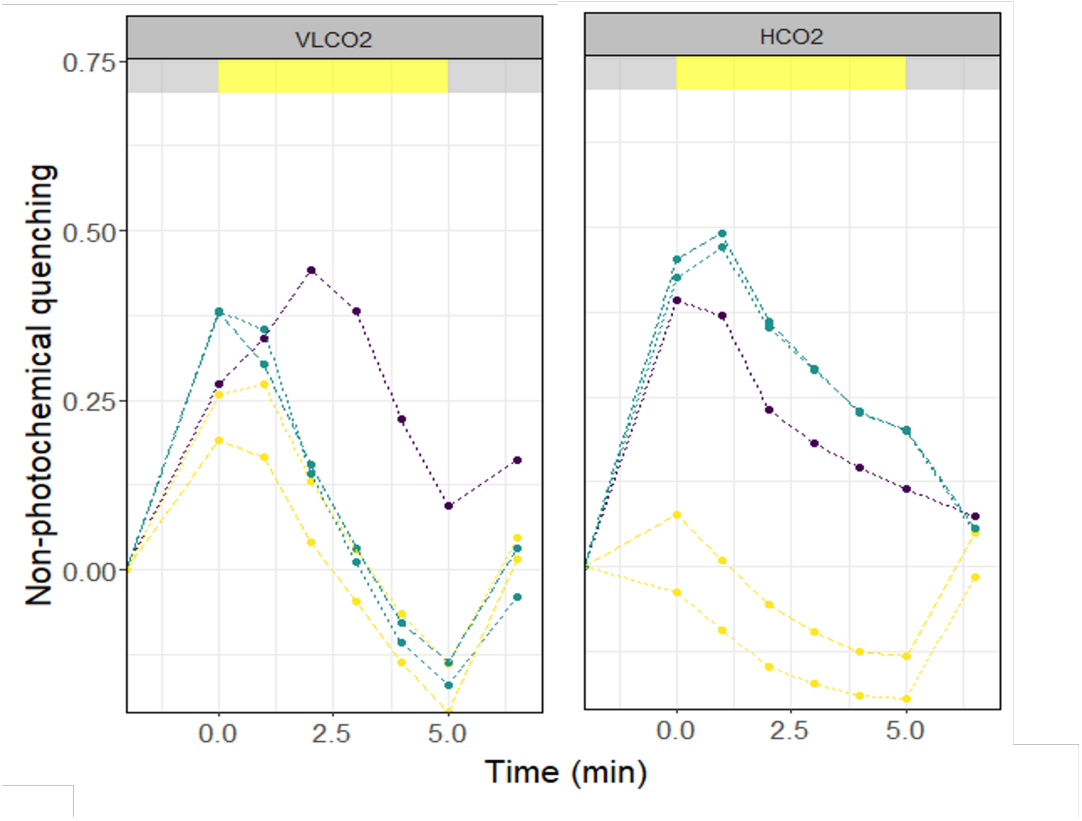


FIGURE 8.3. – Cinétiques de quenching non photochimique. NPQ = (Fm-Fm'/Fm'). Fm étant la fluorescence maximale dans l'état adapté à l'obscurité et Fm' les niveaux de fluorescence mesurés après un pulse saturant dans les états non adaptés à l'obscurité. VLCO2 : Les cellules ont poussé en conditions de faibles (VLCO2) ou hautes (HC) concentrations de CO_2. En vert : souche WT, en jaune : Δ*CP12*, en violet : Δ*CP12* complémentée avec la CP12.

8.3. Après la protéomique, la métabolomique ?

Les approches omiques, et plus spécifiquement la métabolomique, s'avèrent particulièrement pertinentes dans le cas où plusieurs voies métaboliques sont simultanément affectées, comme dans la souche Δ*CP12* de *C. reinahrdtii*. L'utilisation de la RMN pour la métabolomique présente un avantage certain, car elle permet le suivi en temps réel des métabolites au sein de cellules intactes, sans nécessiter leur lyse. Cette technique non invasive offre la possibilité de quantifier et de caractériser les métabolites directement dans les cellules, tout en préservant leur intégrité structurelle. Toutefois, deux défis techniques majeurs doivent être surmontés. Le premier consiste à maintenir des conditions physiologiques adéquates pour les cellules d'algues durant l'acquisition RMN, afin de garantir un état métabolique

fidèle à la réalité biologique. Le deuxième est de réussir à observer les résonances RMN des protons des petites molécules. Des filtres de relaxation peuvent être appliqués pour s'affranchir des signaux des grosses molécules.

8.4. Études structurales de la CP12 dans la cellule de *C. reinhardtii*

La RMN présente des avantages pour l'étude des IDPs dans la cellule puisqu'il s'agit d'une méthode non destructive permettant d'avoir une mesure en temps réel en balayant un large spectre d'échelle de temps : de la nanoseconde (dynamique) à des heures. Elle a déjà fait ses preuves dans ce domaine et a fait l'objet de nombreuses publications ([178][179]).

Dans l'ensemble, les données suggèrent que dans son état réduit, la protéine CP12 se trouve dans un ensemble conformationnel dynamique, avec plusieurs conformations coexistantes, avec des vitesses d'échanges supérieures à l'échelle de la nanoseconde. La dynamique d'interconversion entre ces différentes conformations semble dépendante du pH et il est intéressant de noter que le pH du stroma du chloroplaste s'est avéré être un facteur important qui contribue à la régulation du CBB ([7]). C'est un des paramètres physico-chimiques qui varient selon les conditions de lumière (pH de 7,9) ou d'obscurité (pH de 6,8). De plus, des micro-environnements dans la cellule peuvent avoir des valeurs de pH différentes, par exemple, l'intérieur d'un thylacoïde, le lumen est composé d'une phase aqueuse de pH 4. La CP12 peut être un senseur efficace de subtiles fluctuations de pH, mais également des transitions de l'état d'oxydoréduction. En conditions de lumière, il y a exposition des charges de la CP12 puisqu'elle est désordonnée dans ces conditions réductrices. Les régions électronégatives de la protéine (la répartition des charges) pourraient jouer un rôle important pour l'interaction avec d'autres partenaires. De plus, le pH va jouer un rôle dans la distribution de charge au sein de cette protéine. Par exemple, la fonction COO- des résidus glutamate et aspartate se trouve sous forme COOH à pH 4.

Une perspective intéressante est d'étudier les propriétés structurales de la CP12 par RMN directement dans la cellule de *C. reinhardtii* en faisant varier, entre autres, la lumière. De nombreux travaux décrivent comment les variations d'intensités lumineuses induisent la mise en place de processus de régulation du gradient de proton à travers la membrane, comme les flux d'électron cycliques ou pseudo-cycliques ([94]). La CP12 pourrait être un senseur du pH du stroma, ce qui est une hypothèse raisonnable pour une IDP ([38] [136]). Pour tester cette hypothèse, une stratégie est la sur-expression de la CP12 dans les cellules de *C. reinhardtii* grâce à un promoteur inductible à la lumière. Le protocole appliqué serait le même que celui pour l'étude dans la cellule d'*E. coli* qui permettrait d'avoir uniquement la protéine d'intérêt marquée à l'azote 15 et donc visible sur le spectre RMN (Figure 8.4).

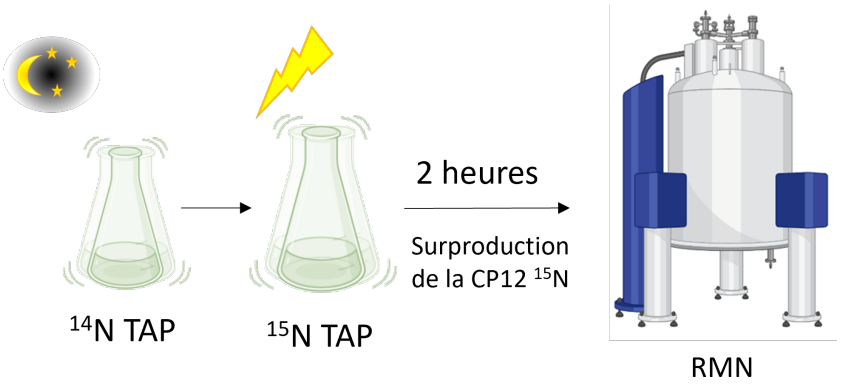


FIGURE 8.4. – Stratégie envisagée pour étudier les propriétés structurales de la CP12 directement dans les cellules intactes de *C. reinhardtii*. Milieu de culture Tris Acétate Phosphate (TAP) contenant (^{15}N TAP) ou non (^{14}N TAP) l'isotope ^{15}N.

Dans des travaux menés par EonSeon Jin, les chercheurs ([143]) ont analysé le promoteur du gène de la protéine inductible à la lumière (LIP) chez l'algue marine *Dunaliella sp.*. L'analyse de la séquence du promoteur de la LIP a révélé la présence de plusieurs motifs sensibles à la lumière. Il a été observé que la transcription à partir du promoteur LIP était activée en réponse à une lumière intense et que cette activation est proportionnelle à l'intensité lumineuse. La souche Δ*CP12* a donc été transformée pour introduire ce promoteur inductible à la lumière. Les résultats montrent, en effet, que l'expression génique de la CP12 a été induite par la lumière pour les souches notées #6 et #20 (Figure 8.5).

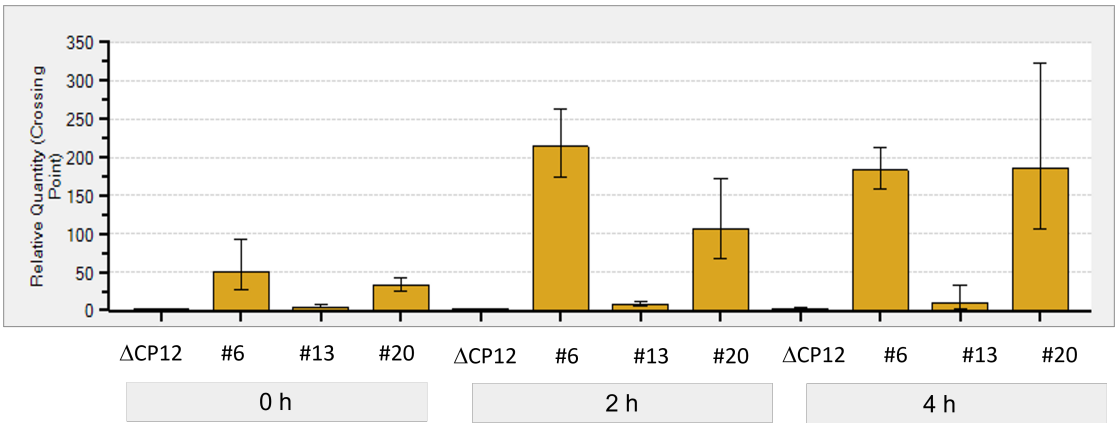


FIGURE 8.5. – Niveau d'expression du gène CP12 chez les souches : Δ*CP12*, et différentes souches Δ*CP12* avec le promoteur LIP (#6, #13 et #20). Les cellules ont été exposées à une lumière de pendant 2 ou 4 heures à une intensité de 500 µmol photons m^2 s^{-1}.

La stratégie (8.4) a donc été testée avec l'utilisation de la souche #6 avec une exposition à haute intensité lumineuse (300 µmol de photons m^2 s^{-1}) pendant deux

heures. Cependant, un problème qui n'avait pas été le cas pour l'expérience chez *E. coli* est la sédimentation des cellules au cours du temps et donc la perte du signal. Pour pallier à ce problème, de l'agar à une concentration de 0,5 % a été ajouté aux cellules de *C. reinhardtii*. Il a été montré que même si les cellules étaient encapsulées dans cet agar, elles étaient toujours capables d'avoir un métabolisme actif et de faire de la photosynthèse (Figure 8.6).

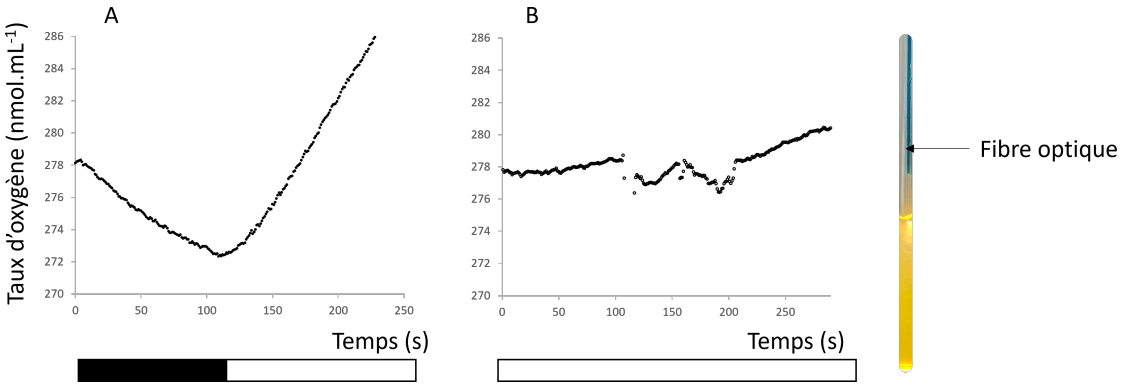


FIGURE 8.6. – Le taux d'oxygène est mesuré en fonction du temps grâce à une électrode à oxygène (Oxytherm +) dans des conditions optimales de culture de *C. reinhardtii* (**A**) ou quand les cellules sont mélangées avec de l'agar à une concentration de 0,5 % (**B**). Les barres horizontales représentent les conditions d'obscurité (noir) et de lumière (blanc). La source lumineuse utilisée pour (**B**) provient d'une fibre optique adaptée pour un tube RMN.

La source de lumière utilisée pour cette expérience est une fibre optique adaptée au diamètre interne d'un tube de RMN. Celle-ci pourra donc être utilisée pour mener à bien ces expériences et permettre aux cellules de *C. reinhardtii* d'être dans des conditions de lumière. Les propriétés structurales de la CP12 pourront alors être étudiées dans des conditions réductrices, où la protéine est désordonnée, mais également à l'obscurité, correspondant à des conditions oxydantes, où elle interagit avec ses partenaires la PRK et la GAPDH. Ces expériences constitueraient les premières études structurales d'une protéine dans le chloroplaste d'une cellule photosynthétique ([29]). Des tentatives similaires ont été réalisées dans les cellules de *A. thaliana* sans succès, et les auteurs ont proposé de poursuivre ces tentatives sur ces cellules de microalgues.

Bibliographie

[1] Liat Adler et al. « New horizons for building pyrenoid-based CO2-concentrating mechanisms in plants to improve yields ». In : *Plant Physiology* 190.3 (1er nov. 2022), p. 1609-1627. ISSN : 0032-0889. DOI : 10.1093/plphys/kiac373. URL : https://doi.org/10.1093/plphys/kiac373 (visité le 30/08/2024).

[2] E. Virginia Armbrust et al. « The genome of the diatom Thalassiosira pseudonana : ecology, evolution, and metabolism ». In : *Science (New York, N.Y.)* 306.5693 (1er oct. 2004), p. 79-86. ISSN : 1095-9203. DOI : 10.1126/science.1101156.

[3] E. Asamizu et al. « Generation of expressed sequence tags from low-CO2 and high-CO2 adapted cells of Chlamydomonas reinhardtii ». In : *DNA research : an international journal for rapid publication of reports on genes and genomes* 7.5 (31 oct. 2000), p. 305-307. ISSN : 1340-2838. DOI : 10.1093/dnares/7.5.305.

[4] LUISANA AVILAN. « Etude de l'interaction entre la phosphoribulokinase et la glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase chez chlamydomonas reinhardtii ». These de doctorat. Paris 7, 1er jan. 1998. URL : https://theses.fr/1998PA077008 (visité le 26/07/2024).

[5] Luisana Avilan, Sandrine Lebreton et Brigitte Gontero. « Thioredoxin Activation of Phosphoribulokinase in a Bi-enzyme Complex from Chlamydomonas reinhardtii Chloroplasts ». In : *Journal of Biological Chemistry* 275.13 (mars 2000), p. 9447-9451. ISSN : 00219258. DOI : 10.1074/jbc.275.13.9447. URL : https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0021925818300589 (visité le 21/06/2022).

[6] Luisana Avilan et al. « CP12 residues involved in the formation and regulation of the glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase–CP12–phosphoribulokinase complex in Chlamydomonas reinhardtii ». In : *Molecular BioSystems* 8.11 (2012), p. 2994. ISSN : 1742-206X, 1742-2051. DOI : 10.1039/c2mb25244a. URL : http://xlink.rsc.org/?DOI=c2mb25244a (visité le 18/02/2022).

[7] Luisana Avilan et al. « Regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase in the eustigmatophyte Pseudocharaciopsis ovalis is intermediate between a chlorophyte and a diatom ». In : *European Journal of Phycology* 47.3 (1er août 2012). Publisher : Taylor & Francis _eprint : https ://doi.org/10.1080/09670262.2012.687459, p. 207-215. ISSN : 0967-0262. DOI : 10.1080/09670262.2012.687459. URL : https://doi.org/10.1080/09670262.2012.687459 (visité le 06/10/2024).

[8] Anthony Banks et al. « Intrinsically Disordered Protein Exhibits Both Compaction and Expansion under Macromolecular Crowding ». In : *Biophysical Journal* 114.5 (13 mars 2018). Publisher : Elsevier, p. 1067-1079. ISSN : 0006-3495. DOI : 10.1016/j.bpj.2018.01.011. URL : https://www.cell.com/biophysj/abstract/S0006-3495(18)30131-0 (visité le 10/09/2024).

[9] Bojana Banovic Deri et al. « Leaf transcriptome analysis of Lancaster versus other heterotic groups' maize inbred lines revealed different regulation of cold-responsive genes ». In : *Journal of Agronomy and Crop Science* (). Place : Hoboken Publisher : Wiley WOS :000667772300001. ISSN : 0931-2250. DOI : 10.1111/jac.12529. URL : http://www.webofscience.com/wos/alldb/full-record/WOS:000667772300001 (visité le 20/06/2022).

[10] James Barber. « A mechanism for water splitting and oxygen production in photosynthesis ». In : *Nature Plants* 3 (3 avr. 2017), p. 17041. ISSN : 2055-0278. DOI : 10.1038/nplants.2017.41.

[11] Christopher O. Barnes, William B. Monteith et Gary J. Pielak. « Internal and global protein motion assessed with a fusion construct and in-cell NMR spectroscopy ». In : *Chembiochem : A European Journal of Chemical Biology* 12.3 (11 fév. 2011), p. 390-391. ISSN : 1439-7633. DOI : 10.1002/cbic.201000610.

[12] James Barrett, Philipp Girr et Luke C. M. Mackinder. « Pyrenoids : CO2-fixing phase separated liquid organelles ». In : *Biochimica Et Biophysica Acta. Molecular Cell Research* 1868.5 (avr. 2021), p. 118949. ISSN : 1879-2596. DOI : 10.1016/j.bbamcr.2021.118949.

[13] J. A. Bassham, A. A. Benson et M. Calvin. « The path of carbon in photosynthesis ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 185.2 (août 1950), p. 781-787. ISSN : 0021-9258.

[14] Camille Bathellier et al. « Ribulose 1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activates O2 by electron transfer ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 117.39 (29 sept. 2020). Publisher : Proceedings of the National Academy of Sciences, p. 24234-24242. DOI : 10.1073/pnas.2008824117. URL : https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2008824117 (visité le 25/06/2024).

[15] Andres Binolfi, Francois-Xavier Theillet et Philipp Selenko. « Bacterial in-cell NMR of human -synuclein : a disordered monomer by nature ? » In : *Biochemical Society Transactions* 40.5 (oct. 2012), p. 950-954. ISSN : 1470-8752. DOI : 10.1042/BST20120096.

[16] Ray D. Blackwell et al. « The value of mutants unable to carry out photorespiration ». In : *Photosynthesis Research* 16.1 (1er avr. 1988), p. 155-176. ISSN : 1573-5079. DOI : 10.1007/BF00039491. URL : https://doi.org/10.1007/BF00039491 (visité le 29/07/2024).

[17] Victoire Blanc-Garin et al. « First in vivo analysis of the regulatory protein CP12 of the model cyanobacterium Synechocystis PCC 6803 : Biotechnological implications ». In : *Frontiers in Plant Science* 13 (2022), p. 999672. ISSN : 1664-462X. DOI : 10.3389/fpls.2022.999672.

[18] Pablo M. Blanco et al. « Influence of macromolecular crowding on the charge regulation of intrinsically disordered proteins ». In : *Soft Matter* 17.3 (28 jan. 2021). Publisher : The Royal Society of Chemistry, p. 655-669. ISSN : 1744-6848. DOI : 10.1039/D0SM01475C. URL : https://pubs.rsc.org/en/content/articlelanding/2021/sm/d0sm01475c (visité le 10/09/2024).

[19] Nicole Boggetto, Brigitte Gontero et Stephen C. Maberly. « Regulation of phosphoribulokinase and glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase in a freshwater diatom, *Asterionella formosa* ». In : *Journal of Phycology* 43.6 (déc. 2007), p. 1227-1235. ISSN : 00223646, 15298817. DOI : 10.1111/j.1529-8817.2007.00409.x. URL : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1111/j.1529-8817.2007.00409.x (visité le 18/02/2022).

[20] Nicolas D. Boisset et al. « Phosphoribulokinase abundance is not limiting the Calvin-Benson-Bassham cycle in Chlamydomonas reinhardtii ». In : *Frontiers in Plant Science* 14 (31 août 2023). Publisher : Frontiers. ISSN : 1664-462X. DOI : 10.3389/fpls.2023.1230723. URL : https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2023.1230723/full (visité le 18/09/2024).

[21] G. Bowes, W. L. Ogren et R. H. Hageman. « Phosphoglycolate production catalyzed by ribulose diphosphate carboxylase ». In : *Biochemical and Biophysical Research Communications* 45.3 (5 nov. 1971), p. 716-722. ISSN : 0006-291X. DOI : 10.1016/0006-291x(71)90475-x.

[22] M. M. Bradford. « A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding ». In : *Analytical Biochemistry* 72 (7 mai 1976), p. 248-254. ISSN : 0003-2697. DOI : 10.1006/abio.1976.9999.

[23] Virginia M. Burger, Thomas Gurry et Collin M. Stultz. « Intrinsically Disordered Proteins : Where Computation Meets Experiment ». In : *Polymers* 6.10 (oct. 2014). Number : 10 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 2684-2719. ISSN : 2073-4360. DOI : 10.3390/polym6102684. URL : https://www.mdpi.com/2073-4360/6/10/2684 (visité le 08/08/2024).

[24] Adrien Burlacot et Gilles Peltier. « Energy crosstalk between photosynthesis and the algal CO2-concentrating mechanisms ». In : *Trends in Plant Science* 28.7 (juill. 2023), p. 795-807. ISSN : 1878-4372. DOI : 10.1016/j.tplants.2023.03.018.

[25] Adrien Burlacot, Gilles Peltier et Yonghua Li-Beisson. « Subcellular Energetics and Carbon Storage in Chlamydomonas ». In : *Cells* 8.10 (oct. 2019). Number : 10 Publisher : Multidisciplinary Digital Publishing Institute, p. 1154. ISSN : 2073-4409. DOI : 10.3390/cells8101154. URL : https://www.mdpi.com/2073-4409/8/10/1154 (visité le 26/09/2024).

[26] Adrien Burlacot et al. « Alternative photosynthesis pathways drive the algal CO2-concentrating mechanism ». In : *Nature* 605.7909 (mai 2022). Publisher : Nature Publishing Group, p. 366-371. ISSN : 1476-4687. DOI : 10.1038/s41586-022-04662-9. URL : https://www.nature.com/articles/s41586-022-04662-9 (visité le 17/09/2024).

[27] Pierre Cardol et al. « The mitochondrial oxidative phosphorylation proteome of Chlamydomonas reinhardtii deduced from the Genome Sequencing Project ». In : *Plant Physiology* 137.2 (fév. 2005), p. 447-459. ISSN : 0032-0889. DOI : 10.1104/pp.104.054148.

[28] Tanai Cardona et al. « Charge separation in Photosystem II : A comparative and evolutionary overview ». In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*. Photosystem II 1817.1 (1er jan. 2012), p. 26-43. ISSN : 0005-2728. DOI : 10.1016/j.bbabio.2011.07.012. URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0005272811001782 (visité le 17/09/2024).

[29] Cesyen Cedeño, Kris Pauwels et Peter Tompa. « Protein Delivery into Plant Cells : Toward In vivo Structural Biology ». In : *Frontiers in Plant Science* 8 (19 avr. 2017). Publisher : Frontiers. ISSN : 1664-462X. DOI : 10.3389/fpls.2017.00519. URL : https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2017.00519/full (visité le 23/09/2024).

[30] T. Chardot et J. C. Meunier. « Properties of oxidized and reduced spinach (Spinacia oleracea) chloroplast fructose-1,6-bisphosphatase activated by various agents ». In : *The Biochemical Journal* 278 (Pt 3) (Pt 3 15 sept. 1991), p. 787-791. ISSN : 0264-6021. DOI : 10.1042/bj2780787.

[31] Parag R. Chitnis. « PHOTOSYSTEM I : Function and Physiology ». In : *Annual Review of Plant Biology* 52 (Volume 52, 2001 1er juin 2001). Publisher : Annual Reviews, p. 593-626. ISSN : 1543-5008, 1545-2123. DOI : 10.1146/annurev.arplant.52.1.593. URL : https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.arplant.52.1.593 (visité le 17/09/2024).

[32] Tomasz Cierpicki et Jacek Otlewski. « Amide proton temperature coefficients as hydrogen bond indicators in proteins ». In : *Journal of Biomolecular NMR* 21.3 (1er nov. 2001), p. 249-261. ISSN : 1573-5001. DOI : 10.1023/A:1012911329730. URL : https://doi.org/10.1023/A:1012911329730 (visité le 27/09/2024).

[33] Elio A. Cino, Mikko Karttunen et Wing-Yiu Choy. « Effects of Molecular Crowding on the Dynamics of Intrinsically Disordered Proteins ». In : *PLOS ONE* 7.11 (26 nov. 2012). Publisher : Public Library of Science, e49876. issn : 1932-6203. doi : 10.1371/journal.pone.0049876. url : https://journals.plos.org/plosone/article?id=10.1371/journal.pone.0049876 (visité le 10/09/2024).

[34] Romain Clement et al. « Responses of the marine diatom Thalassiosira pseudonana to changes in CO2 concentration : a proteomic approach ». In : *Scientific Reports* 7 (9 fév. 2017), p. 42333. issn : 2045-2322. doi : 10.1038/srep42333.

[35] Romain Clement et al. « The nature of the CO2 -concentrating mechanisms in a marine diatom, Thalassiosira pseudonana ». In : *The New Phytologist* 209.4 (mars 2016), p. 1417-1427. issn : 1469-8137. doi : 10.1111/nph.13728.

[36] *CLiP*. url : https://www.chlamylibrary.org/ (visité le 01/10/2024).

[37] Robyn L. Croke et al. « Hydrogen exchange of monomeric alpha-synuclein shows unfolded structure persists at physiological temperature and is independent of molecular crowding in Escherichia coli ». In : *Protein Science : A Publication of the Protein Society* 17.8 (août 2008), p. 1434-1445. issn : 1469-896X. doi : 10.1110/ps.033803.107.

[38] Cesar L. Cuevas-Velazquez et al. « Intrinsically disordered protein biosensor tracks the physical-chemical effects of osmotic stress on cells ». In : *Nature Communications* 12.1 (14 sept. 2021). Publisher : Nature Publishing Group, p. 5438. issn : 2041-1723. doi : 10.1038/s41467-021-25736-8. url : https://www.nature.com/articles/s41467-021-25736-8 (visité le 30/09/2024).

[39] Peter L. Cummins, Babu Kannappan et Jill E. Gready. « Directions for Optimization of Photosynthetic Carbon Fixation : RuBisCO's Efficiency May Not Be So Constrained After All ». In : *Frontiers in Plant Science* 9 (1er mars 2018). Publisher : Frontiers. issn : 1664-462X. doi : 10.3389/fpls.2018.00183. url : https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2018.00183/full (visité le 15/07/2024).

[40] Ousmane Dao. « Étude de l'interaction entre l'état énergétique de la cellule et le stockage du carbone chez la microalgue Chlamydomonas reinhardtii ». These en préparation. Aix-Marseille, 2019. url : https://theses.fr/s376026 (visité le 04/10/2024).

[41] Rahul K. Das et Rohit V. Pappu. « Conformations of intrinsically disordered proteins are influenced by linear sequence distributions of oppositely charged residues ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 110.33 (13 août 2013), p. 13392-13397. issn : 1091-6490. doi : 10.1073/pnas.1304749110.

[42] F. Delaglio et al. « NMRPipe : a multidimensional spectral processing system based on UNIX pipes ». In : *Journal of biomolecular NMR* 6.3 (nov. 1995), p. 277-293. ISSN : 0925-2738. DOI : 10.1007/BF00197809.

[43] Arnaud Delobel et al. « Mass spectrometric analysis of the interactions between CP12, a chloroplast protein, and metal ions : a possible regulatory role within a PRK/GAPDH/CP12 complex ». In : *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 19.22 (2005), p. 3379-3388. ISSN : 0951-4198. DOI : 10.1002/rcm.2192.

[44] A. G. Dickson et F. J. Millero. « A comparison of the equilibrium constants for the dissociation of carbonic acid in seawater media ». In : *Deep Sea Research Part A. Oceanographic Research Papers* 34.10 (1er oct. 1987), p. 1733-1743. ISSN : 0198-0149. DOI : 10.1016/0198-0149(87)90021-5. URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0198014987900215 (visité le 02/12/2024).

[45] Richard G. Dorrell et Alison G. Smith. « Do red and green make brown ? : perspectives on plastid acquisitions within chromalveolates ». In : *Eukaryotic Cell* 10.7 (juill. 2011), p. 856-868. ISSN : 1535-9786. DOI : 10.1128/EC.00326-10.

[46] Benjamin D. Engel et al. « Native architecture of the Chlamydomonas chloroplast revealed by in situ cryo-electron tomography ». In : *eLife* 4 (13 jan. 2015), e04889. ISSN : 2050-084X. DOI : 10.7554/eLife.04889.

[47] Jenny Erales, Sabrina Lignon et Brigitte Gontero. « CP12 from Chlamydomonas reinhardtii, a permanent specific "chaperone-like" protein of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 284.19 (8 mai 2009), p. 12735-12744. ISSN : 0021-9258. DOI : 10.1074/jbc.M808254200.

[48] Jenny Erales et al. « Exploring CP12 binding proteins revealed aldolase as a new partner for the phosphoribulokinase/glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase/CP12 complex–purification and kinetic characterization of this enzyme from Chlamydomonas reinhardtii ». In : *The FEBS journal* 275.6 (mars 2008), p. 1248-1259. ISSN : 1742-464X. DOI : 10.1111/j.1742-4658.2008.06284.x.

[49] M. Eriksson et al. « Discovery of an algal mitochondrial carbonic anhydrase : molecular cloning and characterization of a low-CO2-induced polypeptide in Chlamydomonas reinhardtii ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93.21 (15 oct. 1996), p. 12031-12034. ISSN : 0027-8424. DOI : 10.1073/pnas.93.21.12031.

[50] David Fell. *Understanding the Control of Metabolism*. 1er jan. 1997. ISBN : 978-1-85578-047-7.

[51] Simona FERMANI et al. « Conformational selection and folding-upon-binding of intrinsically disordered protein CP12 regulate photosynthetic enzymes assembly ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 287.25 (15 juin 2012), p. 21372-21383. ISSN : 1083-351X. DOI : 10.1074/jbc.M112.350355.

[52] Elizabeth S. FREEMAN ROSENZWEIG et al. « The Eukaryotic CO2-Concentrating Organelle Is Liquid-like and Exhibits Dynamic Reorganization ». In : *Cell* 171.1 (21 sept. 2017), 148-162.e19. ISSN : 1097-4172. DOI : 10.1016/j.cell.2017.08.008.

[53] S. FUJIWARA et al. « Structure and differential expression of two genes encoding carbonic anhydrase in Chlamydomonas reinhardtii ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87.24 (déc. 1990), p. 9779-9783. ISSN : 0027-8424. DOI : 10.1073/pnas.87.24.9779.

[54] Hideya FUKUZAWA et al. « Nucleotide sequences of two genes CAH1 and CAH2 which encode carbonic anhydrase polypeptides in Chlamydomonas reinhardtii ». In : *Nucleic Acids Research* 18.21 (21 nov. 1990), p. 6441-6442. ISSN : 0305-1048. DOI : 10.1093/nar/18.21.6441. URL : https://doi.org/10.1093/nar/18.21.6441 (visité le 30/08/2024).

[55] Zhi-Fang GAO et al. « A dynamic phosphoproteomic analysis provides insight into the C4 plant maize (Zea mays L.) response to natural diurnal changes ». In : *The Plant Journal* 113.2 (2023). _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/tpj.16047, p. 291-307. ISSN : 1365-313X. DOI : 10.1111/tpj.16047. URL : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/tpj.16047 (visité le 17/07/2024).

[56] Fabrice GARDEBIEN et al. « Construction of a 3D model of CP12, a protein linker ». In : *Journal of Molecular Graphics & Modelling* 25.2 (oct. 2006), p. 186-195. ISSN : 1093-3263. DOI : 10.1016/j.jmgm.2005.12.003.

[57] Cassy GÉRARD et al. « A Trajectory of Discovery : Metabolic Regulation by the Conditionally Disordered Chloroplast Protein, CP12 ». In : *Biomolecules* 12.8 (28 juill. 2022), p. 1047. ISSN : 2218-273X. DOI : 10.3390/biom12081047.

[58] Cassy GÉRARD et al. « Reduction in Phosphoribulokinase Amount and Re-Routing Metabolism in Chlamydomonas reinhardtii CP12 Mutants ». In : *International Journal of Molecular Sciences* 23.5 (28 fév. 2022), p. 2710. ISSN : 1422-0067. DOI : 10.3390/ijms23052710.

[59] Alexander P. GOLOVANOV et al. « A Simple Method for Improving Protein Solubility and Long-Term Stability ». In : *Journal of the American Chemical Society* 126.29 (1er juill. 2004). Publisher : American Chemical Society, p. 8933-8939. ISSN : 0002-7863. DOI : 10.1021/ja049297h. URL : https://doi.org/10.1021/ja049297h (visité le 08/09/2024).

[60] B. Gontero, M. L. Cardenas et J. Ricard. « A functional five-enzyme complex of chloroplasts involved in the Calvin cycle ». In : *European Journal of Biochemistry* 173.2 (1988). Place : Oxford Publisher : Blackwell, p. 437-443. ISSN : 0014-2956.

[61] Brigitte Gontero et Stephen C. Maberly. « An intrinsically disordered protein, CP12 : jack of all trades and master of the Calvin cycle ». In : *Biochemical Society Transactions* 40.5 (oct. 2012), p. 995-999. ISSN : 1470-8752. DOI : 10.1042/BST20120097.

[62] Brigitte Gontero et Michael E. Salvucci. « Regulation of photosynthetic carbon metabolism in aquatic and terrestrial organisms by Rubisco activase, redox-modulation and CP12 ». In : *Aquatic Botany*. SPECIAL ISSUE : In Honour of George Bowes : Linking Terrestrial and Aquatic Botany 118 (1er août 2014), p. 14-23. ISSN : 0304-3770. DOI : 10.1016/j.aquabot.2014.05.011. URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S030437701400076X (visité le 17/09/2024).

[63] Myriam Goudet. « Role of the small subunit of Rubisco in the green algal phylogeny and Carbon Concentrating Mechanism expression ». In : (28 avr. 2020). DOI : 10.17863/CAM.54139. URL : https://www.repository.cam.ac.uk/handle/1810/307044 (visité le 29/07/2024).

[64] Emmanuelle Graciet. « Etude de la nature des interactions protéine-protéine et de leur rôle dans l'émergence de nouvelles propriétés au sein d'un complexe impliqué dans l'assimilation du CO2 : étude structurale et fonctionnelle de la protéine de liaison CP12 ». These de doctorat. Paris 6, 1er jan. 2003. URL : https://theses.fr/2003PA066145 (visité le 17/12/2024).

[65] Emmanuelle Graciet et al. « Characterization of native and recombinant A4 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Kinetic evidence for confromation changes upon association with the small protein CP12 ». In : *European Journal of Biochemistry* 270.1 (jan. 2003), p. 129-136. ISSN : 0014-2956. DOI : 10.1046/j.1432-1033.2003.03372.x.

[66] Emmanuelle Graciet et al. « The Small Protein CP12 : A Protein Linker for Supramolecular Complex Assembly ». In : *Biochemistry* 42.27 (1er juill. 2003). Publisher : American Chemical Society, p. 8163-8170. ISSN : 0006-2960. DOI : 10.1021/bi034474x. URL : https://doi.org/10.1021/bi034474x (visité le 23/09/2024).

[67] René Groben et al. « Comparative sequence analysis of CP12, a small protein involved in the formation of a Calvin cycle complex in photosynthetic organisms ». In : *Photosynthesis Research* 103.3 (mars 2010), p. 183-194. ISSN : 1573-5079. DOI : 10.1007/s11120-010-9542-z.

[68] Libero Gurrieri et al. « Arabidopsis and Chlamydomonas phosphoribulokinase crystal structures complete the redox structural proteome of the Calvin-Benson cycle ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116.16 (16 avr. 2019), p. 8048-8053. ISSN : 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1820639116.

[69] Libero Gurrieri et al. « Calvin-Benson cycle regulation is getting complex ». In : *Trends in Plant Science* 26.9 (sept. 2021), p. 898-912. ISSN : 1878-4372. DOI : 10.1016/j.tplants.2021.03.008.

[70] Wang H et al. « The global phosphoproteome of Chlamydomonas reinhardtii reveals complex organellar phosphorylation in the flagella and thylakoid membrane ». In : *Molecular & cellular proteomics : MCP* 13.9 (sept. 2014). Publisher : Mol Cell Proteomics. ISSN : 1535-9484. DOI : 10.1074/mcp.M114.038281. URL : https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24917610/ (visité le 07/10/2024).

[71] Claudia Hackenberg et al. « Structural and functional insights into the unique CBS-CP12 fusion protein family in cyanobacteria ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 115.27 (3 juill. 2018), p. 7141-7146. ISSN : 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1806668115.

[72] W. Haehnel. « Photosynthetic Electron Transport in Higher Plants ». In : *Annual Review of Plant Biology* 35 (Volume 35, 1984 1er juin 1984). Publisher : Annual Reviews, p. 659-693. ISSN : 1543-5008, 1545-2123. DOI : 10.1146/annurev.pp.35.060184.003303. URL : https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev.pp.35.060184.003303 (visité le 17/09/2024).

[73] David Thomas Hanson et al. « The Chlamydomonas reinhardtii cia3 mutant lacking a thylakoid lumen-localized carbonic anhydrase is limited by CO2 supply to rubisco and not photosystem II function in vivo ». In : *Plant Physiology* 132.4 (août 2003), p. 2267-2275. ISSN : 0032-0889. DOI : 10.1104/pp.103.023481.

[74] D. H. Harrison et al. « The crystal structure of phosphoribulokinase from Rhodobacter sphaeroides reveals a fold similar to that of adenylate kinase ». In : *Biochemistry* 37.15 (14 avr. 1998), p. 5074-5085. ISSN : 0006-2960. DOI : 10.1021/bi972805y.

[75] Shan He et al. « The structural basis of Rubisco phase separation in the pyrenoid ». In : *Nature Plants* 6.12 (déc. 2020). Publisher : Nature Publishing Group, p. 1480-1490. ISSN : 2055-0278. DOI : 10.1038/s41477-020-00811-y. URL : https://www.nature.com/articles/s41477-020-00811-y (visité le 17/09/2024).

[76] Hans W. Heldt et al. « Alkalization of the chloroplast stroma caused by light-dependent proton flux into the thylakoid space ». In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 314.2 (31 août 1973), p. 224-241. ISSN : 0005-2728. DOI : 10.1016/0005-2728(73)90137-0. URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0005272873901370 (visité le 02/09/2024).

[77] Jessica H. Hennacy et al. « Biogenesis, engineering and function of membranes in the CO 2 -fixing pyrenoid ». In : *bioRxiv : The Preprint Server for Biology* (9 août 2024), p. 2024.08.08.603944. ISSN : 2692-8205. DOI : 10.1101/2024.08.08.603944.

[78] E. Himelblau et al. « Identification of a functional homolog of the yeast copper homeostasis gene ATX1 from Arabidopsis ». In : *Plant Physiology* 117.4 (août 1998), p. 1227-1234. ISSN : 0032-0889. DOI : 10.1104/pp.117.4.1227.

[79] Alex S. Holehouse et al. « CIDER : Resources to Analyze Sequence-Ensemble Relationships of Intrinsically Disordered Proteins ». In : *Biophysical Journal* 112.1 (10 jan. 2017), p. 16-21. ISSN : 1542-0086. DOI : 10.1016/j.bpj.2016.11.3200.

[80] Thomas P. Howard et al. « Antisense suppression of the small chloroplast protein CP12 in tobacco : a transcriptional viewpoint ». In : *Plant Signaling & Behavior* 6.12 (déc. 2011), p. 2026-2030. ISSN : 1559-2324. DOI : 10.4161/psb.6.12.18055.

[81] Thomas P. Howard et al. « Thioredoxin-mediated reversible dissociation of a stromal multiprotein complex in response to changes in light availability ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 105.10 (11 mars 2008). Publisher : Proceedings of the National Academy of Sciences, p. 4056-4061. DOI : 10.1073/pnas.0710518105. URL : https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.0710518105 (visité le 24/09/2024).

[82] Eva Huala et al. « The Arabidopsis Information Resource (TAIR) : a comprehensive database and web-based information retrieval, analysis, and visualization system for a model plant ». In : *Nucleic Acids Research* 29.1 (1er jan. 2001), p. 102-105. ISSN : 0305-1048. URL : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC29827/ (visité le 06/10/2024).

[83] Diane W. Husic et al. « The oxidative photosynthetic carbon cycle or C2 cycle ». In : *Critical Reviews in Plant Sciences* 5.1 (1er jan. 1987). Publisher : Taylor & Francis _eprint : https ://doi.org/10.1080/07352688709382234, p. 45-100. ISSN : 0735-2689. DOI : 10.1080/07352688709382234. URL : https://doi.org/10.1080/07352688709382234 (visité le 29/07/2024).

[84] S. H. Hutner et al. « Some Approaches to the Study of the Role of Metals in the Metabolism of Microorganisms ». In : *Proceedings of the American Philosophical Society* 94.2 (1950). Publisher : American Philosophical Society, p. 152-170. ISSN : 0003-049X. URL : https://www.jstor.org/stable/3143215 (visité le 28/06/2024).

[85] Wassim Kaaki et al. « Exploration of CP12 conformational changes and of quaternary structural properties using electrospray ionization traveling wave ion mobility mass spectrometry ». In : *Rapid communications in mass spectrometry : RCM* 27.1 (15 jan. 2013), p. 179-186. ISSN : 1097-0231. DOI : 10.1002/rcm.6442.

[86] R. Kaiser et L. Metzka. « Enhancement of cyanogen bromide cleavage yields for methionyl-serine and methionyl-threonine peptide bonds ». In : *Analytical Biochemistry* 266.1 (1er jan. 1999), p. 1-8. ISSN : 0003-2697. DOI : 10.1006/abio.1998.2945.

[87] Anika Küken et al. « Effects of microcompartmentation on flux distribution and metabolic pools in Chlamydomonas reinhardtii chloroplasts ». In : *eLife* 7 (11 oct. 2018), e37960. ISSN : 2050-084X. DOI : 10.7554/eLife.37960.

[88] U. K. Laemmli. « Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4 ». In : *Nature* 227.5259 (15 août 1970), p. 680-685. ISSN : 0028-0836. DOI : 10.1038/227680a0.

[89] Helene Launay et al. « Flexibility of Oxidized and Reduced States of the Chloroplast Regulatory Protein CP12 in Isolation and in Cell Extracts ». In : *Biomolecules* 11.5 (8 mai 2021), p. 701. ISSN : 2218-273X. DOI : 10.3390/biom11050701. URL : https://www.mdpi.com/2218-273X/11/5/701 (visité le 31/01/2022).

[90] Hélène Launay et al. « Absence of residual structure in the intrinsically disordered regulatory protein CP12 in its reduced state ». In : *Biochemical and Biophysical Research Communications* 477.1 (août 2016), p. 20-26. ISSN : 0006291X. DOI : 10.1016/j.bbrc.2016.06.014. URL : https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0006291X16309329 (visité le 15/09/2021).

[91] Hélène Launay et al. « Cryptic Disorder Out of Disorder : Encounter between Conditionally Disordered CP12 and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase ». In : *Journal of Molecular Biology* 430.8 (13 avr. 2018), p. 1218-1234. ISSN : 1089-8638. DOI : 10.1016/j.jmb.2018.02.020.

[92] Hélène Launay et al. « Location of the photosynthetic carbon metabolism in microcompartments and separated phases in microalgal cells ». In : *FEBS letters* 597.23 (déc. 2023), p. 2853-2878. ISSN : 1873-3468. DOI : 10.1002/1873-3468.14754.

[93] Hélène Launay et al. « Orchestration of algal metabolism by protein disorder ». In : *Archives of Biochemistry and Biophysics* 672 (sept. 2019), p. 108070. ISSN : 00039861. DOI : 10.1016/j.abb.2019.108070. URL : https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S000398611930493X (visité le 06/10/2021).

[94] Théo Le Moigne et al. « Chapter 8 - Photoproduction of reducing power and the Calvin-Benson cycle ». In : *The Chlamydomonas Sourcebook (Third Edition)*. Sous la dir. d'Arthur R. Grossman et Francis-André Wollman. London : Academic Press, 1er jan. 2023, p. 273-315. ISBN : 978-0-12-821430-5. DOI : 10.1016/B978-0-12-821430-5.00016-X. URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B978012821430500016X (visité le 26/07/2024).

[95] Théo Le Moigne et al. « Crystal structure of chloroplast fructose-1,6-bisphosphate aldolase from the green alga Chlamydomonas reinhardtii ». In : *Journal of Structural Biology* 214.3 (sept. 2022), p. 107873. ISSN : 1095-8657. DOI : 10.1016/j.jsb.2022.107873.

[96] Théo Le Moigne et al. « High-Resolution Crystal Structure of Chloroplastic Ribose-5-Phosphate Isomerase from Chlamydomonas reinhardtii-An Enzyme Involved in the Photosynthetic Calvin-Benson Cycle ». In : *International Journal of Molecular Sciences* 21.20 (21 oct. 2020), p. 7787. ISSN : 1422-0067. DOI : 10.3390/ijms21207787.

[97] Sandrine Lebreton, Emmanuelle Graciet et Brigitte Gontero. « Modulation, via protein-protein interactions, of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity through redox phosphoribulokinase regulation ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 278.14 (4 avr. 2003), p. 12078-12084. ISSN : 0021-9258. DOI : 10.1074/jbc.M213096200.

[98] Robin van der Lee et al. « Classification of Intrinsically Disordered Regions and Proteins ». In : *Chemical Reviews* 114.13 (9 juill. 2014). Publisher : American Chemical Society, p. 6589-6631. ISSN : 0009-2665. DOI : 10.1021/cr400525m. URL : https://doi.org/10.1021/cr400525m (visité le 17/09/2024).

[99] Woonghee Lee, Marco Tonelli et John L. Markley. « NMRFAM-SPARKY : enhanced software for biomolecular NMR spectroscopy ». In : *Bioinformatics (Oxford, England)* 31.8 (15 avr. 2015), p. 1325-1327. ISSN : 1367-4811. DOI : 10.1093/bioinformatics/btu830.

[100] Stéphane D. Lemaire et al. « Thioredoxins in chloroplasts ». In : *Current Genetics* 51.6 (juin 2007), p. 343-365. ISSN : 0172-8083. DOI : 10.1007/s00294-007-0128-z.

[101] Edward A. Lemke et al. « Intrinsic disorder : A term to define the specific physicochemical characteristic of protein conformational heterogeneity ». In : *Molecular Cell* 84.7 (4 avr. 2024), p. 1188-1190. ISSN : 1097-4164. DOI : 10.1016/j.molcel.2024.02.024.

[102] Kailong Li et al. « Chloroplast Protein 12 Expression Alters Growth and Chilling Tolerance in Tropical Forage Stylosanthes guianensis (Aublet) Sw ». In : *Frontiers in Plant Science* 9 (6 sept. 2018). Publisher : Frontiers. ISSN : 1664-462X. DOI : 10.3389/fpls.2018.01319. URL : https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2018.01319/full (visité le 24/09/2024).

[103] Sonia Longhi. « Structural disorder within paramyxoviral nucleoproteins ». In : *FEBS letters* 589.19 (14 sept. 2015), p. 2649-2659. ISSN : 1873-3468. DOI : 10.1016/j.febslet.2015.05.055.

[104] Patricia E. López-Calcagno, Thomas P. Howard et Christine A. Raines. « The CP12 protein family : a thioredoxin-mediated metabolic switch ? » In : *Frontiers in Plant Science* 5 (2014), p. 9. ISSN : 1664-462X. DOI : 10.3389/fpls.2014.00009.

[105] Patricia Elena López-Calcagno et al. « Arabidopsis CP12 mutants have reduced levels of phosphoribulokinase and impaired function of the Calvin-Benson cycle ». In : *Journal of Experimental Botany* 68.9 (1er avr. 2017), p. 2285-2298. ISSN : 1460-2431. DOI : 10.1093/jxb/erx084.

[106] Stefan Lucius et al. « CP12 fine-tunes the Calvin-Benson cycle and carbohydrate metabolism in cyanobacteria ». In : *Frontiers in Plant Science* 13 (11 oct. 2022). Publisher : Frontiers. ISSN : 1664-462X. DOI : 10.3389/fpls.2022.1028794. URL : https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2022.1028794/full (visité le 28/08/2024).

[107] S.c. Maberly. « Diel, episodic and seasonal changes in pH and concentrations of inorganic carbon in a productive lake ». In : *Freshwater Biology* 35.3 (1996). _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/j.1365-2427.1996.tb01770.x, p. 579-598. ISSN : 1365-2427. DOI : 10.1111/j.1365-2427.1996.tb01770.x. URL : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/j.1365-2427.1996.tb01770.x (visité le 29/07/2024).

[108] Stephen Maberly et Brigitte Gontero. *Planète bleue, photosynthèse rouge et verte.* Sous la dir. d'ISTE Editions Ltd. Mars 2023. 330 pages. URL : https://amu.hal.science/hal-04048854 (visité le 17/09/2024).

[109] Stephen C. Maberly et al. « Inorganic carbon uptake in a freshwater diatom, Asterionella formosa (Bacillariophyceae) : from ecology to genomics ». In : *Phycologia* 60.5 (3 sept. 2021). Publisher : Taylor & Francis _eprint : https ://doi.org/10.1080/00318884.2021.1916297, p. 427-438. ISSN : 0031-

8884. DOI : 10.1080/00318884.2021.1916297. URL : https://doi.org/10.1080/00318884.2021.1916297 (visité le 29/07/2024).

[110] Luke C. M. MACKINDER et al. « A repeat protein links Rubisco to form the eukaryotic carbon-concentrating organelle ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 113.21 (24 mai 2016). Publisher : Proceedings of the National Academy of Sciences, p. 5958-5963. DOI : 10.1073/pnas.1522866113. URL : https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1522866113 (visité le 16/09/2024).

[111] Hiranmay MAITY, Lipika BAIDYA et Govardhan REDDY. « Salt-Induced Transitions in the Conformational Ensembles of Intrinsically Disordered Proteins ». In : *The Journal of Physical Chemistry. B* 126.32 (18 août 2022), p. 5959-5971. ISSN : 1520-5207. DOI : 10.1021/acs.jpcb.2c03476.

[112] Annelie MARQUARDT, Robert J. HENRY et Frederik C. BOTHA. « Effect of sugar feedback regulation on major genes and proteins of photosynthesis in sugarcane leaves ». In : *Plant Physiology and Biochemistry* 158 (1er jan. 2021), p. 321-333. ISSN : 0981-9428. DOI : 10.1016/j.plaphy.2020.11.022. URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0981942820305738 (visité le 17/09/2024).

[113] Lucia MARRI et al. « Co-ordinated gene expression of photosynthetic glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, phosphoribulokinase, and CP12 in Arabidopsis thaliana ». In : *Journal of Experimental Botany* 56.409 (jan. 2005), p. 73-80. ISSN : 0022-0957. DOI : 10.1093/jxb/eri020.

[114] Lucia MARRI et al. « CP12-mediated protection of Calvin-Benson cycle enzymes from oxidative stress ». In : *Biochimie* 97 (fév. 2014), p. 228-237. ISSN : 1638-6183. DOI : 10.1016/j.biochi.2013.10.018.

[115] Lucia MARRI et al. « In vitro characterization of Arabidopsis CP12 isoforms reveals common biochemical and molecular properties ». In : *Journal of Plant Physiology* 167.12 (août 2010), p. 939-950. ISSN : 01761617. DOI : 10.1016/j.jplph.2010.02.008. URL : https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0176161710001008 (visité le 17/06/2022).

[116] Lucia MARRI et al. « Prompt and Easy Activation by Specific Thioredoxins of Calvin Cycle Enzymes of Arabidopsis thaliana Associated in the GAPDH/CP12/PRK Supramolecular Complex ». In : *Molecular Plant* 2.2 (mars 2009), p. 259-269. ISSN : 16742052. DOI : 10.1093/mp/ssn061. URL : https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S167420521460469X (visité le 20/06/2022).

[117] Lucia MARRI et al. « Reconstitution and properties of the recombinant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/CP12/phosphoribulokinase supramolecular complex of Arabidopsis ». In : *Plant Physiology* 139.3 (nov. 2005), p. 1433-1443. ISSN : 0032-0889. DOI : 10.1104/pp.105.068445.

[118] Lucia MARRI et al. « Spontaneous assembly of photosynthetic supramolecular complexes as mediated by the intrinsically unstructured protein CP12 ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 283.4 (25 jan. 2008), p. 1831-1838. ISSN : 0021-9258. DOI : 10.1074/jbc.M705650200.

[119] Hiroyoshi MATSUMURA et al. « Structure basis for the regulation of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity via the intrinsically disordered protein CP12 ». In : *Structure (London, England : 1993)* 19.12 (7 déc. 2011), p. 1846-1854. ISSN : 1878-4186. DOI : 10.1016/j.str.2011.08.016.

[120] Motomichi MATSUZAKI et al. « Genome sequence of the ultrasmall unicellular red alga Cyanidioschyzon merolae 10D ». In : *Nature* 428.6983 (8 avr. 2004), p. 653-657. ISSN : 1476-4687. DOI : 10.1038/nature02398.

[121] Edoardo Jun MATTIOLI et al. « Structural snapshots of nitrosoglutathione binding and reactivity underlying S-nitrosylation of photosynthetic GAPDH ». In : *Redox Biology* 54 (août 2022), p. 102387. ISSN : 2213-2317. DOI : 10.1016/j.redox.2022.102387.

[122] Ciaran R. MCFARLANE et al. « Structural basis of light-induced redox regulation in the Calvin-Benson cycle in cyanobacteria ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 116.42 (15 oct. 2019), p. 20984-20990. ISSN : 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1906722116.

[123] Brian C. MCNULTY, Gregory B. YOUNG et Gary J. PIELAK. « Macromolecular crowding in the Escherichia coli periplasm maintains alpha-synuclein disorder ». In : *Journal of Molecular Biology* 355.5 (3 fév. 2006), p. 893-897. ISSN : 0022-2836. DOI : 10.1016/j.jmb.2005.11.033.

[124] Malika MEKHALFI et al. « Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is regulated by ferredoxin-NADP reductase in the diatom <i>Asterionella formosa<i> ». In : *The New Phytologist* 203.2 (juill. 2014), p. 414-423. ISSN : 1469-8137. DOI : 10.1111/nph.12820.

[125] Maria MELONI et al. « Ribulose-1,5-bisphosphate regeneration in the Calvin-Benson-Bassham cycle : Focus on the last three enzymatic steps that allow the formation of Rubisco substrate ». In : *Frontiers in Plant Science* 14 (2023), p. 1130430. ISSN : 1664-462X. DOI : 10.3389/fpls.2023.1130430.

[126] Sabeeha S. MERCHANT et al. « The Chlamydomonas genome reveals the evolution of key animal and plant functions ». In : *Science (New York, N.Y.)* 318.5848 (12 oct. 2007), p. 245-250. ISSN : 1095-9203. DOI : 10.1126/science.1143609.

[127] Moritz T MEYER, Charles WHITTAKER et Howard GRIFFITHS. « The algal pyrenoid : key unanswered questions ». In : *Journal of Experimental Botany* 68.14 (8 sept. 2017), p. 3739-3749. ISSN : 0022-0957. DOI : 10.1093/jxb/erx178. URL : https://doi.org/10.1093/jxb/erx178 (visité le 18/09/2024).

[128] H. Mira, F. Martínez-García et L. Peñarrubia. « Evidence for the plant-specific intercellular transport of the Arabidopsis copper chaperone CCH ». In : *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 25.5 (mars 2001), p. 521-528. ISSN : 0960-7412. DOI : 10.1046/j.1365-313x.2001.00985.x.

[129] Mautusi Mitra et al. « Identification of a new chloroplast carbonic anhydrase in Chlamydomonas reinhardtii ». In : *Plant Physiology* 135.1 (mai 2004), p. 173-182. ISSN : 0032-0889. DOI : 10.1104/pp.103.037283.

[130] H. M. Miziorko. « Phosphoribulokinase : current perspectives on the structure/function basis for regulation and catalysis ». In : *Advances in Enzymology and Related Areas of Molecular Biology* 74 (2000), p. 95-127. ISSN : 0065-258X. DOI : 10.1002/9780470123201.ch3.

[131] Théo Le Moigne et al. « Structure of the photosynthetic Calvin-Benson-Bassham sedoheptulose-1,7-bisphosphatase SBPase from the model microalga Chlamydomonas reinhardtii ». In : *eLife* 12 (11 juin 2023). Publisher : eLife Sciences Publications Limited. DOI : 10.7554/eLife.87196.1. URL : https://elifesciences.org/reviewed-preprints/87196 (visité le 26/07/2024).

[132] Satish Babu Moparthi et al. « FRET analysis of CP12 structural interplay by GAPDH and PRK ». In : *Biochemical and Biophysical Research Communications* 458.3 (13 mars 2015), p. 488-493. ISSN : 1090-2104. DOI : 10.1016/j.bbrc.2015.01.135.

[133] S. Mori et al. « Improved sensitivity of HSQC spectra of exchanging protons at short interscan delays using a new fast HSQC (FHSQC) detection scheme that avoids water saturation ». In : *Journal of Magnetic Resonance. Series B* 108.1 (juill. 1995), p. 94-98. ISSN : 1064-1866. DOI : 10.1006/jmrb.1995.1109.

[134] James V. Moroney et Ruby A. Ynalvez. « Proposed carbon dioxide concentrating mechanism in Chlamydomonas reinhardtii ». In : *Eukaryotic Cell* 6.8 (août 2007), p. 1251-1259. ISSN : 1535-9778. DOI : 10.1128/EC.00064-07.

[135] James V. Moroney et al. « Photorespiration and carbon concentrating mechanisms : two adaptations to high O2, low CO2 conditions ». In : *Photosynthesis Research* 117.1 (nov. 2013), p. 121-131. ISSN : 1573-5079. DOI : 10.1007/s11120-013-9865-7.

[136] David Moses et al. « Intrinsically disordered regions are poised to act as sensors of cellular chemistry ». In : *Trends in Biochemical Sciences* 48.12 (1er déc. 2023). Publisher : Elsevier, p. 1019-1034. ISSN : 0968-0004. DOI : 10.1016/j.tibs.2023.08.001. URL : https://www.cell.com/trends/biochemical-sciences/abstract/S0968-0004(23)00204-9 (visité le 30/09/2024).

[137] K. A. Mott et J. A. Berry. « Effects of pH on Activity and Activation of Ribulose 1,5-Bisphosphate Carboxylase at Air Level CO(2) ». In : *Plant Physiology* 82.1 (sept. 1986), p. 77-82. ISSN : 0032-0889. DOI : 10.1104/pp.82.1.77.

[138] D. R. Muhandiram et L. E. Kay. « Gradient-Enhanced Triple-Resonance Three-Dimensional NMR Experiments with Improved Sensitivity ». In : *Journal of Magnetic Resonance, Series B* 103.3 (1er mars 1994), p. 203-216. ISSN : 1064-1866. DOI : 10.1006/jmrb.1994.1032. URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1064186684710326 (visité le 03/04/2024).

[139] Christine Oesterhelt et al. « Redox regulation of chloroplast enzymes in Galdieria sulphuraria in view of eukaryotic evolution ». In : *Plant & Cell Physiology* 48.9 (sept. 2007), p. 1359-1373. ISSN : 0032-0781. DOI : 10.1093/pcp/pcm108.

[140] William L. Ogren et George Bowes. « Ribulose Diphosphate Carboxylase regulates Soybean Photorespiration ». In : *Nature New Biology* 230.13 (mars 1971). Publisher : Nature Publishing Group, p. 159-160. ISSN : 2058-1092. DOI : 10.1038/newbio230159a0. URL : https://www.nature.com/articles/newbio230159a0 (visité le 02/09/2024).

[141] José Nelson Onuchic et Peter G. Wolynes. « Theory of protein folding ». In : *Current Opinion in Structural Biology* 14.1 (fév. 2004), p. 70-75. ISSN : 0959-440X. DOI : 10.1016/j.sbi.2004.01.009.

[142] C. B. Osmond. « Photorespiration and photoinhibition : Some implications for the energetics of photosynthesis ». In : *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Reviews on Bioenergetics* 639.2 (4 déc. 1981), p. 77-98. ISSN : 0304-4173. DOI : 10.1016/0304-4173(81)90006-9. URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0304417381900069 (visité le 29/07/2024).

[143] Seunghye Park et al. « Expression of the high light-inducible Dunaliella LIP promoter in Chlamydomonas reinhardtii ». In : *Planta* 238.6 (déc. 2013), p. 1147-1156. ISSN : 1432-2048. DOI : 10.1007/s00425-013-1955-4.

[144] Miriam Pasquini et al. « Structural basis for the magnesium-dependent activation of transketolase from Chlamydomonas reinhardtii ». In : *Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects* 1861.8 (août 2017), p. 2132-2145. ISSN : 0304-4165. DOI : 10.1016/j.bbagen.2017.05.021.

[145] Kris Pauwels, Pierre Lebrun et Peter Tompa. « To be disordered or not to be disordered : is that still a question for proteins in the cell ? » In : *Cellular and Molecular Life Sciences : CMLS* 74.17 (13 juin 2017), p. 3185-3204. ISSN : 1420-682X. DOI : 10.1007/s00018-017-2561-6. URL : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC11107661/ (visité le 27/09/2024).

[146] A. R. Portis et H. W. Heldt. « Light-dependent changes of the Mg2+ concentration in the stroma in relation to the Mg2+ dependency of CO2 fixation in intact chloroplasts ». In : *Biochimica Et Biophysica Acta* 449.3 (6 déc. 1976), p. 434-436. ISSN : 0006-3002. DOI : 10.1016/0005-2728(76)90154-7.

[147] *Protein intrinsic disorder and structure-function continuum - PubMed*. URL : https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31521229/ (visité le 24/09/2024).

[148] Ja Raven. « Contributions of anoxygenic and oxygenic phototrophy and chemolithotrophy to carbon and oxygen fluxes in aquatic environments ». In : *Aquatic Microbial Ecology* 56 (3 sept. 2009), p. 177-192. ISSN : 0948-3055, 1616-1564. DOI : 10.3354/ame01315. URL : http://www.int-res.com/abstracts/ame/v56/n2-3/p177-192/ (visité le 13/07/2024).

[149] John A Raven, Charles S Cockell et Christina L De La Rocha. « The evolution of inorganic carbon concentrating mechanisms in photosynthesis ». In : *Philosophical Transactions of the Royal Society B : Biological Sciences* 363.1504 (27 août 2008), p. 2641-2650. ISSN : 0962-8436. DOI : 10.1098/rstb.2008.0020. URL : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2606764/ (visité le 30/08/2024).

[150] M. Rawat et J. V. Moroney. « Partial characterization of a new isoenzyme of carbonic anhydrase isolated from Chlamydomonas reinhardtii ». In : *The Journal of Biological Chemistry* 266.15 (25 mai 1991), p. 9719-9723. ISSN : 0021-9258.

[151] Véronique Receveur-Bréchot et Dominique Durand. « How Random are Intrinsically Disordered Proteins ? A Small Angle Scattering Perspective ». In : *Current Protein & Peptide Science* 13.1 (fév. 2012), p. 55-75. ISSN : 1389-2037. DOI : 10.2174/138920312799277901. URL : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3394175/ (visité le 28/08/2024).

[152] David F. Rendón-Luna et al. « Determining the Protective Activity of IDPs Under Partial Dehydration and Freeze-Thaw Conditions ». In : *Methods in Molecular Biology (Clifton, N.J.)* 2141 (2020), p. 519-528. ISSN : 1940-6029. DOI : 10.1007/978-1-0716-0524-0_26.

[153] R. J. Ritchie. « Universal chlorophyll equations for estimating chlorophylls a, b, c, and d and total chlorophylls in natural assemblages of photosynthetic organisms using acetone, methanol, or ethanol solvents ». In : *Photosynthetica* 46.1 (1er mars 2008). Publisher : Photosynthetica, p. 115-126. ISSN : 03003604, 15739058. DOI : 10.1007/s11099-008-0019-7. URL : https://doi.org/10.1007/s11099-008-0019-7 (visité le 08/04/2024).

[154] Steven Robbens et al. « Unique regulation of the Calvin cycle in the ultrasmall green alga Ostreococcus ». In : *Journal of Molecular Evolution* 64.5 (mai 2007), p. 601-604. ISSN : 0022-2844. DOI : 10.1007/s00239-006-0159-y.

[155] Maureen Saint-Sorny et al. « Interactions Between Carbon Metabolism and Photosynthetic Electron Transport in a Chlamydomonas reinhardtii Mutant Without CO2 Fixation by RuBisCO ». In : *Frontiers in Plant Science* 13 (28 avr. 2022). Publisher : Frontiers. ISSN : 1664-462X. DOI : 10.3389/fpls.2022.876439. URL : https://www.frontiersin.org/journals/plant-science/articles/10.3389/fpls.2022.876439/full (visité le 06/10/2024).

[156] Michael E. Salvucci et George Bowes. « Induction of Reduced Photorespiratory Activity in Submersed and Amphibious Aquatic Macrophytes 1 ». In : *Plant Physiology* 67.2 (1er fév. 1981), p. 335-340. ISSN : 0032-0889. DOI : 10.1104/pp.67.2.335. URL : https://doi.org/10.1104/pp.67.2.335 (visité le 02/09/2024).

[157] R. Scheibe et al. « Co-existence of two regulatory NADP-glyceraldehyde 3-P dehydrogenase complexes in higher plant chloroplasts ». In : *European Journal of Biochemistry* 269.22 (nov. 2002). Place : Oxford Publisher : Blackwell Publishing Ltd WOS :000179115100031, p. 5617-5624. ISSN : 0014-2956. DOI : 10.1046/j.1432-1033.2002.03269.x. URL : http://www.webofscience.com/wos/alldb/full-record/WOS:000179115100031 (visité le 20/06/2022).

[158] Takatoshi Sekiguchi et al. « Chloroplast ATP synthase is reduced by both f-type and m-type thioredoxins ». In : *Biochimica Et Biophysica Acta. Bioenergetics* 1861.11 (1er nov. 2020), p. 148261. ISSN : 1879-2650. DOI : 10.1016/j.bbabio.2020.148261.

[159] Sumra Shahid et al. « Size-dependent studies of macromolecular crowding on the thermodynamic stability, structure and functional activity of proteins : in vitro and in silico approaches ». In : *Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects* 1861.2 (fév. 2017), p. 178-197. ISSN : 0304-4165. DOI : 10.1016/j.bbagen.2016.11.014.

[160] Hui Shao et al. « A new type of flexible CP12 protein in the marine diatom Thalassiosira pseudonana ». In : *Cell communication and signaling : CCS* 19.1 (24 mars 2021), p. 38. ISSN : 1478-811X. DOI : 10.1186/s12964-021-00718-x.

[161] Kim A. Sharp. « Analysis of the size dependence of macromolecular crowding shows that smaller is better ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 112.26 (30 juin 2015). Publisher : Proceedings of the National Academy of Sciences, p. 7990-7995. DOI : 10.1073/pnas.1505396112. URL : https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.1505396112 (visité le 26/09/2024).

[162] Diwakar Shukla et Bernhardt L. Trout. « Understanding the synergistic effect of arginine and glutamic acid mixtures on protein solubility ». In : *The Journal of Physical Chemistry. B* 115.41 (20 oct. 2011), p. 11831-11839. ISSN : 1520-5207. DOI : 10.1021/jp204462t.

[163] Prashant SINGH, Dimitrios KALOUDAS et Christine A. RAINES. « Expression analysis of the Arabidopsis CP12 gene family suggests novel roles for these proteins in roots and floral tissues ». In : *Journal of Experimental Botany* 59.14 (2008), p. 3975-3985. ISSN : 1460-2431. DOI : 10.1093/jxb/ern236.

[164] C. R. SOMERVILLE et W. L. OGREN. « Genetic modification of photorespiration ». In : *Trends in Biochemical Sciences* 7.5 (1er mai 1982), p. 171-174. ISSN : 0968-0004. DOI : 10.1016/0968-0004(82)90130-X. URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/096800048290130X (visité le 29/07/2024).

[165] M. H. SPALDING, R. J. SPREITZER et W. L. OGREN. « Carbonic Anhydrase-Deficient Mutant of Chlamydomonas reinhardii Requires Elevated Carbon Dioxide Concentration for Photoautotrophic Growth ». In : *Plant Physiology* 73.2 (oct. 1983), p. 268-272. ISSN : 0032-0889. DOI : 10.1104/pp.73.2.268.

[166] Martin H. SPALDING. « Microalgal carbon-dioxide-concentrating mechanisms : Chlamydomonas inorganic carbon transporters ». In : *Journal of Experimental Botany* 59.7 (1er mai 2008), p. 1463-1473. ISSN : 0022-0957. DOI : 10.1093/jxb/erm128. URL : https://doi.org/10.1093/jxb/erm128 (visité le 17/09/2024).

[167] Desirée N. STANLEY, Christine A. RAINES et Cheryl A. KERFELD. « Comparative analysis of 126 cyanobacterial genomes reveals evidence of functional diversity among homologs of the redox-regulated CP12 protein ». In : *Plant Physiology* 161.2 (fév. 2013), p. 824-835. ISSN : 1532-2548. DOI : 10.1104/pp.112.210542.

[168] J. STÖCKEL et al. « Prion protein selectively binds copper(II) ions ». In : *Biochemistry* 37.20 (19 mai 1998), p. 7185-7193. ISSN : 0006-2960. DOI : 10.1021/bi972827k.

[169] F. William STUDIER. « Protein production by auto-induction in high-density shaking cultures ». In : *Protein Expression and Purification* 41.1 (mai 2005), p. 207-234. ISSN : 10465928. DOI : 10.1016/j.pep.2005.01.016. URL : https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1046592805000264 (visité le 20/03/2024).

[170] D. F. SÜLTEMEYER et al. « Photosynthesis and apparent affinity for dissolved inorganic carbon by cells and chloroplasts of Chlamydomonas reinhardtii grown at high and low CO2 concentrations ». In : *Planta* 176.2 (nov. 1988), p. 256-260. ISSN : 0032-0935. DOI : 10.1007/BF00392453.

[171] Claudiu T. SUPURAN. « Structure and function of carbonic anhydrases ». In : *Biochemical Journal* 473.14 (12 juill. 2016), p. 2023-2032. ISSN : 0264-6021. DOI : 10.1042/BCJ20160115. URL : https://doi.org/10.1042/BCJ20160115 (visité le 29/07/2024).

[172] Damian Szklarczyk et al. « The STRING database in 2023 : protein-protein association networks and functional enrichment analyses for any sequenced genome of interest ». In : *Nucleic Acids Research* 51 (D1 6 jan. 2023), p. D638-D646. ISSN : 1362-4962. DOI : 10.1093/nar/gkac1000.

[173] Ketty C. Tamburrini et al. « The disordered C-terminal tail of fungal LPMOs from phytopathogens mediates protein dimerization and impacts plant penetration ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 121.13 (26 mars 2024). Publisher : Proceedings of the National Academy of Sciences, e2319998121. DOI : 10.1073/pnas.2319998121. URL : https://www.pnas.org/doi/10.1073/pnas.2319998121 (visité le 29/07/2024).

[174] Masahiro Tamoi et Shigeru Shigeoka. « CP12 Is Involved in Protection against High Light Intensity by Suppressing the ROS Generation in Synechococcus elongatus PCC7942 ». In : *Plants* 10.7 (23 juin 2021), p. 1275. ISSN : 2223-7747. DOI : 10.3390/plants10071275.

[175] Masahiro Tamoi et al. « The Calvin cycle in cyanobacteria is regulated by CP12 via the NAD(H)/NADP(H) ratio under light/dark conditions ». In : *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 42.4 (mai 2005), p. 504-513. ISSN : 0960-7412. DOI : 10.1111/j.1365-313X.2005.02391.x.

[176] Guillaume Tcherkez. « The mechanism of Rubisco-catalysed oxygenation ». In : *Plant, Cell & Environment* 39.5 (2016). _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1111/pce.12629, p. 983-997. ISSN : 1365-3040. DOI : 10.1111/pce.12629. URL : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/pce.12629 (visité le 29/07/2024).

[177] Jing Tsong Teh et al. « NTRC regulates CP12 to activate Calvin–Benson cycle during cold acclimation ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 120.33 (15 août 2023). Publisher : Proceedings of the National Academy of Sciences, e2306338120. DOI : 10.1073/pnas.2306338120. URL : https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.2306338120 (visité le 28/08/2024).

[178] Francois-Xavier Theillet et Enrico Luchinat. « In-cell NMR : Why and how ? » In : *Progress in Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy* 132-133 (2022), p. 1-112. ISSN : 1873-3301. DOI : 10.1016/j.pnmrs.2022.04.002.

[179] Francois-Xavier Theillet et al. « Structural disorder of monomeric -synuclein persists in mammalian cells ». In : *Nature* 530.7588 (4 fév. 2016), p. 45-50. ISSN : 1476-4687. DOI : 10.1038/nature16531.

[180] Gabriel Thieulin-Pardo et al. « Fairy "tails" : flexibility and function of intrinsically disordered extensions in the photosynthetic world ». In : *Frontiers in Molecular Biosciences* 2 (2015), p. 23. ISSN : 2296-889X. DOI : 10.3389/fmolb.2015.00023.

[181] Gabriel THIEULIN-PARDO et al. « Phosphoribulokinase from Chlamydomonas reinhardtii : a Benson-Calvin cycle enzyme enslaved to its cysteine residues ». In : *Molecular bioSystems* 11.4 (avr. 2015), p. 1134-1145. ISSN : 1742-2051. DOI : 10.1039/c5mb00035a.

[182] Luke R. THOMPSON et al. « Phage auxiliary metabolic genes and the redirection of cyanobacterial host carbon metabolism ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108.39 (27 sept. 2011), E757-764. ISSN : 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.1102164108.

[183] Peter TOMPA. « Intrinsically unstructured proteins ». In : *Trends in Biochemical Sciences* 27.10 (oct. 2002), p. 527-533. ISSN : 0968-0004. DOI : 10.1016/s0968-0004(02)02169-2.

[184] Howard TP et al. « Thioredoxin-mediated reversible dissociation of a stromal multiprotein complex in response to changes in light availability ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 105.10 (11 mars 2008). Publisher : Proc Natl Acad Sci U S A. ISSN : 1091-6490. DOI : 10.1073/pnas.0710518105. URL : https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/18322016/ (visité le 27/08/2024).

[185] Mai Duy Luu TRINH et Shinji MASUDA. « Chloroplast pH Homeostasis for the Regulation of Photosynthesis ». In : *Frontiers in Plant Science* 13 (25 mai 2022), p. 919896. ISSN : 1664-462X. DOI : 10.3389/fpls.2022.919896. URL : https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC9174948/ (visité le 29/07/2024).

[186] Vladimir N. UVERSKY. « A decade and a half of protein intrinsic disorder : Biology still waits for physics ». In : *Protein Science* 22.6 (2013). _eprint : https ://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/pro.2261, p. 693-724. ISSN : 1469-896X. DOI : 10.1002/pro.2261. URL : https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1002/pro.2261 (visité le 29/07/2024).

[187] Vladimir N. UVERSKY. « Protein intrinsic disorder and structure-function continuum ». In : *Progress in Molecular Biology and Translational Science* 166 (2019), p. 1-17. ISSN : 1878-0814. DOI : 10.1016/bs.pmbts.2019.05.003.

[188] Vladimir N. UVERSKY et A. Keith DUNKER. « Understanding protein nonfolding ». In : *Biochimica Et Biophysica Acta* 1804.6 (juin 2010), p. 1231-1264. ISSN : 0006-3002. DOI : 10.1016/j.bbapap.2010.01.017.

[189] Peter VANCE et Martin H SPALDING. « Growth, photosynthesis, and gene expression in Chlamydomonas over a range of CO2 concentrations and CO2/O2 ratios : CO2 regulates multiple acclimation states ». In : *Canadian Journal of Botany* 83.7 (juill. 2005). Publisher : NRC Research Press, p. 796-809. ISSN : 0008-4026. DOI : 10.1139/b05-064. URL : https://cdnsciencepub.com/doi/10.1139/b05-064 (visité le 29/07/2024).

[190] Daniele VENTUROLI et Bengt RIPPE. « Ficoll and dextran vs. globular proteins as probes for testing glomerular permselectivity : effects of molecular size, shape, charge, and deformability ». In : *American Journal of Physiology-Renal Physiology* 288.4 (avr. 2005). Publisher : American Physiological Society, F605-F613. ISSN : 1931-857X. DOI : 10.1152/ajprenal.00171.2004. URL : https://journals-physiology-org.insb.bib.cnrs.fr/doi/full/10.1152/ajprenal.00171.2004 (visité le 29/08/2024).

[191] S. VILLA, G. DE FAZIO et U. CANOSI. « Cyanogen bromide cleavage at methionine residues of polypeptides containing disulfide bonds ». In : *Analytical Biochemistry* 177.1 (15 fév. 1989), p. 161-164. ISSN : 0003-2697. DOI : 10.1016/0003-2697(89)90032-8. URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/0003269789900328 (visité le 06/10/2024).

[192] Berkley J. WALKER et al. « The Costs of Photorespiration to Food Production Now and in the Future ». In : *Annual Review of Plant Biology* 67 (Volume 67, 2016 29 avr. 2016). Publisher : Annual Reviews, p. 107-129. ISSN : 1543-5008, 1545-2123. DOI : 10.1146/annurev-arplant-043015-111709. URL : https://www.annualreviews.org/content/journals/10.1146/annurev-arplant-043015-111709 (visité le 29/07/2024).

[193] Lianyong WANG et al. « A chloroplast protein atlas reveals punctate structures and spatial organization of biosynthetic pathways ». In : *Cell* 186.16 (3 août 2023), 3499-3518.e14. ISSN : 1097-4172. DOI : 10.1016/j.cell.2023.06.008.

[194] Yingjun WANG, Dan J. STESSMAN et Martin H. SPALDING. « The CO2 concentrating mechanism and photosynthetic carbon assimilation in limiting CO2 : how Chlamydomonas works against the gradient ». In : *The Plant Journal : For Cell and Molecular Biology* 82.3 (mai 2015), p. 429-448. ISSN : 1365-313X. DOI : 10.1111/tpj.12829.

[195] Christopher A. WAUDBY et al. « In-cell NMR characterization of the secondary structure populations of a disordered conformation of -synuclein within E. coli cells ». In : *PloS One* 8.8 (2013), e72286. ISSN : 1932-6203. DOI : 10.1371/journal.pone.0072286.

[196] Christopher A. WAUDBY et al. « Rapid distinction of intracellular and extracellular proteins using NMR diffusion measurements ». In : *Journal of the American Chemical Society* 134.28 (18 juill. 2012), p. 11312-11315. ISSN : 1520-5126. DOI : 10.1021/ja304912c.

[197] N. WEDEL et J. SOLL. « Evolutionary conserved light regulation of Calvin cycle activity by NADPH-mediated reversible phosphoribulokinase/CP12/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complex dissociation ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95.16 (4 août 1998). Place : Washington Publisher : Natl Acad Sciences WOS :000075246600114, p. 9699-9704. ISSN : 0027-8424. DOI : 10.1073/pnas.95.16.9699. URL :

http://www.webofscience.com/wos/alldb/full-record/WOS:000075246600114 (visité le 20/06/2022).

[198] Norbert Wedel, Jürgen Soll et Brigitte K. Paap. « CP12 provides a new mode of light regulation of Calvin cycle activity in higherplants ». In : *Proceedings of the National Academy of Sciences* 94.19 (16 sept. 1997). Publisher : Proceedings of the National Academy of Sciences, p. 10479-10484. DOI : 10.1073/pnas.94.19.10479. URL : https://www.pnas.org/doi/full/10.1073/pnas.94.19.10479 (visité le 20/04/2022).

[199] K. Werdan, H. W. Heldt et M. Milovancev. « The role of pH in the regulation of carbon fixation in the chloroplast stroma. Studies on CO2 fixation in the light and dark ». In : *Biochimica Et Biophysica Acta* 396.2 (11 août 1975), p. 276-292. ISSN : 0006-3002. DOI : 10.1016/0005-2728(75)90041-9.

[200] Samuel Wohl, Matthew Jakubowski et Wenwei Zheng. « Salt-Dependent Conformational Changes of Intrinsically Disordered Proteins ». In : *The Journal of Physical Chemistry Letters* 12.28 (22 juill. 2021), p. 6684-6691. ISSN : 1948-7185. DOI : 10.1021/acs.jpclett.1c01607.

[201] Katia Wostrikoff et Luke C. M. Mackinder. « Chapter 7 - Rubisco and inorganic carbon assimilation ». In : *The Chlamydomonas Sourcebook (Third Edition)*. Sous la dir. d'Arthur R. Grossman et Francis-André Wollman. London : Academic Press, 1er jan. 2023, p. 223-271. ISBN : 978-0-12-821430-5. DOI : 10.1016/B978-0-12-821430-5.00015-8. URL : https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/B9780128214305000158 (visité le 27/09/2024).

[202] Ruby A. Ynalvez et al. « Identification and characterization of two closely related beta-carbonic anhydrases from Chlamydomonas reinhardtii ». In : *Physiologia Plantarum* 133.1 (mai 2008), p. 15-26. ISSN : 1399-3054. DOI : 10.1111/j.1399-3054.2007.01043.x.

[203] Inmaculada Yruela et Bruno Contreras-Moreira. « Genetic recombination is associated with intrinsic disorder in plant proteomes ». In : *BMC genomics* 14 (9 nov. 2013), p. 772. ISSN : 1471-2164. DOI : 10.1186/1471-2164-14-772.

[204] Ailing Yu et al. « Photosynthetic Phosphoribulokinase Structures : Enzymatic Mechanisms and the Redox Regulation of the Calvin-Benson-Bassham Cycle ». In : *The Plant Cell* 32.5 (mai 2020), p. 1556-1573. ISSN : 1532-298X. DOI : 10.1105/tpc.19.00642.

[205] Yizhi Zhang et al. « Exploring intrinsically disordered proteins in Chlamydomonas reinhardtii ». In : *Scientific Reports* 8.1 (déc. 2018), p. 6805. ISSN : 2045-2322. DOI : 10.1038/s41598-018-24772-7. URL : http://www.nature.com/articles/s41598-018-24772-7 (visité le 07/02/2022).

[206] Yizhi ZHANG et al. « Interaction between adenylate kinase 3 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase from Chlamydomonas reinhardtii ». In : *The FEBS journal* 285.13 (juill. 2018), p. 2495-2503. ISSN : 1742-4658. DOI : 10.1111/febs.14494.

A. Annexes

>DNA sequence, DNA strands reverse

aatcctcgtagacgcggcactcatcggcatcgggggcatccttgcagaaagcctccaggggtc
ggtcagggtgacgtcggccttgacggcatccttcttgtgcgagacagcagcgctgagctcctcaa
cggtgtcccaggccacggcgcagtccgcggaggtgcccttggcgcaagcgtcctcagcctccttc
acggcgtcctgaaccttcttgttcaggtccacagcgggctggccgctcatatgacgaccttcgata
tggccgctgctgtgatgatgatgatgatgatgatgatgatgg

>Protein sequence

HHHHHHHHHHSSGHIEGRHMSGQPAVDLNKKVQDAVKEAEDACAKGTSA
DCAVAWDTVEELSAAVSHKKDAVKADVTLTDPLEAFCKDAPDADECRVYED

FIGURE A.1. – Séquence ADN de la CP12 et résultats de la traduction (via Expasy). Ces résultats proviennent d'un séquençage T7Term du plasmide pET16b CP12.

Mass [m/z]	CS [z]
496,1929	2
524,7036	2
550,2907	2
614,3382	2
738,8536	2
749,2935	2
761,8765	2
767,3643	2
777,8043	2
790,3872	2
802,901	2
831,4118	2
934,5154	2
968,4902	2
997,0009	2
1032,5377	2
1061,0484	2
1174,0471	2
1202,5579	2
1238,0946	2
1248,0568	2
1266,6053	2
1305,0783	2
1444,7083	2
1454,6706	2
1473,2191	2
1501,1575	2
1511,692	2
1558,1789	2
1582,7109	2
1639,7324	2
1646,7584	2
1703,7799	2
1902,8881	2
1959,9096	2
492,9048	3
499,8648	3
508,2534	3
511,9119	3
518,8719	3
527,2606	3
535,6031	3
554,6103	3
623,346	3
645,9959	3
665,003	3
688,6942	3
707,7014	3
783,0338	3

802,041	3
825,7322	3
832,3737	3
844,7393	3
870,388	3
963,4746	3
970,1161	3
982,4818	3
1001,1074	3
1008,1304	3
1039,1217	3
1055,4764	3
1093,4907	3
1098,1747	3
1136,189	3
1268,9279	3
1306,9422	3
498,99683	4
516,7652	4
531,02058	4
587,51993	4
601,7753	4
619,54368	4
624,52478	4
633,79905	4
653,03553	4
722,85053	4
727,83165	4
737,1059	4
751,0751	4
756,34238	4
779,58583	4
791,85183	4
820,36258	4
823,87558	4
852,3863	4
951,94043	4
980,45118	4

FIGURE A.2. – Liste des peptides incluse dans le programme d'acquisition des données MS/MS pour la quantification ciblée de la CP12.

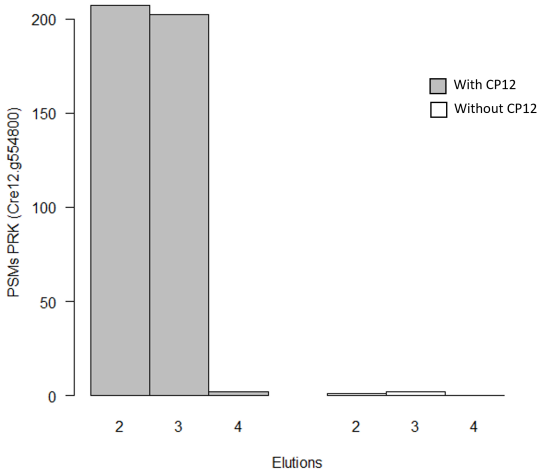


FIGURE A.3. – Expérience de pull-down avec ou sans la CP12 comme appât. Peptide Score Match (PSMs) correspondant à la PRK (Cre12.g554800) présente dans les différentes fractions avec ou sans CP12 collée à la résine.

```
// Set measurements to area and display results with 3 decimal precision
run("Set Measurements...", "area display redirect=None decimal=3");

// Select image directory
folderPath = getDirectory("Select image folder");

list = getFileList(folderPath);

// Function to get the base name of a file
function getBaseName(fileName) {
   dotIndex = indexOf(fileName, ".");
   if (dotIndex > 0) {
      return substring(fileName, 0, dotIndex);
   }
   return fileName;
}

// Iterate through the files in the folder
for (i = 0; i < list.length; i++) {
   if (list[i].endsWith(".tif")) {
      fileName = list[i];
      baseName = getBaseName(fileName);
      segFileName = baseName + "_seg.tif";
      segFilePath = folderPath + File.separator + segFileName;

      // Check if segmentation file exists
      if (File.exists(segFilePath)) {
         // Apply classifier using Trainable Weka Segmentation
         open(folderPath + File.separator + fileName);
         titreImageBase = getTitle();
         open(segFilePath);
         titreImageSeg = getTitle();
         run("Tile");  // Tile both the base image and segmentation
```

```
// Initialize ROI manager and perform manual selection
roiManager("reset");
setTool("freehand");
waitForUser("Select the pyrenoid");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 0);
roiManager("Rename", "pyre");

// Select the entire cell
setTool("freehand");
roiManager("Show All");
waitForUser("Select the whole cell");
roiManager("Add");

// Create a cell region excluding the pyrenoid
roiManager("Select", newArray(0, 1));
roiManager("XOR");
roiManager("Add");
roiManager("Select", 2);
roiManager("Rename", "cell-noPyr");

// Save the ROIs to a zip file
saveRoiPath = folderPath + baseName + "_rois.zip";
roiManager("Save", saveRoiPath);

// Measure the cell and pyrenoid regions
selectImage(titreImageSeg);
roiManager("Select", 2);
run("Measure");
run("Analyze Particles...", "summarize");
selectImage(titreImageSeg);
roiManager("Select", 0);
```

```
            run("Measure");
            run("Analyze Particles...", "summarize");
            close("*");
        }
    }
}

// Collect results into arrays
nbGold = newArray();
Area = newArray();
Density = newArray();
ImageRois = newArray();

selectWindow("Summary");

// Loop through summary results to calculate gold particle density
for (i = 0; i < Table.size; i++) {
    ImageRois[i] = getResultString("Label", i);
    nbGold[i] = Table.get("Count", i);
    Area[i] = getResult("Area", i);
    Density[i] = nbGold[i] / Area[i];
}

// Display and save results as a CSV file
Table.showArrays("GoldResult", ImageRois, nbGold, Area, Density);
selectWindow("GoldResult");
saveAs("Results", folderPath + File.separator + "_GoldResults.csv");

exit();
```

FIGURE A.4. – Macro utilisée pour analyser les images de microscopie électronique avec le logiciel Fiji pour les expériences de marquage Immunogold. Cette macro permet à l'utilisateur de définir la région correspondant au pyrénoïde de *C. reinhardtii* et l'ensemble de la zone cellulaire. Le nombre de particules dans ces régions est compté et le ratio de particules dans ces zones est calculé.


Q3N.H
A5N.H
V6N.H
D7N.H
L8N.H
N9N.H
K10N.H
K11N.H
V12N.H
Q13N.H
D14N.H
A15N.H
V16N.H
K17N.H
E18N.H
A19N.H
E20N.H
D21N.H
A22N.H
C23N.H
A24N.H
K25N.H
G26N.H
T27N.H
S28N.H
A29N.H
D30N.H
C31N.H
A32N.H
V33N.H
A34N.H
W35N.H
D36N.H
T37N.H
V38N.H
E39N.H
E40N.H
L41N.H
S42N.H
A43N.H
A44N.H
V45N.H
S46N.H
H47N.H
K48N.H
K49N.H
D50N.H
A51N.H
V52N.H
K53N.H
δH en ppm
Température en K

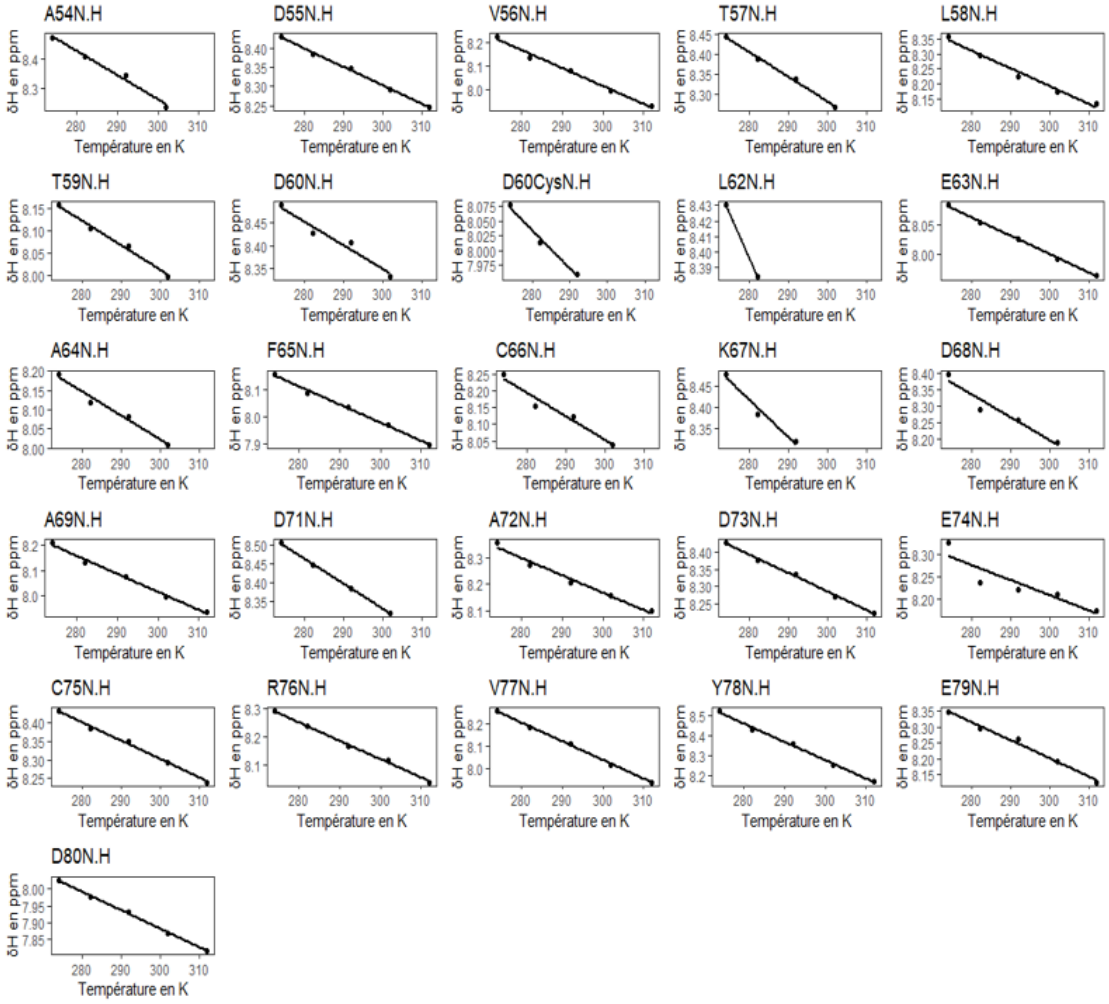
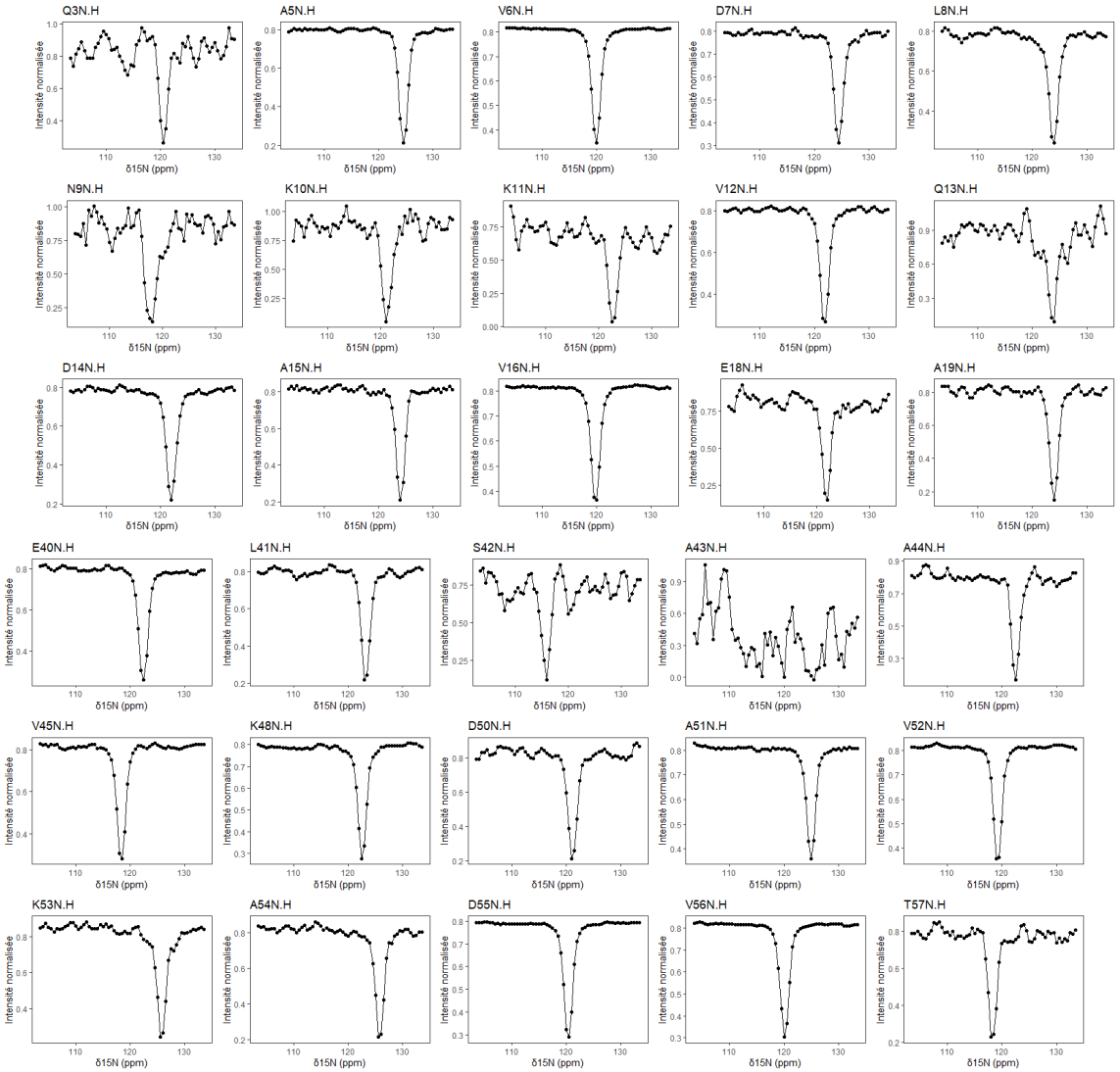


FIGURE A.5. – Coefficients de variation de température pour chaque résidu de la protéine CP12 réduite.


Q3N.H
A5N.H
V6N.H
D7N.H
L8N.H
N9N.H
K10N.H
K11N.H
V12N.H
Q13N.H
D14N.H
A15N.H
V16N.H
E18N.H
A19N.H
E40N.H
L41N.H
S42N.H
A43N.H
A44N.H
V45N.H
K48N.H
D50N.H
A51N.H
V52N.H
K53N.H
A54N.H
D55N.H
V56N.H
T57N.H
Intensité normalisée
δ15N (ppm)

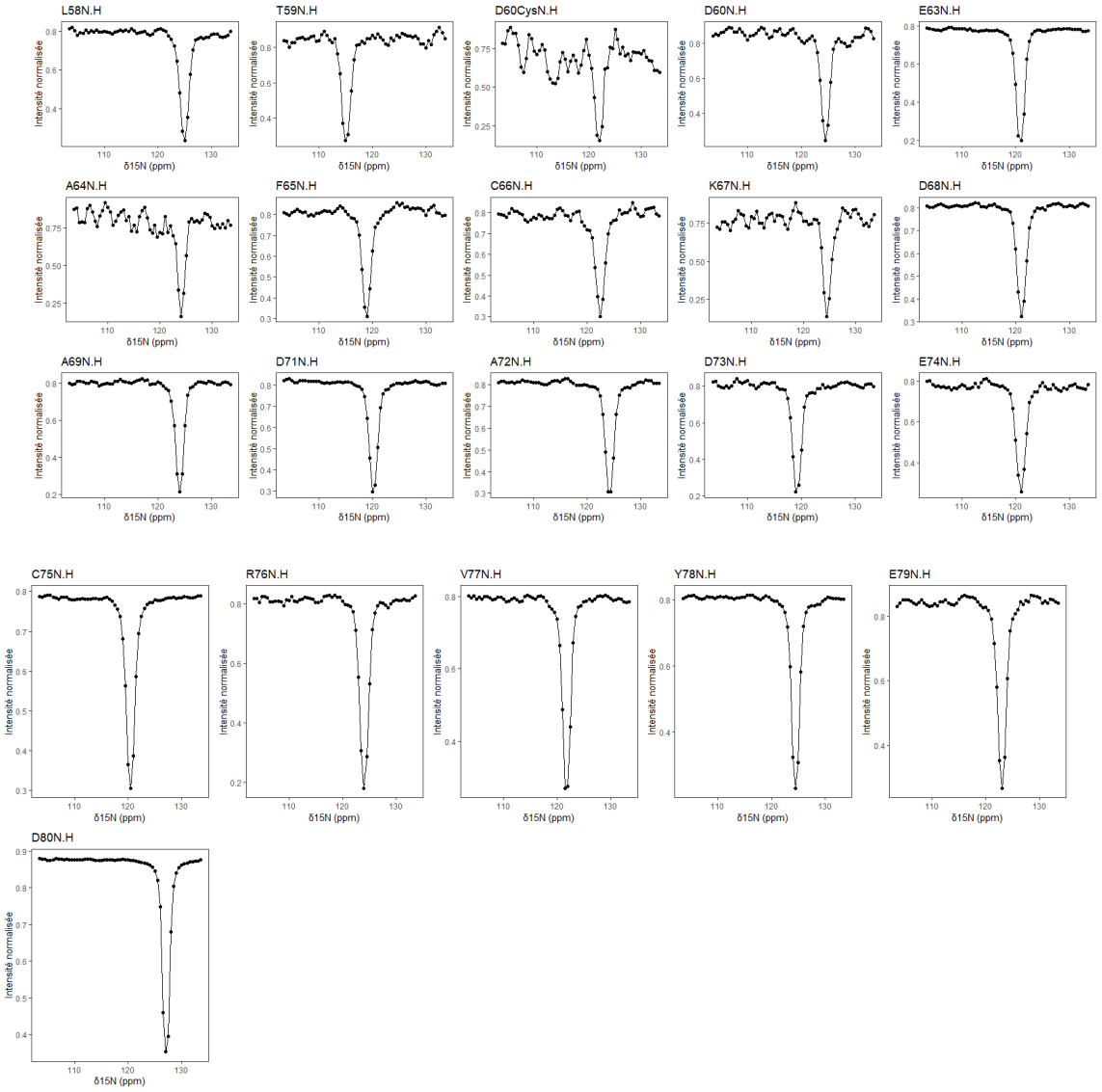


FIGURE A.6. – Profils CEST pour chaque ^{15}N des résidus de la CP12 réduite. L'expérience CEST ^{15}N indique qu'il n'y a pas de dynamique conformationnelle à échelle de temps lente.

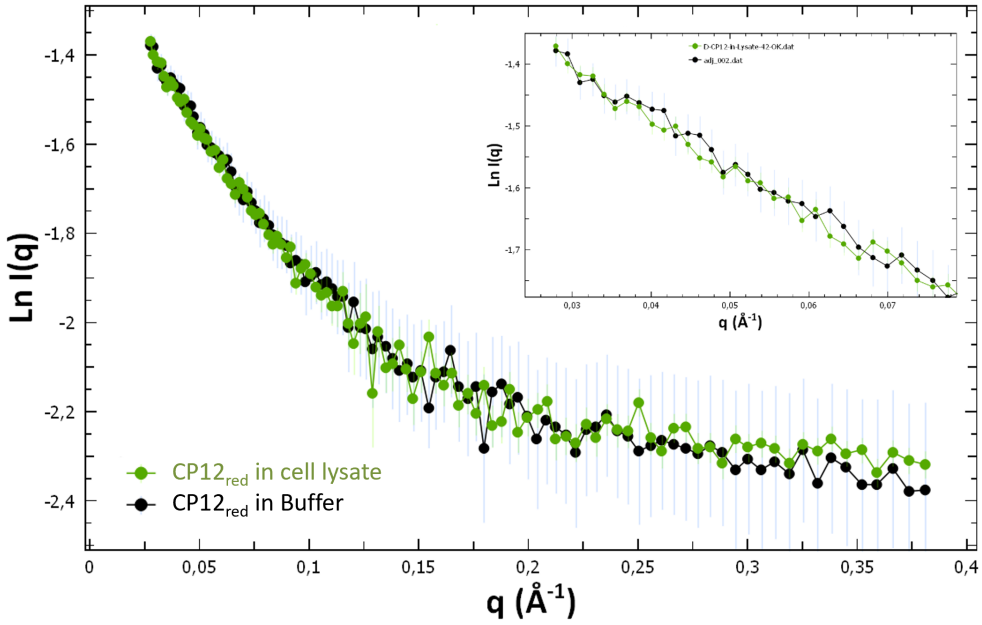


FIGURE A.7. – Résultats de « Small Angle Neutron Scattering » (SANS) obtenus avec la CP12 réduite en solution (en noir) et dans un extrait cellulaire de *C. reinhardtii* (en vert). La CP12 se comporte comme protéine désordonnée *in vitro* (Rg = 29.5 ± 1.5 Å) et dans des conditions reproduisant l'environnement physiologique (Rg = 28.5 ± 1.3 Å).

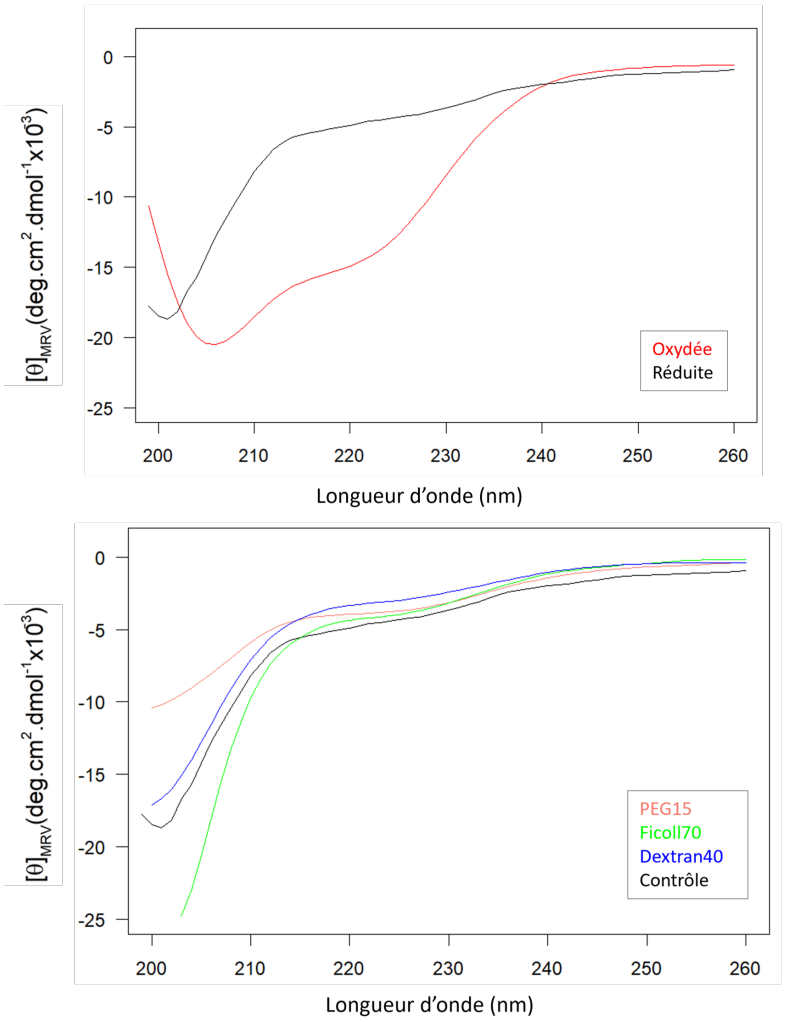


FIGURE A.8. – Spectre CD de la protéine CP12 oxydée et de la CP12 réduite (Tris pH 7.9 NaCl 150 mM TCEP 1mM) en présence ou non (contrôle), de Ficoll70 (250 mg/mL), de Dextran40 (200 mg/mL), ou de PEG15 (200mg/mL).

B. Revues bibliographiques

B.1. « A Trajectory of Discovery : Metabolic Regulation by the Conditionally Disordered Chloroplast Protein, CP12 »

biomolecules

Review

A Trajectory of Discovery: Metabolic Regulation by the Conditionally Disordered Chloroplast Protein, CP12

Cassy Gérard, Frédéric Carrière, Véronique Receveur-Bréchot, Hélène Launay * and Brigitte Gontero *

Aix Marseille Univ, CNRS, BIP, UMR 7281, IMM, FR3479, 31 Chemin J. Aiguier, CEDEX 9, 13 402 Marseille, France; cgerard@imm.cnrs.fr (C.G.); carriere@imm.cnrs.fr (F.C.); veronique.brechot@imm.cnrs.fr (V.R.-B.)

* Correspondence: helene.launay@univ-amu.fr (H.L.); bmeunier@imm.cnrs.fr (B.G.)

Abstract: The chloroplast protein CP12, which is widespread in photosynthetic organisms, belongs to the intrinsically disordered proteins family. This small protein (80 amino acid residues long) presents a bias in its composition; it is enriched in charged amino acids, has a small number of hydrophobic residues, and has a high proportion of disorder-promoting residues. More precisely, CP12 is a conditionally disordered proteins (CDP) dependent upon the redox state of its four cysteine residues. During the day, reducing conditions prevail in the chloroplast, and CP12 is fully disordered. Under oxidizing conditions (night), its cysteine residues form two disulfide bridges that confer some stability to some structural elements. Like many CDPs, CP12 plays key roles, and its redox-dependent conditional disorder is important for the main function of CP12: the dark/light regulation of the Calvin-Benson-Bassham (CBB) cycle responsible for CO_2 assimilation. Oxidized CP12 binds to glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase and phosphoribulokinase and thereby inhibits their activity. However, recent studies reveal that CP12 may have other functions beyond the CBB cycle regulation. In this review, we report the discovery of this protein, its features as a disordered protein, and the many functions this small protein can have.

Keywords: Calvin-Benson-Bassham cycle; conditionally disordered protein; history of modern science; metabolism regulation; moonlighting protein; protein-protein interaction

check for updates

Citation: Gérard, C.; Carrière, F.; Receveur-Bréchot, V.; Launay, H.; Gontero, B. A Trajectory of Discovery: Metabolic Regulation by the Conditionally Disordered Chloroplast Protein, CP12. *Biomolecules* **2022**, *12*, 1047. https://doi.org/10.3390/biom12081047

Academic Editors: Prakash Kulkarni, Stefania Brocca, Keith Dunker and Sonia Longhi

Received: 27 June 2022
Accepted: 26 July 2022
Published: 28 July 2022

Publisher's Note: MDPI stays neutral with regard to jurisdictional claims in published maps and institutional affiliations.

Copyright: © 2022 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/).

1. Introduction

As V. Uversky mentioned, the discovery of the natural abundance and functional importance of intrinsically disordered proteins (IDPs) has changed protein science [1]. It is now widely accepted that the protein structure-function paradigm that dominated scientific minds for more than 100 years does not hold true for all proteins, and IDPs or proteins containing disordered regions (IDR)s are widespread in all areas of life. IDPs and IDRs differ from structured globular proteins and domains in many respects, such as their amino acid composition, complexity of sequence, hydrophobicity, charge, flexibility, and rate of amino acid substitutions over evolutionary time [2]. They play significant roles in many biological processes, such as control of the cell cycle, transcriptional activation, and signaling, and they frequently interact with many partners or function as central hubs in protein interaction networks. However, in the plant kingdom only a few IDPs have been studied through a recent analysis of 12 plant genomes, which revealed that the occurrence of disorder in plants is similar to that in many other eukaryotes [3]. In plants, most of the information on IDPs comes from *Arabidopsis thaliana*, and among them, to cite but a few, the late embryogenesis abundant (LEA) proteins that are important IDPs are mainly associated with environmental stress [4]. In the algae research field, a recent experimental study reported that 682 proteins from a chlorophyte, *Chlamydomonas reinhardtii*, were heat-resistant, and 299 were predicted to be disordered by four different disorder predictors [5]. However, only a few algal proteins that are fully or partially disordered have been studied [6–9]. Among them, only

the essential pyrenoid component 1 (EPYC1) [10–14], and, above all, the chloroplast protein of 12 kDa (CP12), as evidenced below, have been experimentally studied in depth.

2. Discovery of a Small Protein, CP12, in Photosynthetic Organisms

In 1996, cDNA clones were reported from expression libraries for a nuclear-encoded chloroplast protein in three higher plants: pea, spinach, and tobacco, which was named CP12 [15]. This was the first report on CP12, and at this stage, not much was known about this protein. The authors found that this protein consists of about 75 amino acid residues, and it had an abnormal electrophoretic mobility in sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis (SDS-PAGE) experiments. In addition, they noticed that the CP12 proteins from the three higher plants had a high content of charged amino acid residues, and their conclusion at this time was that this protein was highly hydrophilic and very likely a good candidate for a soluble stroma-located protein within the chloroplast. In all of the three species, two conserved cysteine residues are present at the N- and at the C-terminus that are separated by eight amino acid residues with a central proline residue. The secondary structure prediction suggested that CP12 has a central helix and is organized into two domains, with each containing two cysteine residues that could form disulfide bonds (Figure 1). In this pioneer work, they also showed that CP12 could interact with an enzyme from the Calvin-Benson-Bassham (CBB) cycle, the glyceraldehyde -3-phosphate dehydrogenase (GAPDH, EC 1.2.1.13) [15].



Figure 1. Schematic representation of the predicted secondary structure of mature CP12. Cysteine residues proposed to form peptide loops and that can form two disulfide bridges (C23–C31 and C66–C75) when CP12 is oxidized are indicated with black circles. These two loops are separated by an alpha helix. The proline residue conserved in CP12 from Plantae is shown with a yellow circle. Numbering is from the *C. reinhardtii* mature CP12 sequence. This figure was created with BioRender (https://biorender.com/ (accessed on 25 July 2022)) and adapted from Wedel et al. [16].

Later, in a work performed on spinach leaves, the same group showed that CP12 not only interacts with GAPDH but also with another enzyme of the CBB cycle, the phosphoribulokinase (PRK, EC 2.7.1.19) [16]. They showed that CP12 could form a 600 kDa complex with the two enzymes mentioned above. This ternary complex was not affected by the presence of NAD(H), but the presence of NADP or NADPH, as well as the high concentration of a reducing agent, dithiothreitol (DTT), led to its dissociation. The authors proposed a model in which the ternary complex exists under dark and dissociates under light. Their results and those of other groups in the literature suggested that the enzymes within the complex were inactive and became active upon dissociation [17–19]. Since the CBB cycle does not operate in the dark and become active in the light, the association–dissociation of this complex could be a means to regulate the CBB cycle upon dark-light transitions and reciprocally.

At the same time, Avilan et al. found a complex made up of PRK and GAPDH in the green alga, *C. reinhardtii* [20]. In the green algae, there is a unique form of GAPDH, the homotetrameric A_4, while in higher plants there is also an A_2B_2 where the B-type subunit has a C-terminal extremity that presents homology to the C-terminus of CP12. These authors deeply analyzed the characteristics and the kinetics of the enzymes within the complex and those of the enzymes that dissociated from it [20–23]. They purified this complex to homogeneity, and, later, the presence of CP12 in the PRK/GAPDH complex reported previously was revealed by MALDI-ToF mass spectrometry [24]. N-terminal sequencing by Edman degradation of the ternary complex allowed one to determine the first amino acid residues of each protein and revealed that the sequence of the mature

CP12 starts at SGQPA [25]. Therefore, the complex isolated by Avilan et al. had the same compositions as that found by Wedel et al. Indeed, in 1998, Wedel et al. showed that CP12 was present not only in higher plants but also in *C. reinhardtii*, as well as in many other species (mosses, cyanobacteria). The presence of CP12 in this complex agreed with the cryo-electron microscopy performed on this purified complex, which suggested that other components besides PRK and GAPDH were present [26]. The activities of the enzymes involved in this complex were regulated in vitro by metabolites such as NADP(H) [16,27,28]. All together, these results provided new ideas for the regulation of photosynthesis and were further investigated by many groups.

In *C. reinhardtii*, it was shown that not only the regulatory properties of GAPDH but also its kinetics parameters were affected by CP12. Native GAPDH and recombinant algal GAPDH displayed Michaelis-Menten kinetics with NADH and NADPH as cofactors, with a marked preference for NADPH. Both forms displayed positive cooperativity towards the substrate, 1,3-bisphosphoglycerate (BPGA), but interestingly, these kinetic analyses showed that the native GAPDH had a two-fold lower catalytic constant for the reduction of BPGA, as well as a two-fold lower pseudo-affinity ($K_{0.5}$) for BPGA compared to recombinant GAPDH [24]. These results were surprising, but using mass spectrometry the authors showed that the native GAPDH was still associated with CP12. At the same time, as only a partial sequence of the *C. reinhardtii* CP12 was obtained by PCR, the same authors cloned the entire cDNA of this algal protein and subsequently expressed the protein in *Escherichia coli* [25].

If some results suggested that the PRK/GAPDH/CP12 allowed for the regulation of these enzymes, the presence of this small protein raised a question about its role in the formation of the complex. The role of CP12 in the assembly pathway of the algal PRK/GAPDH/CP12 complex was thus investigated as no complex could be reconstituted in vitro with the native PRK and the recombinant GAPDH devoid of CP12.

In darkened spinach leaves, Scheibe's group also showed that GAPDH can exist under two inactive aggregated states, one that corresponded to a hexadecameric A_8B_8 form and another one that corresponded to the PRK/GAPDH/CP12 complex. Only the dissociation of these edifices with reducing treatment mimicking light resulted in the activity of the released enzymes [29]. The role of CP12 was, by then, far from being understood. Of interest, in the literature, many high oligomerization states of either GAPDH or PRK, in spinach but also in *Phaesolus vulgaris*, have been reported [30]. In spinach, the oligomeric enzymes had latent activity that only appeared upon dissociation [31,32]. In the 20th century, the existence of supramolecular complexes was not recognized in living cells and their existence was seen as artefactual. Therefore, the data were differentially interpreted, but it is very likely that the high molecular mass of GAPDH and PRK with latent activity in fact corresponded to supramolecular complexes.

In the green algae as in the higher plants, it was later shown that the four cysteine residues could form two disulfide bridges, one bridging the N-terminal cysteine pair (residues 23 and 31 in *C. reinhardtii*) and one bridging the C-terminal pair (residues 66 and 75 in *C. reinhardtii*). It was shown using surface plasmon resonance that CP12 under its oxidized state, with two disulfide bridges, was able to bind sequentially to GAPDH with a high affinity (K_D equal to 0.44 nM), and then this subcomplex was able to bind to PRK (K_D equal to 60 nM). The affinity of CP12 for GAPDH was higher than the one found (µM range) for the Arabidopsis complex [33]. The entity composed of one tetrameric GAPDH, one dimeric PRK, and CP12 (the stoichiometry of which was yet unknown) was defined as a unit. This entity was then able to dimerize to provide the native complex. CP12 therefore acted as a linker in the assembly of the ternary PRK/GAPDH/CP12 complex [25]. Later, native mass spectrometry revealed that two monomeric CP12 molecules were bound to one GAPDH tetramer [34]. Consequently, the stoichiometry inside the ternary complex is two tetrameric GAPDH, two dimeric PRK, and four monomeric CP12. Studies using mutagenesis and limited proteolysis have allowed the residues involved in the interaction between CP12

and GAPDH from *C. reinhardtii* to be mapped and to show that this interaction involves the S-loop arginine residues of GAPDH and the C-terminus of CP12 [35].

3. CP12, a Flexible Protein

The first observation of CP12 as an IDP was its abnormal behavior under SDS-PAGE. The protein migrates as a 15 kDa under oxidized form and 25 kDa under its reduced form for *C. reinhardtii*, while the expected theoretical molecular mass of the monomer is 8.5 kDa (Figure 2A,B). Moreover, using size-exclusion chromatography, the elution volume of *C. reinhardtii* CP12 released from the PRK/GAPDH/CP12 complex corresponded to an apparent molecular mass of 35 ± 4 kDa using a column calibrated with globular proteins (Figure 2C). This could correspond to a tetrameric globular form that has never been proven or to an elongated form. These enigmatic behaviors of CP12 were only understood after the concept of IDP was claimed [2,36–38]. The size exclusion elution volume mentioned above correlates to a hydrodynamic radius of 2.8 ± 0.1 nm, which corresponds to the expected hydrodynamic properties of a random-coil polymer of 8.8 kDa. These values were in agreement with those confirmed by fluorescence correlation spectroscopy experiments [39]. In 2003, for the first time, it was proposed that the *C. reinhardtii* CP12 belongs to the IDP family (formerly also called an "intrinsically unstructured protein") [25]. Indeed, CP12 possesses a range of properties that are landmarks of IDPs such as a bias in amino acid composition, is enriched in charged amino acid residues, is depleted in hydrophobic residues, and has a high proportion of disorder-promoting residues (Figure 3). Even if CP12 has a high proportion of disorder-promoting residues, the presence of cysteine residues was first surprising as cysteine residues were considered as "order-promoting residues" due to their ability to form inter- or intramolecular disulfide bridges.

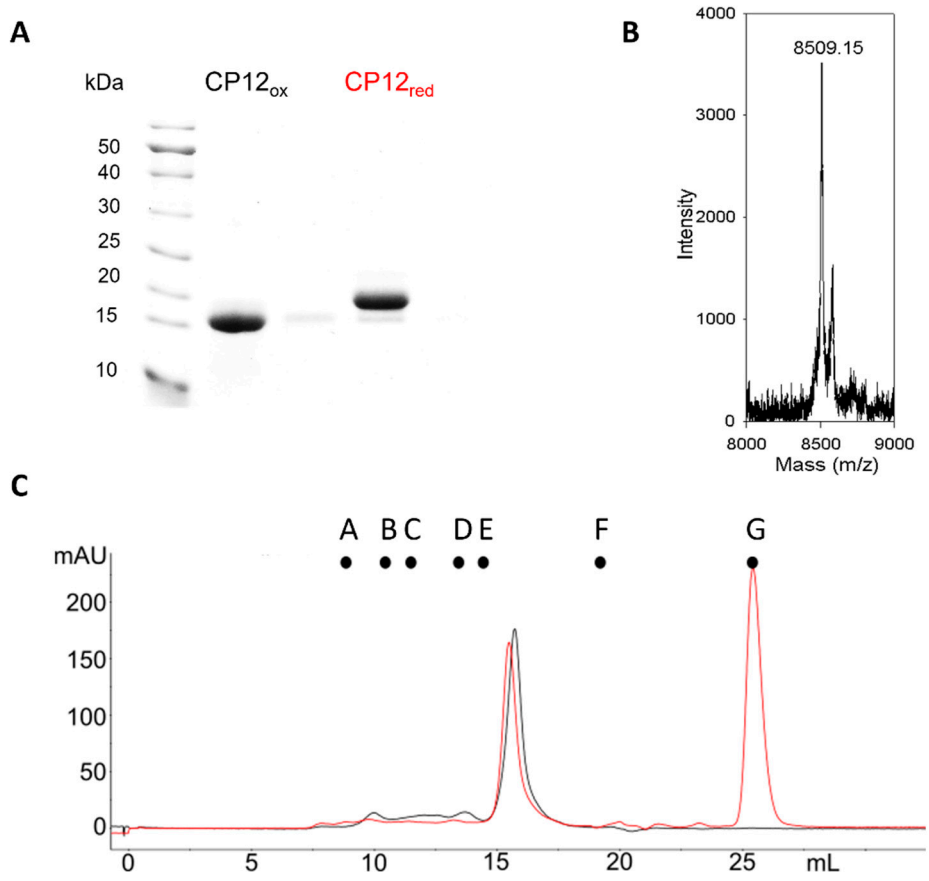


Figure 2. CP12 behaves as an IDP. (**A**) SDS-PAGE (12%) of 4 µg *C. reinhardtii* recombinant CP12 under its oxidized or reduced state. (**B**) MALDI-ToF mass spectrum of the native CP12 isolated from the PRK/GAPDH/CP12 complex of *C. reinhardtii*. (**C**) Size-exclusion chromatography profile

of *C. reinhardtii* recombinant CP12 under oxidized (black) or reduced (red) conditions (column: Superdex 200 10 × 300 mm). Above the chromatogram, the dots from A to G indicate the position of molecular-weight standard globular proteins. A: Ferritine (MW 440 kDa, r_H 6.8 nm); B: Catalase (MW 240 kDa, r_H 5.5 nm); C: dimer of Bovine Serum Albumin (BSA, MW 136 kDa, r_H 4.5 nm); D: monomer of BSA (MW 68 kDa, r_H 3.5 nm); E: Ovalbumin (MW 43 kDa, r_H 3 nm); F: Cytochrome (MW 12.5 kDa, r_H 2 nm) C; and G: oxidized form of DTT. MW and r_H stand for molecular weight and hydrodynamic radius.

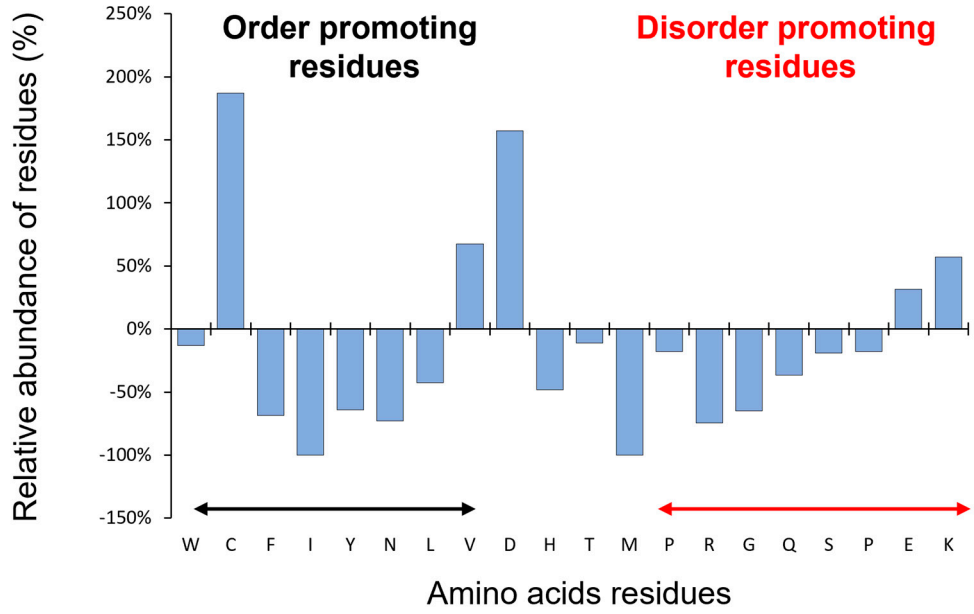


Figure 3. CP12 presents a bias in amino acid composition. Comparison of amino acid composition between globular proteins and *C. reinhardtii* CP12 using composition profiler (http://www.cprofiler.org (accessed on 25 July 2022)) [40]. The globular proteins dataset is from protein data bank (PDB) Select 25.

After the identification of CP12 as an IDP, a range of biophysical techniques confirmed that reduced CP12 completely lacks stable secondary and tertiary structural elements. The circular dichroism (CD) spectrum of reduced CP12 (or imitations of reduced CP12 using cysteine to serine mutants) showed a minimum ellipticity at 200 nm, as is characteristic for disordered proteins (Figure 4A) [25]. The Kratky representation of the small-angle X-ray scattering (SAXS) data of reduced CP12 exhibited a plateau at q.Rg > 2 typical of random polymers and characteristic of fully disordered proteins (Figure 4B) [41]. The ^{1}H nuclear magnetic resonance (NMR) frequencies of all resonances from reduced CP12 showed minimal chemical shift dispersion (clustered from 7.5 to 8.5 ppm); their linewidths were sharp, and all the features of NMR data were typical of that disordered proteins (Figure 4C) [41]. In addition, NMR data confirmed that reduced CP12 exchanges between a myriad of possible conformations rapidly at a timescale of less than a nanosecond, as expected for an IDP. Other biophysical methods confirmed the IDP properties for reduced CP12, including Förster resonance energy transfer (FRET), fluorescence correlation spectroscopy (FCS), or mass spectrometry [42]. Moreover, it was shown that under oxidized conditions, CP12 was partially folded but still very flexible, and only a model structure obtained by sequence-based molecular modelling was available for many years [43]. CD analysis showed that it was much more helical than in its reduced form (Figure 4A), and an ion-mobility mass spectrometry study showed that the algal oxidized CP12 exists under two conformational states, a compact one and an extended one [34]. Later, experimental data obtained by SAXS also showed atypical features: the Kratky plot of oxidized CP12 was an intermediate between that of a well-folded protein (a bell-shaped curve with a

maximum at q.Rg value of $\sqrt{3}$) and that of a fully disordered protein (such as that of reduced CP12), and these features are characteristic of protein with unstable structural properties (Figure 4B) [44,45]. The SAXS profile revealed the co-existence of two populations of conformers in solution, a compact one and a more disordered one, with all features being characteristic of protein with unstable structural properties. Similarly, the ^{1}H-^{15}N NMR spectrum of oxidized CP12 differed from that of reduced CP12 and showed a small number of dispersed resonances together with a large number of broad resonances clustered from 7.5 to 8.5 ppm (Figure 4C). All these experimental data could be reconciled with a two-state equilibrium for the algal oxidized CP12: (i) 60% of the oxidized CP12 molecules have two helices in the N-terminal half of the protein and a globular domain at the C-terminus; (ii) 40% of the oxidized CP12 molecules have only the globular fold at the C-terminus, while the N-terminal half remains disordered [44]. The multiple structural transitions and conformational flexibility of CP12 could provide a clue on how this protein can carry variable functions and bind multiple partners. When the stable C-terminal structural element of the *C. reinhardtii* oxidized CP12 binds to GAPDH, it induces a cryptic disorder, and its unstable N-terminal region is further destabilized to favor a disordered conformation [44]. This structural transition upon GAPDH binding contrasts to plant oxidized CP12, where the binding of GAPDH leads to a compaction of the N-terminal region [36,37]. These differences in the stability of the N-terminal region of oxidized CP12 correlate with the differences of relative affinity of CP12 for GAPDH between the algal and the plant species mentioned above with opposite entropic contribution to the binding.

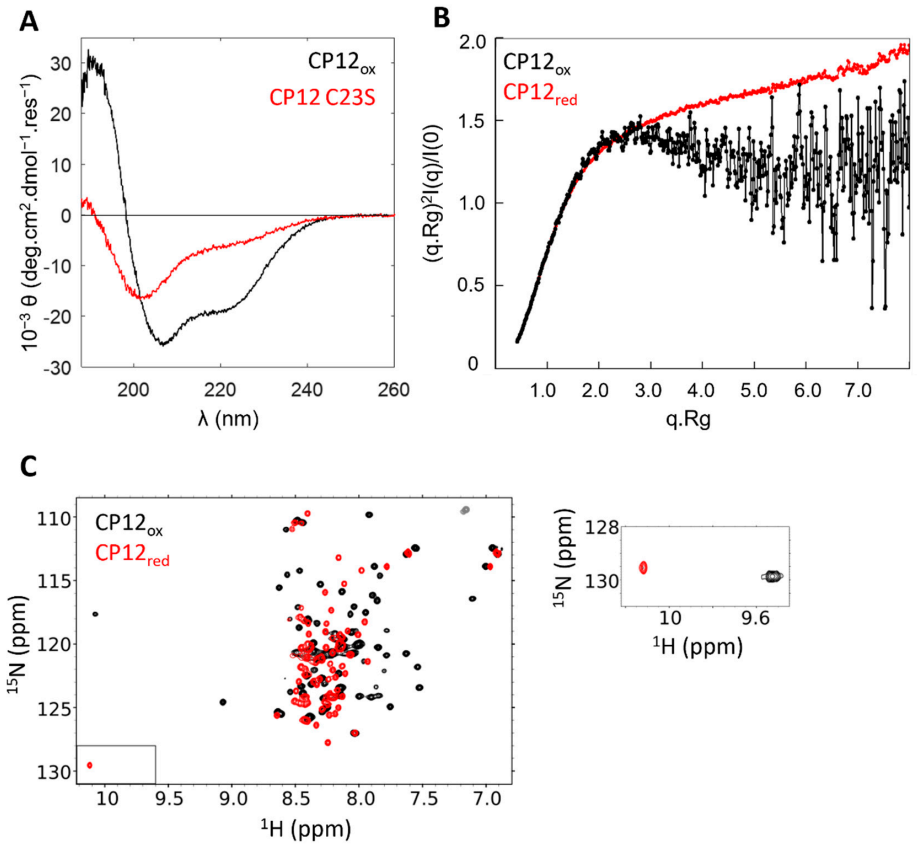


Figure 4. Biophysical analysis of CP12 confirmed that CP12 is an IDP. (**A**) Circular dichroism spectra of 10 µM recombinant *C. reinhardtii* oxidized CP12 (black), and of a CP12 mutant lacking the N-terminal disulfide bridge (mimicking reducing conditions, red). (**B**) Normalised Kratky representation of the SAXS data of the oxidized (black) and reduced (red) form of recombinant *C. reinhardtii* CP12. (**C**) NMR ^{1}H-^{15}N-HSQC spectra of the oxidized (black) and reduced (red) form of recombinant *C. reinhardtii* CP12. The box between 9.5 and 10 ppm corresponds to the insert shown on the left.

Because the structural properties of CP12 vary significantly depending upon the redox conditions, the term conditionally disordered was coined for this protein. Structural properties of CDP such as CP12 are challenging to analyze [46]. Therefore, the only high-resolution structures available for CP12 are those of oxidized CP12 within the ternary complex and have been deciphered recently by crystallography and cryo-electron microscopy [47–50].

CP12 is not the unique protein that undergoes structural transitions upon oxidation/reduction, and it is predicted that redox-sensitive CDPs are widespread and have key roles in many eukaryotic processes [51]. Based on the computational platform, IUPred2A, it was predicted that cysteine-rich sequences display significant disorder in the reduced but not the oxidized form, increasing the potential for such sequences to function in a redox-sensitive manner [52]. In photosynthetic organisms where dark-light transitions are correlated to different oxido-reduction conditions, this concept is of paramount importance. The redox structural transitions that have been observed for CP12 might be highly relevant to CP12 being a redox switch of the CBB cycle [53].

4. CP12, a Widespread Protein with Sequence Variations on an Original Theme

After 2002, the number of manuscripts dealing with this protein started to increase, and CP12 has been found in many species such as higher plants, microalgae and cyanobacteria [54]. The canonical CP12 sequence contains one N-terminal cysteine residue pair separated by seven or eight residues, one C-terminal cysteine residue pair separated by eight residues encompassing a central proline residue (CxxxPxxxxC), and a core sequence AWD_VEEL (Figure 5). The two pairs of cysteine residues are capable of forming disulfide bridges required to form the ternary complex described above in green algae and higher plants [55]. However, in the glaucophyte *Cyanophora paradoxa*, CP12 lacks the two cysteine residues at the N-terminus [54]. The lack of the N-terminal pair of cysteine residues was also found in the red algal *Galdieria sulphuraria* CP12 and *Synechococcus elongatus* PCC7942, but it did not impair the formation of the ternary complex [56,57]. Though these two cysteine residues were claimed to be important to the PRK binding in higher plants, the presence of the disulfide bond at the N-terminus of CP12 might not be a requisite for PRK binding. It is, however, possible that the affinity between PRK and CP12 is much lower when this disulfide bond is absent and that its absence modulates the stability of the N-terminal helical hairpin described above. Indeed, the mutant of CP12 lacking this disulfide bond is less prone to interact with PRK, but a faint band is still present, indicating a degree of PRK and CP12 interaction [16].

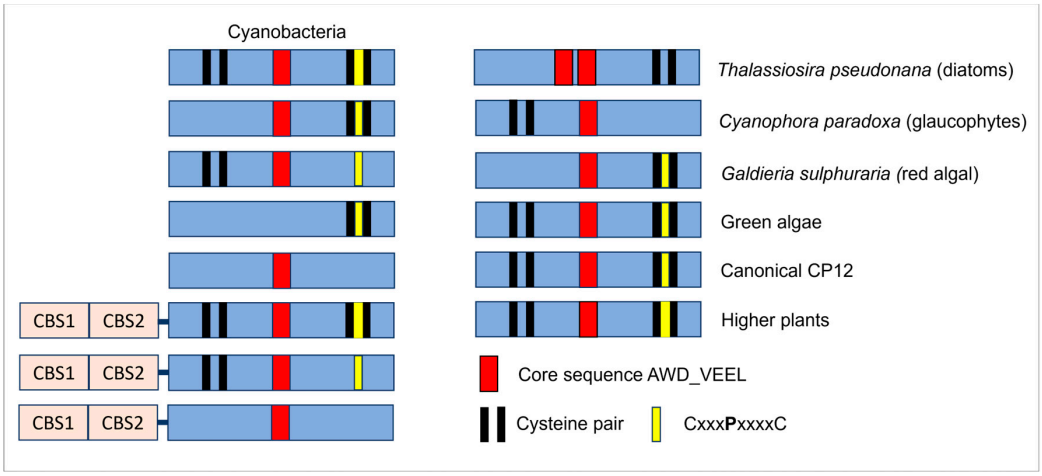


Figure 5. Schematic representation of structural variants of CP12. CBS (orange rectangles) stands for cystathionine β-synthase. The pairs of black lines represent cysteine residues pairs, the red rectangles represent the core sequences AWD_VEEL, and the yellow lines represent the central proline within the C-terminal residues pair. Adapted from D.N Stanley et al., 2013 [58].

In cyanobacteria, CP12 proteins fused to two cystathionine β-synthase (CBS) domains (CBS-CP12) were found beside the stand-alone CP12, and at present, CBS-fused CP12 has only been reported in these organisms. These CBS-proteins are widespread, and the analysis of 333 cyanobacterial genomes revealed the presence of many variants (Figure 5) [58].

A CP12-like protein was reported in the freshwater diatom, *Asterionella formosa*, that was associated with GAPDH and the ferredoxin NADP reductase, but the sequence of this protein is not available [59,60]. In contrast, in the marine diatom, *Thalassiosira pseudonana*, three CP12 proteins were identified, CP12-1 and CP12-2 were predicted to be localized in the chloroplast, and only CP12-2 was found in expressed sequence tags (ESTs) database and further characterized [61]. The gene coding for this protein in other diatoms was also found. In diatoms, nonetheless, PRK/GAPDH/CP12 has never been found [62], and it seems that the absence of two cysteine residues at positions 245 and 248 on diatom PRK could explain this [63]. Like the canonical CP12, the *T. pseudonana* CP12 possesses some intrinsically disordered regions, is highly dynamic but possesses a central coiled coil motif, and is dimeric, and these characteristics give *T. pseudonana* CP12-2 a form of an elongated cylinder with kinks [61].

The cyanophage-infecting marine picocyanobacteria of the genera Prochlorococcus and Synechococcus have been shown to express a protein that has a C-terminal extension similar to that of CP12. This protein shuts down the CBB cycle, as does the canonical CP12, and uses the NADPH produced by the host to fuel their own deoxynucleotide biosynthesis for replication [64]. Other proteins also possess a C-terminal extension similar to the C-terminus of CP12, such as the B subunit of the higher plant A_2B_2 GAPDH, the adenylate kinase 3 (ADK3) from *C. reinhardtii*, and the argininosuccinate lyase. This CxxxPxxxxC extremity interacts with GAPDH in the PRK/GAPDH/CP12, and this interaction is also conserved in the A_2B_2 GAPDH and the ADK3 [65,66]. In the prasinophycean green algae, *Ostreococcus tauri* and *Ostreococcus lucimarinus*, CP12 is not present, but they possess the redox-regulated B subunit of GAPDH, which is typical of *Streptophyta* [67].

Three isoforms of CP12 have been reported in higher plants [66]. In *A. thaliana*, the transcripts localization of the isoforms differs; CP12-1 and CP12-2 are mostly expressed in photosynthetic tissues, whereas CP12-3 is expressed in non-photosynthetic tissues such as in the roots. In contrast, in *C. reinhardtii*, one unique isoform has been reported to be localized in the chloroplast. In the C4 plant maize (*Zea mays*), a CP12 homolog was found in the bundle sheath and not in the mesophyll cells [68]. Recently, two CP12 proteins were found in sugarcane, another C4 plant [69]. Though yet never reported, it is very likely that plants with a crassulacean acid metabolism (CAM) also possess this protein. Therefore, it seems that this protein is ubiquitous in the plant kingdom.

5. One Gene, One Protein, Many Functions

5.1. CP12 Jack-of-All Trades but Master of the CBB Cycle

As mentioned above, CP12 is known to be the master of the CBB cycle [9]. The involvement of oxidized CP12 in supramolecular complexes containing GAPDH and PRK has been demonstrated in several photosynthetic organisms though the strength of binding between these proteins differs among species. As mentioned above, the dissociation constant for GAPDH/CP12 is in the micromolar range in *A. thaliana* [33] but in the nanomolar range in *C. reinhardtii* [25]. The flexibility and the net negative charge of CP12 may increase its reactive area and 'stickiness' compared with rigid proteins, thus enhancing the ability of this protein to act as a 'scaffold protein' [70].

In *S. elongatus* PCC7942, CP12 forms the ternary complex in response to NADP(H)/NAD(H) ratio. Of interest, most CBB enzymes are not redox-regulated in cyanobacteria [57], whereas in higher plants and green algae, some CBB enzymes are redox-regulated via the thioredoxins (Trx). In Plantae, the Trx participate, in addition to the association-dissociation of the complex PRK/CP12/GAPDH, regulates PRK and GAPDH enzymes activities. PRK and CP12 are reduced by Trx f and m and could be oxidized by the newly characterized TrxLike2 [71,72]. The presence of CP12 has been shown to modify the PRK redox regulation,

and, in particular, the formation of the ternary complex decreases the time required for PRK activation [73]. CP12 is also responsible for the redox regulation of the A_4 form of GAPDH in *C. reinhardtii* [35]. In contrast, the A_2B_2 form of GAPDH is autonomously redox-regulated, and CP12 therefore might not be required. Nevertheless, the A_2B_2 GAPDH is found in the ternary complex and is more easily activated in dimmer light than the A_8B_8 GAPDH oligomer mentioned above [29]. This suggests that CP12 can have other functions than the redox regulation of PRK and GAPDH.

The expression of the genes encoding GAPDH, PRK, and CP12-2 in *A. thaliana* was found to be coordinated, and this suggests that they are regulated at the transcriptional level [74,75]. This suggests that CP12 is involved in the post-translational regulation and at the transcriptional level. A recent study showed that reduced *C. reinhardtii* CP12 stabilizes PRK in vitro and in vivo, but the mechanism of this protection needs further investigation [76,77]. In the mutant strain of *C. reinhardtii*, where the CP12 protein is absent, while the abundance of numerous proteins increases (see below), the abundance of others, including PRK, involved in photosynthesis, decreases. This is in agreement with other studies on *N. tabacum*, *A. thaliana*, and *S. guianensis* that showed that photosynthetic efficiency is reduced in the CP12 deletion mutant [76–80].

5.2. CP12, Other Functions

Like many IDPs, CP12 is a promiscuous protein, and in *C. reinhardtii*, in an oxidized state, it can bind other enzymes such as the malate dehydrogenase, the elongation factor 1α2, and 38 kDa ribosome-associated protein, but to a lesser extent than PRK, GAPDH, and the fructose-1,6-bisphosphate aldolase [81]. IDPs are well known to be a hub for the supramolecular complex, but it is surprising that, so far, no interacting partners have been identified for the disordered reduced CP12, and this has probably been overlooked.

Several studies have shown that the role of CP12 is beyond the CBB cycle. In *C. reinhardtii*, the deletion of the protein induced a re-routing of the metabolism under the light. In particular, metabolic pathways involving malate shuttles increased in the mutant such as the tricarboxylic acid cycle (TCA) and the glyoxylate pathway [77]. Malate shuttles, combined with other signaling factors, play a putative role in algal CO_2-concentrating mechanisms (CCM) [82,83]. In relation to this, it can be noticed that CP12 increases in low CO_2 conditions in *T. pseudonana*, conditions that trigger CCM [84]. In *N. tabacum* antisense plants, the activity of malate dehydrogenase and glucose-6-phosphate dehydrogenase decreased, and transcripts for polyamine metabolism and polyphenol oxidase were up-regulated [78,79]. A CP12-disrupted strain was engineered in *S. elongatus* PCC7942, and its growth was similar to that of wild-type cells under continuous light but was significantly reduced under the light/dark cycle (12 h/12 h) [57,85]. In the dark, the O_2 consumption by the mutant strain was lower, and the concentration of ribulose-1,5-bisphosphate, the product of the PRK reaction, was higher than for the wild-type. In cyanobacteria, the main metabolic pathway in the dark is the oxidative pentose phosphate (OPP) pathway that also encompasses the ribulose-1,5 -bisphosphate. By inhibiting the activity of PRK and GAPDH in the dark, CP12 thus regulates the carbon flow from the CBB cycle to the OPP cycle. The authors also found that the cyanobacterial CP12 can bind NADPH (not NADH), but this has not been reported and/or studied to our knowledge in any other CP12. All these results show that the role of CP12 is beyond the regulation of the CBB cycle. In the sugarcane, the expression of one of the isoform of the CP12—ShCP12-1—decreased immediately on the onset of sucrose accumulation that occurs under the yellow canopy syndrome, a specific pattern of leaf yellowing accompanied by abnormal and lethal accumulation of sucrose and starch in leaves [69]. This CP12 might therefore be the primary regulation point of sugar feedback regulation occurring in C4 plants, while the two carboxylating enzymes, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase oxygenase (RuBisCO) and phosphoenolpyruvate carboxylase, were only negatively regulated at a later stage and might be the secondary regulation points.

In cyanobacteria, CP12 has been found in a fusion protein with a CBS domain, as mentioned above. A study of CBS-CP12 from *Microcystis aeruginosa* revealed that the gene expression of this protein is clearly light-induced. In addition, CBS-CP12 oligomerizes and forms a hexamer but does not form the ternary complex with GAPDH and PRK. It can bind AMP and then inhibits the activation of PRK by thioredoxins [86]. The authors propose that this new architecture provides CP12 additional regulatory functions in cyanobacteria.

5.3. CP12, an Anti-Stress Protein

In both *A. thaliana* and *N. tabacum*, the antisense suppression of CP12 increased the expression of proteins related to oxidative stress [87]. Recently, it has been shown in *C. reinhardtii* that the suppression of CP12 leads also to an increase in the proteins involved in stress [77]. In addition, in cyanobacteria, CP12 might be involved in oxidative stress by controlling the electrons flux from Photosystem I. Indeed, while the growth at low light of the wild-type and the CP12 mutant strain were the same, at high light the mutant strain grew more slowly. The chlorophyll content also decreased in this strain, and the reactive oxygen species increased [85], while in A. thaliana and *C. reinhardtii*, it has been shown that CP12 provides the thiol groups PRK and GAPDH protection against oxidative damage [87]. In cyanobacteria, the defense mechanism could be different and independent of the thiol groups of these enzymes [57].

In *C. reinhardtii*, CP12 protected GAPDH against heat inactivation and aggregation and therefore plays the role of a specific chaperone [88]. As mentioned above, CP12 also protects PRK against irreversible inactivation in vitro [77]. Besides these roles as a specific chaperone, CP12 from other organisms is more abundant in stress conditions, and this is the case for the *T. pseudonana* CP12-2. The expression of this protein was higher under low CO_2 [84] but also under N, P, or Si limited conditions [89]. These results therefore indicate that CP12 is not specific to carbon metabolism.

In the tropical legume, *Stylosanthes guianensis*, the higher expression of CP12 increases growth and plant height. In addition to the expected functions, a potential role for CP12 in chilling tolerance has been suggested [80]. A recent transcriptomic analysis of maize also revealed the different regulations of cold-responsive genes and, among them, the CP12 gene is present [90].

All these results show that the role of CP12 is not restricted to the formation of the well-known supramolecular complex involving PRK and GAPDH but is probably more general and characterized not only by conformation heterogeneity but also by functional heterogeneity defining its moonlighting signature as many IDPs.

5.4. CP12 and Metal Ions

Metal binding is ubiquitous in biology, being important for folding, stability, transportation, and catalysis [91]. *C. reinhardtii* recombinant CP12 purified by affinity chromatography on nickel columns had a yellow color, even after dialysis with a buffer devoid of metal and imidazole. The absorption spectra from 280 to 600 nm showed the presence of a broad peak around 410 nm, and these spectra strongly resembled those of ferredoxin [92]. Using electrospray non-denaturing mass spectrometry, the authors showed that CP12 was specifically able to bind Cu^{2+} and Ni^{2+} with a low affinity (dissociation constants of 26 and 11 µM, respectively) [92], values close to those obtained for the binding of copper to prion proteins (K_D of 14 µM) [93]. Cu^{2+} catalyzed the oxidation of the reduced CP12, with the reformation of disulfide bonds leading to the formation of oxidized CP12, which was able to bind a Cu^{2+} ion. In addition, a hydrophobic cluster analysis showed that CP12 had high similarity with copper chaperones from A. thaliana. Though many questions remain unanswered, one can hypothesize that CP12 may play a role in copper homeostasis like other copper chaperones [94]. Later, using top-down mass spectrometry, three regions were found to be involved in metal ion binding: Asp16-Asp23, Asp38-Lys50, and Asp70-Glu76 [88]. It has been suggested that the binding of copper led to a more rigid structure, but this requires further investigation. Later, using two-dimensional polyacrylamide gel

electrophoresis separation of the stroma fraction of *A. thaliana* chloroplasts followed by calcium overlay assay, CP12 was identified as a calcium-binding protein [95]. Though this protein does not possess the canonical calcium-binding EF-hand motif, the authors suggested that negatively charged amino acid residues could be involved in this binding. The biological functions of the Cu^{2+}, Ni^{2}+, and Ca^{2+} binding, however, remain unsolved and need to be further investigated.

6. Conclusions

Photosynthesis regulation depends on many signals, including pH, metabolite concentrations, and oxido-reduction conditions. For photosynthesis to be optimized, the signals received have to be transmitted in a rapid and specific manner and often involve protein-protein interactions; IDPs are well suited for such functions. The chloroplast protein, CP12, a redox dependent conditionally disordered protein, acting as a linker or scaffold between PRK and GAPDH, can integrate these multiple signals to regulate their activity. The redox state of CP12 conditions a severe structural transition of its structural properties from a completely disordered state under reducing conditions to a partially stable state under oxidizing conditions. This redox-dependent structural transition is also concomitant with the association-dissociation with PRK and GAPDH enzymes and thus the regulation of their activity under dark (inactive enzymes) or light (active enzymes). The two enzymes, PRK and GAPDH, do not catalyze consecutive reactions but are using ATP and NADPH, respectively, both products from the primary phase of photosynthesis. PRK produces the RuBisCO substrate, ribulose 1,5-bisphosphate, from the ribulose-5-phosphate, an intermediate of the OPP pathway. GAPDH uses NADPH to produce glyceraldehyde-3-phosphate, which can be exported and is also an intermediate of the OPP. Therefore, CP12 using as a regulatory protein of both PRK and GAPDH, thus "killing two birds with one stone", contributes to the fine tuning of metabolic pathways such as the CBB cycle, the glycolysis, and the OPP, avoiding futile cycling. It is also involved in the regulation of TCA and glyoxylate cycles involving the malate shuttle and possibly involved in CCM. Moreover, besides its role in controlling metabolic pathways, CP12 provides a cell-signaling pathway, triggers anti-stress responses and protects against oxidative damage. It is also able to bind metal ions, though hitherto the biological significance of this remains unknown (Figure 6). The pursuit of knowledge on these disordered proteins will probably produce new concepts in the sciences as the more we learn and the more questions we will find to ask. The discovery of disordered proteins and of CP12, 70 years after the discovery of the CBB cycle, offers new insights into the photosynthesis field, and this is probably not a dead end.

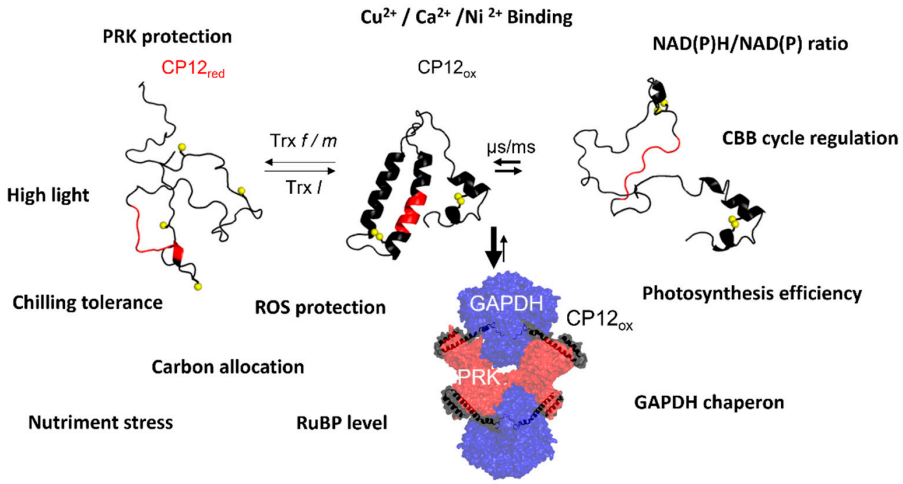


Figure 6. Atlas of CP12 functions. The core sequence of CP12, AWD_VEEL, is in red, and sulfur atoms are indicated in yellow. Reduced CP12 is fully disordered, and oxidized CP12 is partially ordered. Under oxidized state, CP12 forms a supramolecular complex with GAPDH and PRK. A non-exhaustive list of CP12 functions is indicated in the scheme.

Author Contributions: B.G., H.L. and C.G., writing—original draft preparation, B.G., H.L., C.G., V.R.-B. and F.C. writing—review and editing. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

Funding: C.G.'s studentship (ED62) is supported by the Ministère de la Recherche, de l'Enseignement supérieur et de l'Innovation. Research from B.G., H.L., F.C. and V.R.-B. is supported by the Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), Aix-Marseille Université, Agence Nationale de la Recherche (ANR-21-CE20-0029) and the Federation of European Biochemical Societies (Launay FEBS Excellence Award, 2021).

Institutional Review Board Statement: Not applicable.

Informed Consent Statement: Not applicable.

Data Availability Statement: Not applicable.

Acknowledgments: This work received support from the French government under the France 2030 investment plan, as part of the Initiative d'Excellence d'Aix-Marseille Université—A*MIDEX and is part of the Institute of Microbiology, Bioenergies, and Biotechnology—IM2B (AMX-19-IET-006).

Conflicts of Interest: The authors declare no conflict of interest.

References

1. Uversky, V.N. Protein Intrinsic Disorder and Structure-Function Continuum. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2019**, *166*, 1–17. [CrossRef] [PubMed]
2. Uversky, V.N. Natively Unfolded Proteins: A Point Where Biology Waits for Physics. *Protein Sci. Publ. Protein Soc.* **2002**, *11*, 739–756. [CrossRef] [PubMed]
3. Yruela, I.; Contreras-Moreira, B. Genetic Recombination Is Associated with Intrinsic Disorder in Plant Proteomes. *BMC Genom.* **2013**, *14*, 772. [CrossRef]
4. Rendón-Luna, D.F.; Romero-Pérez, P.S.; Cuevas-Velazquez, C.L.; Reyes, J.L.; Covarrubias, A.A. Determining the Protective Activity of IDPs Under Partial Dehydration and Freeze-Thaw Conditions. *Methods Mol. Biol.* **2020**, *2141*, 519–528. [CrossRef]
5. Zhang, Y.; Launay, H.; Schramm, A.; Lebrun, R.; Gontero, B. Exploring Intrinsically Disordered Proteins in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Sci. Rep.* **2018**, *8*, 6805. [CrossRef] [PubMed]
6. Thieulin-Pardo, G.; Schramm, A.; Lignon, S.; Lebrun, R.; Kojadinovic, M.; Gontero, B. The Intriguing CP12-like Tail of Adenylate Kinase 3 from *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS J.* **2016**, *283*, 3389–3407. [CrossRef] [PubMed]
7. Sena, L.; Uversky, V.N. Comparison of the Intrinsic Disorder Propensities of the RuBisCO Activase Enzyme from the Motile and Non-Motile Oceanic Green Microalgae. *Intrinsically Disord. Proteins* **2016**, *4*, e1253526. [CrossRef]
8. Launay, H.; Receveur-Bréchot, V.; Carrière, F.; Gontero, B. Orchestration of Algal Metabolism by Protein Disorder. *Arch. Biochem. Biophys.* **2019**, *672*, 108070. [CrossRef]
9. Gontero, B.; Maberly, S.C. An Intrinsically Disordered Protein, CP12: Jack of All Trades and Master of the Calvin Cycle. *Biochem. Soc. Trans.* **2012**, *40*, 995–999. [CrossRef]
10. Mackinder, L.C.M.; Meyer, M.T.; Mettler-Altmann, T.; Chen, V.K.; Mitchell, M.C.; Caspari, O.; Rosenzweig, E.S.F.; Pallesen, L.; Reeves, G.; Itakura, A.; et al. A Repeat Protein Links Rubisco to Form the Eukaryotic Carbon-Concentrating Organelle. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2016**, *113*, 5958–5963. [CrossRef]
11. Atkinson, N.; Mao, Y.; Chan, K.X.; McCormick, A.J. Condensation of Rubisco into a Proto-Pyrenoid in Higher Plant Chloroplasts. *Nat. Commun.* **2020**, *11*, 6303. [CrossRef]
12. He, S.; Chou, H.-T.; Matthies, D.; Wunder, T.; Meyer, M.T.; Atkinson, N.; Martinez-Sanchez, A.; Jeffrey, P.D.; Port, S.A.; Patena, W.; et al. The Structural Basis of Rubisco Phase Separation in the Pyrenoid. *Nat. Plants* **2020**, *6*, 1480–1490. [CrossRef] [PubMed]
13. Wunder, T.; Cheng, S.L.H.; Lai, S.-K.; Li, H.-Y.; Mueller-Cajar, O. The Phase Separation Underlying the Pyrenoid-Based Microalgal Rubisco Supercharger. *Nat. Commun.* **2018**, *9*, 5076. [CrossRef] [PubMed]
14. Mackinder, L.C.M.; Chen, C.; Leib, R.D.; Patena, W.; Blum, S.R.; Rodman, M.; Ramundo, S.; Adams, C.M.; Jonikas, M.C. A Spatial Interactome Reveals the Protein Organization of the Algal CO_2-Concentrating Mechanism. *Cell* **2017**, *171*, 133–147.e14. [CrossRef] [PubMed]
15. Pohlmeyer, K.; Paap, B.K.; Soll, J.; Wedel, N. CP12: A Small Nuclear-Encoded Chloroplast Protein Provides Novel Insights into Higher-Plant GAPDH Evolution. *Plant Mol. Biol.* **1996**, *32*, 969–978. [CrossRef]
16. Wedel, N.; Soll, J.; Paap, B.K. CP12 Provides a New Mode of Light Regulation of Calvin Cycle Activity in Higher Plants. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1997**, *94*, 10479–10484. [CrossRef] [PubMed]
17. Gontero, B.; Cardenas, M.L.; Ricard, J. A Functional Five-Enzyme Complex of Chloroplasts Involved in the Calvin Cycle. *Eur. J. Biochem.* **1988**, *173*, 437–443. [CrossRef]
18. Gontero, B.; Mulliert, G.; Rault, M.; Giudici-Orticoni, M.-T.; Ricard, J. Structural and Functional Properties of a Multi-Enzyme Complex from Spinach Chloroplasts. II: Modulation of the Kinetic Properties of Enzymes in the Aggregated State. *Eur. J. Biochem.* **1993**, *217*, 1075–1082. [CrossRef]

19. Rault, M.; Gontero, B.; Ricard, J. Thioredoxin Activation of Phosphoribulokinase in a Chloroplast Multi-Enzyme Complex. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *197*, 791–797. [CrossRef]
20. Avilan, L.; Gontero, B.; Lebreton, S.; Ricard, J. Memory and Imprinting Effects in Multienzyme Complexes. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *246*, 78–84. [CrossRef]
21. Avilan, L.; Gontero, B.; Lebreton, S.; Ricard, J. Information Transfer in Multienzyme Complexes.2. The Role of Arg64 of *Chlamydomonas reinhardtii* Phosphoribulokinase in the Information Transfer between Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and Phosphoribulokinase. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 296–302. [CrossRef]
22. Lebreton, S.; Gontero, B.; Avilan, L.; Ricard, J. Memory and Imprinting Effects in Multienzyme Complexes.2. Kinetics of the Bienzyme Complex from *Chlamydomonas reinhardtii* and Hysteretic Activation of Chloroplast Oxidized Phosphoribulokinase. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *246*, 85–91. [CrossRef] [PubMed]
23. Lebreton, S.; Gontero, B.; Avilan, L.; Ricard, J. Information Transfer in Multienzyme Complexes.1. Thermodynamics of Conformational Constraints and Memory Effects in the Bienzyme Glyceraldehyde-3-Phosphate-Dehydrogenase-Phosphoribulokinase Complex of *Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **1997**, *250*, 286–295. [CrossRef] [PubMed]
24. Graciet, E.; Lebreton, S.; Camadro, J.-M.; Gontero, B. Characterization of Native and Recombinant A4 Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase. Kinetic Evidence for Confromation Changes upon Association with the Small Protein CP12. *Eur. J. Biochem.* **2003**, *270*, 129–136. [CrossRef] [PubMed]
25. Graciet, E.; Gans, P.; Wedel, N.; Lebreton, S.; Camadro, J.-M.; Gontero, B. The Small Protein CP12: A Protein Linker for Supramolecular Complex Assembly. *Biochemistry* **2003**, *42*, 8163–8170. [CrossRef] [PubMed]
26. Mouche, F.; Gontero, B.; Callebaut, I.; Mornon, J.P.; Boisset, N. Striking Conformational Change Suspected within the Phosphoribulokinase Dimer Induced by Interaction with GAPDH. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 6743–6749. [CrossRef] [PubMed]
27. Graciet, E.; Lebreton, S.; Camadro, J.-M.; Gontero, B. Thermodynamic Analysis of the Emergence of New Regulatory Properties in a Phosphoribulokinase-Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase Complex. *J. Biol. Chem.* **2002**, *277*, 12697–12702. [CrossRef] [PubMed]
28. Wedel, N.; Soll, J. Evolutionary Conserved Light Regulation of Calvin Cycle Activity by NADPH-Mediated Reversible Phosphoribulokinase/CP12/Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Complex Dissociation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **1998**, *95*, 9699–9704. [CrossRef] [PubMed]
29. Scheibe, R.; Wedel, N.; Vetter, S.; Emmerlich, V.; Sauermann, S.M. Co-Existence of Two Regulatory NADP-Glyceraldehyde 3-P Dehydrogenase Complexes in Higher Plant Chloroplasts. *Eur. J. Biochem.* **2002**, *269*, 5617–5624. [CrossRef]
30. Howard, T.P.; Lloyd, J.C.; Raines, C.A. Inter-Species Variation in the Oligomeric States of the Higher Plant Calvin Cycle Enzymes Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase and Phosphoribulokinase. *J. Exp. Bot.* **2011**, *62*, 3799–3805. [CrossRef]
31. Clasper, S.; Easterby, J.S.; Powls, R. Properties of Two High-Molecular-Mass Forms of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase from Spinach Leaf, One of Which Also Possesses Latent Phosphoribulokinase Activity. *Eur. J. Biochem.* **1991**, *202*, 1239–1246. [CrossRef] [PubMed]
32. Wara-Aswapati, O.; Kemble, R.J.; Bradbeer, J.W. Activation of Glyceraldehyde-Phosphate Dehydrogenase (NADP) and Phosphoribulokinase in *Phaseolus vulgaris* Leaf Extracts Involves the Dissociation of Oligomers. *Plant Physiol.* **1980**, *66*, 34–39. [CrossRef] [PubMed]
33. Marri, L.; Trost, P.; Trivelli, X.; Gonnelli, L.; Pupillo, P.; Sparla, F. Spontaneous Assembly of Photosynthetic Supramolecular Complexes as Mediated by the Intrinsically Unstructured Protein CP12. *J. Biol. Chem.* **2008**, *283*, 1831–1838. [CrossRef] [PubMed]
34. Kaaki, W.; Woudstra, M.; Gontero, B.; Halgand, F. Exploration of CP12 Conformational Changes and of Quaternary Structural Properties Using Electrospray Ionization Traveling Wave Ion Mobility Mass Spectrometry. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2013**, *27*, 179–186. [CrossRef]
35. Erales, J.; Mekhalfi, M.; Woudstra, M.; Gontero, B. Molecular Mechanism of NADPH-Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Regulation through the C-Terminus of CP12 in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochemistry* **2011**, *50*, 2881–2888. [CrossRef]
36. Wright, P.E.; Dyson, H.J. Intrinsically Unstructured Proteins: Re-Assessing the Protein Structure-Function Paradigm. *J. Mol. Biol.* **1999**, *293*, 321–331. [CrossRef]
37. Dyson, H.J.; Wright, P.E. Coupling of Folding and Binding for Unstructured Proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2002**, *12*, 54–60. [CrossRef]
38. Tompa, P. Intrinsically Unstructured Proteins. *Trends Biochem. Sci.* **2002**, *27*, 527–533. [CrossRef]
39. Moparthi, S.B.; Thieulin-Pardo, G.; Mansuelle, P.; Rigneault, H.; Gontero, B.; Wenger, J. Conformational Modulation and Hydrodynamic Radii of CP12 Protein and Its Complexes Probed by Fluorescence Correlation Spectroscopy. *FEBS J.* **2014**, *281*, 3206–3217. [CrossRef]
40. Vacic, V.; Uversky, V.N.; Dunker, A.K.; Lonardi, S. Composition Profiler: A Tool for Discovery and Visualization of Amino Acid Composition Differences. *BMC Bioinform.* **2007**, *8*, 211. [CrossRef]
41. Launay, H.; Barré, P.; Puppo, C.; Manneville, S.; Gontero, B.; Receveur-Bréchot, V. Absence of Residual Structure in the Intrinsically Disordered Regulatory Protein CP12 in Its Reduced State. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2016**, *477*, 20–26. [CrossRef] [PubMed]
42. Moparthi, S.B.; Thieulin-Pardo, G.; de Torres, J.; Ghenuche, P.; Gontero, B.; Wenger, J. FRET Analysis of CP12 Structural Interplay by GAPDH and PRK. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2015**, *458*, 488–493. [CrossRef] [PubMed]
43. Gardebien, F.; Thangudu, R.R.; Gontero, B.; Offmann, B. Construction of a 3D Model of CP12, a Protein Linker. *J. Mol. Graph. Model.* **2006**, *25*, 186–195. [CrossRef] [PubMed]

44. Launay, H.; Barré, P.; Puppo, C.; Zhang, Y.; Maneville, S.; Gontero, B.; Receveur-Bréchot, V. Cryptic Disorder Out of Disorder: Encounter between Conditionally Disordered CP12 and Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. *J. Mol. Biol.* **2018**, *430*, 1218–1234. [CrossRef] [PubMed]
45. Receveur-Brechot, V.; Durand, D. How Random Are Intrinsically Disordered Proteins? A Small Angle Scattering Perspective. *Curr. Protein Pept. Sci.* **2012**, *13*, 55–75. [CrossRef] [PubMed]
46. Reichmann, D.; Jakob, U. The Roles of Conditional Disorder in Redox Proteins. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **2013**, *23*, 436–442. [CrossRef] [PubMed]
47. McFarlane, C.R.; Shah, N.R.; Kabasakal, B.V.; Echeverria, B.; Cotton, C.A.R.; Bubeck, D.; Murray, J.W. Structural Basis of Light-Induced Redox Regulation in the Calvin-Benson Cycle in Cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2019**, *116*, 20984–20990. [CrossRef] [PubMed]
48. Yu, A.; Xie, Y.; Pan, X.; Zhang, H.; Cao, P.; Su, X.; Chang, W.; Li, M. Photosynthetic Phosphoribulokinase Structures: Enzymatic Mechanisms and the Redox Regulation of the Calvin-Benson-Bassham Cycle. *Plant Cell* **2020**, *32*, 1556–1573. [CrossRef]
49. Matsumura, H.; Kai, A.; Maeda, T.; Tamoi, M.; Satoh, A.; Tamura, H.; Hirose, M.; Ogawa, T.; Kizu, N.; Wadano, A.; et al. Structure Basis for the Regulation of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Activity via the Intrinsically Disordered Protein CP12. *Structure* **2011**, *19*, 1846–1854. [CrossRef]
50. Trost, P.; Fermani, S.; Marri, L.; Zaffagnini, M.; Falini, G.; Scagliarini, S.; Pupillo, P.; Sparla, F. Thioredoxin-Dependent Regulation of Photosynthetic Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase: Autonomous vs. CP12-Dependent Mechanisms. *Photosynth. Res.* **2006**, *89*, 263–275. [CrossRef]
51. Erdős, G.; Mészáros, B.; Reichmann, D.; Dosztányi, Z. Large-Scale Analysis of Redox-Sensitive Conditionally Disordered Protein Regions Reveals Their Widespread Nature and Key Roles in High-Level Eukaryotic Processes. *Proteomics* **2019**, *19*, e1800070. [CrossRef] [PubMed]
52. Bhopatkar, A.A.; Uversky, V.N.; Rangachari, V. Disorder and Cysteines in Proteins: A Design for Orchestration of Conformational See-Saw and Modulatory Functions. *Prog. Mol. Biol. Transl. Sci.* **2020**, *174*, 331–373. [CrossRef] [PubMed]
53. Lopez-Calcagno, P.E.; Howard, T.P.; Raines, C.A. The CP12 Protein Family: A Thioredoxin-Mediated Metabolic Switch? *Front. Plant Sci.* **2014**, *5*, 9. [CrossRef] [PubMed]
54. Groben, R.; Kaloudas, D.; Raines, C.A.; Offmann, B.; Maberly, S.C.; Gontero, B. Comparative Sequence Analysis of CP12, a Small Protein Involved in the Formation of a Calvin Cycle Complex in Photosynthetic Organisms. *Photosynth. Res.* **2010**, *103*, 183–194. [CrossRef] [PubMed]
55. Avilan, L.; Puppo, C.; Erales, J.; Woudstra, M.; Lebrun, R.; Gontero, B. CP12 Residues Involved in the Formation and Regulation of the Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase–CP12–Phosphoribulokinase Complex in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Biosyst.* **2012**, *8*, 2994. [CrossRef] [PubMed]
56. Oesterhelt, C.; Klocke, S.; Holtgrefe, S.; Linke, V.; Weber, A.P.M.; Scheibe, R. Redox Regulation of Chloroplast Enzymes in *Galdieria sulphuraria* in View of Eukaryotic Evolution. *Plant Cell Physiol.* **2007**, *48*, 1359–1373. [CrossRef] [PubMed]
57. Tamoi, M.; Miyazaki, T.; Fukamizo, T.; Shigeoka, S. The Calvin Cycle in Cyanobacteria Is Regulated by CP12 via the NAD(H)/NADP(H) Ratio under Light/Dark Conditions. *Plant J.* **2005**, *42*, 504–513. [CrossRef]
58. Stanley, D.N.; Raines, C.A.; Kerfeld, C.A. Comparative Analysis of 126 Cyanobacterial Genomes Reveals Evidence of Functional Diversity among Homologs of the Redox-Regulated CP12 Protein. *Plant Physiol.* **2013**, *161*, 824–835. [CrossRef] [PubMed]
59. Mekhalfi, M.; Puppo, C.; Avilan, L.; Lebrun, R.; Mansuelle, P.; Maberly, S.C.; Gontero, B. Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase Is Regulated by Ferredoxin-NADP Reductase in the Diatom *Asterionella formosa*. *New Phytol.* **2014**, *203*, 414–423. [CrossRef]
60. Boggetto, N.; Gontero, B.; Maberly, S.C. Regulation of Phosphoribulokinase and Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase in a Freshwater Diatom, *Asterionella formosa*. *J. Phycol.* **2007**, *43*, 1227–1235. [CrossRef]
61. Shao, H.; Huang, W.; Avilan, L.; Receveur-Bréchot, V.; Puppo, C.; Puppo, R.; Lebrun, R.; Gontero, B.; Launay, H. A New Type of Flexible CP12 Protein in the Marine Diatom *Thalassiosira pseudonana*. *Cell Commun. Signal. CCS* **2021**, *19*, 38. [CrossRef] [PubMed]
62. Wilhelm, C.; Büchel, C.; Fisahn, J.; Goss, R.; Jakob, T.; Laroche, J.; Lavaud, J.; Lohr, M.; Riebesell, U.; Stehfest, K.; et al. The Regulation of Carbon and Nutrient Assimilation in Diatoms Is Significantly Different from Green Algae. *Protist* **2006**, *157*, 91–124. [CrossRef] [PubMed]
63. Thieulin-Pardo, G.; Remy, T.; Lignon, S.; Lebrun, R.; Gontero, B. Phosphoribulokinase from *Chlamydomonas reinhardtii*: A Benson-Calvin Cycle Enzyme Enslaved to Its Cysteine Residues. *Mol. Biosyst.* **2015**, *11*, 1134–1145. [CrossRef] [PubMed]
64. Thompson, L.R.; Zeng, Q.; Kelly, L.; Huang, K.H.; Singer, A.U.; Stubbe, J.; Chisholm, S.W. Phage Auxiliary Metabolic Genes and the Redirection of Cyanobacterial Host Carbon Metabolism. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2011**, *108*, E757–E764. [CrossRef]
65. Zhang, Y.; Launay, H.; Liu, F.; Lebrun, R.; Gontero, B. Interaction between Adenylate Kinase 3 and Glyceraldehyde-3-phosphate Dehydrogenase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS J.* **2018**, *285*, 2495–2503. [CrossRef]
66. Marri, L.; Pesaresi, A.; Valerio, C.; Lamba, D.; Pupillo, P.; Trost, P.; Sparla, F. In Vitro Characterization of Arabidopsis CP12 Isoforms Reveals Common Biochemical and Molecular Properties. *J. Plant Physiol.* **2010**, *167*, 939–950. [CrossRef]
67. Robbens, S.; Petersen, J.; Brinkmann, H.; Rouzé, P.; Van de Peer, Y. Unique Regulation of the Calvin Cycle in the Ultrasmall Green Alga Ostreococcus. *J. Mol. Evol.* **2007**, *64*, 601–604. [CrossRef]
68. Sun, Q.; Zybailov, B.; Majeran, W.; Friso, G.; Olinares, P.D.B.; van Wijk, K.J. PPDB, the Plant Proteomics Database at Cornell. *Nucleic Acids Res.* **2009**, *37*, D969–D974. [CrossRef]

69. Marquardt, A.; Henry, R.J.; Botha, F.C. Effect of Sugar Feedback Regulation on Major Genes and Proteins of Photosynthesis in Sugarcane Leaves. *Plant Physiol. Biochem. PPB* **2021**, *158*, 321–333. [CrossRef]
70. Cortese, M.S.; Uversky, V.N.; Keith Dunker, A. Intrinsic Disorder in Scaffold Proteins: Getting More from Less. *Prog. Biophys. Mol. Biol.* **2008**, *98*, 85–106. [CrossRef]
71. Marri, L.; Zaffagnini, M.; Collin, V.; Issakidis-Bourguet, E.; Lemaire, S.D.; Pupillo, P.; Sparla, F.; Miginiac-Maslow, M.; Trost, P. Prompt and Easy Activation by Specific Thioredoxins of Calvin Cycle Enzymes of *Arabidopsis thaliana* Associated in the GAPDH/CP12/PRK Supramolecular Complex. *Mol. Plant* **2009**, *2*, 259–269. [CrossRef] [PubMed]
72. Yoshida, K.; Hara, A.; Sugiura, K.; Fukaya, Y.; Hisabori, T. Thioredoxin-Like2/2-Cys Peroxiredoxin Redox Cascade Supports Oxidative Thiol Modulation in Chloroplasts. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, E8296–E8304. [CrossRef] [PubMed]
73. Avilan, L.; Lebreton, S.; Gontero, B. Thioredoxin Activation of Phosphoribulokinase in a Bi-Enzyme Complex from *Chlamydomonas reinhardtii* Chloroplasts. *J. Biol. Chem.* **2000**, *275*, 9447–9451. [CrossRef] [PubMed]
74. Marri, L.; Trost, P.; Pupillo, P.; Sparla, F. Reconstitution and Properties of the Recombinant Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase/CP12/Phosphoribulokinase Supramolecular Complex of Arabidopsis. *Plant Physiol.* **2005**, *139*, 1433–1443. [CrossRef] [PubMed]
75. Terzaghi, W.B.; Cashmore, A.R. Light-Regulated Transcription. *Annu. Rev. Plant Physiol Plant Mol. Biol.* **1995**, *46*, 445–474. [CrossRef]
76. Elena López-Calcagno, P.; Omar Abuzaid, A.; Lawson, T.; Anne Raines, C. Arabidopsis CP12 Mutants Have Reduced Levels of Phosphoribulokinase and Impaired Function of the Calvin-Benson Cycle. *J. Exp. Bot.* **2017**, *68*, 2285–2298. [CrossRef] [PubMed]
77. Gérard, C.; Lebrun, R.; Lemesle, E.; Avilan, L.; Chang, K.S.; Jin, E.; Carrière, F.; Gontero, B.; Launay, H. Reduction in Phosphoribulokinase Amount and Re-Routing Metabolism in *Chlamydomonas reinhardtii* CP12 Mutants. *Int. J. Mol. Sci.* **2022**, *23*, 2710. [CrossRef]
78. Howard, T.P.; Fryer, M.J.; Singh, P.; Metodiev, M.; Lytovchenko, A.; Obata, T.; Fernie, A.R.; Kruger, N.J.; Quick, W.P.; Lloyd, J.C.; et al. Antisense Suppression of the Small Chloroplast Protein CP12 in Tobacco Alters Carbon Partitioning and Severely Restricts Growth. *Plant Physiol.* **2011**, *157*, 620–631. [CrossRef] [PubMed]
79. Howard, T.P.; Upton, G.J.G.; Lloyd, J.C.; Raines, C.A. Antisense Suppression of the Small Chloroplast Protein CP12 in Tobacco: A Transcriptional Viewpoint. *Plant Signal. Behav.* **2011**, *6*, 2026–2030. [CrossRef]
80. Li, K.; Qiu, H.; Zhou, M.; Lin, Y.; Guo, Z.; Lu, S. Chloroplast Protein 12 Expression Alters Growth and Chilling Tolerance in Tropical Forage *Stylosanthes guianensis* (Aublet) Sw. *Front. Plant Sci.* **2018**, *9*, 1319. [CrossRef]
81. Erales, J.; Avilan, L.; Lebreton, S.; Gontero, B. Exploring CP12 Binding Proteins Revealed Aldolase as a New Partner for the Phosphoribulokinase/Glyceraldehyde 3-Phosphate Dehydrogenase/CP12 Complex–Purification and Kinetic Characterization of This Enzyme from *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS J.* **2008**, *275*, 1248–1259. [CrossRef] [PubMed]
82. Burlacot, A.; Dao, O.; Auroy, P.; Cuiné, S.; Li-Beisson, Y.; Peltier, G. Alternative Photosynthesis Pathways Drive the Algal CO_2-Concentrating Mechanism. *Nature* **2022**, *605*, 366–371. [CrossRef] [PubMed]
83. Dao, O.; Kuhnert, F.; Weber, A.P.M.; Peltier, G.; Li-Beisson, Y. Physiological Functions of Malate Shuttles in Plants and Algae. *Trends Plant Sci.* **2022**, *27*, 488–501. [CrossRef] [PubMed]
84. Clement, R.; Lignon, S.; Mansuelle, P.; Jensen, E.; Pophillat, M.; Lebrun, R.; Denis, Y.; Puppo, C.; Maberly, S.C.; Gontero, B. Responses of the Marine Diatom *Thalassiosira pseudonana* to Changes in CO_2 Concentration: A Proteomic Approach. *Sci. Rep.* **2017**, *7*, 42333. [CrossRef]
85. Tamoi, M.; Shigeoka, S. CP12 Is Involved in Protection against High Light Intensity by Suppressing the ROS Generation in *Synechococcus elongatus* PCC7942. *Plants* **2021**, *10*, 1275. [CrossRef] [PubMed]
86. Hackenberg, C.; Hakanpää, J.; Cai, F.; Antonyuk, S.; Eigner, C.; Meissner, S.; Laitaoja, M.; Jänis, J.; Kerfeld, C.A.; Dittmann, E.; et al. Structural and Functional Insights into the Unique CBS-CP12 Fusion Protein Family in Cyanobacteria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2018**, *115*, 7141–7146. [CrossRef] [PubMed]
87. Marri, L.; Thieulin-Pardo, G.; Lebrun, R.; Puppo, R.; Zaffagnini, M.; Trost, P.; Gontero, B.; Sparla, F. CP12-Mediated Protection of Calvin-Benson Cycle Enzymes from Oxidative Stress. *Biochimie* **2014**, *97*, 228–237. [CrossRef] [PubMed]
88. Erales, J.; Lignon, S.; Gontero, B. CP12 from *Chlamydomonas reinhardtii*, a Permanent Specific "Chaperone-like" Protein of Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **2009**, *284*, 12735–12744. [CrossRef]
89. Chen, X.-H.; Li, Y.-Y.; Zhang, H.; Liu, J.-L.; Xie, Z.-X.; Lin, L.; Wang, D.-Z. Quantitative Proteomics Reveals Common and Specific Responses of a Marine Diatom *Thalassiosira pseudonana* to Different Macronutrient Deficiencies. *Front. Microbiol.* **2018**, *9*, 2761. [CrossRef] [PubMed]
90. Banovic Deri, B.; Bozic, M.; Dudic, D.; Vicic, I.; Milivojevic, M.; Ignjatovic-Micic, D.; Samardzic, J.; Vancetovic, J.; Delic, N.; Nikolic, A. Leaf Transcriptome Analysis of Lancaster versus Other Heterotic Groups' Maize Inbred Lines Revealed Different Regulation of Cold-Responsive Genes. *J. Agron. Crop Sci.* **2022**, *208*, 497–509. [CrossRef]
91. Bosco, G.L.; Baxa, M.; Sosnick, T.R. Metal Binding Kinetics of Bi-Histidine Sites Used in Psi Analysis: Evidence of High-Energy Protein Folding Intermediates. *Biochemistry* **2009**, *48*, 2950–2959. [CrossRef] [PubMed]
92. Delobel, A.; Graciet, E.; Andreescu, S.; Gontero, B.; Halgand, F.; Laprévote, O. Mass Spectrometric Analysis of the Interactions between CP12, a Chloroplast Protein, and Metal Ions: A Possible Regulatory Role within a PRK/GAPDH/CP12 Complex. *Rapid Commun. Mass Spectrom.* **2005**, *19*, 3379–3388. [CrossRef] [PubMed]

93. Stöckel, J.; Safar, J.; Wallace, A.C.; Cohen, F.E.; Prusiner, S.B. Prion Protein Selectively Binds Copper(II) Ions. *Biochemistry* **1998**, *37*, 7185–7193. [CrossRef] [PubMed]
94. Himelblau, E.; Mira, H.; Lin, S.J.; Culotta, V.C.; Peñarrubia, L.; Amasino, R.M. Identification of a Functional Homolog of the Yeast Copper Homeostasis Gene ATX1 from Arabidopsis. *Plant Physiol.* **1998**, *117*, 1227–1234. [CrossRef]
95. Rocha, A.G.; Vothknecht, U.C. Identification of CP12 as a Novel Calcium-Binding Protein in Chloroplasts. *Plants* **2013**, *2*, 530–540. [CrossRef]

B.2. « Location of the photosynthetic carbon metabolism in microcompartmments and separated phases in microalgal cells »

Check for updates

FEBS Letters

FEBS PRESS science publishing by scientists

PERSPECTIVE

Location of the photosynthetic carbon metabolism in microcompartments and separated phases in microalgal cells

Hélène Launay, Luisana Avilan, Cassy Gérard, Goetz Parsiegla, Véronique Receveur-Brechot, Brigitte Gontero and Frédéric Carriere

Aix Marseille Univ, CNRS, BIP, UMR7281, Marseille, France

Correspondence
H. Launay, Aix Marseille Univ, CNRS, BIP, UMR7281, F-13402 Marseille, France
Tel: +33491 16 41 92
E-mail: helene.launay@univ-amu.fr

(Received 16 June 2023, revised 4 September 2023, accepted 22 September 2023, available online 24 October 2023)

doi:10.1002/1873-3468.14754

Edited by Peter Brzezinski

Carbon acquisition, assimilation and storage in eukaryotic microalgae and cyanobacteria occur in multiple compartments that have been characterised by the location of the enzymes involved in these functions. These compartments can be delimited by bilayer membranes, such as the chloroplast, the lumen, the peroxisome, the mitochondria or monolayer membranes, such as lipid droplets or plastoglobules. They can also originate from liquid–liquid phase separation such as the pyrenoid. Multiple exchanges exist between the intracellular microcompartments, and these are reviewed for the CO_2 concentration mechanism, the Calvin–Benson–Bassham cycle, the lipid metabolism and the cellular energetic balance. Progress in microscopy and spectroscopic methods opens new perspectives to characterise the molecular consequences of the location of the proteins involved, including intrinsically disordered proteins.

Keywords: bioenergetics; Calvin–Benson–Bassham cycle; *Chlamydomonas reinhardtii*; cyanobacterium; diatom; intrinsically disordered protein; liquid–liquid phase separation; nuclear magnetic resonance; photosynthesis; structural biology

Photosynthesis is an essential metabolic pathway that allows autotrophic organisms to mobilise inorganic carbon and produce carbohydrates and fatty acids that are further used by other metabolic pathways. These pathways are differentially localised in compartments that have distinct physicochemical properties, which

Abbreviations

ALA, α-linolenic acid; ARA, arachidonic acid; ATP S.ase, ATP synthase; ATP, adenosine triphosphate; BPGA, bisphosphoglyceric acid; CA, carbonic anhydrase; Carb., carbamylated; CBB, Calvin–Benson–Bassham; CCM, CO_2 concentration mechanism; CEF, cyclic electron flux; DAG, diacylglycerol; DES, deep eutectic solvents; DGAT, diacylglycerol acyltransferase,; DGDG, digalactosyldiacylglycerol; DGTS, diacylglyceryltrimethylhomo-Ser; DHA, docosahexaenoic acid; EPA, eicosapentaenoic acid; EPYC1, essential pyrenoid component 1; ER, endoplasmic reticulum; FA, fatty acid; FAS, fatty acid synthase; FBPase, fructose-1,6 bisphosphatase; Fdx, ferredoxin; FNR, ferredoxin $NADP^+$ reductase; FRAP, fluorescence recovery after photobleaching; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; IDP, intrinsically disordered protein; LD, lipid droplet; LEF, linear electron flux; LLPS, separated liquid–liquid phases; MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; MLDP, major LD protein; NaDES, natural DES; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; NMR, nuclear magnetic resonance; NTR, N-terminal repeat regions; OPP, oxidative pentose phosphates; PC, phosphatidylcholine; PDB, protein data bank; PG, phosphatidylglycerol; PGA, phosphoglyceric acid; PGD1, plastid galactoglycerolipid degradation 1; PGK, phosphoglycerate kinase; PRI, ribose-5-phosphate isomerase; PRK, phosphoribulokinase; PSI, photosystem I; PSII, photosystem II; PTM, post-translational modifications; PUFA, polyunsaturated fatty acids; Ri5P, ribose-5-phosphate; Ru5P, ribulose-5-phosphate; RuBisCO, Ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase; RuBP, ribulose-1,5 bisphosphate; SAXS, small-angle X-ray scattering; SBPase, sedoheptulose-1,7 bisphosphatase; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycerol; SSUL, RuBisCO small subunit like domain; TAG, triacylglycerol; TPI, triose phosphate isomerase; Trx, thioredoxin.

This is an open access article under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits use, distribution and reproduction in any medium, provided the original work is properly cited.

can affect the physiology. The complete photosynthetic carbon metabolism is complex, and only three main stages will be discussed here: The first stage is the acquisition of inorganic carbon and its accumulation at the location of the enzyme ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase (RuBisCO; Fig. 1). In the

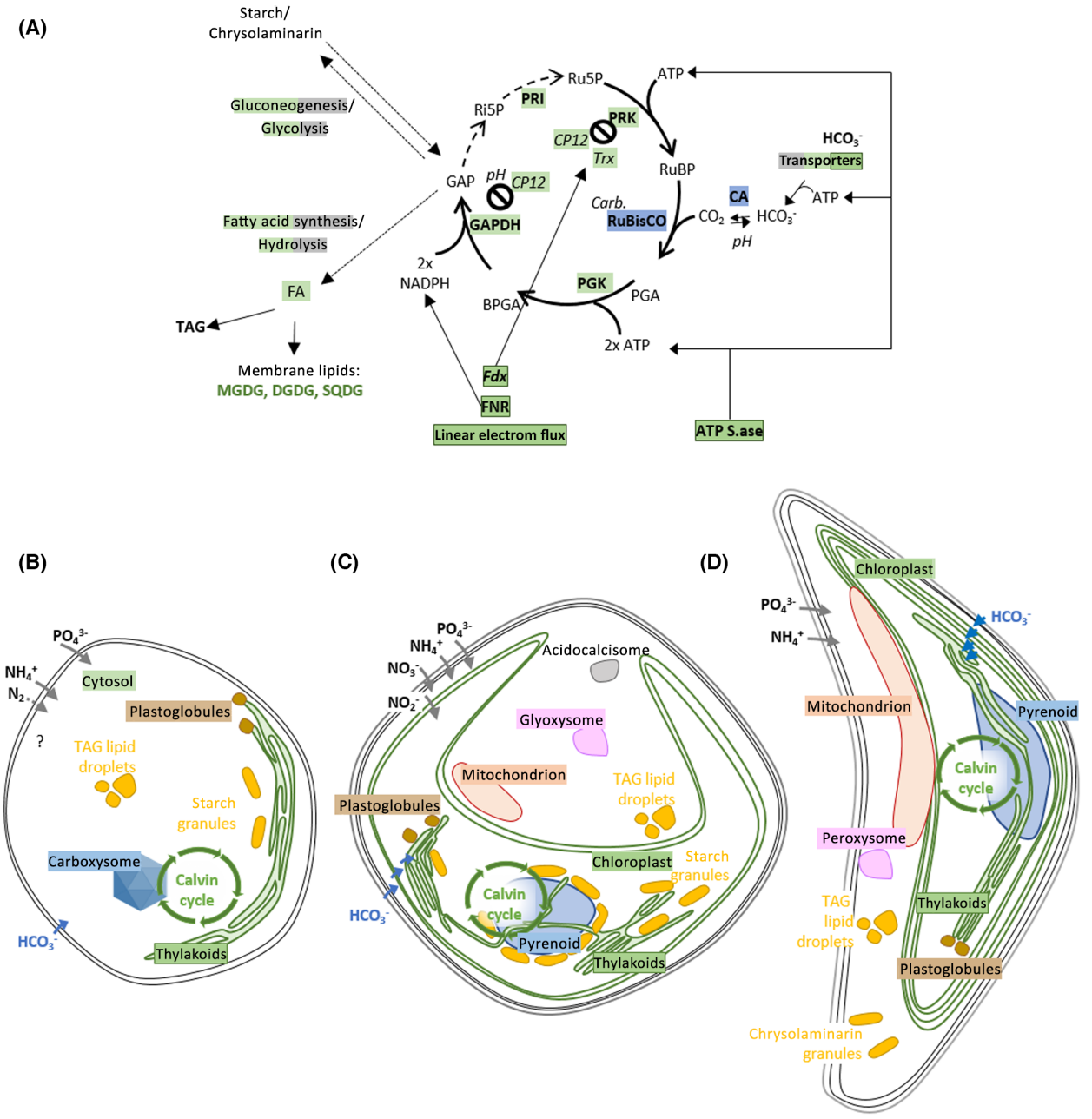


Fig. 1. Schematic of the carbon metabolism pathways that are discussed in this Review (A) together with schemes of the ultrastructures of a cyanobacterial cell (B), of *C. reinhardtii* (C) and of *P. tricornutum* (D). The location of some enzymes has been determined experimentally (refer to the main text) and the colour of the rectangle surrounding their name indicates their localisation: blue: pyrenoid or carboxysome; light green: cytosol of cyanobacteria or chloroplast of eukaryotic algae; dark green: thylakoids; grey: cytosol of eukaryotic algae. ATP S.ase, ATP synthase; ATP, adenosine triphosphate; BPGA, bisphosphoglyceric acid; CA, carbonic anhydrase; Carb., carbamylated RuBisCO; DGDG, digalactosyldiacylglycerol; FA, fatty acid; Fdx, ferredoxin; FNR, ferredoxin NADP$^+$ reductase; GAP, glyceraldehyde-3-phosphate; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase; MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; NADPH, nicotinamide adenine dinucleotide phosphate; PGA, phosphoglyceric acid; PGK, phosphoglycerate kinase; PRK, phosphoribulokinase; Ri5P, ribose-5-phosphate; Ru5P, ribulose-5-phosphate; RuBP, ribulose-1,5 bisphosphate; SQDG, sulfoquinovosyldiacylglycerol; TAG, triacylglycerol; Trx, thioredoxin.

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

second stage, RuBisCO fixes CO_2 with a carboxylation step and produces two molecules of phosphoglyceric acid (PGA), a three-carbon molecule that is further converted into reduced carbohydrates in the Calvin–Benson–Bassham (CBB) pathway. The CBB pathway relies on the availability of a reducing power and adenosine triphosphate (ATP) generated by the photochemical phase of photosynthesis. Finally, the third stage is the synthesis of the carbon storage compounds in the form of either carbohydrates or fatty acids further esterified into membrane and storage lipids (triacylglycerol lipids). Each of these three stages is finely tuned according to light intensity, availability of the inorganic carbon source or environmental stresses (nutrient shortage, temperature, salinity, drought, pressure, etc.).

The molecular mechanisms underlying the regulation of carbon acquisition, assimilation and storage pathways are well-described in the literature. These involve physicochemical transitions such as changes in pH, redox potential, metabolites and metal ion concentrations within the cellular compartments where photosynthesis occurs [1–4], post-translational modifications [5–7], structural transitions of key enzymes [8–10] and reorganisations within supramolecular complexes [11–14]. Recent high-resolution cryo-electron microscopy images and tomograms from the cyanobacterium *Synechocystis 6803* [15], the green alga *Chlamydomonas reinhardtii* [16–18] and the diatom *Phaeodactylum tricornutum* [19] enabled the cellular localisation of some metabolic pathways. The location of enzymes within the cells (Fig. 1B) can be correlated with the molecular description of the biochemical pathways (Fig. 1A) thanks to progress in biophysical methods such as microscopy, mass spectrometry, several spectroscopic methods such as fluorescence spectroscopy and nuclear magnetic resonance (NMR) and machine-learning-assisted-data interpretation [16,20,21].

Here, we will focus on unicellular photosynthetic organisms, where all stages of the carbon cycle occur in a single cell, unlike most higher plants. In multicellular organisms, cell specialisation can allow to separate physiological functions on the macroscopic level. In eukaryotic unicellular photosynthetic organisms, different organelles participate in the compartmentalisation of some metabolic pathways. This partitioning helps prevent futile cycles of antagonist metabolic pathways that share the same metabolites. For example, the oxidative pentose phosphate (OPP) cycle in diatoms is localised in the cytoplasm, and its antagonist pathway, the CBB, also named reductive pentose phosphate cycle, is localised in the chloroplast [22]. In eukaryotic microalgae, inorganic carbon is imported and assimilated in the chloroplasts (Fig. 1B). Carbon storage is then ensured by the synthesis of polysaccharides that accumulate in the form of starch granules in the chloroplast of green algae, of starch-like polymers in cyanobacteria [23], or of chrysolaminarin granules in the vacuoles of diatoms [24,25]. Alternatively, carbon can be stored through the synthesis of triacylglycerols (TAG) that assemble in lipid droplets (LD) [26]. Even though these carbon metabolic pathways are separated in different spaces within the cell, they are interconnected by exchange of metabolites between the different partitions and across their boundaries.

The physical–chemical nature of these cell compartments varies. For example, LDs encapsulate an organic liquid phase [27], whereas polysaccharide granules are composed of amorphous and semicrystalline layers of polysaccharides [27–29]. Traditionally, the term ‘organelle’ refers to large aqueous cellular compartments surrounded by a bilayer membrane such as the chloroplast, the vacuole or the mitochondrion. The term organelle has been also proposed to name LDs that are smaller organic partitions surrounded by a monolayer membrane [27,30]. Organelles can be themselves divided in different regions of space that we chose to name microcompartments. For example, polysaccharide granules that localise within the chloroplast of green microalgae or within the vacuole of diatoms can be referred to as a microcompartment. One can also refer to the self-assembled granules of polysaccharide as ‘biomolecular condensates’. Indeed, the term ‘condensation’ has been used to denominate the spontaneous clustering of biomolecules that result in a high local concentration surrounded by a dilute phase and the partitioning of the cell [31]. Different types of biomolecules can spontaneously cluster in biomolecular condensates, including ribonucleic acid, polysaccharides, proteins or lipids [32–34]. The pyrenoid matrix is a well-described example of protein biomolecular condensate that is described in details in Pyrenoid and carboxysome section. Because biomolecular condensates do not possess membranes, they are also referred to as membrane-less organelles [32–34]. The physicochemical properties of these biomolecular condensates are the focus of intense scrutiny.

Microcompartments can be observed in microscopy images of prokaryotic unicellular organisms, such as carboxysomes, in nonheterocystous cyanobacteria, where inorganic carbon and RuBisCO are condensed [35]. The thylakoid membranes can also be considered as a microcompartment because they define a new region of space in the chloroplast where the photochemical phase of photosynthesis produces ATP and NADPH. Their associated plastoglobules are another

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

example of partition, the function of which is multiple [36]. Plastoglobules encapsulate a hydrophobic core with varying compounds that change according to culture conditions, surrounded by a monolayer membrane [37]. They have been proposed to provide storage for thylakoid components, and to be involved in insoluble isoprenoid synthesis or degradation, and in stress response, as well as in the storage of compounds that can be toxic for the cell such as terpenes [36,38].

This perspective review aims to discuss the organisation of carbon metabolism in different microcompartments and at different scales within the cell. This includes the molecular description of the regulatory processes with the physical separation of their key actors, as well as the formation of supramolecular assemblies/biocondensates leading to the segregation of metabolites and enzymes.

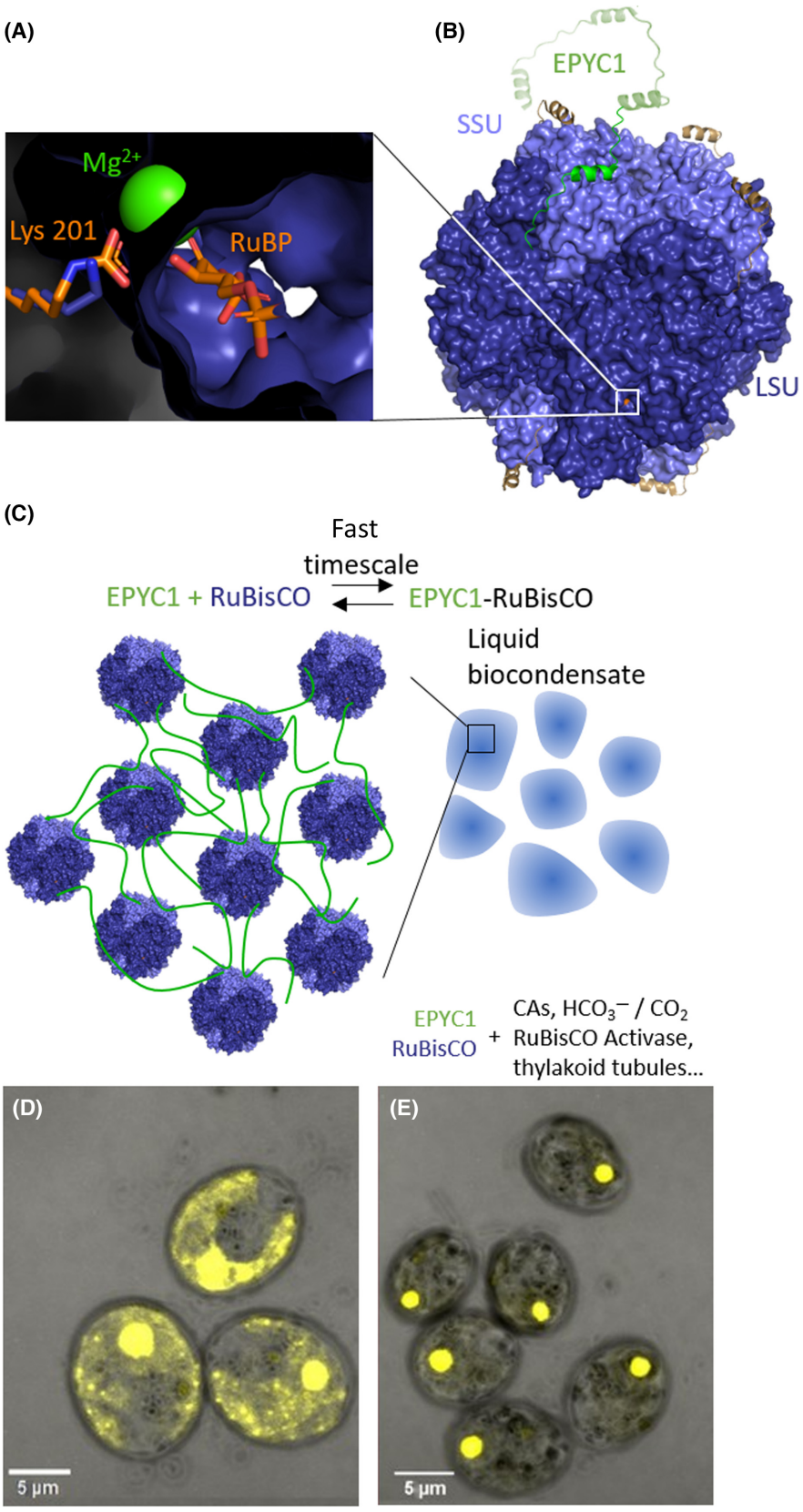
Illustration from the emblematic case of RuBisCO

The study of RuBisCO, which is a complex made up of large (L) and small (S) subunits (Fig. 2A), is emblematic of the structure–function relationships in a complex [39]. Since the first X-ray structure of the active RuBisCO in 1989 [40], more than 240 structures from all the photosynthetic lineage have been deposited in the Protein Data Bank (PDB). The mainly described oligomeric state of the enzyme is the L_8S_8 hexadecameric form, but other oligomeric states exist [41]. The regulation of the enzyme, notably by pH, a Mg^{2+} cation and an 'activating' nonsubstrate CO_2 molecule via the carbamylation of Lysine 201 in the active site of the large subunit is well-understood [7] (numbering from *C. reinhardtii*, Fig. 2A). Binding of RuBP to noncarbamylated RuBisCO results in an inhibited state. This state is resolved by interaction with a RuBisCO activase or possibly by CBB X protein (CbbX) in diatoms [42,43]. The 'structure–function' correlation of this model enzyme is thus well-established. Since more than 30 years, its localisation in an ultrastructure has been observed on microscopy images: in the pyrenoid in eukaryotic microalgae or in the carboxysomes in cyanobacteria [35,44–46]. More precisely, in *C. reinhardtii* and under atmospheric CO_2 ($\sim$ 400 ppm) and O_2 concentrations, RuBisCO is present both in the chloroplast stroma and in the pyrenoid microcompartment (Fig. 2D). Under CO_2 concentrations lower than atmospheric ($<$ 200 ppm) or high O_2 conditions, RuBisCO relocates from the stroma to the pyrenoid (Fig. 2E) [18,47,48]. Only very recently, the physicochemical nature of the pyrenoid has been described. This biomolecular condensate is detailed in the following section [32,49–52]. Also, recent metabolic flux models provide insights into the consequence of this 'segregation' or 'condensation' of RuBisCO within these demixing condensates as regard to the CBB metabolic flux [18].

From the example of RuBisCO, one can now extend the 'structure–function' relationships from quaternary structure (oligomeric enzyme complex) to an additional level of supramolecular assembly that could be named 'ultrastructure-function' relationships. Such an organisation raises new questions. What is the significance of the heterogeneity within a cell, in other words 'roughness', observed in microscopy images [53,54]? What are the physicochemical properties of the various microcompartments? Some are mesoscopic macromolecular complexes such as carboxysomes or starch granules. Some are separated liquid phases that demix because of the presence of different water-insoluble compounds such as lipids. Some are separated liquid phases that demix because of condensation of protein constituents through multivalent transient intermolecular interactions such as the pyrenoid [33,34,55]. While the phase separation of lipids appears obvious, why do carbohydrates (starch) and proteins (pyrenoid) also phase separate? These microcompartments cannot be considered as strictly confined zones, as metabolites diffuse in and out. How is their formation/disassembly regulated? How do proteins fold in these different microcompartments? All these questions can be raised for each stage of the carbon cycle of microalgae, but this is also true for all metabolic pathways in all types of cells.

Fig. 2. RuBisCO regulation at the molecular and supramolecular levels. (A) Structure of the active site of RuBisCO (PDB ID: 1IR2). (B) Hexadecameric L_8S_8 RuBisCO bound to eight Essential Pyrenoid Component 1 (EPYC1) proteins, obtained by cocrystallisation with saturating concentrations of synthetic peptides shown in brown (PDB IDs: 7JSX and 7JFO). In addition, one full-length EPYC1 protein is artistically depicted in green. (C) Schematic of the molecular contacts between EPYC1 and RuBisCO underlying the phase separation. (D, E) Confocal microscopy images of *C. reinhardtii* showing Venus-labelled RuBisCO that indicating the location of the hexadecameric complex. (D) Location of RuBisCO in both the chloroplast stroma and the pyrenoid at atmospheric CO_2 concentration with 5 mM bicarbonate. (E) Hyperoxia phenotype and the relocation of RuBisCO induced by 100 µM H_20_2 to the culture. Panels D and E are adapted from [48]. The same relocation is observed under low CO_2 conditions without hyperoxia.

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License



18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Ideally, to grasp the above-defined 'ultrastructure-function' relationships, one would like to be able to describe all the ultrastructural elements observed on electron microscopy images at the molecular level and provide a rationale on their role for the regulation of the metabolic pathways they are hosting. Most of the recent technological developments that allowed deciphering some of these aspects on the carbon metabolism of microalgae will be mentioned.

Pyrenoid and carboxysome

As mentioned above, the most emblematic enzyme for CO_2 fixation is RuBisCO, which is responsible for the conversion of 10^{14} kilogrammes of carbon each year [56]. Surprisingly, the maximum catalytic activity for the carboxylation of RuBP by RuBisCO is achieved at significantly high CO_2 concentrations (ranging from 25 to 100 μM). These concentrations are higher than the atmospheric CO_2 concentration (c.a. 15 μM in the oceans) [57,58]. The pH of the compartment where RuBisCO is localised, such as the chloroplast stroma or the cyanobacteria cytosol (pH 7.9), suggests that the major form of inorganic carbon is bicarbonate. Considering these biochemical data, it can be concluded that RuBisCO is not working at its maximum rate and that the carboxylation reaction is in competition with the oxygenation of RuBP. The latter produces an inhibitor of the CBB cycle, 2-phosphoglycolate, that must be metabolised in the C2 respiratory pathway. This apparent paradox may be resolved when the ultrastructure of the chloroplast is taken into consideration. The chloroplast membranes, including the thylakoids membranes, are permeable to CO_2, and bicarbonate transporters catalyse the import of HCO_3^- into the stroma (Fig. 1B). In each compartment, carbonic anhydrases catalyse the HCO_3^-/CO_2 conversion so that their pH-dependent ratio is instantly achieved. Besides, the equilibrium across multiple microcompartments that have different pH—the thylakoids lumen (pH 6) versus the chloroplast stroma and the pyrenoid (pH 7.9)—drives the import of inorganic carbon to the pyrenoid [57]. The 'passive' transport of inorganic carbon through the different microcompartments can support RuBisCO carboxylation activity in the pyrenoid under atmospheric CO_2 conditions, while additional HCO_3^- transporters enhance inorganic carbon import under low CO_2 [59]. Finally, the condensation of RuBisCO together with CAs in the carboxysome (cyanobacteria) or the pyrenoid (eukaryotic microalgae) increases the availability of CO_2 in the vicinity of the enzyme, which enables its activity. The pyrenoid is often surrounded by a discontinuous layer of starch granules that could contribute to the confinement of inorganic carbon that results in a higher CO_2/O_2 ratio compared with the stroma and that supports carboxylation at the expense of oxygenation reaction [47]. Under specific conditions (hyperoxia), the pyrenoid has no starch sheath and presents a large interface with the chloroplast stroma [48]. The existence of such interface will be discussed later.

For decades, it was enigmatic how the colocalisation of RuBisCO and CAs was mediated, even though the functions of the carboxysome and pyrenoid were known [35,44,45]. RuBisCO was copurified in cyanobacterial β-carboxysome as a supramolecular complex with small putative shell proteins (CcmM) that are composed of three RuBisCO small subunit-like domains (SSUL) and one isoform that possesses a CA domain [60]. Reconstitution of the RuBisCO–CcmM complexes *in vitro* induced a liquid–liquid phase separation: One phase is a biomolecular condensate of RuBisCO-CcmM and the other phase is free of proteins [61,62]. In a nutshell, multivalent interactions between the hexadecameric RuBisCO (L_8S_8) and the SSUL domains result in the condensation of the two protein complexes when they are mixed in the appropriate stoichiometry (0.25 : 1 molar ratio). The reversible demixing of these two separated liquid–liquid phases (LLPS) can be observed using fluorescent-tagged proteins and fluorescence microscopy. Demixing does not occur under high salt concentrations that interfere with electrostatic intermolecular interactions. Also excess of CcmM prevented the condensation of the separated liquid phase, indicating that stoichiometry is essential [61]. The fluidic (liquid) nature of the protein condensate was confirmed by dual-colour fluorescence cross-correlation spectroscopy and fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) that allowed to quantify the short live-time of the RuBisCO–CcmM contacts.

Similarly, the α-carboxysome biogenesis involves multivalent interactions of the hexadecameric RuBisCO with four N-terminal repeat regions (NTR) of a large (~ 900 residues) intrinsically disordered protein (IDP) named CsoS2. Demixing into two liquid–liquid phases was observed when RuBisCO and CsoS2-NTR are present in the appropriate stoichiometry (1 : 1 molar ratio) [63]. The dynamics that are characteristic for the LLPS biocondensates only have been studied by *in vitro* studies of carboxysomes biogenesis. This biphasic state is not conserved in the final mesoscopic RuBisCO-CA supramolecular complex, that is surrounded by shell proteins. This suggests that the transient interactions are fixed upon the recruitment of other partners of the final aggregates that acquire microcrystalline properties [64].

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Unlike carboxysomes, the pyrenoid has no protein-shell. It has been a challenge to isolate this membraneless microcompartment in order to identify its molecular constituents. It is not a microcrystalline structure and therefore it loses its integrity upon purification steps. The constituents of the pyrenoid were identified by a combination of genetic screening with the creation of a library of GFP-mutant chloroplast proteins, microscopy and proteomic screening [65]. An essential protein for the formation of the pyrenoid is the Essential Pyrenoid Component 1 (EPYC1) that has no enzymatic activity [66]. Like CsoS2, EPYC1 (in *C. reinhardtii*) is an IDP composed of five repeat domains having a small RuBisCO subunit binding site (Fig. 2B). If EPYC1 and hexadecameric RuBisCO are present in a defined stoichiometry (2 : 1 molar ratio), demixing into two phases occurs in a process similar to that of the RuBisCO : CcmM or the RuBisCO : CsoS2 biomolecular condensates [49,51]. As for the RuBisCO–CcmM biocondensates, the demixing is prevented by high salt concentration or by excess of EPYC1 or RuBisCO, indicating that the multivalent electrostatic interactions are essential for the condensation. Similarly, FRAP revealed the very transient EPYC1 : RuBisCO contacts, which is also a hallmark for LLPS and the formation of biocondensates [51] (Fig. 2C).

EPYC1, CsoS2 or CcmM act as scaffolds, 'smooth mortar' or 'stickers' to confine RuBisCO in a biomolecular condensate due to their multivalent binding sites with this enzyme. This condensate can maintain a high degree of freedom—liquid properties—because the intermolecular interactions are transient. Other factors can contribute to the rigidification as it is the case for the mature carboxysomes. On the contrary, in the cells, the pyrenoid retains a high degree of freedom that characterises liquid droplets. The absence of a stable three-dimensional structure in CsoS2 and EPYC provides an extra level of flexibility to the scaffold. Intrinsically disordered proteins are described as essential in the responsiveness to stimuli, and their roles in the regulatory network also have been demonstrated for the regulation of the carbon metabolism [11]. Their structural flexibility enables fast re-arrangement upon exposition to different conditions, such that they can act as sensors. For example, the intrinsically disordered region of the MAPK phosphatase AP2C3 of *Arabidopsis thaliana* was proposed to be the CO_2 sensor that regulates the phosphatase activity in response to increasing CO_2 concentration [67]. The molecular description of AP2C3 revealed that the IDP fosters the condensation of LLPS droplets at 10 000 ppm CO_2, whilst the proteins were scattered or dispersed at atmospheric CO_2 concentrations (400 ppm). To our knowledge, the catalytic properties of RuBisCO in the pyrenoid compared with that free in solution is not known but new properties might emerge in this more complex environment. How the condensation of protein-dense phases might contribute to the catalytic efficiency will be discussed at the end of this perspective paper. Intrinsically disordered proteins are also prone to have post-translational modifications (PTMs) as response to signalling pathways, and these PTMs can trigger dissociation of LLPS as it is the case for histone containing LLPS [68]. Altogether, IDPs are considered as key regulators for the formation/disassembly of LLPS [69].

Intrinsically disordered proteins are also often described as 'hub' proteins, a property observed for several scaffold proteins in liquid biomolecular condensates. The full molecular properties of EPYC or CsoS2 in the condensates are not yet described. Only transient contacts between the scaffold protein and RuBisCO have been described by using fusion proteins with small polypeptides (Fig. 2B) [49,63]. It is expected that the entire proteins will remain highly flexible like other IDPs scaffolds for LLPS biocondensates. Several of them have been investigated at the residue-scale using NMR such as FUS [70], hnRNPA2 [71], CAPRIN1 [72,73], HP1α [74], tau [75,76], Ntail [77] and TCP42 [78] (for global review, refer to [70]). Nuclear magnetic resonance can indeed complement the fluorescence-based methods that have mostly been employed to characterise the RuBisCO-containing LLPS. The NMR chemical shift reflects the structural properties of the protein at the residue-specific scale (are they in folded regions or disordered?). Putative conformational dynamic timescales can be probed using a range of NMR experiments (ns-μs using spin relaxation experiments, 100 μs–100 ms using relaxation dispersion or off-field saturation experiments) and the short-range and long-range transient contacts can be probed using nuclear Overhauser effect spectroscopy or paramagnetic relaxation enhancement experiments. A review of the recent NMR method developments and their use in structural biology can be found in Thiellet and Luchinat, Prog. in NMR Spec. (2022) [79]. In addition, recent developments of pulsed-field gradient NMR spectroscopy (or diffusion-ordered spectroscopy) can be used to discriminate the localisation of the proteins within the different phases [73,76]. Nuclear magnetic resonance is thus a unique method that can combine structural and physicochemical information in complex environments such as LLPS.

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Regulation of the RuBisCO substrate regeneration

The positive effect of pyrenoid or carboxysome formation for the availability of CO_2 in the vicinity of the RuBisCO active site has been modelled [18,57], but their effect for the availability of the sugar substrate, RuBP, within these microcompartments is puzzling. In the higher plant *Nicotiana tabacum*, the RuBP carboxylation by RuBisCO is not the rate limiting step for CO_2 assimilation, but the RuBP regeneration by the CBB enzymes is limiting [80], and one could assume that it is the same in green microalgae. The last step of RuBP regeneration is performed by the phosphoribulokinase (PRK) that catalyses the phosphorylation of ribulose-5-phosphate with ATP. Decrease of up to 80% of the amount of PRK did not affect CO_2 assimilation in *Nicotiana tabacum* and *C. reinhardtii*, indicating that the rate limiting step is not the last step of the RuBP regeneration [81,82]. Genetic engineering of a fluorescent-tagged protein library in *C. reinhardtii* allowed to localise PRK in the chloroplast stroma around the pyrenoid (Fig. 3A) [16,18], which raises the question of how the PRK product, RuBP, crosses the pyrenoid boundaries. Similarly, phosphoglycerate kinase (PGK) that catalyses the phosphorylation of RuBisCO product PGA into bisphosphoglycerate is also localised in the chloroplast stroma, such that the PGA has to migrate out of the pyrenoid. The bisphosphoglycerate is in turn reduced by the glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) that shares the same stromal localisation (Fig. 3A). It is known that substrate and cofactor availability is a key parameter in the regulation of the enzymes in general and of the CBB pathway in particular [1,83]: PRK and PGK phosphorylate their substrate by using ATP, and the reducing power of GAPDH is provided by NADPH. The availability of ATP and NADPH, both products of the photochemical stage that occurs on thylakoid membranes, is discussed below. In the cyanobacterium *Synechocystis pcc6803*, several CBB enzymes were localised by immunogold labelling and electron microscopy in proximity with the thylakoid membranes: 72% of the PRK particles, together with 66% of PGK and GAPDH and 47% of the observed RuBisCO particles [15].

Regulation of PRK is another emblematic case for the structure–function relationships. Since 2019, the crystal structure of the active PRK dimer is available as well as that of inactive PRK in supramolecular complexes with GAPDH and the small regulatory protein CP12 [9,84–86] (Fig. 4B). CP12 colocalises with PRK and GAPDH in the chloroplast stroma at the periphery of the pyrenoid [16]. Activity assays of purified PRK revealed that it is regulated by its redox state: The reduction in inactive oxidised PRK is catalysed by thioredoxin f or m [87–89]. Phosphoribulokinase is thus a target of the ferredoxin–thioredoxin network as several other CBB enzymes [5]. The nature of the spatial organisation of the thylakoid membranes discussed below could be considered in this regulation. The molecular description of thioredoxin-mediated regulation of PRK was deciphered by a combination of mutagenesis, activity assays and crystallographic structures and can be summarised as follows. In its reduced state, the active site is localised in a groove that harbours Arg64 (numbering from the model *C. reinhardtii*) that can coordinate Ru5P and Cys16 that binds ATP (Fig. 4A) [9,90]. Upon oxidation, the disulphide-bond formation between Cys16 and Cys55 reorganises the ATP binding site (Fig. 4B). When oxidative conditions prevail, PRK has a high affinity for the GAPDH-CP12 subcomplex [91,92]. The N-terminal hairpin of CP12 that harbours the disulphide-bond Cys23-Cys31 occupies the active site groove of PRK [84,85]. The formation of the ternary complex is mediated by the redox-dependent structural transition of CP12 that we have described using NMR and small-angle X-ray scattering (SAXS) experiments: It is intrinsically disordered in reducing conditions and becomes partially ordered in oxidising conditions [12,93]. This protein is thus conditionally disordered and is a hub for the ternary complex association. The weak electron density observed for CP12 in the cryo-electron microscopy of the GAPDH-CP12-PRK complex suggests that it retains a high degree of flexibility within the ternary complex [84]. Interestingly, reduction and re-activation of PRK occurs faster when it is sequestered within the ternary complex compared with free oxidised PRK, and this is an example of how supramolecular organisation modifies the regulation [14,88,92,94]. Also, in the complex, PRK and GAPDH are protected from oxidative damage [95]. This large assembly also recruits another CBB enzyme: the aldolase, conferring new properties to this enzyme when embedded in this supramolecular edifice [96].

The recent molecular description of the GAPDH-CP12-PRK complex can be confronted to 30-year-old reports of copurification of active proteins (Table 1) [12]. For example in spinach, GAPDH and PRK were shown to associate with phosphoribose isomerase (PRI), RuBisCO, sedoheptulose-1,7-bisphosphatase and ferredoxin-$NADP^+$ reductase close to the thylakoid membranes [97]. Other studies revealed the association of at least PRI, PRK and RuBisCO in spinach [13], rice [98], tobacco [99], all

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

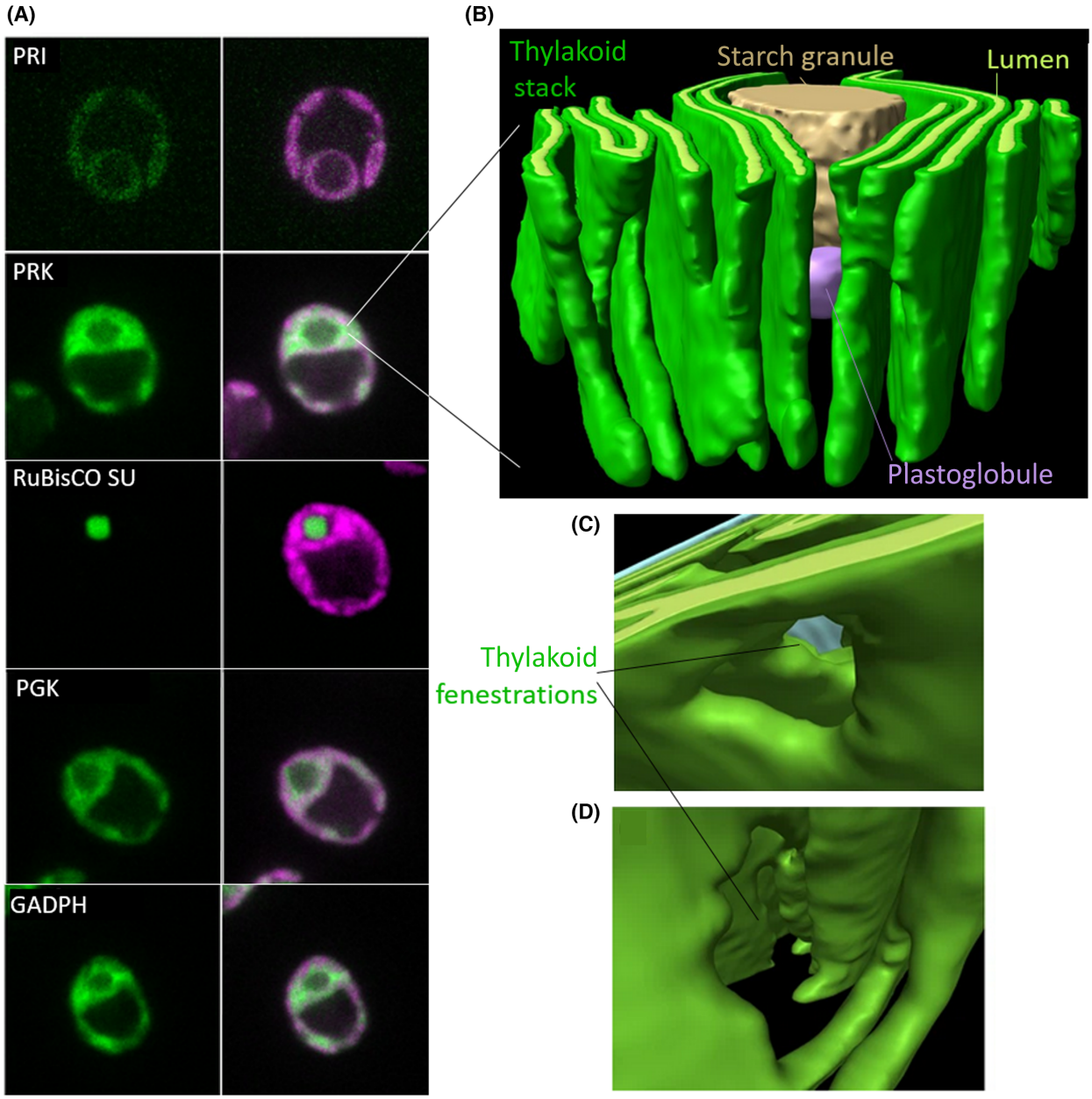


Fig. 3. (A) Location of different enzymes of the CBB cycle revealed by fluorescence microscopy using Venus-fusion constructs shown ingreen. The autofluorescence of chlorophyll is shown in purple. Figure adapted from [18]. (B) 3D organisation of the thylakoids stacks that shows the three continuous phases: the lumen (light green), the bilayer membrane (dark green) and the stroma. (C, D) Show fenestrations through the thylakoids that enable communications between different stroma compartments delimited by the thylakoids. Figure adapted from [17].

higher plants that are devoid of pyrenoids. The colocalisation of successive enzymes for the RuBP regeneration is a strategy to increase metabolite turnover [100]. In *C. reinhardtii* and other microalgae, however, PRI and PRK were not observed in the pyrenoid or carboxysomes. Nonetheless, RuBisCO is not sequestered in the pyrenoid or carboxysome under atmospheric or high CO_2 conditions and therefore could be available for such supramolecular complexes (Fig. 2D) [15,48]. Despite the tremendous efforts that enable to solve the structure of homomeric complexes for most enzymes of the CBB cycle [1], no other supramolecular complexes except GAPDH-CP12-PRK or the transient complex of RuBisCO-EPYC1 have been reconstituted

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

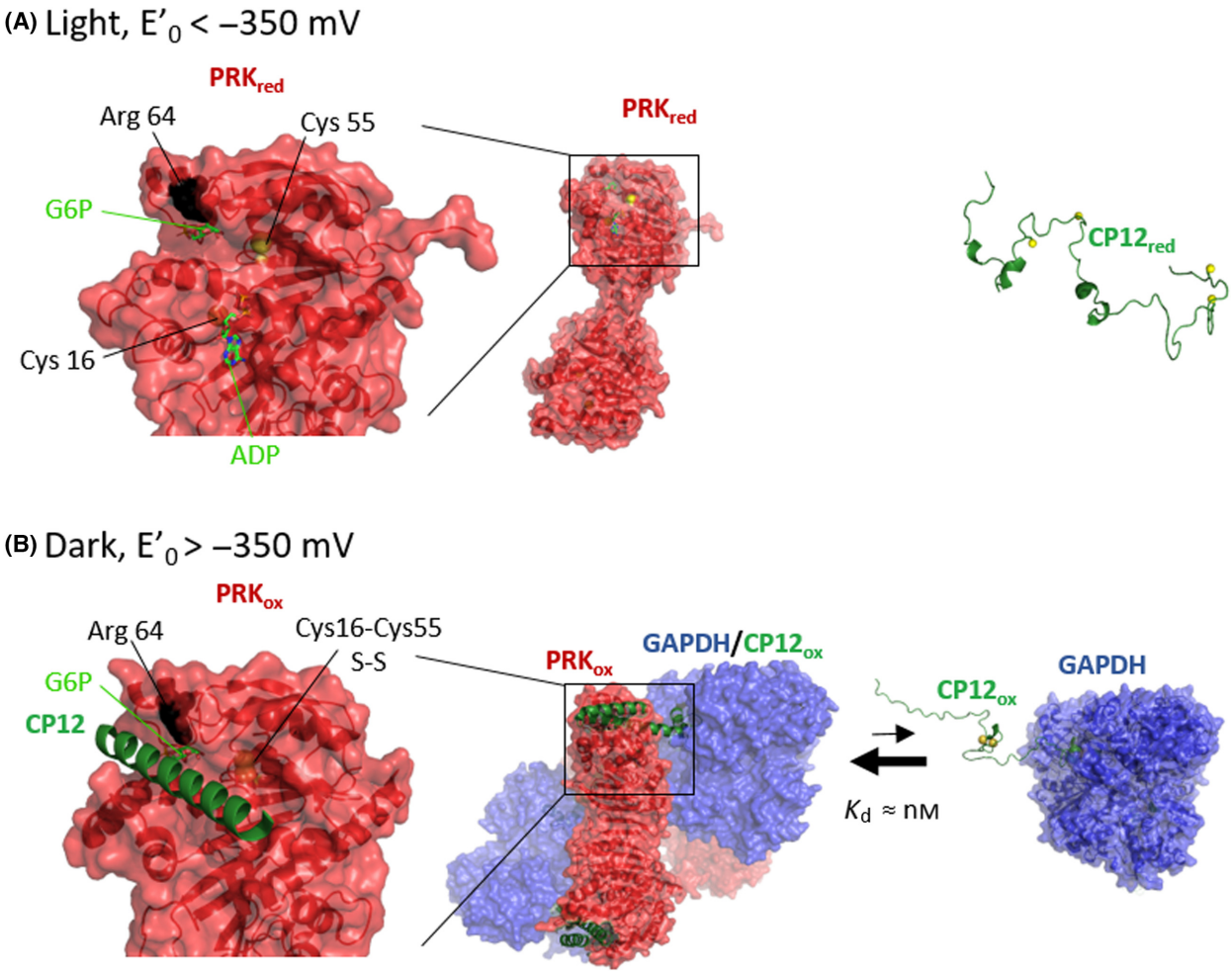


Fig. 4. Regulation of PRK from the molecular to the supramolecular level: from left to right are shown the structure of the active site of PRK from *C. reinhardtii* in reducing conditions (PDB ID: 6H7G) and from *A. thaliana* in oxidising conditions (PDB ID: 6KEZ). The positions of the ATP/ADP and substrate are modelled thanks to alignment with the structure of *S. elongatus* PRK (PDB ID: 6KEV). In this structure PRK is crystallised with glucose-6-phosphate that can occupy the active site at the position of Ru5P. The Arg64 position is indicated. (A) In the light, reducing conditions prevails in the chloroplast stroma as it is indicated by the low Nernst potential (E'_0). CP12 is intrinsically disordered [204] and the regulatory PRK disulphide Cys16-Cys55 bond is disrupted. (B) In the dark, oxidative conditions prevails in the chloroplast stroma as it is indicated by the higher Nernst potential. CP12 is partially folded, has a high affinity for GAPDH and the GAPDH-CP12 sub-complex in turn has a high affinity for PRK [205].

and studied *in vitro* (let aside the carboxysomes). Both of these complexes involve a hub or scaffold IDP, that has no enzymatic function: EPYC1 or CP12. The identification of CP12 was enable decades ago thanks to its homology with the C-terminal extension of the B-isoform of GAPDH of higher plants [101]. The RuBisCO–EPYC1 interactions are transient and would not support copurification by classic chromatographic strategies, and it has thus escaped knowledge until recent proteomic studies [66]. The recent advances of mass spectrometry coupled with cross-linking agents could be in future at the origin of the identification of transient protein–protein interactions and of other protein hubs that may mediate the association of other CBB enzymes in supramolecular complexes [102].

ATP and reducing power generation

The acquisition of one CO_2 molecule (i.e. its transport to the vicinity of RuBisCO in the pyrenoid) consumes 1.3 ATP molecules [57], and its assimilation by the CBB cycle consumes two NADPH and three ATP molecules [1]. Their primary generation occurs in the thylakoid membranes via the proton gradient and the linear electron flux (LEF) that are generated on the photochemical phase of photosynthesis. This

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Table 1. Supramolecular complexes containing CBB enzymes, the organism in which they have been observed and the related reference that had reported these complexes. CA, carbonic anhydrase; FBPase, fructose-1,6 bisphosphatase; FNR, ferredoxin $NADP^+$ reductase; GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate-dehydrogenase; PGK, phosphoglycerate kinase; PRI, ribose-5-phosphate isomerase; PRK, phosphoribulokinase; RuBisCO, ribulose-1,5 bisphosphate carboxylase/oxygenase; SBPase, sedoheptulose-1,7 bisphosphatase; TPI, triose phosphate isomerase.

Protein content	Organism	References
CA/PRK/RuBisCO/PGK	*Pisum sativum*	[188]
PRI/PRK/RuBisCO	*P. sativum*	[189]
PRI/PRK/RuBisCO/PGK	*P. sativum*	[190]
PRI/PRK/RuBisCO/PGK/GAPDH	*Spinacia oleracea*	[13]
	Anacystis nidulans	[191]
PRI/PRK/RuBisCO/PGH/GAPDH/ATP synthase	*Synechocystis 6803*	[15]
RuBisCO/PGK/GAPDH/TPI/aldolase/FBPase	*S. oleracea*	[192]
PRI/PRK/RuBisCO/PGH/GAPDH/SBPase/FNR/ATP synthase	*S. oleracea*	[193]
RuBisCO/PGK/GAPDH/TPI/aldolase/FBPase	*S. oleracea*	[192]
GAPDH/TPI/aldolase/SBPase	*P. sativum*	[190]
GAPDH/CP12/PRK	*S. oleracea*	[101,194,195]
	P. sativum	[194,195]
	A. thaliana	[196]
	Galderia sulfuraria	[197]
	Synechocystis 6803	[198,199]
	Synechococcus PCC7942	[200]
	C. reinhardtii	[199,201,202]
GAPDH/CP12/FNR complex	*Asterionella formosa*	[203]

photochemical process produces two NADPH and 2.6 ATP molecules, and the ATP : NADPH ratio is modulated by the Mehler reaction, the flavodiiron proteins and the cyclic electron flux (CEF) though their quantitative contribution is difficult to assess [103,104]. Malate valves that are discussed in the next section are also involved [105]. Before expending on the energetic balance across organelles in the case of eukaryotic algae, the supramolecular organisation of the thylakoid membranes (that is shared by prokaryote and eukaryote algae) is discussed. The thylakoids are bilayer membranes of amphiphilic lipids that adopt a well-organised structure that encapsulates a single internal aqueous phase that is the lumen, where protons accumulate from water splitting at the interface of photosystem II (PSII). This proton gradient force provides the energy for the ATP synthase to regenerate ATP. The electrons released from water splitting are transported by the quinone pool to the cytochrome b_6/f and the photosystem I (PSI), and finally to ferredoxin and ferredoxin $NADP^+$ reductase (FNR). This LEF occurs between spatially separated photosystems: PSII accumulates in thylakoids stacks or grana that are multilayer packing of thylakoids, Cyt b_6/f is more evenly distributed, whereas PSI accumulates in unstacked thylakoids lamellae together with ATP synthase [106]. It should be noted that in *C. reinhardtii*, the proportion of stacked over unstacked thylakoid membranes is much lower than that in higher plant, and the above-mentioned distribution can be balanced [17,107]. Continuous progress of tomographic and cryo-electron microscopy will improve to decipher the localisation of the photosystem constituents [17]. The organic interface of the bilayer membranes and the lumen are continuous phases all through the chloroplast, such that there is a unique boundary between the lumen and the stroma and a unique thermodynamic balance between the two aqueous phases. The thylakoid lamellae where NADPH and ATP are regenerated separate the chloroplast stroma in a series of microcompartments; in other words, they create boundaries within the chloroplast stroma [53]. How do NADPH and ATP distribute through the chloroplast stroma under these circumstances? The recent electron microscopy tomograms of *C. reinhardtii* cells revealed that the thylakoids are pierced by fenestrations (Fig. 3B) that enable the different microcompartments of the stroma to communicate. As a consequence, the stroma is also a continuous tangled phase in which proteins and metabolites can diffuse. The heterogeneity and complex 3D boundaries render molecular motions highly complex in the stroma, and these effects on protein and metabolites are discussed in the last paragraph of the manuscript.

Biosynthesis of thylakoid lipids and their supramolecular assembly

The thylakoid membranes should not be seen as rigid boundary, their assembly in bilayer membranes is

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

dictated by phase separation and this is highly dependent on temperature stress [108,109]. Furthermore, several molecular mechanisms involved in membrane-remodelling have been discovered, and the role of the lipid polar head and fatty acyl chain composition will be discussed below [110–113]. Membrane-associated protein can also play a role in membrane remodelling. For example, the molecular mechanism by which the protomers of IM30 protein (for Inner Membrane protein of 30 kDa) self-assemble to thylakoid membranes has been described using a range of biophysical technics such as atomic-force spectroscopy, SAXS and modelling [114]. Their association with the thylakoids results in the formation of a protective carpet and their intrinsically disordered C-terminal tail unfolds and promotes pore forming. The role of IDP in membrane protection and remodelling is another contribution to the 'ultrastructure'-function relationships.

The polar lipids present in the thylakoid membranes and the inner-chloroplast membrane of eukaryotic microalgae as well as those of cyanobacteria are mainly monogalactosyldiacylglycerols (MGDG), digalactosyldiacylglycerols (DGDG) and sulfoquinovosyldiacylglycerols (SQDG) and a small proportion of phosphatidylglycerol (PG). These represent 70–80% of the total lipids of eukaryotic microalgae that also possess other phospholipids in the extrachloroplastic membranes [115]. In the most studied microalga *C. reinhardtii*, betaine lipids such as diacylglyceryltrimethylhomo-Ser (DGTS) can act as substitute of phosphatidylcholine (PC). The acyl chains of galactolipids from eukaryotic microalgae and cyanobacteria usually differ from those of higher plants by their enrichment in polyunsaturated fatty acids (PUFA) such as α-linolenic acid (ALA, 18 : 3), the main fatty acid in *C. reinhardtii*, arachidonic acid (ARA; 20 : 4 n-6) and eicosapentaenoic acid (EPA; 20 : 5 n-3) found in *Nannochloropsis gaditana* [116] and *P. tricornutum* [117], docosahexaenoic acid (DHA; 22 : 6 n-3) found in *Schizochytrium limacinum* [118] or hexadecatetraenoic acid (16 : 4 n-3) found in *C. reinhardtii* [115]. Interestingly, lipid biosynthesis in eukaryotic photosynthetic microalgae results from molecular exchanges occurring between different cellular compartments [115,119]. A major part of fatty acid biosynthesis occurs in the stroma of the chloroplast through the action of the fatty acid synthase (FAS) complex on acetyl-CoA as the starting unit further converted in elongated acyl chains by sequential condensation of two-carbon units. Then, acyl chains bound to acyl carrier protein can either be incorporated into acylglycerolipids inside the chloroplast via the so-called 'prokaryotic' pathway or be exported outside the chloroplast to reach the 'eukaryotic' pathway in the endoplasmic reticulum (ER). Finally, their incorporation in acyl lipids is performed by various acyl transferases. Approximately 40% of fatty acids synthesised in chloroplasts enter the prokaryotic pathway, whereas 60% are exported to the eukaryotic pathway. About half of the exported fatty acids returns to the plastid after their desaturation in the ER and is used for the synthesis of the thylakoid membrane galactolipids by MGDG and DGDG synthases [120]. Desaturation of fatty acids is tightly linked with the location of the diacylglycerolipids in which they are incorporated and their transfer between the chloroplast envelope and the ER. These fatty acids result from a combination of elongation and desaturation reactions taking place either in the ER where the Δ6- or Δ5-the desaturase are located [121,122], or in the chloroplast where the Δ4 desaturase CrΔ4FAD [123] acts on MGDG to generate the 16 : 4 Δ4,7,10,13 PUFA, a predominant component of MGDG molecular species.

The polar head and fatty acid compositions of the acylglycerol lipids determine their supramolecular organisation [110–112]. While DGDGs are known to form lamellar phases (Lα) and induce bilayer formation, MGDGs tend to form inverted hexagonal phase (H_{II}) in aqueous solution [112]. Because of MGDG physicochemical properties, the formation of photosynthetic membrane bilayer *in vivo* raises questions about the role of this lipid in the organisation and functional properties of the chloroplast membranes [124]. It has been suggested that MGDG, which has a conical molecular shape due to its small head group, may help pack large protein complexes into biological membranes through lipid–protein interactions [113]. The molar ratio of MGDG over DGDG is known to adapt to stress conditions and to modulate the photosynthesis efficiency [125]. Conversely, fatty acid desaturation depends on the photosynthetic activity and the molecular composition of galactolipids varies according to the growth conditions. The high content of PUFAs in galactolipids contributes to the fluidity of membranes [109]. Lipidomics has provided a rich database of the lipid composition of photosynthetic membranes [126]. Critical physical and thermodynamic properties such as bilayer thickness, 2D motions of lipids, packing of the acyl chains, surface charge distribution and thylakoid membrane packing have been characterised using reconstituted galactolipid membranes and a range of methods such as microscopy, differential scanning calorimetry, solid-state NMR, fluorescence anisotropy, small-angle neutron and X-ray scattering, atomic force spectroscopy and molecular dynamics (reviewed here [109]).

The phase separations possibly occurring in these membranes have also been investigated by tensiometry,

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

ellipsometry and Langmuir–Blodgett transfer coupled to atomic force microscopy using biomimetic Langmuir monolayers [127]. Enzymes (lipases) interacting with monolayers were found to be preferentially adsorbed at the expanded/fluid lipid phases but compounds such as phytosterols and phospholipids inducing phase heterogeneity also favoured the adsorption of enzymes at the phase boundaries and towards the defects in condensed phases. Thus, the lipid composition of photosynthetic membranes affects both the structure of integral membrane proteins from photosystems and the binding of peripheral proteins.

Other chloroplast microcompartments

Another feature of the chloroplast lipids is that they constitute the boundaries of plastoglobules [54]. The function of these organic phase droplets encompassed by the external thylakoid membrane protuberance is still a matter of debate. It has been proposed that they serve as a reservoir for the maintenance of the protein/galactolipid ratio of the thylakoids, or that their organic phase enables the storage of organic metabolites produced in the chloroplast [36]. In *C. reinhardtii*, recent cryomicroscopy tomograms suggest that their proximity with the thylakoid stack is not obvious [17]. They share some similarities with the eyespots, which are also LDs that locate at the periphery of the chloroplast towards the light. The molecular composition of the plastoglobules and the eyespot is not clear, except that they are phase separated from the chloroplast stroma. They contain mainly prenylquinones and carotenoids and lower amounts of TAGs [128,129]. A protocol for their isolation has been proposed in 2022 that may lift a hurdle for their molecular characterisation [130].

One interesting perspective would be to consider the fact that many metabolites produced in the chloroplast in large quantities form natural deep eutectic solvents (NaDES). These mixtures characterised by a fusion point lower than those of their isolated components are liquid at physiological temperature and they present peculiar solvation properties [131–133]. This is the case for instance for Glucose : Fructose, Fructose : Sucrose, Glucose : Sucrose, Sucrose : Glucose : Fructose at molar ratio [133]. *In vitro* reconstitution of these mixtures studied by NMR showed that in the fluid phase, intermolecular transient contacts act as in liquid crystal to partially order the molecule orientation whilst offering a high fluidity. Chemists have described the good solvation properties of synthetic DES and NaDES for poorly soluble molecules [134,135].

Carbon and energy storage: starch granules and lipid droplets

In the chloroplast, the main carbon storage components are large polysaccharide condensates in the form of a highly organised semicrystalline fraction: the starch or chrysolaminarin granules. These are ordered polymers of polysaccharide where glucose subunits are predominantly linked by α-(1 → 4)-D glycosidic bonds with α-(1 → 6) branches for starch and by β(1 → 3) and β(1 → 6) branches in chrysolaminarin. The starch granules result from a complex organisation of semicrystalline and amorphous concentric layers surrounding an amorphous hilum, and different models have been proposed for their assemblies [27–29]. Contrary to glycogen that is water-soluble and occurs as nanoparticles of limited diameter, the starch/chrysolaminarin molecules can have in principle unlimited size [136]. In the green lineage, starch biogenesis is located in the chloroplast, whereas in the red lineage such as in diatoms, chrysolaminarin synthesis occurs in the vacuole, another membrane-bound microcompartment of the cytosol [137]. The understanding of gluconeogenesis or glycolysis is mainly achieved via genetic studies [138], and recent biophysical tools are being used to explore the molecular structure of this large ordered semicrystalline condensate [139].

The gluconeogenesis *vs* glycolysis equilibrium is dependent on the availability of the energy source, primarily ATP and NAD(P)H, and the several regulation pathways involve exchange through the several microcompartments within the stroma discussed above, but also exchange in and out of the chloroplast in eukaryotic algae. This will be discussed in the next section.

Another form of carbon storage compartment much studied in microalgae is the LD. This is the most effective form of energy storage with 9 $kcal \cdot g^{-1}$ for fatty acid and derived acylglycerolipids against 4 $kcal \cdot g^{-1}$ for carbohydrates. The most common type of LD presents a hydrophobic core made of TAG and surrounded by a lipoproteic monolayer. *Chlamydomonas reinhardtii* LDs contain 95% TAGs, 1–5% polar lipids and 1–5% proteins [140]. The polar lipid monolayer surrounding the LDs contains a specific set of polar lipids including DGTS, SQDG, DGDG and MGDG with relative amounts depending on culture conditions (light level, nitrogen depletion) [141]. Also at the monolayer, LD proteomics has revealed the presence of enzymes involved in several subcellular mechanisms, including lipid synthesis, degradation, trafficking, signalling and lipid homeostasis. For example, in *C. reinhardtii*, LD proteomics has shown that around 30 proteins involved in lipid metabolism were present,

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

including the betaine lipid synthase (BTA1), a lysophosphatidic acid acyltransferase (LPAT), a putative long chain acyl-CoA synthetase (LACS), a diacylglycerol acyltransferase (DGAT), a major LD protein (MLDP) of unknown function, the phosphatidylethanolamine-binding DTH1 (DELAYED IN TAG HYDROLYSIS1), two lipases and two enzymes involved in fatty acid β-oxidation [141–143]. This has led to the classification of LDs as new cellular organelles [30].

Triacylglycerol biogenesis regulation is complex, and often triggered by stress conditions such as heat or nutriments depletion (e.g. nitrogen) [26,126]. In *C. reinhardtii*, TAG biosynthesis is thought to mainly occur in the cytosol through the same enzymatic steps as in plants [144], and it requires the transfer to the cytosol of the acyl chains initially synthesised in the chloroplast. Galactolipids also appear as the main backbone in which *de novo*–synthesised fatty acids are incorporated before they enter into TAG synthesis. In *C. reinhardtii*, a galactolipase, named plastid galactoglycerolipid degradation 1 (PGD1), was identified as a key player in lipid remodelling following nitrogen deprivation. The galactolipase activity of PGD1 allows the flux of fatty acids from plastid lipids to TAGs in which they are re-esterified to form LDs [145]. It remains however unclear whether the final step of TAG synthesis from diacylglycerol (DAG) also occurs inside the chloroplast. Indeed, some TAG-synthesising enzymes such as DGAT1 and phosphoglycerol acyltransferase (PDAT) were found in the chloroplast [146]. Also, data from microscopy studies have showed that some LDs can be present inside the chloroplast, as well as in the cytosol in close association with the chloroplast envelope [146,147]. In the chloroplast, LD are referred to as plastoglobules, and we have seen above in ATP and reducing power generation section. that these contain TAG. Lipid droplet synthesis can yet be another function of these enigmatic microcompartments. We have also seen previously in ATP and reducing power generation section. that polar lipids from membranes can serve as a source of recycled acyl chains for TAG synthesis, besides *de novo* fatty acid synthesis.

The study of LD biogenesis and composition is typically investigated using timely resolved culture sampling and lipid extraction combined with genetic modification [126]. Nevertheless, these technics require cellular disruption before isolation of LDs and lipid extraction. These steps can generate side reactions such as lipid hydrolysis/degradation due to their mixing with lipolytic enzymes initially present in other cell compartments, and binding to LDs of amphiphilic proteins that are normally not interacting with LDs. There is therefore a need for other methods allowing the identification and structural characterisation of lipids and proteins within the cell. One common approach is the expression of green fluorescent protein (GFP)-fused protein to localise the protein using fluorescence confocal microscopy and confirm whether it is effectively bound to LDs *in cellula*. Regarding lipids, an emerging methodology using NMR allowed to investigate the accumulation of TAG in the microalga *N. gaditana* [148]. This nondestructive approach allows real-time analysis of lipids in the living algae, without the need of lipid extraction and separation. As discussed above for protein-NMR, NMR can provide information on the chemistry of lipids such as TAG, but also on the physicochemical properties of their supramolecular organisation. For example, the dynamics of LD formation (size changes) in *P. tricornutum*, as well as the lipid-motion within the cells, were monitored by pulse field gradient nuclear magnetic resonance [149].

The two main forms of carbon storage are antagonistic and correlated. In *C. reinhardtii*, as in other species, fatty acid degradation takes place in the peroxisome, that are small organelles in the cytosol, via β-oxidation [150]. The generated acetyl-CoA can be further converted to carbohydrates serving as building blocks or cellular energy through respiration in the mitochondria. This pathway requires a close connexion between LDs and peroxisome to enable the transfer of the fatty acid released from LDs' TAG by lipases. Also, this pathway is linked to the global energetic balance within the cell that implies exchange between organelles.

Exchange of metabolites across the boundaries of organelles

We discussed above the apparent energy unbalance between the production by the LEF (ATP/NADPH ratio of 1.3) and the consumption by CO_2 uptake and the CBB cycle (ATP/NADPH ratio of 2.6). Many other metabolic pathways have been described that modulate the ATP/NADPH ratio, which will not be described here (for review refer to [105]). In eukaryotic algae, the energetic balance occurs between the chloroplast, the mitochondria and the cytosol. Organelle membranes are impermeable to NAD(P)H, and various transporters have been identified together with malate and oxaloacetate transporters [151]. Malate conversion to oxaloacetate by malate dehydrogenase generates reducing power; thus, it is established that the malate/oxaloacetate shuttle through the different cellular compartments is a key factor for their

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

energetic balance. Malate dehydrogenases are located in the chloroplast, in peroxisome (also named glyoxysomes in *C. reinhardtii* [152]), in the cytoplasm and in the mitochondria. Various other transporters also contribute to the maintenance of the metabolic flux, such inorganic phosphate, ammonium and nitrate/nitrite transporters [153]. Bicarbonate transporters have been discussed above in Pyrenoid and carboxysome section. Also concerning the carbon flux, several sugar transporters are present with specialised functions. For example, the triose phosphate transporter 3 has been described as being essential for the metabolic balance and the export of photosynthetic fixed carbon in green algae [154].

The case of diatoms is more complex because of their evolutionary origin, their chloroplast is surrounded by four membranes. Metabolic exchange between the mitochondria and the chloroplast involves direct exchange between the two organelles through their membranes [19,155]. Membranes of intra- and extracellular vesicles have also been identified as shuttles for transferring information, function and metabolites from cellular compartments and the endosomal trafficking system to other cells and tissues. Still concerning lipids, LDs have been shown to interact with other organelles such as the peroxisomes, the nucleus, the mitochondria and involved in metabolite trafficking [140,150].

Metabolic exchange across organelles is also an example of how the existence of microcompartment modulates the metabolism. To fully understand the energetic balance within the cell, one would like to be able to follow the fate of a metabolite from its synthesis to its conversion. Whilst this challenge remains unrealistic at the single molecule level, progress in fluxomic methods provides precious data to improve the current models [156,157]. Fluxomic or 'flux-metabolomics' enable to characterise the metabolic pathway downstream of an isotopically labelled metabolite using mass spectrometry or NMR. Mass spectrometry enables the characterisation of a high number of metabolites on a wide concentration range and thus provides a huge metabolic flux database [158]. Nuclear magnetic resonance has suffered for some time from a lower sensitivity, but it provides the advantage of being nondestructive, as opposed to mass spectrometry, and is not dependent on extraction using different solvents [159,160]. As discussed above for the on-flow monitoring of TAG accumulation, *in-situ* NMR can also be used to monitor the fate of specific metabolites [161–163].

The boundaries of the different microcompartments are where metabolite exchange occurs at their interfaces. These boundaries are usually biological membranes where receptors and transporters are present in the form of integral membrane proteins, as well as peripheral proteins that bind to the membrane upon fulfilling their task as molecular shuttle or enzymes. In LDs, the monolayer surrounding the hydrophobic core also contains functional enzymes and structural proteins, such as MLDP in *C. reinhardtii*, that control the biogenesis and fate of these organelles. Such interfaces have been extensively studied in the case of LDs/emulsions dispersed in an aqueous phase [164–167]. The concepts of phase separation, interfacial tension, adsorption and partitioning occurring at the lipid-water interface are well-defined. Interfacial tension, or surface pressure, for instance, has an impact on protein and metabolite adsorption and penetration at the interface, enzyme activity, as well as on protein folding and stability [168,169]. The surface of polysaccharide granules also contains starch granule-associated proteins that are often starch synthetic enzymes but can have other functions such as modulating the overall properties of the semicrystalline phase [170,171]. The membrane-less organelles formed by LLPS create a novel type of interface between distinct phases. Intracellular phase separation differs however from demixing of oil and water, because the compounds involved in LLPS (proteins, nucleic acids, amino acids, sugars and other small metabolites) are water soluble and the condensates they form are hydrated. The interface delimiting two aqueous phases formed by LLPS should also be considered. Some proteins and other compounds are specifically localised at this interface, where they might impact physicochemical properties (surface tension and surface potential). For example, Starch Granules Abnormal 1 and 2 proteins localise in the pyrenoid in small puncta and are responsible for the association of starch granules at the periphery of the LLPS [172]. Deletion of this protein results in the modification of the volume/surface ratio of the LLPS and induces the formation of several pyrenoid condensates. Strikingly, hyperoxia is also a condition where no starch granules surround pyrenoid, but the number of pyrenoid fraction is not modified [48]. There is limited understanding of the quantitative laws governing solute partitioning into LLPS and adsorption at their interface. Experimental evidence of solute/metabolite partitioning between microcompartments and membranes is also missing [18]. In that context, diffusion-ordered NMR spectroscopy and estimation of diffusion coefficient can provide information on molecules simultaneously present in distinct phases within the cell [73,76,149,173].

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Molecular consequences of the composition of the microcompartments

As discussed above, within a photosynthetic cell, many microcompartments derived from phase separation are currently being described at the physicochemical level: the pyrenoid, the thylakoids bilayer membranes that separate two phases: the lumen and the stroma, the LDs, the semicrystalline starch or chrysolaminarin granules, and others that remain more enigmatic such as the plastoglobules or the eyespots. For long, biochemists considered only two phases in cells: the aqueous phase of cytoplasm and organelles and the hydrophobic environment formed by membrane mono or bilayers. The gradual recognition of subcellular environments with distinct or nonaqueous phase has drastically changed the representation of the cell and its functional compartments. Intracellular LD for instance became considered as organelles and not just energy storage aggregates when proteomics revealed the presence of specific proteins and enzymes, and therefore specific functions, on their surface [30]. The more recent identification of intracellular and intraorganellar LLPS mediated by protein–protein or protein–ribonucleic acid transient contacts opened new perspectives. The import of CO_2 is a telling example. CO_2 solubility is poor in water and suffers from hydration equilibrium that is pH dependent. On the contrary, CO_2 solubility increases in organic phases where ionisation and pH are not relevant. The pyrenoid is an aqueous phase, but dense protein packing could modulate CO_2 solvation properties. Indeed, in the *A. thaliana* AP2C3 LLPS, CO_2 molecules contribute to the molecular packing at the origin of the condensation [67]. Metabolite solubility across these different phases is very likely variable [174]. Chemists have been using phase transfer catalysis for decades. Could phase-transfer catalysis also contribute to regulate the carbon metabolism within microalgae? What are the respective solubilities of CO_2, sugar phosphate, glyceric acid, carbohydrate or fatty acids in the different microcompartments mentioned above?

One can also consider the effect of these different phases on the actors of the carbon cycle: the proteins. Most structures of globular enzymes have been solved when the proteins were in crystal phase, and this most likely represents their in-cell overall structure. Nevertheless, the high molecular crowding with large proteins reduces the available space for macromolecules of the same size, this phenomenon is known as excluded volume [175,176]. Excluded volume results in restricted molecular diffusion (viscosity) and is likely to significantly alter the mobility of proteins. Excluded volume effects were also predicted to have a larger impact on IDP than on globular proteins [177]. The conformational ensemble that adopts an IDP in a dilute phase samples large conformations among others, as demonstrated by their large hydrodynamic radius compared with globular proteins of the same molecular mass [178]. In a crowded environment, these extended conformations may be unfavoured because of the excluded volume effect [177]. Several studies on the effect of molecular crowding on IDPs, either *in vitro* using macromolecular crowders (polyethylene glycol, ficoll, dextran, globular proteins) or in cellular environments (*in vivo* or in cell extracts) suggest that this phenomenon is very complex and each IDP or IDR will behave specifically, depending also on the crowding conditions: While a majority of IDPs will keep their disordered properties in a crowded environment, some of them will partially fold, completely fold, or even sometimes become more disordered [179]. The cell is a complex medium and natural molecular crowding results also favours interactions between molecules, likely to modify the affinity of IDPs with their partners. We have highlighted above several examples of IDP that are key regulators for the condensation of several phases: EPYC1, CsoS2 and IM30. In these condensed phases, the concentration of the IDPs can be very high and they can be considered as self-crowders. Recent studies on several such IDPs looking for hypothetical conformational changes upon phase separation suggest that they generally retain their disordered nature, but their dynamics and mobility are slowed down [70–75,77,78]. Key components of the cell may influence these crowding effects and the dynamics of these phase transitions, as ATP, which has been shown when it is highly concentrated in the cell to enhance the solubility of proteins, and thus to act as a crowd controller [179]. Because each compartment has variable constituents, the nature of the molecular crowding is not homogeneous within the cell, the excluded volumes also, and the conformational sampling of dynamic protein is probably specific for each localisation. Besides, the molecular diversity is also restricted in biocondensates that encompass only specific proteins and/or metabolites. Intrinsically disordered proteins have the particularity of interacting with many partners, and compartmentalisation will reduce the presence of several partners to specific localisations [175,176].

These considerations have driven scientists to perform *in cellula* structural investigations of IDPs, and again NMR has proven to be a suitable method. A very complete review of in cell structural investigation

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

by NMR can be found here [20], and this is a fast expanding field. An attempt to investigate the structural properties of a plant protein within a cell was limited by the requirement of selective isotopic labelling of the target protein against a 'NMR-invisible' background [180]. A first approach is to use total cell lysate that encompasses all the molecular components reorganised by sonication or high pressure to expose them to the isotopically labelled protein [93]. This, however, will not allow to investigate the specificities of distinct microcompartments, which, in contrast, could be approached by the use of purified compartments (purified pyrenoid, purified plastoglobules) or *in vitro* reconstituted LLPS.

Conclusions

In cyanobacteria and in eukaryotic microalgae, carbon acquisition, assimilation and storage involve various metabolic routes that spread across various cellular microcompartments. CO_2 is the substrate of RuBisCO that is located in the carboxysome, a semicrystalline microcompartment in cyanobacteria, or in the chloroplast stroma or in the pyrenoid, a LLPS biocondensate, in eukaryotic microalgae. The existence of distinct microcompartments with distinct pH ranging from 6.9 (lumen) to 7.9 (cytosol, stroma, pyrenoid) separated by boundaries permeable for CO_2 but not HCO_3^- (thylakoids), and the presence of CA in each aqueous phase enable the concentration of CO_2 at the vicinity of RuBisCO. The condensation of RuBisCO is also triggered under high O_2 conditions. What is the diffusion of second RuBisCO substrate and the RuBisCO product in and out of these biocondensates? What is RuBisCO catalytic constant in these highly crowded liquid phase? Separated liquid–liquid phases are a fascinating example of supramolecular organisations that can modulate the physiology of a cell. Following the well-studied case of RuBisCO and its substrates, the existence of other distinct supramolecular organisations can be considered. How do enzymes of the CBB cycle organise to optimise both metabolic flux and substrate availability? Several megacomplexes have been proposed in the literature, but are lacking high-resolution structural characterisation. The putative low affinity for these complexes could explain why their reconstitution is challenging. One can also hypothesise the existence of linker proteins that remain to be identified, as this is the case for CP12 that is the linker for the GAPDH-CP12-PRK complex.

CP12 is a conditionally disordered protein with multiple functions but no catalytic activity [12]. A high number of proteins that belong to the IDP family such as CP12 play a role in the microcompartmentalisation of the cells. They can be scaffold for LLPS demixing (e.g. EPYC1 and CsoS2); sensors to induce the formation of these microcompartments (e.g. AP2C2); or they can contribute to the remodelling of thylakoid membranes (e.g. IM30). Their malleability enables them to adapt to many different phases and interphases that have different physicochemical properties. However, the lack of catalytic activities and their atypical physicochemical properties renders them difficult to identify, and it is likely that more IDPs will be identified in future thanks to advanced omics approaches.

The location of photosynthetic enzymes in a specific organelle, the chloroplast, is known since the middle of the nineteenth century [181,182], and the advantage of physical barriers to confine the toxic O_2 photosynthetic product has been well described. Beyond the membrane-delimited organelles such as the chloroplasts, thylakoid lumen, vacuole, peroxisome, mitochondria or plastoglobules, other intracellular biocondensates such as the pyrenoids or LDs are now emerging. They are not delimited by a lipid bilayer but demix spontaneously due to their chemical composition. Lipid droplets demix because of their lipophilic components and hydrophobic interactions. Protein-rich LLPS demix because of electrostatic interactions and hydrogen bonds. Phase separation, in which solutes self-aggregate but remain in a liquid condensed state, is named coacervation [183]. The biologists' interest for this phenomenon has increased after coacervation was found to occur in cells [32,33], but it has been proposed as one supramolecular organisation as early as the beginning of the twentieth century [184]. Indeed, Oparin hypothesised that life could have emerged under the form of spontaneous coacervates before the occurrence of long amphiphilic lipids [184,185]. Strikingly, we now know that fatty acid synthesis and desaturation involve multiple exchanges in and out of microcompartments of the chloroplast and out of the chloroplast: ER, peroxisomes, mitochondria.

Investigating the structure and function of proteins in such environments is challenging, but it will certainly reveal a novel and better understanding of biological reactions and metabolic pathways. Recent advances in microscopy and spectroscopic methods, and the opportunity to perform molecular scale analysis on living cell by *in-vivo* fluorescent and in-cell spectroscopic methods such as NMR and EPR [20,186] have opened new perspectives. Nuclear magnetic resonance spectroscopy and its various applications appear as the most powerful biophysical methods to investigate *in cellula* and in biomimetic media the structure–

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

function and ultrastructure–function relationships of enzymes and their cofactors coupled to reaction kinetics and metabolite monitoring. These are exciting objectives that drive research projects in this field.

Acknowledgements

HL thanks the FEBS Excellence award. Financial support from the CNRS, Aix Marseille University, the French Agence Nationale de la Recherche ANR-22-CE44-0031-01 and ANR-21-CE20-0029 is acknowledged. The authors thank the administrative support of the BIP laboratory, the Institut de Microbiology de la Méditerranée (IMM) and the Institute Microbiology Bioénergies et Biotechnologies (IM2B): Isabelle Pinet, Aurelia Bimbi, Julia Fargeot, Agnes Kammoun, Agnès Duclot.

References

Recent work in several fields of science has identified a bias in citation practices such that papers from women and other minority scholars are under-cited relative to the number of such papers in the field [187]. Our list of authors is thus, as many, not representative of the diversity of respected scholars in the fields.

1 Le Moigne T, Boisset ND, de Carpentier F, Crozet P, Danon A, Henri J, Marchand CH, Lemaire SD and Johnson X (2023) Chapter 8 – Photoproduction of reducing power and the Calvin-Benson cycle. In The Chlamydomonas Sourcebook (Grossman AR and Wollman F-A, eds), 3rd edn, pp. 273–315. Academic Press, London.
2 Buchanan BB and Balmer Y (2005) REDOX REGULATION: a broadening horizon. *Annu Rev Plant Biol* **56**, 187–220.
3 Jensen E, Clément R, Maberly SC and Gontero B (2017) Regulation of the Calvin-Benson-Bassham cycle in the enigmatic diatoms: biochemical and evolutionary variations on an original theme. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci* **372**, 20160401.
4 Launay H, Huang W, Maberly SC and Gontero B (2020) Regulation of carbon metabolism by environmental conditions: a perspective from diatoms and other chromalveolates. *Front Plant Sci* **11**, 1033.
5 Zimmer D, Swart C, Graf A, Arrivault S, Tillich M, Proost S, Nikoloski Z, Stitt M, Bock R, Mühlhaus T *et al.* (2021) Topology of the redox network during induction of photosynthesis as revealed by time-resolved proteomics in tobacco. *Sci Adv* **7**, eabi8307.
6 Michelet L, Zaffagnini M, Morisse S, Sparla F, Pérez-Pérez ME, Francia F, Danon A, Marchand CH, Fermani S, Trost P *et al.* (2013) Redox regulation of the Calvin-Benson cycle: something old, something new. *Front Plant Sci* **4**, 470.
7 Stec B (2012) Structural mechanism of RuBisCO activation by carbamylation of the active site lysine. *Proc Natl Acad Sci USA* **109**, 18785–18790.
8 Gütle DD, Roret T, Müller SJ, Couturier J, Lemaire SD, Hecker A, Dhalleine T, Buchanan BB, Reski R, Einsle O *et al.* (2016) Chloroplast FBPase and SBPase are thioredoxin-linked enzymes with similar architecture but different evolutionary histories. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**, 6779–6784.
9 Gurrieri L, Del Giudice A, Demitri N, Falini G, Pavel NV, Zaffagnini M, Polentarutti M, Crozet P, Marchand CH, Henri J *et al.* (2019) *Arabidopsis* and *Chlamydomonas* phosphoribulokinase crystal structures complete the redox structural proteome of the Calvin-Benson cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**, 8048–8053.
10 Gontero B, Meunier J-C, Buc J and Ricard J (1984) The 'slow' pH-induced conformational transition of chloroplast fructose 1,6-bisphosphatase and the control of the Calvin cycle. *Eur J Biochem* **145**, 485–488.
11 Launay H, Receveur-Bréchot V, Carrière F and Gontero B (2019) Orchestration of algal metabolism by protein disorder. *Arch Biochem Biophys* **672**, 108070.
12 Gérard C, Carrière F, Receveur-Bréchot V, Launay H and Gontero B (2022) A trajectory of discovery: metabolic regulation by the conditionally disordered chloroplast protein, CP12. *Biomolecules* **12**, 1047.
13 Gontero B, Cárdenas ML and Ricard J (1988) A functional five-enzyme complex of chloroplasts involved in the Calvin cycle. *Eur J Biochem* **173**, 437–443.
14 Graciet E, Lebreton S and Gontero B (2004) Emergence of new regulatory mechanisms in the Benson-Calvin pathway via protein-protein interactions: a glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/CP12/phosphoribulokinase complex. *J Exp Bot* **55**, 1245–1254.
15 Agarwal R, Ortleb S, Sainis JK and Melzer M (2009) Immunoelectron microscopy for locating Calvin cycle enzymes in the thylakoids of *Synechocystis 6803*. *Mol Plant* **2**, 32–42.
16 Wang L, Patena W, Baalen KAV, Xie Y, Singer ER, Gavrilenko S, Warren-Williams M, Han L, Harrigan HR, Hartz LD *et al.* (2023) A chloroplast protein atlas reveals punctate structures and spatial organization of biosynthetic pathways. *Cell* **186**, 3499–3518.e14.
17 Engel BD, Schaffer M, Kuhn Cuellar L, Villa E, Plitzko JM and Baumeister W (2015) Native architecture of the *Chlamydomonas* chloroplast revealed by in situ cryo-electron tomography. *Elife* **4**, e04889.
18 Küken A, Sommer F, Yaneva-Roder L, Mackinder LC, Höhne M, Geimer S, Jonikas MC, Schroda M,

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

Stitt M, Nikoloski Z *et al.* (2018) Effects of microcompartmentation on flux distribution and metabolic pools in *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *Elife* **7**, e37960.
19 Uwizeye C, Decelle J, Jouneau P-H, Flori S, Gallet B, Keck J-B, Bo DD, Moriscot C, Seydoux C, Chevalier F *et al.* (2021) Morphological bases of phytoplankton energy management and physiological responses unveiled by 3D subcellular imaging. *Nat Commun* **12**, 1049.
20 Theillet F-X and Luchinat E (2022) In-cell NMR: why and how? *Prog Nucl Magn Reson Spectrosc* **132–133**, 1–112.
21 Taylor MJ, Lukowski JK and Anderton CR (2021) Spatially resolved mass spectrometry at the single cell: recent innovations in proteomics and metabolomics. *J Am Soc Mass Spectrom* **32**, 872–894.
22 Gruber A, Weber T, Bártulos CR, Vugrinec S and Kroth PG (2009) Intracellular distribution of the reductive and oxidative pentose phosphate pathways in two diatoms. *J Basic Microbiol* **49**, 58–72.
23 Cenci U, Chabi M, Ducatez M, Tirtiaux C, Nirmal-Raj J, Utsumi Y, Kobayashi D, Sasaki S, Suzuki E, Nakamura Y *et al.* (2013) Convergent evolution of polysaccharide debranching defines a common mechanism for starch accumulation in cyanobacteria and plants. *Plant Cell* **25**, 3961–3975.
24 Wilhelm C, Büchel C, Fisahn J, Goss R, Jakob T, LaRoche J, Lavaud J, Lohr M, Riebesell U, Stehfest K *et al.* (2006) The regulation of carbon and nutrient assimilation in diatoms is significantly different from green algae. *Protist* **157**, 91–124.
25 Allan GG, Lewin J and Johnson PG (1972) Marine polymers. IV diatom polysaccharides. *Botanica Marina* **15**, 102–108.
26 Li-Beisson Y and Carrière F (2020) Biogenesis and fate of lipid droplets. *Biochimie* **169**, 1–2.
27 Buléon A, Colonna P, Planchot V and Ball S (1998) Starch granules: structure and biosynthesis. *Int J Biol Macromol* **23**, 85–112.
28 Pérez S and Bertoft E (2010) The molecular structures of starch components and their contribution to the architecture of starch granules: a comprehensive review. *Starke* **62**, 389–420.
29 Tetlow IJ and Bertoft E (2020) A review of starch biosynthesis in relation to the building block-backbone model. *Int J Mol Sci* **21**, 7011.
30 Cohen S (2018) Lipid droplets as organelles. *Int Rev Cell Mol Biol* **337**, 83–110.
31 Banani SF, Lee HO, Hyman AA and Rosen MK (2017) Biomolecular condensates: organizers of cellular biochemistry. *Nat Rev Mol Cell Biol* **18**, 285–298.
32 Spruijt E (2023) Open questions on liquid–liquid phase separation. *Commun Chem* **6**, 1–5.
33 Boeynaems S, Alberti S, Fawzi NL, Mittag T, Polymenidou M, Rousseau F, Schymkowitz J, Shorter J, Wolozin B, Van Den Bosch L *et al.* (2018) Protein phase separation: a new phase in cell biology. *Trends Cell Biol* **28**, 420–435.
34 Cable J, Brangwynne C, Seydoux G, Cowburn D, Pappu RV, Castañeda CA, Berchowitz LE, Chen Z, Jonikas M, Dernburg A *et al.* (2019) Phase separation in biology and disease-a symposium report. *Ann N Y Acad Sci* **1452**, 3–11.
35 Rae BD, Long BM, Badger MR and Price GD (2013) Functions, compositions, and evolution of the two types of carboxysomes: polyhedral microcompartments that facilitate CO_2 fixation in cyanobacteria and some proteobacteria. *Microbiol Mol Biol Rev* **77**, 357–379.
36 van Wijk KJ and Kessler F (2017) Plastoglobuli: plastid microcompartments with integrated functions in metabolism, plastid developmental transitions, and environmental adaptation. *Annu Rev Plant Biol* **68**, 253–289.
37 Arzac MI, Fernández-Marín B and García-Plazaola JI (2022) More than just lipid balls: quantitative analysis of plastoglobule attributes and their stress-related responses. *Planta* **255**, 62.
38 Austin JR, Frost E, Vidi P-A, Kessler F and Staehelin LA (2006) Plastoglobules are lipoprotein subcompartments of the chloroplast that are permanently coupled to thylakoid membranes and contain biosynthetic enzymes. *Plant Cell* **18**, 1693–1703.
39 Tabita FR, Satagopan S, Hanson TE, Kreel NE and Scott SS (2008) Distinct form I, II, III, and IV Rubisco proteins from the three kingdoms of life provide clues about Rubisco evolution and structure/function relationships. *J Exp Bot* **59**, 1515–1524.
40 Andersson I, Knight S, Schneider G, Lindqvist Y, Lundqvist T, Brändén C-I and Lorimer GH (1989) Crystal structure of the active site of ribulose-bisphosphate carboxylase. *Nature* **337**, 229–234.
41 Gontero B and Maberly SC (2022) Biochemical carbon dioxide concentrating mechanisms. In Blue Planet, Red and Green Photosynthesis (Maberly S and Gontero B, eds), pp. 133–166. ISTE, London.
42 Stotz M, Mueller-Cajar O, Ciniawsky S, Wendler P, Hartl FU, Bracher A and Hayer-Hartl M (2011) Structure of green-type RuBisCO activase from tobacco. *Nat Struct Mol Biol* **18**, 1366–1370.
43 Mueller-Cajar O, Stotz M, Wendler P, Hartl FU, Bracher A and Hayer-Hartl M (2011) Structure and function of the AAA+ protein CbbX, a red-type RuBisCO activase. *Nature* **479**, 194–199.
44 Meyer MT, Whittaker C and Griffiths H (2017) The algal pyrenoid: key unanswered questions. *J Exp Bot* **68**, 3739–3749.
45 Meyer M and Griffiths H (2013) Origins and diversity of eukaryotic CO_2-concentrating mechanisms: lessons for the future. *J Exp Bot* **64**, 769–786.

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

46 Meyer MT (2022) Rubisco microcompartments: the function of carboxysomes and pyrenoids in aquatic CO_2. In Blue Planet, Red and Green Photosynthesis (Maberly S and Gontero B, eds), ISTE, London.

47 Ramazanov Z, Rawat M, Henk MC, Mason CB, Matthews SW and Moroney JV (1994) The induction of the CO_2-concentrating mechanism is correlated with the formation of the starch sheath around the pyrenoid of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Planta* **195**, 210–216.

48 Neofotis P, Temple J, Tessmer OL, Bibik J, Norris N, Pollner E, Lucker B, Weraduwage SM, Withrow A, Sears B *et al*. (2021) The induction of pyrenoid synthesis by hyperoxia and its implications for the natural diversity of photosynthetic responses in *Chlamydomonas*. *Elife* **10**, e67565.

49 He S, Chou H-T, Matthies D, Wunder T, Meyer MT, Atkinson N, Martinez-Sanchez A, Jeffrey PD, Port SA, Patena W *et al*. (2020) The structural basis of RuBisCO phase separation in the pyrenoid. *Nat Plants* **6**, 1480–1490.

50 Meyer MT, Itakura AK, Patena W, Wang L, He S, Emrich-Mills T, Lau CS, Yates G, Mackinder LCM and Jonikas MC (2020) Assembly of the algal CO_2-fixing organelle, the pyrenoid, is guided by a Rubisco-binding motif. *Science*. *Advances* **6**, eabd2408.

51 Wunder T, Cheng SLH, Lai S-K, Li H-Y and Mueller-Cajar O (2018) The phase separation underlying the pyrenoid-based microalgal RuBisCO supercharger. *Nat Commun* **9**, 5076.

52 Freeman Rosenzweig ES, Xu B, Kuhn Cuellar L, Martinez-Sanchez A, Schaffer M, Strauss M, Cartwright HN, Ronceray P, Plitzko JM, Förster F *et al*. (2017) The eukaryotic CO_2-concentrating organelle is liquid-like and exhibits dynamic reorganization. *Cell* **171**, 148–162.e19.

53 Kirchhoff H (2019) Chloroplast ultrastructure in plants. *New Phytol* **223**, 565–574.

54 Shanmugabalaji V, Zita W, Collombat J and Kessler F (2022) Chapter three – plastoglobules: a hub of lipid metabolism in the chloroplast. In Advances in Botanical Research (Rébeillé F and Maréchal E, eds), pp. 91–119. Academic Press, Cambridge, MA.

55 Boeynaems S, Chong S, Gsponer J, Holt L, Milovanovic D, Mitrea DM, Mueller-Cajar O, Portz B, Reilly JF, Reinkemeier CD *et al*. (2023) Phase separation in biology and disease; current perspectives and open questions. *J Mol Biol* **435**, 167971.

56 Bar-On YM and Milo R (2019) The global mass and average rate of RuBisCO. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**, 4738–4743.

57 Fei C, Wilson AT, Mangan NM, Wingreen NS and Jonikas MC (2022) Modelling the pyrenoid-based CO_2-concentrating mechanism provides insights into its operating principles and a roadmap for its engineering into crops. *Nat Plants* **8**, 583–595.

58 Giordano M, Beardall J and Raven JA (2005) CO_2 concentrating mechanisms in algae: mechanisms, environmental modulation, and evolution. *Annu Rev Plant Biol* **56**, 99–131.

59 Huang W, Han S, Jiang H, Gu S, Li W, Gontero B and Maberly SC (2020) External α-carbonic anhydrase and solute carrier 4 are required for bicarbonate uptake in a freshwater angiosperm. *J Exp Bot* **71**, 6004–6014.

60 Long BM, Badger MR, Whitney SM and Price GD (2007) Analysis of carboxysomes from *Synechococcus* PCC7942 reveals multiple Rubisco complexes with carboxysomal proteins CcmM and CcaA. *J Biol Chem* **282**, 29323–29335.

61 Wang H, Yan X, Aigner H, Bracher A, Nguyen ND, Hee WY, Long BM, Price GD, Hartl FU and Hayer-Hartl M (2019) RuBisCO condensate formation by CcmM in β-carboxysome biogenesis. *Nature* **566**, 131–135.

62 Zang K, Wang H, Hartl FU and Hayer-Hartl M (2021) Scaffolding protein CcmM directs multiprotein phase separation in β-carboxysome biogenesis. *Nat Struct Mol Biol* **28**, 909–922.

63 Oltrogge LM, Chaijarasphong T, Chen AW, Bolin ER, Marqusee S and Savage DF (2020) Multivalent interactions between CsoS2 and RuBisCO mediate α-carboxysome formation. *Nat Struct Mol Biol* **27**, 281–287.

64 Cameron JC, Wilson SC, Bernstein SL and Kerfeld CA (2013) Biogenesis of a bacterial organelle: the carboxysome assembly pathway. *Cell* **155**, 1131–1140.

65 Mackinder LCM, Chen C, Leib RD, Patena W, Blum SR, Rodman M, Ramundo S, Adams CM and Jonikas MC (2017) A spatial interactome reveals the protein organization of the algal CO_2-concentrating mechanism. *Cell* **171**, 133–147.e14.

66 Mackinder LCM, Meyer MT, Mettler-Altmann T, Chen VK, Mitchell MC, Caspari O, Freeman Rosenzweig ES, Pallesen L, Reeves G, Itakura A *et al*. (2016) A repeat protein links RuBisCO to form the eukaryotic carbon-concentrating organelle. *Proc Natl Acad Sci USA* **113**, 5958–5963.

67 Zhang M, Zhu C, Duan Y, Liu T, Liu H, Su C and Lu Y (2022) The intrinsically disordered region from PP2C phosphatases functions as a conserved CO_2 sensor. *Nat Cell Biol* **24**, 1029–1037.

68 Harrison RES, Weng K, Wang Y and Peng Q (2021) Phase separation and histone epigenetics in genome regulation. *Curr Opin Solid State Mater Sci* **25**, 100892.

69 Kuznetsova IM, Zaslavsky BY, Breydo L, Turoverov KK and Uversky VN (2015) Beyond the excluded volume effects: mechanistic complexity of the crowded milieu. *Molecules* **20**, 1377–1409.

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

70 Murthy AC, Dignon GL, Kan Y, Zerze GH, Parekh SH, Mittal J and Fawzi NL (2019) Molecular interactions underlying liquid–liquid phase separation of the FUS low-complexity domain. *Nat Struct Mol Biol* **26**, 637–648.
71 Ryan VH, Dignon GL, Zerze GH, Chabata CV, Silva R, Conicella AE, Amaya J, Burke KA, Mittal J and Fawzi NL (2018) Mechanistic view of hnRNPA2 low complexity domain structure, interactions, and phase separation altered by disease mutation and arginine methylation. *Mol Cell* **69**, 465–479.e7.
72 Wong LE, Kim TH, Muhandiram DR, Forman-Kay JD and Kay LE (2020) NMR experiments for studies of dilute and condensed protein phases: application to the phase-separating protein CAPRIN1. *J Am Chem Soc* **142**, 2471–2489.
73 Brady JP, Farber PJ, Sekhar A, Lin Y-H, Huang R, Bah A, Nott TJ, Chan HS, Baldwin AJ, Forman-Kay JD *et al.* (2017) Structural and hydrodynamic properties of an intrinsically disordered region of a germ cell-specific protein on phase separation. *Proc Natl Acad Sci USA* **114**, E8194–E8203.
74 Ackermann BE and Debelouchina GT (2019) Heterochromatin protein HP1α gelation dynamics revealed by solid-state NMR spectroscopy. *Angew Chem Int Ed Engl* **58**, 6300–6305.
75 Ambadipudi S, Biernat J, Riedel D, Mandelkow E and Zweckstetter M (2017) Liquid–liquid phase separation of the microtubule-binding repeats of the Alzheimer-related protein tau. *Nat Commun* **8**, 275.
76 Pantoja CF, Ibáñez de Opakua A, Cima-Omori M-S and Zweckstetter M (2023) Determining the physicochemical composition of biomolecular condensates from spatially-resolved NMR. *Angew Chem Int Ed Engl* **62**, e202218078.
77 Guseva S, Schnapka V, Adamski W, Maurin D, Ruigrok RWH, Salvi N and Blackledge M (2023) Liquid-liquid phase separation modifies the dynamic properties of intrinsically disordered proteins. *J Am Chem Soc* **145**, 10548–10563.
78 Mohanty P, Shenoy J, Rizuan A, Ortiz JFM, Fawzi NL and Mittal J (2022) Aliphatic residues contribute significantly to the phase separation of TDP-43 C-terminal domain. *bioRxiv* 10.1101/2022.11.10.516004 [PREPRINT]
79 Ikeya T, Ban D, Lee D, Ito Y, Kato K and Griesinger C (2018) Solution NMR views of dynamical ordering of biomacromolecules. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1862**, 287–306.
80 Yamori W, Evans JR and Von Caemmerer S (2010) Effects of growth and measurement light intensities on temperature dependence of CO_2 assimilation rate in tobacco leaves. *Plant Cell Environ* **33**, 332–343.
81 Paul MJ, Knight JS, Habash D, Parry MAJ, Lawlor DW, Barnes SA, Loynes A and Gray JC (1995) Reduction in phosphoribulokinase activity by antisense RNA in transgenic tobacco: effect on CO_2 assimilation and growth in low irradiance. *Plant J* **7**, 535–542.
82 Boisset ND, Favoino G, Meloni M, Jomat L, Cassier-Chauvat C, Zaffagnini M, Lemaire SD and Crozet P (2023) Phosphoribulokinase abundance is not limiting the Calvin-Benson-Bassham cycle in *Chlamydomonas reinhardtii*. *bioRxiv* 10.1101/2023.05.10.540127 [PREPRINT]
83 Fridlyand LE and Scheibe R (1999) Regulation of the Calvin cycle for CO_2 fixation as an example for general control mechanisms in metabolic cycles. *Biosystems* **51**, 79–93.
84 Mcfarlane C, Shah N, Kabasakal BV, Cotton CAR, Bubeck D and Murray JW (2019) Structural basis of light-induced redox regulation in the Calvin cycle. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**, 20984–20990.
85 Yu A, Xie Y, Pan X, Zhang H, Cao P, Su X, Chang W and Li M (2020) Photosynthetic phosphoribulokinase structures: enzymatic mechanisms and the redox regulation of the Calvin-Benson-Bassham cycle. *Plant Cell* **32**, 1556–1573.
86 Wilson RH, Hayer-Hartl M and Bracher A (2019) Crystal structure of phosphoribulokinase from *Synechococcus* sp. strain PCC 6301. *Acta Crystallogr F Struct Biol Commun* **75**, 278–289.
87 Marri L, Zaffagnini M, Collin V, Issakidis-Bourguet E, Lemaire SD, Pupillo P, Sparla F, Miginiac-Maslow M and Trost P (2009) Prompt and easy activation by specific thioredoxins of Calvin cycle enzymes of *Arabidopsis thaliana* associated in the GAPDH/CP12/PRK supramolecular complex. *Mol Plant* **2**, 259–269.
88 Avilan L, Lebreton S and Gontero B (2000) Thioredoxin activation of phosphoribulokinase in a bi-enzyme complex from *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts. *J Biol Chem* **275**, 9447–9451.
89 Porter MA, Stringer CD and Hartman FC (1988) Characterization of the regulatory thioredoxin site of phosphoribulokinase. *J Biol Chem* **263**, 123–129.
90 Roesler KR, Marcotte BL and Ogren WL (1992) Functional importance of arginine 64 in *Chlamydomonas reinhardtii* phosphoribulokinase. *Plant Physiol* **98**, 1285–1289.
91 Graciet E, Gans P, Wedel N, Lebreton S, Camadro J-M and Gontero B (2003) The small protein CP12: a protein linker for supramolecular complex assembly. *Biochemistry* **42**, 8163–8170.
92 Lebreton S, Graciet E and Gontero B (2003) Modulation, via protein-protein interactions, of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase activity through redox phosphoribulokinase regulation. *J Biol Chem* **278**, 12078–12084.
93 Launay H, Shao H, Bornet O, Cantrelle F-X, Lebrun R, Receveur-Brechot V and Gontero B (2021) Flexibility of oxidized and reduced states of the

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

chloroplast regulatory protein CP12 in isolation and in cell extracts. *Biomolecules* **11**, 701.
94 Lebreton S and Gontero B (1999) Memory and imprinting in multienzyme complexes. Evidence for information transfer from glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase to phosphoribulokinase under reduced state in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* **274**, 20879–20884.
95 Marri L, Thieulin-Pardo G, Lebrun R, Puppo R, Zaffagnini M, Trost P, Gontero B and Sparla F (2014) CP12-mediated protection of Calvin–Benson cycle enzymes from oxidative stress. *Biochimie* **97**, 228–237.
96 Erales J, Avilan L, Lebreton S and Gontero B (2008) Exploring CP12 binding proteins revealed aldolase as a new partner for the phosphoribulokinase/glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase/CP12 complex – purification and kinetic characterization of this enzyme from *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS J* **275**, 1248–1259.
97 Süss K-H, Arkona C, Manteuffel R and Adler K (1993) Calvin cycle multienzyme complexes are bound to chloroplast thylakoid membranes of higher plants in situ. *Proc Natl Acad Sci USA* **90**, 5514–5518.
98 Mendiola L and Akazawa T (1964) Partial purification and the enzymatic nature of fraction I protein of rice leaves. *Biochemistry* **3**, 174–179.
99 Van Noort G and Wildman SG (1964) Proteins of green leaves: IX. Enzymatic properties of fraction-1 protein isolated by a specific antibody. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **90**, 309–317.
100 Gontero B, Giudici-Orticoni M-T and Ricard J (1994) The modulation of enzyme reaction rates within multi-enzyme complexes. *Eur J Biochem* **226**, 999–1006.
101 Pohlmeyer K, Paap BK, Soll J and Wedel N (1996) CP12: a small nuclear-encoded chloroplast protein provides novel insights into higher-plant GAPDH evolution. *Plant Mol Biol* **32**, 969–978.
102 Piersimoni L, Kastritis PL, Arlt C and Sinz A (2022) Cross-linking mass spectrometry for investigating protein conformations and protein–protein interactions—a method for all seasons. *Chem Rev* **122**, 7500–7531.
103 Walker BJ, Kramer DM, Fisher N and Fu X (2020) Flexibility in the energy balancing network of photosynthesis enables safe operation under changing environmental conditions. *Plan Theory* **9**, 301.
104 Shikanai T and Yamamoto H (2017) Contribution of cyclic and pseudo-cyclic electron transport to the formation of proton motive force in chloroplasts. *Mol Plant* **10**, 20–29.
105 Dao O, Kuhnert F, Weber APM, Peltier G and Li-Beisson Y (2022) Physiological functions of malate shuttles in plants and algae. *Trends Plant Sci* **27**, 488–501.
106 Dekker JP and Boekema EJ (2005) Supramolecular organization of thylakoid membrane proteins in green plants. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **1706**, 12–39.
107 Olive J, Vallon O, Wollman F-A, Recouvreur M and Bennoun P (1986) Studies on the cytochrome b 6/f complex. II. Localization of the complex in the thylakoid membranes from spinach and *Chlamydomonas reinhardtii* by immunocytochemistry and freeze-fracture analysis of b 6/f mutants. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* **851**, 239–248.
108 Rathod AK, Chavda D and Manna M (2023) Phase transition and phase separation in realistic thylakoid lipid membrane of marine algae in all-atom simulations. *J Chem Inf Model* **63**, 3328–3339.
109 Bolik S, Demé B and Jouhet J (2022) Chapter one – biophysical properties of glycerolipids and their impact on membrane architecture and biology. In Advances in Botanical Research (Rébeillé F and Maréchal E, eds), pp. 1–57. Academic Press, Cambridge, MA.
110 Siebenaller C and Schneider D (2023) Cyanobacterial membrane dynamics in the light of eukaryotic principles. *Biosci Rep* **43**, BSR20221269.
111 Bottier C, Géan J, Artzner F, Desbat B, Pézolet M, Renault A, Marion D and Vié V (2007) Galactosyl headgroup interactions control the molecular packing of wheat lipids in Langmuir films and in hydrated liquid-crystalline mesophases. *Biochim Biophys Acta* **1768**, 1526–1540.
112 Brentel I, Selstam E and Lindblom G (1985) Phase equilibria of mixtures of plant galactolipids. The formation of a bicontinuous cubic phase. *Biochim Biophys Acta Biomembr* **812**, 816–826.
113 Israelachvili JN, Marcelja S and Horn RG (1980) Physical principles of membrane organization. *Q Rev Biophys* **13**, 121–200.
114 Junglas B, Orru R, Axt A, Siebenaller C, Steinchen W, Heidrich J, Hellmich UA, Hellmann N, Wolf E, Weber SAL *et al.* (2020) IM30 IDPs form a membrane-protective carpet upon super-complex disassembly. *Commun Biol* **3**, 595.
115 Li-Beisson Y, Beisson F and Riekhof W (2015) Metabolism of acyl-lipids in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant J* **82**, 504–522.
116 Sukenik A, Zmora O and Carmeli Y (1993) Biochemical quality of marine unicellular algae with special emphasis on lipid composition. II *Nannochloropsis* Sp. *Aquaculture* **117**, 313–326.
117 Jensen EL, Yangüez K, Carrière F and Gontero B (2020) Storage compound accumulation in diatoms as response to elevated CO_2 concentration. *Biology* **9**, 5.
118 Talbierz S, Dębowski M, Kujawska N, Kazimierowicz J and Zieliński M (2022) Optimization of lipid production by *Schizochytrium limacinum* biomass modified with ethyl methane sulfonate and grown on

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

waste glycerol. *Int J Environ res Public Health* **19**, 3108.
119 Li-Beisson Y, Shorrosh B, Beisson F, Andersson MX, Arondel V, Bates PD, Baud S, Bird D, DeBono A, Durrett TP *et al.* (2010) Acyl-lipid metabolism. *Arabidopsis Book* **8**, e0133.
120 Browse J, Warwick N, Somerville CR and Slack CR (1986) Fluxes through the prokaryotic and eukaryotic pathways of lipid synthesis in the "16:3" plant *Arabidopsis thaliana*. *Biochem J* **235**, 25–31.
121 Shi H, Wu R, Zheng Y and Yue X (2018) Molecular mechanisms underlying catalytic activity of delta 6 desaturase from *Glossomastix chrysoplasta* and *Thalassiosira pseudonana*. *J Lipid res* **59**, 79–88.
122 Kajikawa M, Yamato KT, Kohzu Y, Shoji S, Matsui K, Tanaka Y, Sakai Y and Fukuzawa H (2006) A front-end desaturase from *Chlamydomonas reinhardtii* produces pinolenic and coniferonic acids by omega13 desaturation in methylotrophic yeast and tobacco. *Plant Cell Physiol* **47**, 64–73.
123 Zäuner S, Jochum W, Bigorowski T and Benning C (2012) A cytochrome b5-containing plastid-located fatty acid desaturase from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* **11**, 856–863.
124 Gounaris K and Barber J (1983) Monogalactosyldiacylglycerol: the most abundant polar lipid in nature. *Trends Biochem Sci* **8**, 378–381.
125 Li H-M and Yu C-W (2018) Chloroplast galactolipids: the link between photosynthesis, chloroplast shape, jasmonates, phosphate starvation and freezing tolerance. *Plant Cell Physiol* **59**, 1128–1134.
126 Légeret B, Schulz-Raffelt M, Nguyen HM, Auroy P, Beisson F, Peltier G, Blanc G and Li-Beisson Y (2016) Lipidomic and transcriptomic analyses of *Chlamydomonas reinhardtii* under heat stress unveil a direct route for the conversion of membrane lipids into storage lipids. *Plant Cell Environ* **39**, 834–847.
127 Kergomard J, Carrière F, Paboeuf G, Artzner F, Barouh N, Bourlieu C and Vié V (2022) Interfacial organization and phase behavior of mixed galactolipid-DPPC-phytosterol assemblies at the air-water interface and in hydrated mesophases. *Colloids Surf B Biointerfaces* **217**, 112646.
128 Kessler F and Vidi P-A (2007) Plastoglobule lipid bodies: their functions in chloroplasts and their potential for applications. *Adv Biochem Eng Biotechnol* **107**, 153–172.
129 Bréhélin C and Kessler F (2008) The plastoglobule: a bag full of lipid biochemistry tricks. *Photochem Photobiol* **84**, 1388–1394.
130 Shivaiah K-K, Susanto FA, Devadasu E and Lundquist PK (2022) Plastoglobule lipid droplet isolation from plant leaf tissue and cyanobacteria. *J Vis Exp* doi: 10.3791/64515
131 Choi YH, van Spronsen J, Dai Y, Verberne M, Hollmann F, Arends IWCE, Witkamp G-J and Verpoorte R (2011) Are natural deep eutectic solvents the missing link in understanding cellular metabolism and physiology? *Plant Physiol* **156**, 1701–1705.
132 Durand E, Villeneuve P, Bourlieu-lacanal C and Carrière F (2021) Chapter six – natural deep eutectic solvents: hypothesis for their possible roles in cellular functions and interaction with membranes and other organized biological systems. In Advances in Botanical Research (Verpoorte R, Witkamp G-J and Choi YH, eds), pp. 133–158. Academic Press, Cambridge, MA.
133 Dai Y, Varypataki EM, Golovina EA, Jiskoot W, Witkamp G-J, Choi YH and Verpoorte R (2021) Chapter seven – natural deep eutectic solvents in plants and plant cells: *in vitro* evidence for their possible functions. In Advances in Botanical Research (Verpoorte R, Witkamp G-J and Choi YH, eds), pp. 159–184. Academic Press, Cambridge, MA.
134 Dai Y, Witkamp G-J, Verpoorte R and Choi YH (2013) Natural deep eutectic solvents as a new extraction media for phenolic metabolites in *Carthamus tinctorius L*. *Anal Chem* **85**, 6272–6278.
135 González CG, Mustafa NR, Wilson EG, Verpoorte R and Choi YH (2018) Application of natural deep eutectic solvents for the "green"extraction of vanillin from vanilla pods. *Flavour Fragr J* **33**, 91–96.
136 Ball S, Colleoni C, Cenci U, Raj JN and Tirtiaux C (2011) The evolution of glycogen and starch metabolism in eukaryotes gives molecular clues to understand the establishment of plastid endosymbiosis. *J Exp Bot* **62**, 1775–1801.
137 Kroth PG, Chiovitti A, Gruber A, Martin-Jezequel V, Mock T, Parker MS, Stanley MS, Kaplan A, Caron L, Weber T *et al.* (2008) A model for carbohydrate metabolism in the diatom *Phaeodactylum tricornutum* deduced from comparative whole genome analysis. *PLoS One* **3**, e1426.
138 Chabi M, Leleu M, Fermont L, Colpaert M, Colleoni C, Ball SG and Cenci U (2021) Retracing storage polysaccharide evolution in stramenopila. *Front Plant Sci* **12**, 629045.
139 Tester RF, Karkalas J and Qi X (2004) Starch—composition, fine structure and architecture. *J Cereal Sci* **39**, 151–165.
140 Goold H, Beisson F, Peltier G and Li-Beisson Y (2015) Microalgal lipid droplets: composition, diversity, biogenesis and functions. *Plant Cell Rep* **34**, 545–555.
141 Li-Beisson Y, Kong F, Wang P, Lee Y and Kang B-H (2021) The disassembly of lipid droplets in *Chlamydomonas*. *New Phytol* **231**, 1359–1364.
142 Moellering ER and Benning C (2010) RNA interference silencing of a major lipid droplet protein

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

affects lipid droplet size in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Eukaryot Cell* **9**, 97–106.
143 Nguyen HM, Baudet M, Cuiné S, Adriano J-M, Barthe D, Billon E, Bruley C, Beisson F, Peltier G, Ferro M *et al*. (2011) Proteomic profiling of oil bodies isolated from the unicellular green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: with focus on proteins involved in lipid metabolism. *Proteomics* **11**, 4266–4273.
144 Ohlrogge J and Browse J (1995) Lipid biosynthesis. *Plant Cell* **7**, 957–970.
145 Li X, Moellering ER, Liu B, Johnny C, Fedewa M, Sears BB, Kuo M-H and Benning C (2012) A galactoglycerolipid lipase is required for triacylglycerol accumulation and survival following nitrogen deprivation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Cell* **24**, 4670–4686.
146 Fan J, Andre C and Xu C (2011) A chloroplast pathway for the de novo biosynthesis of triacylglycerol in *Chlamydomonas reinhardtii*. *FEBS Lett* **585**, 1985–1991.
147 Goodson C, Roth R, Wang ZT and Goodenough U (2011) Structural correlates of cytoplasmic and chloroplast lipid body synthesis in *Chlamydomonas reinhardtii* and stimulation of lipid body production with acetate boost. *Eukaryot Cell* **10**, 1592–1606.
148 Bouillaud D, Heredia V, Castaing-Cordier T, Drouin D, Charrier B, Gonçalves O, Farjon J and Giraudeau P (2019) Benchtop flow NMR spectroscopy as an online device for the in vivo monitoring of lipid accumulation in microalgae. *Algal Res* **43**, 101624.
149 Jaussaud A, Lupette J, Salvaing J, Jouhet J, Bastien O, Gromova M and Maréchal E (2020) Stepwise biogenesis of subpopulations of lipid droplets in nitrogen starved *Phaeodactylum tricornutum* cells. *Front. Plant Sci* **11**, 48.
150 Kong F, Liang Y, Légeret B, Beyly-Adriano A, Blangy S, Haslam RP, Napier JA, Beisson F, Peltier G and Li-Beisson Y (2017) *Chlamydomonas* carries out fatty acid β-oxidation in ancestral peroxisomes using a bona fide acyl-CoA oxidase. *Plant J* **90**, 358–371.
151 Selinski J and Scheibe R (2018) Malate valves: old shuttles with new perspectives. *Plant Biol (Stuttg)* **21**, 21–30.
152 Lauersen KJ, Willamme R, Coosemans N, Joris M, Kruse O and Remacle C (2016) Peroxisomal microbodies are at the crossroads of acetate assimilation in the green microalga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Algal Res* **16**, 266–274.
153 Calatrava V, Tejada-Jimenez M, Sanz-Luque E, Fernandez E and Galvan A (2023) Chapter 3 – nitrogen metabolism in *Chlamydomonas*. In The Chlamydomonas Sourcebook (Grossman AR and Wollman F-A, eds), 3rd, 3rd ed edn, pp. 99–128. Academic Press, London.
154 Huang W, Krishnan A, Plett A, Meagher M, Linka N, Wang Y, Ren B, Findinier J, Redekop P, Fakhimi N *et al*. (2023) *Chlamydomonas* mutants lacking chloroplast triose phosphate Transporter3 are metabolically compromised and light sensitive. *Plant Cell* **35**, 2592–2614.
155 Bailleul B, Berne N, Murik O, Petroutsos D, Prihoda J, Tanaka A, Villanova V, Bligny R, Flori S, Falconet D *et al*. (2015) Energetic coupling between plastids and mitochondria drives CO_2 assimilation in diatoms. *Nature* **524**, 366–369.
156 Wu C, Xiong W, Dai J and Wu Q (2015) Genome-based metabolic mapping and ^{13}C flux analysis reveal systematic properties of an oleaginous microalga *Chlorella protothecoides*. *Plant Physiol* **167**, 586–599.
157 Singh H, Shukla MR, Chary KVR and Rao BJ (2014) Acetate and bicarbonate assimilation and metabolite formation in *Chlamydomonas reinhardtii*: a ^{13}C-NMR study. *PLoS One* **9**, e106457.
158 Zhou B, Xiao JF, Tuli L and Ressom HW (2012) LC-MS-based metabolomics. *Mol Biosyst* **8**, 470–481.
159 Wishart DS, Cheng LL, Copié V, Edison AS, Eghbalnia HR, Hoch JC, Gouveia GJ, Pathmasiri W, Powers R, Schock TB *et al*. (2022) NMR and metabolomics—a roadmap for the future. *Metabolites* **12**, 678.
160 Edison AS, Colonna M, Gouveia GJ, Holderman NR, Judge MT, Shen X and Zhang S (2021) NMR: unique strengths that enhance modern metabolomics research. *Anal Chem* **93**, 478–499.
161 Alshamleh I, Krause N, Richter C, Kurrle N, Serve H, Günther UL and Schwalbe H (2020) Real-time NMR spectroscopy for studying metabolism. *Angew Chem Int Ed* **59**, 2304–2308.
162 Judge MT, Wu Y, Tayyari F, Hattori A, Glushka J, Ito T, Arnold J and Edison AS (2019) Continuous in vivo metabolism by NMR. *Front Mol Biosci* **6**, 26.
163 Cerofolini L, Giuntini S, Barbieri L, Pennestri M, Codina A, Fragai M, Banci L, Luchinat E and Ravera E (2019) Real-time insights into biological events: in-cell processes and protein-ligand interactions. *Biophys J* **116**, 239–247.
164 Thiam AR, Farese RV Jr and Walther TC (2013) The biophysics and cell biology of lipid droplets. *Nat Rev Mol Cell Biol* **14**, 775–786.
165 McFearin CL, Beaman DK, Moore FG and Richmond GL (2009) From Franklin to today: toward a molecular level understanding of bonding and adsorption at the oil–water interface. *J Phys Chem C* **113**, 1171–1188.
166 Ruiz-Lopez MF, Francisco JS, Martins-Costa MTC and Anglada JM (2020) Molecular reactions at aqueous interfaces. *Nat Rev Chem* **4**, 459–475.
167 Li G and Zuo YY (2022) Molecular and colloidal self-assembly at the oil–water interface. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **62**, 101639.

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

168 Verger R and de Haas G (1976) Interfacial enzyme kinetics of lipolysis. *Annu Rev Biophys Bioeng* **5**, 77–117.
169 Bénarouche A, Habchi J, Cagna A, Maniti O, Girard-Egrot A, Cavalier J-F, Longhi S and Carrière F (2017) Interfacial properties of NTAIL, an intrinsically disordered protein. *Biophys J* **113**, 2723–2735.
170 Baldwin PM (2001) Starch granule-associated proteins and polypeptides: a review. *Starke* **53**, 475–503.
171 Findinier J, Laurent S, Duchêne T, Roussel X, Lancelon-Pin C, Cuiné S, Putaux J-L, Li-Beisson Y, D'Hulst C, Wattebled F *et al.* (2019) Deletion of BSG1 in *Chlamydomonas reinhardtii* leads to abnormal starch granule size and morphology. *Sci Rep* **9**, 1990.
172 Itakura AK, Chan KX, Atkinson N, Pallesen L, Wang L, Reeves G, Patena W, Caspari O, Roth R, Goodenough U *et al.* (2019) A RuBisCO-binding protein is required for normal pyrenoid number and starch sheath morphology in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* **116**, 18445–18454.
173 Gromova M, Guillermo A, Bayle P-A and Bardet M (2015) *In vivo* measurement of the size of oil bodies in plant seeds using a simple and robust pulsed field gradient NMR method. *Eur Biophys J* **44**, 121–129.
174 Møller BL and Laursen T (2021) Chapter eight – metabolons and bio-condensates: the essence of plant plasticity and the key elements in development of green production systems. In Advances in Botanical Research (Verpoorte R, Witkamp G-J and Choi YH, eds), pp. 185–223. Academic Press, Cambridge, MA.
175 Minton AP (2001) The influence of macromolecular crowding and macromolecular confinement on biochemical reactions in physiological media. *J Biol Chem* **276**, 10577–10580.
176 Ellis RJ and Minton AP (2003) Join the crowd. *Nature* **425**, 27–28.
177 Shahid S, Hassan MI, Islam A and Ahmad F (2017) Size-dependent studies of macromolecular crowding on the thermodynamic stability, structure and functional activity of proteins: *in vitro* and *in silico* approaches. *Biochim Biophys Acta Gen Subj* **1861**, 178–197.
178 Ahmed MC, Crehuet R and Lindorff-Larsen K (2020) Computing, analyzing, and comparing the radius of gyration and hydrodynamic radius in conformational ensembles of intrinsically disordered proteins. *Methods Mol Biol* **2141**, 429–445.
179 Fonin AV, Darling AL, Kuznetsova IM, Turoverov KK and Uversky VN (2018) Intrinsically disordered proteins in crowded milieu: when chaos prevails within the cellular gumbo. *Cell Mol Life Sci* **75**, 3907–3929.
180 Cedeño C, Pauwels K and Tompa P (2017) Protein delivery into plant cells: toward *in vivo* structural biology. *Front Plant Sci* **8**, 519.
181 Böhm J (1857) Beiträge zur näheren kenntnis des chlorophylls. *Gerold [in Komm]*.
182 Mohl HV (1855) Über den bau des chlorophylls. *Bot Ztg* **13**, 105.
183 Yewdall NA, André AAM, Lu T and Spruijt E (2021) Coacervates as models of membraneless organelles. *Curr Opin Colloid Interface Sci* **52**, 101416.
184 Oparin AI (1957) The Origin of Life on the Earth. 3rd edn. Oliver & Boyd, Edinburgh; London.
185 Ghosh B, Bose R and Tang T-YD (2021) Can coacervation unify disparate hypotheses in the origin of cellular life? *Curr Opin Colloid Interface Sci* **52**, 101415.
186 Bonucci A, Ouari O, Guigliarelli B, Belle V and Mileo E (2020) *In-cell* EPR: progress towards structural studies inside cells. *Chembiochem* **21**, 451–460.
187 Zurn P, Bassett DS and Rust NC (2020) The citation diversity statement: a practice of transparency, a way of life. *Trends Cogn Sci* **24**, 669–672.
188 Anderson LE and Carol AA (2004) Enzyme co-localization with RuBisCO in pea leaf chloroplasts. *Photosynth res* **82**, 49–58.
189 Sainis JK and Harris GC (1986) The association of ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase with phosphoriboisomerase and phosphoribulokinase. *Biochem Biophys res Commun* **139**, 947–954.
190 Anderson LE, Goldhaber-Gordon IM, Li D, Tang XY, Xiang M and Prakash N (1995) Enzyme-enzyme interaction in the chloroplast: glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase, triose phosphate isomerase and aldolase. *Planta* **196**, 245–255.
191 Dani DN and Sainis JK (2005) Isolation and characterization of a thylakoid membrane module showing partial light and dark reactions. *Biochim Biophys Acta* **1669**, 43–52.
192 Persson LO and Johansson G (1989) Studies of protein-protein interaction using countercurrent distribution in aqueous two-phase systems. Partition behaviour of six Calvin-cycle enzymes from a crude spinach (*Spinacia oleracea*) chloroplast extract. *Biochem J* **259**, 863–870.
193 Süss K-H, Prokhorenko I and Adler K (1995) *In situ* association of Calvin cycle enzymes, ribulose-1,5-bisphosphate carboxylase/oxygenase activase, ferredoxin-$NADP^+$ reductase, and nitrite reductase with thylakoid and pyrenoid membranes of *Chlamydomonas reinhardtii* chloroplasts as revealed by immunoelectron microscopy. *Plant Physiol* **107**, 1387–1397.
194 Scheibe R, Wedel N, Vetter S, Emmerlich V and Sauermann S-M (2002) Co-existence of two regulatory NADP-glyceraldehyde 3-P dehydrogenase complexes in higher plant chloroplasts. *Eur J Biochem* **269**, 5617–5624.
195 Wedel N, Soll J and Paap BK (1997) CP12 provides a new mode of light regulation of Calvin cycle activity in higher plants. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**, 10479–10484.

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

196 Marri L, Trost P, Pupillo P and Sparla F (2005) Reconstitution and properties of the recombinant glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase/CP12/phosphoribulokinase supramolecular complex of *Arabidopsis*. *Plant Physiol* **139**, 1433–1443.
197 Oesterhelt C, Klocke S, Holtgrefe S, Linke V, Weber APM and Scheibe R (2007) Redox regulation of chloroplast enzymes in *Galdieria sulphuraria* in view of eukaryotic evolution. *Plant Cell Physiol* **48**, 1359–1373.
198 Blanc-Garin V, Veaudor T, Sétif P, Gontero B, Lemaire SD, Chauvat F and Cassier-Chauvat C (2022) First in vivo analysis of the regulatory protein CP12 of the model cyanobacterium *Synechocystis PCC 6803*: biotechnological implications. *Front Plant Sci* **13**, 999672.
199 Wedel N and Soll J (1998) Evolutionary conserved light regulation of Calvin cycle activity by NADPH-mediated reversible phosphoribulokinase/CP12/glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase complex dissociation. *Proc Natl Acad Sci USA* **95**, 9699–9704.
200 Tamoi M, Miyazaki T, Fukamizo T and Shigeoka S (2005) The Calvin cycle in cyanobacteria is regulated by CP12 via the NAD(H)/NADP(H) ratio under light/dark conditions. *Plant J* **42**, 504–513.
201 Avilan L, Gontero B, Lebreton S and Ricard J (1997) Memory and imprinting effects in multienzyme complexes. *Eur J Biochem* **246**, 78–84.
202 Graciet E, Lebreton S, Camadro J-M and Gontero B (2003) Characterization of native and recombinant A4 glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase. Kinetic evidence for confromation changes upon association with the small protein CP12. *Eur J Biochem* **270**, 129–136.
203 Mekhalfi M, Puppo C, Avilan L, Lebrun R, Mansuelle P, Maberly SC and Gontero B (2014) Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase is regulated by ferredoxin-NADP reductase in the diatom *Asterionella formosa*. *New Phytol* **203**, 414–423.
204 Launay H, Barré P, Puppo C, Manneville S, Gontero B and Receveur-Bréchot V (2016) Absence of residual structure in the intrinsically disordered regulatory protein CP12 in its reduced state. *Biochem Biophys Res Commun* **477**, 20–26.
205 Launay H, Barré P, Puppo C, Zhang Y, Maneville S, Gontero B and Receveur-Bréchot V (2018) Cryptic disorder out of disorder: encounter between conditionally disordered CP12 and glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase. *J Mol Biol* **430**, 1218–1234.

18733468, 2023, 23, Downloaded from https://febs.onlinelibrary.wiley.com/doi/10.1002/1873-3468.14754 by Cochrane France, Wiley Online Library on [26/07/2024]. See the Terms and Conditions (https://onlinelibrary.wiley.com/terms-and-conditions) on Wiley Online Library for rules of use; OA articles are governed by the applicable Creative Commons License

C. Contribution scientifique externe

En parallèle des travaux réalisés dans le cadre de ma thèse, j'ai également contribué à un projet de recherche portant sur la digestion et la bioconversion de galactolipides par l'action directe d'enzymes lipolytiques sur la biomasse de *Chlamydomonas reinhardtii*.

Digestion and bioconversion of microalgal galactolipids by direct action of lipolytic enzymes on *Chlamydomonas reinhardtii* biomass

Beatriz Rodrigues Fachini[a], Cassy Gérard[a], Achille Marchand[a], Olivier Bornet[b], Valérie Gros[c], Claire Vigor[c], Camille Oger[c], Guillaume Reversat[c], Thierry Durand[c], Goetz Parsiegla[a], Brigitte Gontero[a], Hélène Launay[a] and Frédéric Carrière[a*]

[a] Aix Marseille Univ, CNRS, UMR7281 Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, 31 Chemin Joseph Aiguier, Marseille, France.

[b] NMR Platform, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Aix Marseille Univ, Marseille, France

[c] Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), Pôle Chimie Balard Recherche, UMR 5247 CNRS, Université de Montpellier, ENSCN, France

[*]Corresponding authors: carriere@imm.cnrs.fr

Abstract

Microalgae are rich in polyunsaturated fatty acids (PUFAs) bound to galactolipids, the main lipids of photosynthetic membranes. The bioaccessibility of these lipids to enzymes showing galactolipase activity, guinea pig pancreatic lipase-related protein 2 (GPLRP2) and *Fusarium solani* cutinase (FsCut), was tested using *Chlamydomonas reinhardtii* whole cells. Both enzymes were found to release large amounts of free fatty acids (FFA), with a lipolysis level reaching 93% of total galactolipid fatty acids with GPLRP2. The same enzymes could also convert *C. reinhardtii* galactolipid fatty acids into ethyl esters in the presence of ethanol, which could provide an easier route for recovering PUFAs from galactolipids dispersed in microalgal biomass. The *in vitro* digestion of *C. reinhardtii* whole cells under conditions mimicking gastric and small intestinal contents showed that galactolipases present in human pancreatic juice have the ability to digest the microalgal galactolipids and release α-linolenic acid (ALA) as the main FFA. The analysis of lipid extracts by NMR spectroscopy showed the appearance of PUFA oxidation products when *C. reinhardtii* endogenous enzymes were not inactivated by heat treatment (blanching) prior to digestion. The non-enzymatic oxidation of ALA into phytoprostanes was also observed and preferentially occurred when lipolysis and release of free ALA occurred first. In conclusion, galactolipids from *C. reinhardtii* whole biomass are bioaccessible to digestive enzymes, providing an interesting source of PUFAs for nutrition, ideally as long as these PUFAs are preserved from oxidation.

Keywords: Alcoholysis, *Fusarium solani* cutinase, galactolipase, lipolysis, microalgae, pancreatic lipase related protein 2, NMR spectroscopy, thin layer chromatography.

Abbreviations: ALA, α-linolenic acid; ALAEE, ethyl linolenate; BSSL, bile salt-stimulated lipase; C8-MGDG, monogalactosyl-dioctanoyl glycerol; CRF, chloroplast-rich fractions; DGDG, digalactosyldiacylglycerol; DGG, digalactosyl glycerol; DGTS, betaine lipid 1,2-diacylglyceryl-3-O-4'-(N,N,N-trimethyl)-homoserine; DHA, docosahexaenoic acid; DW, dry weight; EPA, eicosapentaenoic acid; FW, fresh weight; FA, fatty acid; FAEE, fatty acid ethyl ester; FFA, free fatty acid; FsCut, *Fusarium solani* cutinase; GC-FID, gas chromatography coupled to flame ionization detector; GI, gastrointestinal; GPLRP2, guinea pig pancreatic lipase related protein 2; HPJ, Human pancreatic juice; HPL, Human pancreatic lipase; HSQC, heteronuclear single quantum coherence; IS, internal standard; MGDG, monogalactosyl-diacyl glycerol; MGG, monogalactosyl glycerol; MGMG, monogalactosyl-monoacyl glycerol; NaTDC; sodium taurodeoxycholate; NMR, Nuclear Magnetic Resonance; PE, phosphatidylethanolamine; PhytoP, phytoprostane; PLRP2, pancreatic lipase related protein 2; PUFA, polyunsaturated fatty acids; RGE, rabbit gastric extract; ROS, reactive oxygen species; TAG, triacylglycerol; TLC, thin-layer chromatography; TES, N-tris[hydroxymethyl]methyl-2-aminoethane-sulfonic acid.

1. Introduction

Microalgae are microscopic photosynthetic organisms that play a crucial role in Earth's ecosystems, significantly contributing to global oxygen production and carbon fixation. They can produce lipids like triacylglycerols (TAG) as carbon-storage molecules and their potential use as a source of energy has led to tremendous research efforts {Li-Beisson, 2013 #7083;Li-Beisson, 2019 #6310}. Apart from alkanes, TAG are the biomolecules with the highest density of energy storage (9 kcal/g), contained in the three fatty acids (FA) bound to the glycerol backbone. TAG are usually produced by microalgae under stress or dormancy conditions, and these conditions are not compatible with increasing biomass {Li-Beisson, 2015 #7258}. Under conditions of optimum growth, most of the FA are found in galactolipids that are constitutive bricks of photosynthetic membranes. Galactolipids like monogalactosyldiglycerides (MGDG) and digalactosyldiglycerides (DGDG; Figure 1) are essential constituents of thylakoid membranes, which contribute to photosynthesis by capturing solar energy and converting it into chemical energy {Staehelin, 1996 #7218;Kobayashi, 2016 #7219;Mizusawa, 2012 #7221}. Due to their prevalence in the chloroplasts, and their abundance under optimum growth conditions, they represent another attractive source of FA, although they only contain two FA bound to glycerol {Amara, 2024 #7184}.

Another attractive feature of chloroplast galactolipids is their natural enrichment in long-chain polyunsaturated fatty acids (PUFA), such as α-linolenic acid (ALA; 18:3 n-3), eicosapentaenoic acid (EPA; 20:5 n-3) and docosahexaenoic acid (DHA; 22:6 n-3) depending on the microalgal species {Sahaka, 2020 #6763}. These PUFA play a critical role in the plasticity of thylakoid membranes that show a high protein to lipid ratio, as well as in the adaptation of the photosynthetic machinery to varying light conditions {Jimbo, 2021 #7220} {Horvath, 1987 #7222;Mock, 2002 #7223;Guiheneuf, 2009 #7224;Wacker, 2015 #7225}.

These PUFA make galactolipids more attractive for nutritional applications {Sahaka, 2020 #6763}.

Apart from lipids, microalgae also present a promising solution to global nutritional demands due to their rich composition in proteins, carbohydrates, vitamins and minerals. With a protein content reaching 40% of dry weight (up to 70% in spirulina), they are valuable for human and animal nutrition {Espinosa-Ramírez, 2023 #7226}. The microalga *Chlamydomonas reinhardtii*, in particular, is noted for its high-value biomolecules, including polysaccharides, lipids, proteins and pigments, which have significant applications in nutraceuticals and pharmaceuticals {Darwish, 2020 #7217}. Bioprocessing techniques, such as extraction, microencapsulation, and enzymatic treatments, can enhance the digestibility and bioavailability of these nutrients, making microalgae a potent source of health-promoting compounds. The integration of these techniques can lead to the development of functional and nutritious food products, maximizing the potential of microalgae for human health {Masi, 2023 #7227;Verni, 2023 #7228}. Studies have shown that *C. reinhardtii* surpasses popular dietary supplements like *Chlorella* and *Spirulina* in protein content, amino acid profile, and antioxidant activity, indicating its potential as a functional food ingredient {Darwish, 2020 #7217} . Interestingly, zebrafish fed with *C. reinhardtii* showed a yellow pigmentation due to lutein absorption while β-carotene was converted into vitamin A {Darwish, 2023 #7216}. Increased levels of ALA (C18:3 n-3) and hexadecatrienoic acid (C16: 4-n-3) were observed in zebrafish tissues, indicating that lipids from *C. reinhardtii*, probably galactolipids, were well digested and their fatty acid absorbed {Darwish, 2023 #7216}.

Exploring the enzymatic digestion and conversion of galactolipids is crucial for defining their potential applications. Besides their nutritional interest, their enzymatic transformation into various esters as emulsifiers and lipid excipients may provide a sustainable alternative to chemical production. Research in this area has focused so far on the identification of enzymes,

galactolipases, catalyzing the conversion of galactolipids into free fatty acids and various esters through hydrolysis and alcoholysis reactions {Amara, 2024 #7184;Amara, 2013 #5273;Adlercreutz, 2001 #5195}. Galactolipases can also catalyse FA exchanges in galactolipids {Persson, 2000 #5194}. Among the enzymes showing high galactolipase activity, two notable candidates are Guinea-pig pancreatic lipase-related protein 2 (GPLRP2) and *Fusarium solani* cutinase (FsCut) which have been shown to act directly onto leaves of various plant species {Amara, 2024 #7184}{Belhaj, 2025 #7259}, as well as on isolated chloroplasts {Wattanakul, 2019 #6333;Sahaka, 2023 #7079}. The hydrolysis of galactolipids by these enzymes involves the cleavage of acyl ester bonds linked to the glycerol backbone, targeting MGDG and DGDG molecules in photosynthetic membranes. The process results in the release of free fatty acids, with preferential action on the ester bonds at *sn*-1 position, that can be followed by the release of the second acyl chain, either by direct action at the sn-2 position (slow) or after sn-2 to sn-1 acyl chain migration (most common mechanism). Thus, MGDG and DGDG hydrolysis yields two molecules of free fatty acids (FFA), and monogalactosyl glycerol (MGG) and digalactosyl glycerol (DGG), respectively, as ultimate reaction products *in vitro* {Sahaka, 2023 #7079;Sahaka, 2024 #7186;Sahaka, 2021 #7076}. MGG and DGG have also been detected *in vivo* in rat intestinal contents {Sugawara, 2000 #7016} and these water-soluble galactose-containing compounds can also be generated upon incubation of radiolabeled MGDG and DGDG with human duodenal contents and pancreatic juice {Andersson, 1995 #3485}.

Regarding alcoholysis, the principle remains similar to hydrolysis, with the alcohol acting as the nucleophile instead of water. The same enzymes can convert galactolipid FAs into methyl and ethyl esters in the presence of methanol and ethanol, respectively {Amara, 2024 #7184;Adlercreutz, 2001 #5195}{Belhaj, 2025 #7259}.

The primary objective of this study was to evaluate the capacity of GPLRP2 and FsCut to access to and convert galactolipids from *C. reinhardtii* whole cells into FFA and fatty acid

ethyl esters (FAEE). Second, a two-step *in vitro* digestion assay combining gastric and a small intestinal phase, was carried out to evaluate the ability of gastrointestinal enzymes to digest the galactolipids from the whole microalga, having in mind its applications as a food.

.

2. Materials and methods

2.1. Reagents

Monogalactosyl dioctanoyl-glycerol (C8-MGDG; M_w=506 g/mole), monogalactosyl distearoyl-glycerol (C18-MGDG; M_w=646 g/mole) and digalactosyl dioctanoyl-glycerol (C8-DGDG; M_w=632,21 g/mole), was synthetised as previously described {Amara, 2009 #5013;Lafont, 2006 #4979}. Deuterium oxide, Galactose, N-tris[hydroxymethyl]methyl-2-aminoethane-sulfonic acid (TES), Sodium taurodeoxycholate (NaTDC), Sulphuric acid and Thymol were purchased from Sigma-Aldrich (Saint-Quentin Fallavier, France). Calcium chloride ($CaCl_2$) and sodium chloride (NaCl) were obtained from Euromedex (Souffelweyersheim, France). Acetonitrile, chloroform, ethanol, and methanol were all HPLC grade from Carlo Erba (Peypin, France). Rabbit gastric extracts (RGE) containing gastric lipase were purchased Lipolytech (Marseille, France). Human pancreatic juice (HPJ) was provided by Prof. René Laugier (Gastroenterology department, La Timone Hospital, Assistance Publique-Hôpitaux de Marseille) and was collected as previously described {Salhi, 2020 #6325}.

2.2. Culture and harvesting of C. reinhardtii

The cell wall-deficient *C. reinhardtii* strain CC-4349 cw15 mt+ waspurchased from the Chlamydomonas Resource Center (University of Minnesota, Minneapolis, MN, USA) and maintained in Tris Acetate Phosphate (TAP) medium. Cells were grown in photoautotrophic conditions at 23°C in minimal MOBS culture medium (20 mM MOPS pH 7.4, 0.4 mM KH_2PO_4, 0.6 mM K_2HPO_4, Beijering Salts solution containing 7.5 mM NH_4Cl, 0.4 mM $MgSO_4$ and 0.34 mM $CaCl_2$ and Hutner's trace elements {Hutner, 1950 #7260}and under continuous photosynthetically available illumination at 110 µmol photon $m^2.s^{-1}$, constantly shaken at 110

rpm. Cultures were bubbled with air enriched in CO_2 at partial pressure of 20 000 ppm using a El-Flow Bronkhorst flowmeter. Cells were harvested during the exponential phase when the OD_{680} value reached 1.66, corresponding to $8.33 \pm 0.5 \times 10^6$ cells/mL and 314 ± 22 mg dry weight (DW)/L. Cells were recovered by centrifugation at 4 ºC, 2000 g for 10 min, and transferred into 15-mL Falcon tubes. To prevent endogenous lipolysis, some cell pellets were blanched at 100 ºC for 5 minutes by dipping the tube with the cell pellet in boiling water. After centrifugation of after blanching, the cell pellets were either used directly for enzymatic digestion or stored at -20 ºC before lyophilization overnight (around 16-18h).

2.3.Production, purification and assay of GPLRP2 and Fusarium solani cutinase

Recombinant GPLRP2 and *Fusarium solani* cutinase (FsCut) were produced in the yeast *Pichia pastoris* and purified as previously described {Amara, 2024 #7184}. Stock solutions containing 2.17 mg/L GPLRP2 and 1.92 mg/mL FsCut were prepared and stored at -20°C. Both GPLRP2 and FsCut catalyse the hydrolysis of triacylglycerols (TAG), phospholipids and galactolipids, which generates FFA {Amara, 2013 #5273}. The titration with time of these fatty acids allows the determination of the enzyme activity of both lipases. This activity can be expressed in international units: 1 U = 1 µmole of fatty acid released per minute. For routine analysis of GPLRP2 and FsCut samples, either tributyrin or C8-MGDG, a synthetic galactolipid with eight-carbon acyl chains {Amara, 2009 #5013}, were used as substrates. FFA release was monitored using the pHstat technique (Metrohm Titrando 842 and burette Dosino 800, Herisau, Switzerland), the TIAMO version 1.3 software and 0.1 M NaOH, at a pH endpoint of 7 or 8. The assay solution contained 1 mM Tris, 150 mM NaCl 150 mM, 1 mM $CaCl_2$, and 0.5 mM sodium taurodeoxycholate (NaTDC). All assays were performed in triplicate at 37 ºC for 5 minutes. The specific activities of GPLRP2 and FsCut are 2700 ± 300 and 2596 ± 96 U/mg, respectively, on tributyrin and 5420 ± 85 and 984 ± 62 U/mg, respectively, on C8-MGDG{Amara, 2013 #5273}.

2.4.Hydrolysis reactions.

The hydrolysis of *C. reinhardtii* cells was performed with both GPLRP2 and FsCut. Each hydrolysis reaction was performed using 300-400 mg fresh weight (FW; equivalent to 50-75 mg DW) of *C. reinhardtii* cells pellets. The cell pellet, fresh or after blanching was resuspended in 3 mL of 0.3 mM Tris buffer, pH 8.0, 150 mM NaCl and 2 mM $CaCl_2$. 50 μg of enzyme were added (either 23 μL stock solution of GPLRP2 or 26 μL stock solution of FsCut) and the tubes were incubated at 37 ºC for 3 h, under continuous orbital agitation at around 250 rpm. Control experiments were performed with non-blanched cells with and without adding enzyme. The reactions were stopped after 3 h and a lipid extraction was performed immediately.

2.5. Alcoholysis reactions.

The ethanolysis reactions were carried out with both enzymes, GPLRP2 and FsCut, with an optimum ethanol concentration of 2.5 M defined in a previous work {Amara, 2024 #7184}, in 2 mM Tris buffer, pH 8.0, 150 mM NaCl. Absolute ethanol was added to the buffer solution, and 1 mL of this solution was added to 50-75 mg DW of freeze-dried microalgae cells in 15-mL Falcon tubes. The reaction mix was vortexed before adding the enzyme stock solution (50 μg). Reactions were performed in triplicate at 37 °C with stirring (200 rpm), including a blank reaction without enzyme. For FsCut, the reaction time was 72 h with samples taken at 4, 8, 24, 48, and 72 h. For GPLRP2, the reaction time was 24 h with samples taken at 0.5, 1, 2, 4, 8, and 24 h. All samples underwent lipid extraction, and the organic fraction was analysed by thin-layer chromatography (TLC).

2.6. In vitro gastrointestinal digestion

The experiment included two phases: a gastric step at pH 5, using RGE as a source of gastric lipase and pepsin {Sams, 2018 #6195}, and an intestinal step at pH 6, using HPJ and bile salts (NaTDC) solution. The final concentrations were set to 16 µg gastric lipase /mL (equivalent to 20 U/mL) in the gastric step, 250 µg human pancreatic lipase (HPL) /mL (equivalent to 2,000 U/mL) and 4 mM NaTDC in the intestinal step. Besides HPL, HPJ also contains human PLRP2 and bile salt-stimulated lipase (BSSL) that both display galactolipase activities {Salhi, 2020 #6325}. The assay solution contained 10 mM MES, 150 mM NaCl, with pH adjusted to 5.0 for the gastric phase and 6.0 for the intestinal one, in order to fit with pH values observed in gastric and duodenal contents at half-gastric emptying of test meals {Amara, 2019 #6799}.

For each digestion assay (performed in triplicate), approximately 250 mg of freeze-dried microalgae were added to a 50-mL Falcon tube and re-suspended in 10 mL of the above-mentioned pH 5.0 assay solution. 1 mL of the suspension was taken for lipid extraction and analysis at time zero. After collecting the t_0 sample, RGE was added, and the tube was incubated for 30 min at 37 °C with gentle stirring (100 rpm). Two 1-mL samples were taken at 15 min and 30 min. Two mL of pure water were added to gastric samples prior to lipid extraction.

At 30 min, the intestinal phase started by diluting the remaining gastric phase by half with 7 mL of the prepared HPJ-NaTDC solution and adjusting pH to 6.0. The mixture was vortexed for homogenization and incubated for 60 min at 37 °C with gentle stirring (100 rpm), totalling 90 min of incubation. Five points were taken at 35, 40, 45, 60 and 90 min. Since the reaction mixture was diluted by half, 2-mL samples were taken for lipid extraction at each time point and completed to 3 mL with pure water. All samples underwent lipid extraction, and the organic phase was analysed by TLC.

2.7. Lipid extraction and analysis by thin-layer chromatography

At each time point of reactions, 1 to 3 mL of the reaction mixture containing *C. reinhardtii* cells were collected and completed with pure MilliQ™ water to 3 mL when required. Three mL of chloroform-methanol (2:1 v/v) and 500µL 1N HCl were added to stop the reaction and start the extraction procedure. The samples were frozen at -20°C, thawed and vortexed to ensure cell disruption for efficient extraction. Phase separation was performed by centrifugation at 1,000 rpm for 10 min at 4°C (Sigma 3-18K centrifuge) and the lower organic phase was collected with a Pasteur pipette. Extraction was repeated twice and the organic phases were pooled and washed with 3 mL of saturated NaCl solution. After phase separation, the organic phase was dried using $MgSO_4$.

Lipid extracts and reference standards were spotted on silica gel 60 TLC plates (10 X 20 cm, from Merck-Sigma-Aldrich, Saint-Quentin Fallavier, France) using a Linomat IV sample spotter (Camag, Muttenz, Switzerland) equipped with a 100 µL Hamilton syringe. For each plate, four calibration lanes with increasing amounts of standards were spotted, for plotting calibration curves and subsequent quantification of the compounds separated by TLC.

For galactolipid separation, migration was performed using Chloroform:Methanol:Water (47.5:10:1.25 v/v/v) as the eluant for polar lipids. The migration proceeded until about 80% of the plate height, taking around 20 min. After drying for 10 min at room temperature (RT), the plate was dipped into thymol-sulfuric acid reagent for galactolipid staining {Sahaka, 2021 #7076}, using a Chromatogram Immersion Device 3 (Camag, Muttenz, Switzerland). It was then dried again and placed in an oven at 100 °C for 10 min. Afterward, a densitometry analysis of the plate allowed establishing calibration curves for MGDG, DGDG, and ALA used as reference standards and the estimation of their concentrations in the samples. C8-DGDG (0.25 mg/mL), C18-MGDG (0.5 mg/mL) and ALA (0.5 mg/mL) in $CHCl_3$-MeOH 2:1 (v/v) were

used as reference standards and calibration curves were established with 10 to 400 ng of MGDG and DGDG.

For FFA and FAEE analysis, migration was performed using Heptane:Diethyl Ether:Formic Acid (55:45:1 v/v/v) as the eluant for neutral lipids. The migration proceeded until about 80% of the plate height, taking around 15 min, followed by drying for 10 min. The plate was then dipped in a staining solution of copper acetate solution and phosphoric acid using a Chromatogram Immersion Device 3. After drying again, it was placed in an oven at 180 ºC for 15 min. The same protocol as for the polar lipids was followed regarding the densitometry analysis, except that ALA (0.5 mg mL^{-1}) and ethyl linolenate (ALAEE; 0.5 mg mL^{-1}) in $CHCl_3$-MeOH 2:1 (v/v) were used as reference standards. Calibration curves were established with 50 to 750 ng of ALA and ALAEE spotted onto the plate.

2.8. Analysis of fatty acid methyl esters by gas chromatography-flame ionization detection (GC-FID)

The fatty acids from *C. reinhardtii* lipids and the free fatty acids (FFA) generated upon digestion were derivatized into FAME by adding 2 mL of BF_3 in methanol to the dried lipid extract mixed with 1 mL heptane as co-solvent and a known amount of pentadecanoic acid (C15:0) as internal standard (IS). The reaction was performed by heating at 105°C for 30 min. After cooling, the FAME were extracted by adding 2 mL of heptane. Samples were shaken, and the upper heptane layer was recovered after phase separation. When required it was concentrated by solvent evaporation under a stream of nitrogen and stored at –20 °C before GC analysis. Samples were analysed by GC using a Thermo Scientific TRACE GC UltraTM Gas Chromatograph equipped with an Agilent Technologies J&W HP-5ms GC Column (5 % phenyl, 95 % dimethylpolysiloxane; 60 m x 0.25 mm ID x 0.25 µm film) and a flame ionization detector (FID). Separation of FAME was achieved by injecting 1 µL of each extract in the split

mode (1/80). The carrier gas was hydrogen (1 mL/min). The oven temperature was hold at 100 °C for 2 min and then a temperature gradient was established, ranging from 100 °C to 225 °C at a rate of 10 °C/min, to 240 °C at a rate of 1 °C/min, to 260°C at a rate of 5°C/min and 300°C at a rate of 30°C/min, before a final hold at 300°C for 10 min. The FID detector was set at 280 °C. The identification of fatty acids was based on the elution time of reference standards including FAME 37 from Supelco and *C. reinhardtii* FAME previously produced and characterized in our laboratory.

2.9 Nuclear magnetic resonance (NMR) spectroscopy

^{1}H and ^{13}C NMR spectra were recorded at 298 K, on a Bruker Avance III 600 MHz spectrometer equipped with a TCI cryoprobe, using Topspin 3.2 software. Spectra were recorded on lipid extracts. A given volume of each extract (500 µL) was evaporated under nitrogen and the dry extract was then re-dissolved in deuterated chloroform (500 µL $CDCl_3$) before NMR analysis. HSQC (heteronuclear single quantum correlation) spectra were recorded to determine proton-carbon single bond correlations. The acquisition time in the ^{1}H dimension of 106.5 ms and in the ^{13}C dimension of 4.2 ms. The spectral with were set to 16 ppm in the ^{1}H dimension centred on water (4.7 ppm) and to 200 ppm in the ^{13}C dimension centred at 110 ppm. 16 scans were accumulated for a total acquisition time of 1 hand 18 min.

2.10. Determination of selected non-enzymatic oxylipins (ng/g) in lipid extracts

Briefly, 500 µL of lipid extract in $CHCl_3$/MeOH (2:1) were transferred into centrifuge tubes and brought to a final volume of 3 mL with the same solvent. Then, 4 µL of an Internal Standards (IS) mixture and 1 mL of water were added. The mixture was vortexed for 30 seconds, followed by the addition of 500 µL of phosphate buffer (pH 2). After another 30 seconds of vortexing, 3 mL of cold $CHCl_3$/MeOH (2:1) were added. The mixture was

homogenized and centrifuged at 2000 rpm for 5 min at 4°C. The lower organic phase was transferred to a Pyrex® tube and concentrated to dryness under a nitrogen stream. Subsequently, the samples were hydrolysed with 950 µL of KOH (1M in H_2O) in a thermostatic mixer set to 100 rpm, alternating between 57°C for 15 seconds and 50°C for 4 seconds, for a total of 30 min at 40°C. After hydrolysis, 1 mL of formic acid solution (40 mM in H_2O) was added to the mixture, which was then loaded onto an SPE cartridge (Oasis Max 3CC 60mg, Waters®). The samples were cleaned by sequentially washing with 1.5 mL of 2% (v/v) NH_3, 1.5 mL of MeOH/formic acid (20 mM, 30:70 v/v), 1.5 mL of hexane, and finally 1.5 mL of hexane/acetate (70:30 v/v). After drying, targeted metabolites were eluted with 2 × 750 µl of hexane/ethanol acid (70:29.4:0.6 v/v/v). The eluates were evaporated under a nitrogen stream and reconstituted in 100 µL of H_2O/ACN (83:17 v/v). The mixture was transferred to a 0.45 µm filtering Eppendorf® tube and centrifuged at 10,000 rpm for 1 min. The filtrate was then ready for injection.

All analyses were carried out using a micro-LC-MS/MS. Extracts were chromatographed on a HALO C18 analytical column (100 × 0.5 mm, 2.7 µm; Eksigent Technologies, CA, USA) using an Eksigent ekspert MicroLC 200 instrument. Mass spectrometry measurements were conducted on an AB Sciex QTRAP 5500 (Sciex Applied Biosystems). The ionization source was electrospray ionization (ESI) in negative mode. Detection of the fragmentation ion products from each deprotonated molecule $[M-H]^-$ was performed in multiple reaction monitoring mode (MRM). Analyte concentrations were determined using calibration curves based on the area ratio of the analytes to the IS. Data processing was carried out using MultiQuant 3.0 software (Sciex Applied Biosystems).

3. Results and Discussion

3.1. *Hydrolysis of galactolipids from whole algal cells by GPLRP2*

The hydrolysis reaction was monitored by lipid extraction and TLC analysis of galactosylated lipids and FFA after incubating *Chlamydomonas* whole cells with GPLRP2.

Control experiments with blanched cells without addition of GPLRP2 allowed visualizing and estimating MGDG and DGDG contents in *C. reinhardtii* cells (Figure 2A, lane 2; Table 1). When GPLRP2 was added (Figure 2A, lane 1), one could see the disappearance of MGDG and DGDG bands, while a band corresponding to monogalactosylmonoglyceride (MGMG) was clearly observed. These results indicate that GPLRP2 can directly hydrolyse the galactolipids from *C. reinhardtii* cells without needing any specific pre-treatment beforehand.

The staining with thymol-sulfuric acid makes ALA visible on the TLC plate of polar lipids, with a yellow colour (Figure 2A, lane 1). The reaction responsible for this color is not yet known, but probably results from a reaction with fatty acid double bonds. Lipolysis and production of FFA was confirmed by analysing neutral lipids and staining them with copper acetate and phosphoric acid (Figure 2B, lane 1).

A control with non-blanched cells and no added GPLRP2 was performed (Figure 2, lane 3). Interestingly, the MGDG and DGDG bands have disappeared compared to the control with blanched cells (Figure 2A, lane 2), suggesting that all galactolipids were digested by endogenous lipases. However, no fatty acid band stained in yellow is observed on the TLC plate for polar lipids (Figure 2A, lane 3). On the TLC plate for neutral lipids (Figure 2B, lane 3), one can see that two bands appear where a single and strong band of FFA appears in the sample of blanched cells incubated with GPLRP2. From these findings and comparison, it can be hypothesized that the FFA released from non-blanched cells were further modified after lipolysis and probably oxidized by endogenous lipoxygenases and non-enzymatic reactions.

In Figure 2B, lane 3, the two bands migrating like FFA could correspond to non-oxidized fatty acids for the upper one and to oxidized and more polar fatty acids for the lower one.

From the quantitative TLC analysis of galactolipids and FFA released from blanched cells by GPLRP2, the conversion rates for the lipolysis reaction were calculated (Table 1). As the initial substrate, microalgae cells contained approximately 278.5 ± 72.1 µmole/g DW of FA equivalents in MGDG and DGDG. After the lipolysis reaction, FFA represented 258.2 ± 8.1 µmole/g DW, i.e. a lipolysis level of 93%. Taking into account the presence of MGMG as an intermediate lipolysis product (14.7 ± 5.2 µmole/g DW), the recovery of fatty acids initially present in *C. reinhardtii* galactolipids reached 98% (Table 1). These results show the ability of GPLRP2 to directly digest galactolipids from whole *Chlamydomonas* cells and convert them into FFA with a high efficiency. It is worth mentioning that we used a cell wall-deficient *C. reinhardtii* strain (CC-4349 cw15 mt+), commonly available at our laboratory for genetic engineering {Gerard, 2022 #7205}. This cell line is characterized by a cell wall produced in minute quantities or absent {Hyams, 1972 #7295}. This may have facilitated the access of GPLRP2 to galactolipids in cell membranes, but it was previously shown that this enzyme can access to and hydrolise galactolipids in whole plant leaves {Amara, 2024 #7184}.

3.2. NMR spectroscopy analysis of C. reinhardtii lipid extracts

NMR spectroscopy analysis was performed on the lipid extract from blanched cells incubated with GPLRP2 for 3 h at 37°C (spectrum 1 in Figure 3). The spectrum was compared to those obtained from blanched cells without added enzyme (spectrum 2 in Figure 3; blank for lipolysis and oxidation), non-blanched cells incubated without added enzyme for 3 h at 37°C (spectrum 3 in Figure 3) and pure ALA.

Specific areas of the ^{1}H-NMR spectra are displayed in Figure 3. In the first area of the spectra (2.6-1.2ppm), the matching pattern between spectrum 1 and the α-CH2 and β-CH2 of ALA standard spectrum is striking. It also matches with the complex multiplet of allylic protons. This only appears in sample 1 spectrum. Other spectra do not show clear signals for ALA, although the spectra indicate, in each case, a complex mixture of lipids. These results are in agreement with the high level of FFA in sample 1 and the large proportion of ALA in *C. reinhardtii* galactolipids {Nguyen, 2013 #7198}.

The absence of clear signals for ALA in the spectrum of non-blanched sample 3 suggests that FFA have been further modified after their release by lipolysis. Several signals indicate an oxidation of fatty acids in this sample. A multiplet at 6.1 ppm indicates dienic proton associated with an hydroxyl group {Liu, 2022 #7200}. This could correspond to the formation of 13-(S)-hydroperoxy linolenic acid (Figure 4). An even stronger evidence of fatty acid oxidation in non-blanched sample 3 is the doublet at ~9.5 ppm {Liu, 2022 #7200} that correlates with a ^{13}C-NMR signal at 194 ppm in the HSQC spectrum (See Figure S1 in Supplementary Information). These chemical shifts are typical of carbonyl carbon bound to an aldehydic proton. This suggests the conversion of fatty acids into hydroperoxides and then aldehydes according to the pathway shown in Figure 4. The doublet could be attributed to a conjugated aldehyde that could result from the isomerization of 3-hexenal into 2-hexenal. The other samples do not show such unshielded ^{13}C signals, which indicates the absence of a carbonyl bound to a proton in those samples.

Finally, the three samples also differ in the 3-5 ppm area of their respective spectra (Figure S2). This area is the expected area for carbohydrate protons, proton in the α position of an alcohol function, and is generally crowded if a sugar is present. Interestingly, sample 1 did not display much signal, especially compared to sample 2 (control without lipolysis). In sample 1, this may reflect the extent of galactolipid lipolysis leading to water-soluble end-products like

MGG and DGG. Indeed, these products are expected to be present in lipid extracts {Sahaka, 2021 #7076} and the galactose initially present in galactolipids remains in the aqueous phase upon lipid extraction.

Sample 2 show signals that could match galactose whilst sample 3 has a great variety of signals in this area that do not quite match galactose. It is possible that endogenous enzymes acted on galactose and degraded it in galactose-like or sugar-like molecules explaining these changes. The TLC analysis shown in Figure 2 (Panel A) confirms that galactose from galactolipids is mainly revealed in sample 2 with MGDG and DGDG, and to a lower extent in sample 1 with MGMG, but not in sample 3.

The NMR analysis led to some interesting findings regarding the comparisons between the three samples. The TLC and NMR analysis both highlight the same conclusions. The formation of free ALA resulting from galactolipid lipolysis by GPLRP2 in sample 1, as well as the oxidation of FFA in sample 3. This oxidation is probably promoted by endogenous enzymes that are otherwise inactivated by blanching.

3.3. Search for non-enzymatic fatty acid oxidation products in C. reinhardtii lipid extracts

Since galactolipids from *C. reinhardtii* contain large amounts of ALA (Table 2) {Nguyen, 2013 #7198}, we also searched for non-enzymatic oxidation products of ALA, the so-called phytoprostanes (PhytoPs) {Galano, 2017 #7229}. Reactive oxygen species (ROS) like the free radical $OH^{\bullet}$ can trigger lipid peroxidation by hydrogen abstraction from PUFAs and the addition of molecular oxygen to form a peroxyl radical {Milne, 2011 #7230}. The produced intermediates can undergo a nonenzymatic series of cyclization, addition of a second molecular oxygen, and reduction to form isoprostanoids (IsoP) {Galano, 2017 #7229}, which are more stable than other peroxidation products, such as aldehydes or peroxyl radicals {Longini, 2017

#7231}. In addition to free radicals, the non-enzymatic formation of isoprostanoids requires the presence of at least three double bonds in the PUFA, such as in ALA, the precursor of PhytoPs {Parchmann, 1998 #7232}.

Six PhytoPs (Figure 5) were identified in lipid extract of *C. reinhardtii* by microLC-MS/MS using a method validated with macroalgae isoprostanoids {Vigor, 2018 #7234}. The highest levels were observed in non-blanched cells (Figure 5A) with 9-F_{1t}-PhytoP, 9−L_{1t}−PhytoP and 9-*epi*-9-F_{1t}-PhytoP being the most represented PhytoPs. On the contrary, the lowest levels of PhytoPs were observed with blanched cells without added enzyme (Controls; Figure 5A). Blanched cells treated with GPLRP2 showed an increased in PhytoP levels compared to controls, especially, with 9−L_{1t}−PhytoP that exceeded the levels found in non-blanched cells (Figure 5A). These results indicate that non-enzymatic oxidation of ALA preferentially occurs on free ALA generated upon lipolysis by either endogenous lipases (non-blanched cells) or GPLRP2 added to blanched cells. When IsoPs were discovered in humans, it was indicated that the non-enzymatic free radical-catalyzed peroxidation of PUFAs initially occurred on fatty acids esterified to phospholipids before IsoPs were subsequently released presumably by phospholipases {Morrow, 1992 #7291}. Regarding PhytoPs, it was assumed that they could be produced according to a similar mechanism on esterified fatty acids. Moreover, some oxidized fatty acids are known to be esterified to galactolipids in in *Arabidopsis thaliana*{Nilsson, 2012 #7293}. However, there is still a debate, on whether oxidation preceeds lipolysis or vice versa. Some studies have shown that lipolysis can be anti- or pro-oxidative depending of various factors {Tatiyaborworntham, 2022 #7292}. Here we show that the lipolysis of *C. reinhardtii* galactolipids is pro-oxidative.

3.4. *Hydrolysis of galactolipids from whole algal cells by FsCut*

The digestion of *C. reinhardtii* cells by FsCut followed the same protocol as the one with GPLRP2 and it was monitored by TLC of both polar (Figure 6A) and neutral lipids (Figure 6B). A band corresponding to MGMG was clearly observed (Figure 6A, lanes 1) when blanched *C. reinhardtii* cells were incubated with FsCut, while the DGDG band disappeared and the intensity of the MGDG band was much reduced (Figure 6A, lanes 1) compared to control without enzyme (Figure 6A, lanes 2). A band corresponding to FFA/ALA was observed at the top of the lanes 1 as well as on the TLC plate for neutral lipid analysis (Figure 6B, lanes 1). These results show the ability of FsCut to digest directly galactolipids from whole *C. reinhardtii* cells and convert them into FFA. The conversion efficiency was however lower compared to that obtained with GPLRP2. After the lipolysis reaction, FFA represented 176.7 ± 5.5 µmole/g DW, i.e. a lipolysis level of 63.5%.

3.5. Alcoholysis of galactolipids from whole algal cells by GPLRP2 and FsCut

The ethanolysis reaction was performed in the presence of a large concentration of ethanol (2.5 M) to generate ethyl esters of the galactolipid fatty acids as previously obtained with the same enzymes acting on whole leaves of various plant species {Amara, 2024 #7184}. Nevertheless, water was still present in the reaction mixture and some hydrolysis could not be avoided. It was therefore expected to observe both FFA and fatty acid ethyl esters (FAEE) as the main products of the reaction. The reactions were monitored by TLC of both polar (Figure 7A and C) and neutral lipids (Figure 7B and D).

In the presence of GPLRP2, a band corresponding to MGMG was visible after 30 min (Figure 7A) while the MGDG band was already faint. Then the MGMG band intensity

decreased with time until it had totally disappeared after 24 h. Bands corresponding to FFA/ALA and FAEE were observed simultaneously (Figure 7B). No DGDG was observed, suggesting that the low levels present in *C. reinhardtii* were rapidly converted into FFA and esters. These results showed that GPLRP2 could convert *C. reinhardtii* galactolipids into FAEE directly from the whole cells.

After quantifying the products of the alcoholysis reaction by TLC and densitometry, the mass of FFA and FAEE detected on the plates was converted into molar concentration and their variations plotted as a function of time (Figure 8A). In the presence of GPLRP2, both FFA and FAEE concentrations increased quickly at the beginning of the reaction with FFA levels that were around 2-fold higher than those of FAEE at 30 min. Then, the FAEE to FFA concentration ratio increased up to 24h, where it reached a value of 1 with a FAEE concentration of 1.92 ± 0.05 mM.

With FsCut, the reaction was slower and monitored for a longer period of 72 h. Bands corresponding to residual MGDG and DGDG were observed until 8 h while MGMG appeared transiently from 4 to 24 hours (Figure 7C). The conversion of galactolipids led to the production of both FFA and FAEE (Figure 7D). Their mass detection was converted into molar concentrations, which were plotted as a function of time (Figure 8B).

Kinetics of FFA and FAEE production by FsCut were slower (Figure 8B) than those observed with GPLRP2 (Figure 8A). Similar levels of FAEE were however reached after 10 h, where the FAEE to FFA ratio reached a value of 0.49. Then, FAEE levels increased up to 72 h, where FAEE concentration was 2.0 ± 0.13 mM and the FAEE to FFA ratio was 0.94.

The choice of 2.5 M for the EtOH concentration and the reaction times were based on previous studies performed with the same enzymes acting on galactolipids from spinach leaves {Amara, 2024 #7184}. Globally, the respective behaviours of GPLRP2 and FsCut are the same,

the kinetics being faster with GPLRP2, but a lower FAEE to FFA molar ratio is reached (around 1 versus 2.3 {Amara, 2024 #7184}). With spinach leaves galactolipids, a FAEE to FFA molar ratio of 1 was reached after 5 and 25 h for GPLRP2 and FsCut, respectively. Therefore, the conditions for producing FAEE from the galactolipids of whole *C. reinhardtii* cells will have to be optimized. Nevertheless, the proof of concept is made that such direct galactolipase-catalysed reaction is possible.

Regarding the potential valorisation of FAEE production, one track is that FAEE of galactolipid PUFA might be easier to separate from biomass than galactolipid themselves. FAEE of omega-3 FA, usually produced from fish oils and containing DHA and EPA, already find various applications as dietary supplements or FDA-approved drugs {Ito, 2015 #7235}. Ethyl linolenate is commonly used in cosmetics as a skin emollient and perfuming agent. It is known for its antibacterial and anti-inflammatory properties {Park, 2014 #7237;Jelenko, 1975 #7238}, acceleration of wound healing, as an effective and clinically-proven anti-acne agent {Charakida, 2007 #7239} and possible anti-melanogenesis activity through the inhibition of tyrosinase promoter activity {Ko, 2018 #7236;Huh, 2010 #7240}. Recently, it has been shown that microalgal-sourced FAEEs have an antiparasitic effect against *Gyrodactylus turnbulli* infection in fish (guppies and barramundi) and they may represent a natural solution for the treatment of fish parasitic diseases {Jawaji, 2024 #7199}.

3.6. In vitro digestion of C. reinhardtii under simulated GI tract conditions

An *in vitro* digestion assay was carried out to determine if the gastrointestinal digestive enzymes can release free fatty acids from the galactolipids present in whole *C. reinhardtii* cells. The reaction was intended to mimic the conditions encountered during digestion in the GI tract, with a gastric step in acidic conditions, pepsin and gastric lipase provided by RGE, and an

intestinal phase with a slightly higher pH and the addition of bile salts along with pancreatic enzymes provided by human pancreatic juice (HPJ). The chosen pH conditions correspond to half-gastric emptying of a meal {Amara, 2019 #6799}and they differ from those recommended by the Infogest standard protocol {Brodkorb, 2019 #6247}. HPJ provided a final pancreatic lipase concentration of 2000 U/mL as recommended by Infogest {Brodkorb, 2019 #6247} and other lipolytic activities, including galactolipase activity displayed by human PLRP2 (HPLRP2) and pancreatic carboxyl ester hydrolase {Salhi, 2020 #6325}. HPLRP2 is present in the HPJ juice sample we used {De Caro, 2004 #4827} and its enzyme properties are similar to those of GPLRP2 {Amara, 2010 #5037}. It is worth remembering that classical pancreatic lipase serves as a reference here but it is not involved in the digestion of galactolipids {Andersson, 1995 #3485;Andersson, 1996 #5878}.

In vitro digestion of galactolipids was monitored by TLC after lipid extraction at various time points (Figure 9). During the gastric phase (0- 30 min), a band corresponding to MGDG was clearly seen (Figure 9A) while DGDG was not detected, probably because of its too low levels after cells dilution. The intensity of the MGDG band did not decreased, as expected because gastric lipase provided by RGE does not display galactolipase activity {Wattanakul, 2019 #6333}.

After the beginning of the intestinal phase (35-90 min), MGDG decreased rapidly and was no more observed after 45 min (Figure 9A and C). A band corresponding to MGMG appeared, reaching a maximum at 60 min (Figure 9A and C). Simultaneously, a band corresponding to FFA was observed using both polar (Figure 9A) and neutral (Figure 9B) lipid staining. After 60 min, at which MGMG was maximum, FFA reached a concentration of 0.2 mM, similar to the initial concentration of MGDG (Figure 9C). One fatty acid out of the two esterified to MGDG was therefore released. Progress in lipolysis was then much slower, which probably reflected the preferential release of the fatty acid at the *sn*-1 position of galactolipids

{Amara, 2010 #5037}. These results are similar to those previously reported on the *in vitro* digestion of galactolipids from pea chloroplast-rich fractions (CRF) {Wattanakul, 2019 #6333}. Then, after 60 min, a slight decrease in MGMG concentration was observed, while FFA still slightly increased. This suggests that more than one acyl chain is released by molecule of MGDG. Additionally, some low levels of FFA might also result from DGDG hydrolysis (not seen on the TLC plates). The duration of the *in vitro* digestion (90 min in total) was chosen from previous studies on meals {Carrière, 2000 #4480} and emulsions {Couedelo, 2015 #5672}, which showed an efficient digestion of TAGs (≥70%). This duration was clearly not long enough to reach a complete digestion of galactolipids. Conditions will have to be adapted for further studies but one can reach the conclusion that galactolipids from whole *C. reinhardtii* cells are bioaccessible to the lipolytic enzymes present in HPJ.

Analysis by GC FID of the FFA released upon *in vitro* digestion allowed comparing them with the FA initially present in *C. reinhardtii*, galactolipids (Figure 10). Overall, the two compositions are similar, except that FFA contain more ALA and less 16:4 n-3. This finding probably reflects the specificity of the galactolipases present in HPJ. Indeed, ALA is preferentially found at the *sn*-1 position in MGDG, while 16:4 n-3 is mainly found at the *sn*-2 position (Table 2) {Nguyen, 2013 #7198}. Again, it seems that fatty acids at position *sn*-1 position are preferentially released in comparison to those at *sn*-2 position, which is known property of PLRP2 {Amara, 2010 #5037;Sahaka, 2024 #7186;Sahaka, 2023 #7079}. However, it is worth noting that 16:4 n-3 was found in tissues of zebrafish fed with *C. reinhardtii*{Darwish, 2023 #7216}, suggesting that fish galactolipases have the ability to release also the fatty acid at the *sn*-2 position and thus complete galactolipid digestion.

The detection of 18:4 n-3 (18:4Δ5,9,12,15) could also derive from lipolytic activities on other polar lipids in which this PUFA is present, such phosphatidylethanolamine (PE) and the betaine lipid 1,2-diacylglyceryl-3-O-4'-(N,N,N-trimethyl)-homoserine (DGTS) {Nguyen, 2013 #7198}. Purified guinea pig and human PLRP2 are known to display a phospholipase A1 activity on PE{Hjorth, 1993 #2452;Sias, 2004 #4848;Record, 2011 #5052}, but their activity on DGTS has never been tested to our knowledge.

4. Conclusion

It was shown that several enzymes with galactolipase activity, GPLRP2, FsCut and galactolipases from HPJ, can directly hydrolyse galactolipids from whole *C. reinhardtii* cells, without prior cell disruption. This was achieved with purified enzymes, as well as under conditions mimicking the complex GI tract contents. Galactolipids from *C. reinhardtii* membranes are therefore bioaccessible to digestive enzymes. This finding supports the bioavailability of *C. reinhardtii* fatty acids observed in zebrafish, with increased levels of ALA and hexadecatrienoic acid (C16: 4-n-3) when the fish diet was enriched with *C. reinhardtii* biomass {Darwish, 2023 #7216}. In this previous study, C16:4n-3, a known trophic marker of green algae{Kelly, 2002 #6273}, appears to be a marker of *C. reinhardtii* galactolipid digestion and absorption in the fish. It could be a perfect marker for future nutritional studies in humans since we show here that *C. reinhardtii* galactolipids can be digested by human enzymes present in HPJ (Figure 9), presumably human pancreatic lipase-related protein 2 (HPLRP2) and carboxyl ester hydrolase/bile salt-stimulated lipase (CEH/BSSL){Salhi, 2020 #6325;Sahaka, 2020 #6763}.

Furthermore, the enzymatic capabilities of galactolipases extend beyond hydrolysis, as they efficiently convert *C. reinhardtii* galactolipid fatty acids into ethyl esters in the presence of

ethanol. This may provide an easier route to recover PUFAs from galactolipids dispersed in microalgal biomass, as previously shown with plant leaves{Amara, 2024 #7184}.

The comparison of blanched, non-blanched and enzyme-treated blanched cells showcased the importance of the blanching procedure to avoid degradation of galactolipids and their PUFAs by endogenous enzymes and non-enzymatic oxidation. Analysis of lipid extract by NMR spectroscopy, corroborating the results obtained by TLC, allowed detecting PUFA oxidation products in extracts from non-blanched cells (Figure 3), suggesting the action of endogenous oxygenases (Figure 4). Phytoprostanes resulting from the non-enzymatic oxidation of ALA were found at higher levels in non-blanched cells than in blanched cells. However, their levels also increased when blanched cells were treated with a galactolipase (GPLRP2). Thus, the non-enzymatic conversion of ALA into PhytoPs preferentially occurs when lipolysis and release of free ALA occurs first. These findings highlight the risk of PUFA release upon lipolysis and further oxidation in the microalgal biomass. They complete other observations showing high levels of FFA in commercial biomasses of *Chlorella sp*. (up to 17.9% of total lipids){Barouh, 2024 #7242} and during wet storage of microalgae {Balduyck, 2016 #7244;Balduyck, 2017 #7243}.

C. reinhardtii is generally recognized as safe (GRAS) for human consumption in the US by FDA{Becker, 2007 #7245} {Fields, 2020 #7246}. It is listed as a novel food in the EU Novel Food status Catalogue (https://ec.europa.eu/food/food-feed-portal/screen/novel-food-catalogue/) but a pre-market authorisation is still required before it can be placed as food on the EU market. Assuming a correct handling of its biomass, it is an interesting source of PUFAs, especially the omega-3 ALA, via the digestion of galactolipids. No need here to optimize the culture and growth conditions of microalgae or modify them by genetic engineering to enrich their contents in PUFA-rich oil (TAGs) since PUFAs are constitutive of their main membrane lipids. It is to be noted here that the strain used here is a cell-wall deficient strain that lacks the

extracellular matrix made carbohydrates and glycoproteins of wild type *C. reinhardtii*. The presence of cellulose wall could affect the kinetic of the access of lipase to the galactolipids. Healthy human gut microbiome possesses cellulolytic activities that should be active concomitantly to HPJ lipolytic enzymes during digestion {Morais, 2024 #7261}. Moreover, microalgae usually accumulate oil under stress conditions, resulting in a reduced growth, while they continuously produce galactolipids for the biogenesis of photosynthetic membranes. However, the digestion of galactolipids has been long ignored compare to that of TAGs. By showing the digestibility of *C. reinhardtii* galactolipids, one can promote the use of this microalga as food.

Declaration of competing interest

The authors declare that there are no conflicts of interest.

Author contribution

Beatriz Fachini and Cassy Gérard were involved in acquisition, analysis and interpretation of data, in drafting the article and revising it critically for important intellectual content. Achille Marchand and Olivier Bornet were involved in acquisition, analysis and interpretation of NMR data, and revising the article critically for important intellectual content. Valérie Gros, Claire Vigor, Camille Oger, Guillaume Reversat and Thierry Durand were involved in acquisition and interpretation of Phytoprostane analysis, and revising the article critically for important intellectual content. Goetz Parsiegla was involved in revising the article critically for important intellectual content. Brigitte Gontero was involved in revising the article critically for important intellectual content. Frédéric Carrière and Hélène Launay were involved in the conception and design of the study, in analysis and interpretation of data, in drafting the article and revising it

critically for important intellectual content. All authors were involved in the final approval of the version to be submitted.

Funding

This work received the financial support of Agence Nationale de la Recherche (France) in the framework of the PHOTOXIN project (ANR N°ANR-22-CE44-0031) and ALGADVANCE project (ANR-23-PEBB-0002) supported by “Programmes et équipements prioritaire de recherche (PEPR), Produits biosourcés et biotechnologies industrielles, carburants durables (B-BEST)”.

Acknowledgements

The PhD thesis of Cassy Gérard was supported by a Doctoral Contract from Aix Marseille Université, France.

Figures

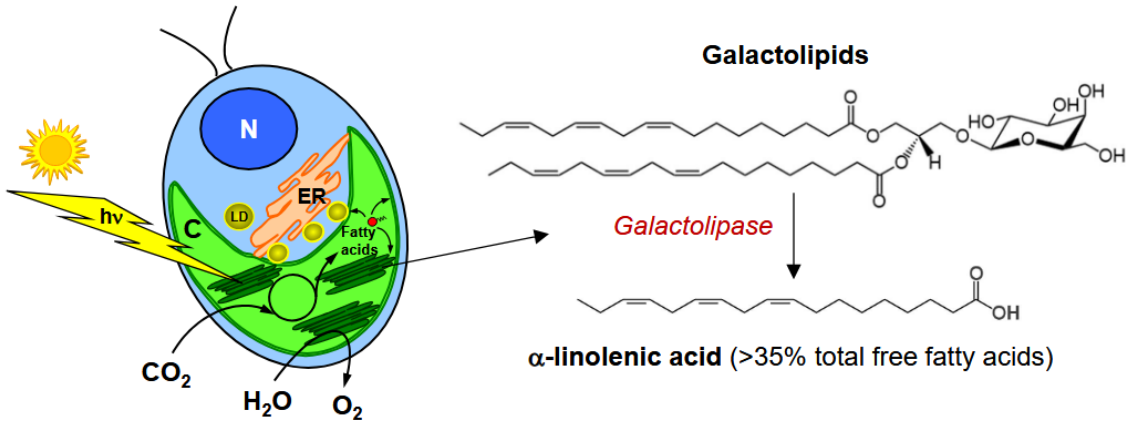


Figure 1. *Organization of C. reinhardtii cell and main galactolipids found in thylakoid membranes*. C, chloroplast; DGDG, digalactosyldiacylglycerol; ER, endoplasmic reticulum; LD, lipid droplet; MGDG, monogalactosyldiacylglycerol; N, nucleus;

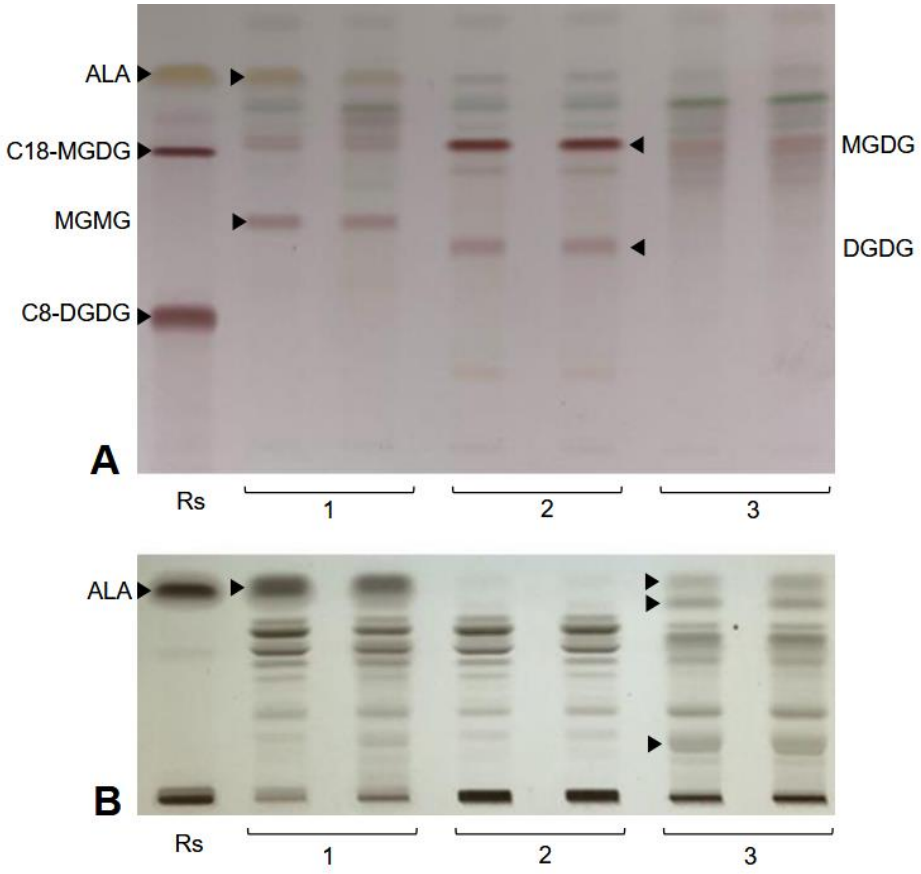


Figure 2. *Direct action of GPLRP2 on whole C. reinhardtii cells*. Panel A: TLC analysis of polar lipids stained with thymol-sulfuric acid. Reference standards (Rs) are α-linolenic acid

(ALA), monogalactosyldistearoylglycerol (C18-MGDG), digalactosyldioctanoyl glycerol (C8-DGDG). Lane 1 (two replicates) shows the lipids extracted after the action of GPLRP2 (3 h at 37°C) on blanched *C. reinhardtii* cells, with one band on the top corresponding to free fatty acids and a band corresponding to monogalactosylmonoacylglycerol (MGMG). Lane 2 (two replicates) is the control showing the lipids extracted from blanched *C. reinhardtii* cells in the absence of added enzyme. Two bands corresponding to MGDG and DGDG are clearly observed. Lane 3 (two replicates) shows the lipid extracted from non-blanched *C. reinhardtii* cells incubated at 37°C for 3 h. Panel B: TLC analysis of neutral lipids stained with phosphoric acid-copper acetate. Reference standard (Rs) is ALA. Lanes 1,2 and 3 correspond to the same samples as in panel A. Lane 1 (two repeats) clearly shows a band corresponding to FFA released from the blanched *C. reinhardtii* cells by GPLRP2. In non-blanched cells (lane 3), two distinct bands of lower intensities are observed in the range of fatty acid elution. An additional band compared to controls (lane 2) and GPLRP2-treated cells (lane 1) appears in the lower part of the lane, which corresponds to an unknown compound with high polarity.

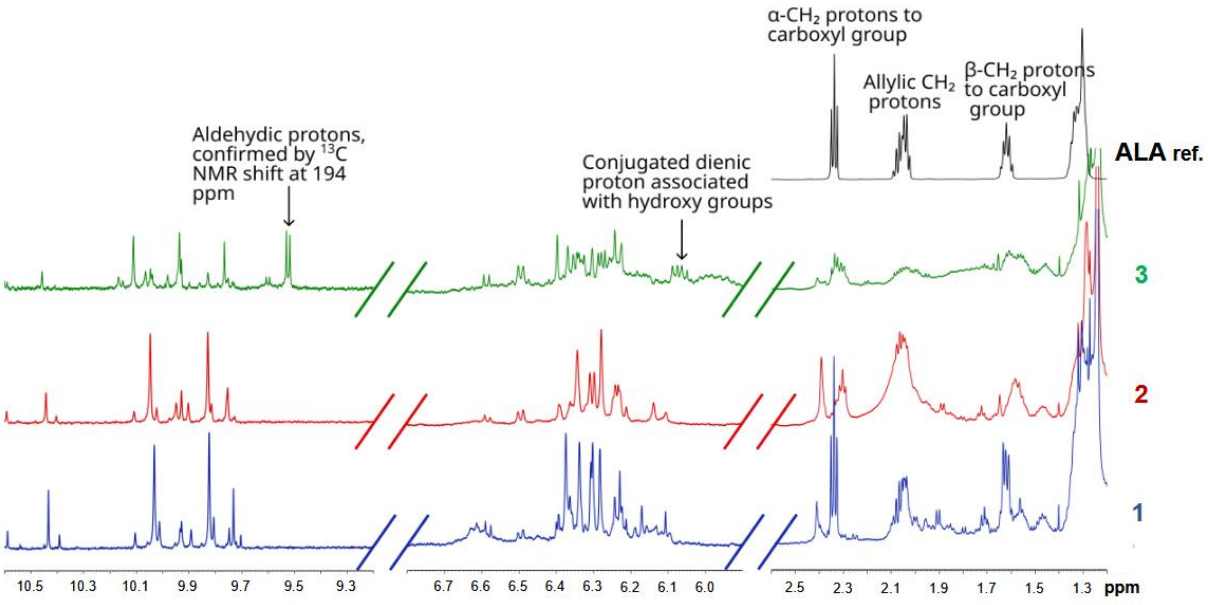


Figure 3. *^{1}H-NMR spectra of C. reinhardtii lipid extracts*. Spectra were acquired for sample 1 (blanched *C. reinhardtii* cells treated with GPLRP2), 2 (blanched *C. reinhardtii* cells without

added enzyme), 3 (non-blanched *C. reinhardtii* cells) and for α-linolenic acid (ALA) reference standard. Only the areas of interest are showed. Chemical shifts of fatty acid oxidation products are observed in spectrum 3. The doublet associated with aldehyde is quite characteristic as it is in an area free of signal in the others samples. The aldehyde signal was confirmed using HSQC which gave a carbon signal at 194 ppm.

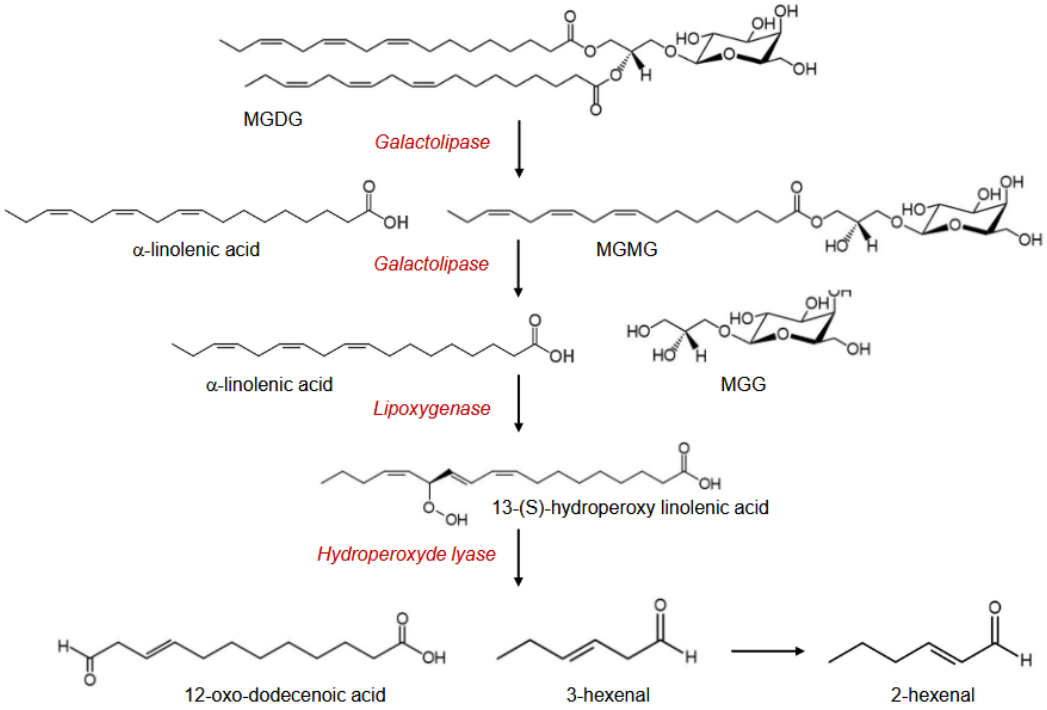


Figure 4. *Oxidation pathway of α-linolenic acid (ALA) released from galactolipids.* Only steps relevant for the interpretation of NMR spectra in Figure 3 are presented. Free ALA results from the enzymatic hydrolysis of MGDG by a galactolipase. It can be further oxidized by lipoxygenase that gives 13-(S)-hydroperoxy linolenic acid, this latter being splitted into 12-oxo-dodecenoic acid and 3-hexenal by hydroperoxide lyase. Finally, 3-hexenal can undergo isomerization to 2-hexenal with its double bond conjugated to the aldehyde group.

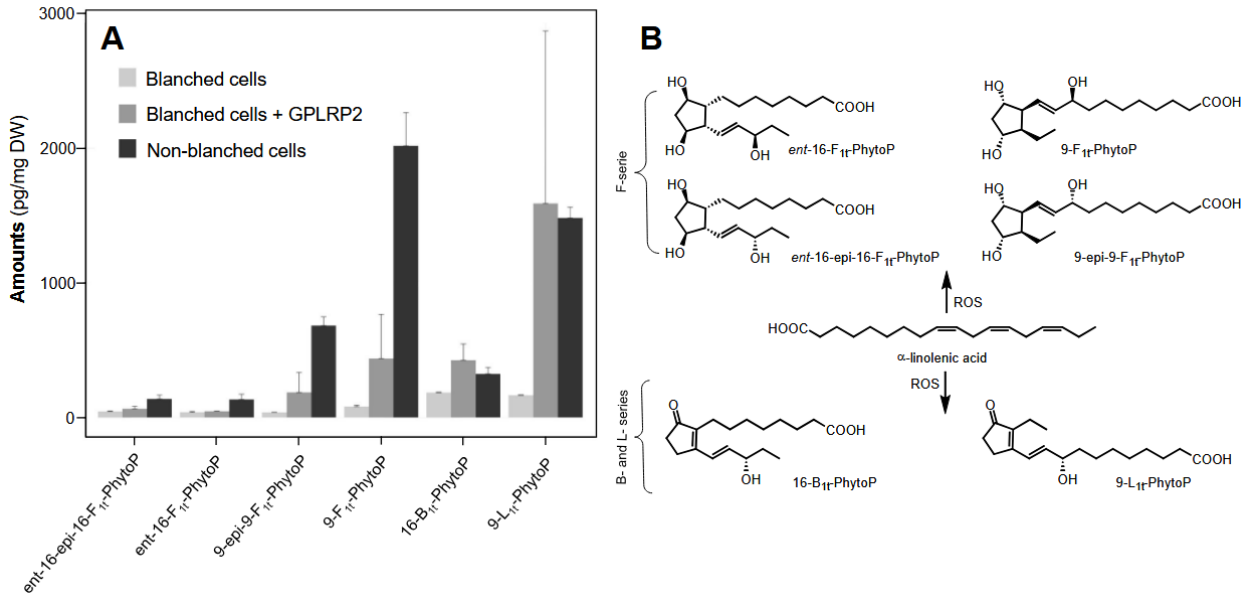


Figure 5. *Identification and quantification of phytoprostanes produced from C. reinhardtii fatty acids.* Panel A: Amounts of phytoprostanes produced from blanched cells (control), blanched cells treated with GPLRP2 and non-blanched cells, all being incubated for 3 h at 37°C. Panel B: Chemical structures of the six identified phytoprostanes resulting from non-enzymatic oxidation of α-linolenic acid.

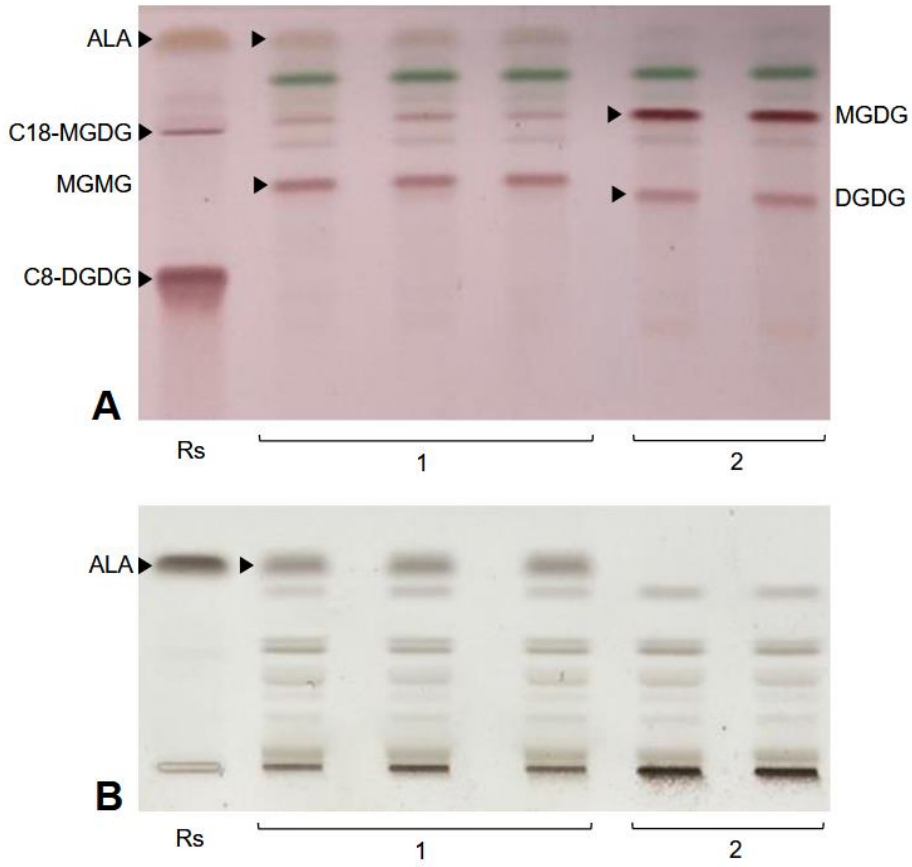


Figure 6. *Direct action of FsCut on whole C. reinhardtii cells*. Panel A: TLC analysis of polar lipids stained with thymol-sulfuric acid. Reference standards (Rs) are α-linolenic acid (ALA), monogalactosyldistearoylglycerol (C18-MGDG), digalactosyldioctanoyl glycerol (C8-DGDG). Lane 1 (three replicates) shows the lipids extracted after the action of FsCut (3 hours at 37°C) on blanched *C. reinhardtii* cells, with one band on the top corresponding to free fatty acids and a band corresponding to monogalactosylmonoacylglycerol (MGMG). Lane 2 (two replicates) is the control showing the lipids extracted from blanched *C. reinhardtii* cells in the absence of added enzyme. Two bands corresponding to MGDG and DGDG are observed. Panel B: TLC analysis of neutral lipids stained with phosphoric acid-copper acetate. Reference standard (Rs) is ALA. Lanes 1 and 2 correspond to the same samples as in panel A. Lane 1 (three replicates) clearly shows a band corresponding to free fatty acids released from the blanched *C. reinhardtii* cells by FsCut.

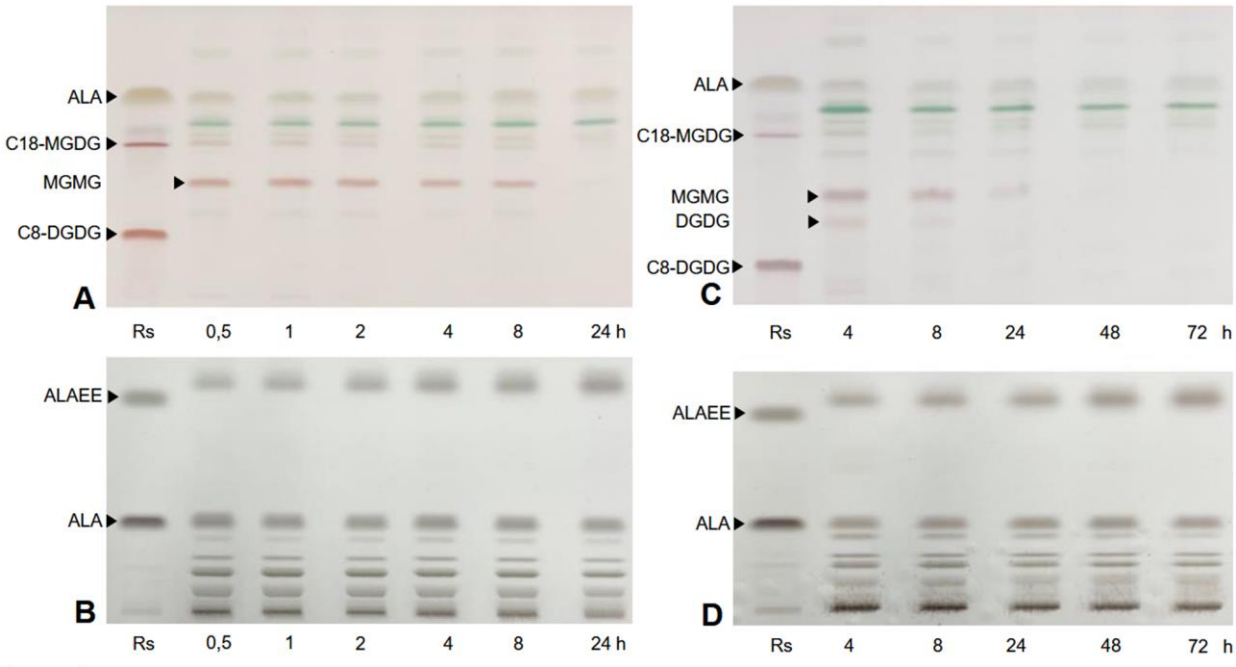


Figure 7. *In situ alcoholysis of galactolipids from* whole *C. reinhardtii cells by GPLRP2 and FsCut.* Panel A: TLC analysis of polar lipids upon reaction with GPLRP2 stained with thymol-sulfuric acid. Reference standards (Rs) are α-linolenic acid (ALA), monogalactosyldistearoylglycerol (C18-MGDG), digalactosyldioctanoyl glycerol (C8-DGDG). Lanes show the lipids extracted upon the action of GPLRP2 at various times from 0.5 to 24 hours in the presence of ethanol. Bands corresponding to FFA and MGMG are observed. Panel B: TLC analysis of neutral lipids upon reaction with GPLRP2 stained with phosphoric acid-copper acetate. Reference standard (Rs) are ALA and α-linolenic acid ethyl ester (ALAEE). Each lane corresponds to the same samples as in panel A. Bands corresponding to FFA and fatty acid ethyl esters (FAEE) are observed. Panel C: TLC analysis of polar lipids upon reaction with FsCut stained with thymol-sulfuric acid. Same Rs as in panel A. Lanes show the lipids extracted after action of FsCut at various times from 4 to 72 hours in the presence of ethanol. Bands corresponding to ALA and MGMG are observed. Panel D: TLC analysis of neutral lipids upon reaction with FsCut stained with phosphoric acid-copper acetate. Same Rs as in panel B. Each lane corresponds to the same samples as in panel C. Bands corresponding to FFA and FAEE are observed.

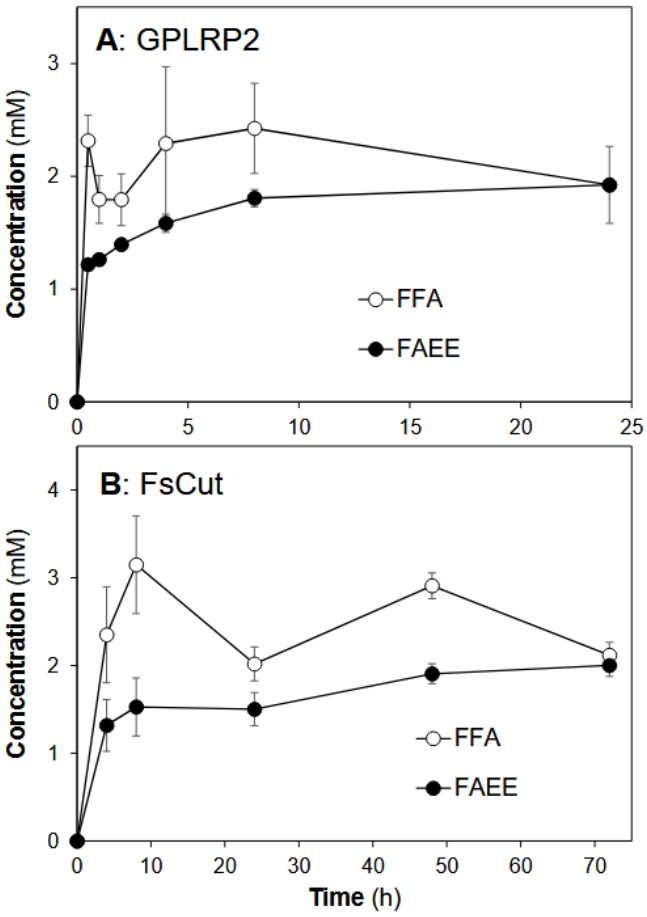


Figure 8. *Kinetics of free fatty acids (FFA) and fatty acid ethyl esters (FAEE) production during the in situ alcoholysis of galactolipids from C. reinhardtii cells by GPLRP2 (A) and FsCut (B).* Panel A: Variation with time in FFA and FAEE concentrations during alcoholysis of *C. reinhardtii* cells by GPLRP2. Panel B: Variation with time in FFA and FAEE concentrations during alcoholysis of *C. reinhardtii* cells by FsCut. Values are means ±SD (n=3).

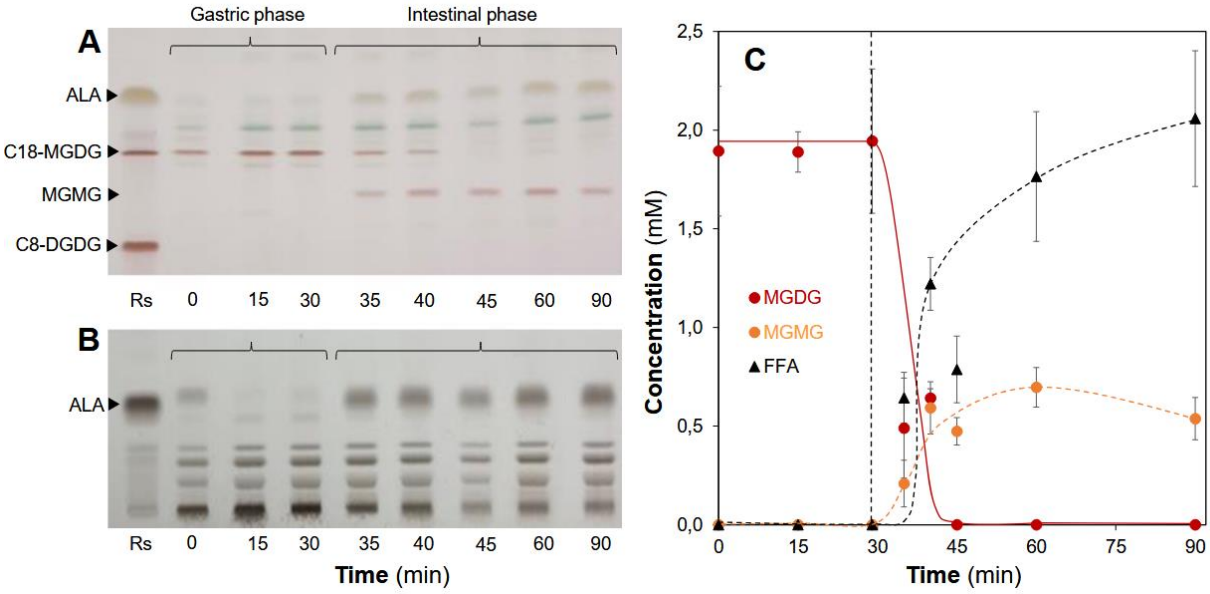


Figure 9. *Two-step in vitro digestion of C. reinhardtii cells*. Panel A: TLC analysis of polar lipids stained with thymol-sulfuric acid. Reference standards (Rs) are α-linolenic acid (ALA), monogalactosyldistearoylglycerol (C18-MGDG), digalactosyldioctanoyl glycerol (C8-DGDG). The three lanes corresponding to time points times 0, 15 and 30 min show the lipid extracts obtained during the gastric phase. The lanes corresponding to time points times 35, 40, 45, 60 and 90 min show the lipid extracts obtained during the intestinal phase. Panel B: TLC analysis of neutral lipids stained with phosphoric acid-copper acetate. Reference standard (Rs) is ALA. Lanes correspond to the same samples as in panel A. They clearly show bands corresponding to FFA after the start of the intestinal phase. Panel C: Time-course variations in the concentration of residual MGDG, MGMG and FFA during the *in vitro* digestion of *C. reinhardtii* cell. Residual MGDG, intermediate monogalactosylmonoacylglycerol (MGMG) and FFA were quantified from the TLC analysis shown in panels A and B from lipid extracts obtained during the gastric (0-30 min) and the intestinal (30-90 min) phases. Values are means ±SD (n=3).

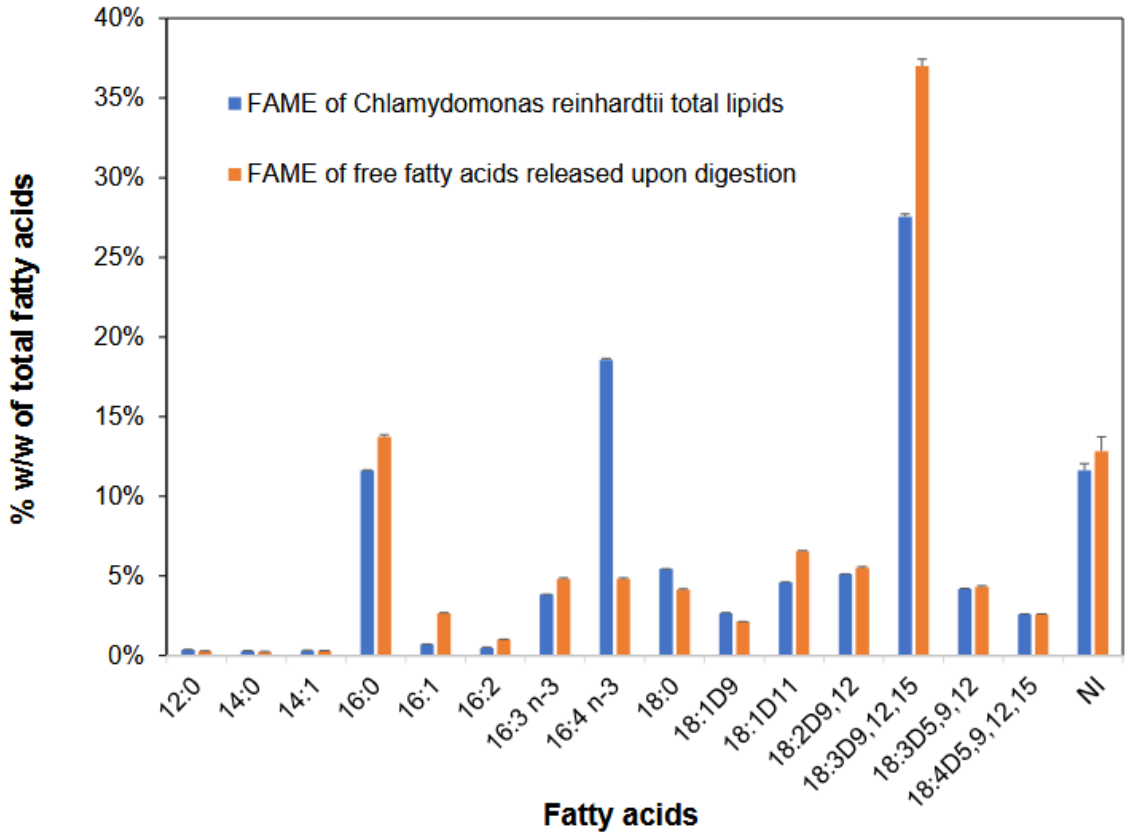


Figure 10. Comparison of fatty acid compositions (FAME) of *C. reinhardtii* total lipids and free fatty acids released upon *in vitro* digestion of algal cells. Fatty acids were derived into FAME using MeOH-BF3 and were separated by GC-FID. NI, non-identified. Values are means ±SD (n=3).

Table 1: *Main galactolipid composition of C. reinhardtii cells and fatty acid recovery upon in situ lipolysis by GPLRP2*. The mass contents expressed in mg per g of cell dry weight (DW) were estimated by TLC analysis. They were converted in µmoles/g DW using the average molar masses of MGDG (737.84 g/mole), DGDG (919.94 g/mole), MGMG (486.16 g/mole) and FFA (269.68 g/mole) estimated from the fatty acid composition of *Chlamydomonas reinhardtii* lipids.

Lipid class		**Contents**		**FA recovery**
		(mg/g DW)	(µmole/g DW)	(% vs total galactolipid FA)
Initial substrate	MGDG	102.4 ± 26.4	138.8 ± 35.8	
	DGDG	0.3 ± 0.2	0.4 ± 0.2	
	FA equivalents		278.5 ± 72.1	
Lipolysis products	FFA	69.6 ± 2.2	258.2 ± 8.1	93 %
	MGMG	7.2 ± 2.5	14.7 ± 5.2	
	FA equivalents		272.9 ± 13.3	98 %

Table 2: *Main molecular species of MGDG and DGDG in C. reihhardtii cells and fatty acid distribution at the sn-1 and sn-2 position of the glycerol backbone*. The relative abundance (%) in the various MGDG and DGDG molecular species in wild-type *C. reinhardtii* strain 137C are from {Nguyen, 2013 #7198}. These data allowed estimating the distribution of fatty acids (FA) at the *sn*-1 and *sn*-2 positions in MGDG and DGDG.

Molecular species	**MGDG**	**DGDG**
18:3α/16:4	67	6
18:2/16:4	10	0.4
18:3α/18:3	5	1
18:3α/16:3	4	18
18:1/16:4	3	
18:2/16:3	2	
18:3α/16:0		32
18:1/16:3	2	0.5
18:3α/16:1	1	3
18:3α/16:2	1	3
18:2/16:1	1	
18:2/16:3	0.8	4
18:2/16:2	0.8	2
18:2/16:1	0.4	1
18:2/16:0		14
18:1/16:2	0.7	0.3
18:1/16:1	0.6	0.7
18:1/16:0	0.5	14
18:0/16:0		0.2
18:0/16:4	0.2	

FA at *sn*-1 in MGDG		**FA at *sn*-2 in MGDG**		**FA at *sn*-1 in DGDG**		**FA at *sn*-2 in DGDG**	
16:0	0	16:0	0.5	16:0	0	16:0	60.2
16:1	0	16:1	3	16:1	0	16:1	4.7
16:2	0	16:2	2.5	16:2	0	16:2	5.3
16:3	0	16:3	8.8	16:3	0	16:3	23.3
16:4	0	16:4	80.2	16:4	0	16:4	6.4
18:0	0.2	18:0	0	18:0	0.2	18:0	0
18:1	6.8	18:1	0	18:1	15.5	18:1	0
18:2	15	18:2	0	18:2	21.4	18:2	0
18:3α	78	18:3	5	18:3α	63.8	18:3	1

References

1. Y. Li-Beisson and G. Peltier, Third-generation biofuels: current and future research on microalgal lipid biotechnology, *OCL - Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, 2013, **20**, D606.

2. Y. Li-Beisson, J. J. Thelen, E. Fedosejevs and J. L. Harwood, The lipid biochemistry of eukaryotic algae, *Prog Lipid Res*, 2019, **74**, 31-68.

3. L. A. Staehelin and G. W. M. van der Staay, in *Oxygenic Photosynthesis: The Light Reactions*, eds. D. R. Ort, C. F. Yocum and I. F. Heichel, Springer, Dordrecht, 1996, vol. 4, pp. 11-30.

4. K. Kobayashi, Role of membrane glycerolipids in photosynthesis, thylakoid biogenesis and chloroplast development, *J Plant Res*, 2016, **129**, 565-580.

5. N. Mizusawa and H. Wada, The role of lipids in photosystem II, *Biochim Biophys Acta*, 2012, **1817**, 194-208.

6. S. Amara, J. Lecomte, B. Barouh, M. Sahaka, D. Lafont, J. D. Rodier, G. Parsiegla, F. Demarne, B. Gontero, P. Villeneuve and F. Carrière, Using Enzymes to Harvest Fatty Acids from Galactosyldiacylglycerols, the Most Abundant Lipids in Plant Biomass, *ACS Sustainable Chemistry and Engineering*, 2024, **12**, 4103−4113.

7. M. Sahaka, S. Amara, J. Wattanakul, M. A. Gedi, N. Aldai, G. Parsiegla, J. Lecomte, J. T. Christeller, D. Gray, B. Gontero, P. Villeneuve and F. Carriere, The digestion of galactolipids and its ubiquitous function in Nature for the uptake of the essential alpha-linolenic acid, *Food Funct*, 2020, **11**, 6710-6744.

8. H. Jimbo, K. Yuasa, K. Takagi, T. Hirashima, S. Keta, M. Aichi and H. Wada, Specific Incorporation of Polyunsaturated Fatty Acids into the sn-2 Position of Phosphatidylglycerol Accelerates Photodamage to Photosystem II under Strong Light, *Int J Mol Sci*, 2021, **22**.

9. G. Horvath, A. Melis, E. Hideg, M. Droppa and L. Vigh, Role of lipids in the organization and function of photosystem II studied by homogeneous catalytic hydrogenation of thylakoid membranes in situ, *Biochimica et Biophysica Acta*, 1987, **891**, 68–74.

10. T. Mock and B. M. Kroon, Photosynthetic energy conversion under extreme conditions--II: the significance of lipids under light limited growth in Antarctic sea ice diatoms, *Phytochemistry*, 2002, **61**, 53-60.

11. F. Guiheneuf, V. Mimouni, L. Ulmann and G. Tremblin, Combined effects of irradiance level and carbon source on fatty acid and lipid class composition in the microalga Pavlova lutheri commonly used in mariculture, *Journal of Experimental Marine Biology and Ecology*, 2009, **369**, 136–143.

12. A. Wacker, M. Piepho and E. Spijkerman, Photosynthetic and fatty acid acclimation of four phytoplankton species in response to light intensity and phosphorus availability, *European Journal of Phycology*, 2015, **50**, 288–300.

13. J. Espinosa-Ramírez, A. C. Mondragón-Portocarrero, J. A. Rodríguez, J. M. Lorenzo and E. M. Santos, Algae as a potential source of protein meat alternatives, *Frontiers in Nutrition*, 2023, **10**, 1254300.

14. R. M. Darwish, M. A. Gedi, P. Akepach, H. Assaye, A. S. Zaky and D. A. Gray, Chlamydomonas reinhardtii is a potential food supplement with the capacity to outperform chlorella and spirulina. , *Applied Science*, 2020, **10**, 6736.

15. A. Masi, F. Leonelli, V. Scognamiglio, G. Gasperuzzo, A. Antonacci and M. A. Terzidis, Chlamydomonas reinhardtii: A Factory of Nutraceutical and Food Supplements for Human Health, *Molecules*, 2023, **28**.

16. M. Verni, C. Demarinis, C. G. Rizzello and E. Pontonio, Bioprocessing to Preserve and Improve Microalgae Nutritional and Functional Potential: Novel Insight and Perspectives, *Foods*, 2023, **12**.

17. R. M. Darwish, K. J. Magee, M. A. Gedi, A. Farmanfarmaian, A. S. Zaky, I. Young and D. A. Gray, Evaluation of Chlamydomonas reinhardtii Microalgae as a Sustainable Feed Supplement and Fishmeal Substitute in Aquaculture with a Positive Impact on Human Nutrition., *Fermentation*, 2023, **9**, 682.

18. A. Amara, D. Lafont, G. Parsiegla, V. Point, A. Chabannes, A. Rousset and F. Carrière, The galactolipase activity of some microbial lipases and pancreatic enzymes., *Eur. J. Lipid Sci. Technol.*, 2013, **115**, 442-451.

19. P. Adlercreutz, C. Virto, M. Persson, S. Vaz, D. Adlercreutz, I. Svensson and E. Wehtje, Enzymatic conversions of polar lipids. Principles, problems and solutions., *Journal of Molecular Catalysis B: Enzymatic*, 2001, **11**, 173-178.

20. P. Persson, I. Svensson and P. Adlercreutz, Enzymatic fatty acid exchange in digalactosyldiacylglycerol., *Chem Phys Lipids*, 2000, **104**, 13-21.

21. J. Wattanakul, M. Sahaka, S. Amara, S. Mansor, B. Gontero, F. Carriere and D. Gray, In vitro digestion of galactolipids from chloroplast-rich fraction (CRF) of postharvest, pea vine field residue (haulm) and spinach leaves, *Food Funct*, 2019, **10**, 7806-7817.

22. M. Sahaka, E. Mateos-Diaz, S. Amara, J. Wattanakul, D. Gray, D. Lafont, B. Gontero, H. Launay and F. Carriere, In situ monitoring of galactolipid digestion by infrared spectroscopy in both model micelles and spinach chloroplasts, *Chem Phys Lipids*, 2023, **252**, 105291.

23. M. Sahaka, O. Bornet, A. Marchand, D. Lafont, B. Gontero, F. Carriere and H. Launay, Monitoring galactolipid digestion and simultaneous changes in lipid-bile salt micellar organization by real-time NMR spectroscopy, *Chem Phys Lipids*, 2024, **258**, 105361.

24. M. Sahaka, S. Amara, J. Lecomte, J. D. Rodier, D. Lafont, P. Villeneuve, B. Gontero and F. Carriere, Quantitative monitoring of galactolipid hydrolysis by pancreatic lipase-related protein 2 using thin layer chromatography and thymol-sulfuric acid derivatization, *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 2021, **1173**, 122674.

25. T. Sugawara and T. Miyazawa, Digestion of plant monogalactosyldiacylglycerol and digalactosyldiacylglycerol in rat alimentary canal, *J Nutr Biochem*, 2000, **11**, 147-52.

26. L. Andersson, C. Bratt, K. C. Arnoldsson, B. Herslof, N. U. Olsson, B. Sternby and A. Nilsson, Hydrolysis of galactolipids by human pancreatic lipolytic enzymes and duodenal contents, *J Lipid Res*, 1995, **36**, 1392-1400.

27. S. Amara, D. Lafont, B. Fiorentino, P. Boullanger, F. Carriere and A. De Caro, Continuous measurement of galactolipid hydrolysis by pancreatic lipolytic enzymes using the pH-stat technique and a medium chain monogalactosyl diglyceride as substrate, *Biochim Biophys Acta*, 2009, **1791**, 983-90.

28. D. Lafont, F. Carriere, F. Ferrato and P. Boullanger, Syntheses of an alpha-D-Gal-(1-->6)-beta-D-Gal diglyceride, as lipase substrate, *Carbohydr Res*, 2006, **341**, 695-704.

29. A. Salhi, S. Amara, P. Mansuelle, R. Puppo, R. Lebrun, B. Gontero, A. Aloulou and F. Carriere, Characterization of all the lipolytic activities in pancreatin and comparison with porcine and human pancreatic juices, *Biochimie*, 2020, **169**, 106-120.

30. L. Sams, S. Amara, P. Mansuelle, R. Puppo, R. Lebrun, J. Paume, J. Giallo and F. Carriere, Characterization of pepsin from rabbit gastric extract, its action on beta-casein and the effects of lipids on proteolysis, *Food Funct*, 2018, **9**, 5975-5988.

31. S. Amara, C. Bourlieu, L. Humbert, D. Rainteau and F. Carriere, Variations in gastrointestinal lipases, pH and bile acid levels with food intake, age and diseases: Possible impact on oral lipid-based drug delivery systems, *Adv Drug Deliv Rev*, 2019, **142**, 3-15.

32. H. M. Nguyen, S. Cuine, A. Beyly-Adriano, B. Legeret, E. Billon, P. Auroy, F. Beisson, G. Peltier and Y. Li-Beisson, The green microalga Chlamydomonas reinhardtii has a single omega-3 fatty acid desaturase that localizes to the chloroplast and impacts both plastidic and extraplastidic membrane lipids, *Plant Physiol*, 2013, **163**, 914-28.

33. J. Liu, Y. J. Wang, X. Y. Huang, X. Z. Li, C. G. Ma and D. J. McClements, NMR Analysis of Lipid Oxidation in Flaxseed Oil-in-Water Emulsions, *J Agric Food Chem*, 2022, **70**, 8417-8429.

34. J. M. Galano, Y. Y. Lee, C. Oger, C. Vigor, J. Vercauteren, T. Durand, M. Giera and J. C. Lee, Isoprostanes, neuroprostanes and phytoprostanes: An overview of 25years of research in chemistry and biology, *Prog Lipid Res*, 2017, **68**, 83-108.

35. G. L. Milne, H. Yin, K. D. Hardy, S. S. Davies and L. J. I. Roberts, Isoprostane generation and function *Chemical Reviews*, 2011, **111**, 5973–5996.

36. M. Longini, E. Belvisi, F. Proietti, F. Bazzini, G. Buonocore and S. Perrone, Oxidative Stress Biomarkers: Establishment of Reference Values for Isoprostanes, AOPP, and NPBI in Cord Blood, *Mediators Inflamm*, 2017, **2017**, 1758432.

37. S. Parchmann and M. J. Mueller, Evidence for the formation of dinor isoprostanes E1 from alpha-linolenic acid in plants, *J Biol Chem*, 1998, **273**, 32650-5.

38. C. Vigor, G. Reversat, A. Rocher, C. Oger, J. M. Galano, J. Vercauteren, T. Durand, T. Tonon, C. Leblanc and P. Potin, Isoprostanoids quantitative profiling of marine red and brown macroalgae, *Food Chem*, 2018, **268**, 452-462.

39. M. K. Ito, A Comparative Overview of Prescription Omega-3 Fatty Acid Products, *P T*, 2015, **40**, 826-57.

40. S. Y. Park, R. Seetharaman, M. J. Ko, D. Y. Kim, T. H. Kim, M. K. Yoon, J. H. Kwak, S. J. Lee, Y. S. Bae and Y. W. Choi, Ethyl linoleate from garlic attenuates lipopolysaccharide-induced pro-inflammatory cytokine production by inducing heme oxygenase-1 in RAW264.7 cells, *Int Immunopharmacol*, 2014, **19**, 253-261.

41. C. Jelenko, M. L. Wheeler, A. P. Anderson, B. D. Callaway and J. C. McKinley, Studies in burns: XIV, Heling in burn wounds treated with Ethyl Linoleate alone or in combination with selected topical antibacterial agents, *Ann Surg*, 1975, **182**, 562-566.

42. A. Charakida, M. Charakida and A. C. Chu, Double-blind, randomized, placebo-controlled study of a lotion containing triethyl citrate and ethyl linoleate in the treatment of acne vulgaris, *Br J Dermatol*, 2007, **157**, 569-574.

43. G. Ko and S. K. Cho, Ethyl linoleate inhibits α-MSH-induced melanogenesis through Akt/GSK3β/β-catenin signal pathway, *Korean Journal of Physiology and Pharmacology*, 2018, **22**, 53-61.

44. S. Huh, Y. S. Kim, E. Jung, J. Lim, K. S. Jung, M. O. Kim, J. Lee and D. Park, Melanogenesis inhibitory effect of fatty acid alkyl esters isolated fromOxalis triangularis, *Biol Pharm Bull*, 2010, **33**, 1242-1245.

45. A. Jawaji, I. K. Goldberg and D. Zilberg, Exploring the use of fatty acid ethyl esters as a potential natural solution for the treatment of fish parasitic diseases, *J Fish Dis*, 2024, DOI: 10.1111/jfd.13991, e13991.

46. A. Brodkorb, L. Egger, M. Alminger, P. Alvito, R. Assuncao, S. Ballance, T. Bohn, C. Bourlieu-Lacanal, R. Boutrou, F. Carriere, A. Clemente, M. Corredig, D. Dupont, C. Dufour, C. Edwards, M. Golding, S. Karakaya, B. Kirkhus, S. Le Feunteun, U. Lesmes, A. Macierzanka, A. R. Mackie, C. Martins, S. Marze, D. J. McClements, O. Menard, M. Minekus, R. Portmann, C. N. Santos, I. Souchon, R. P. Singh, G. E. Vegarud, M. S. J. Wickham, W. Weitschies and I. Recio, INFOGEST static in vitro simulation of gastrointestinal food digestion, *Nat Protoc*, 2019, **14**, 991-1014.

47. L. Andersson, F. Carriere, M. E. Lowe, A. Nilsson and R. Verger, Pancreatic lipase-related protein 2 but not classical pancreatic lipase hydrolyzes galactolipids, *Biochim Biophys Acta*, 1996, **1302**, 236-40.

48. J. De Caro, B. Sias, P. Grandval, F. Ferrato, H. Halimi, F. Carriere and A. De Caro, Characterization of pancreatic lipase-related protein 2 isolated from human pancreatic juice, *Biochim Biophys Acta*, 2004, **1701**, 89-99.

49. S. Amara, N. Barouh, J. Lecomte, D. Lafont, S. Robert, P. Villeneuve, A. De Caro and F. Carriere, Lipolysis of natural long chain and synthetic medium chain galactolipids by pancreatic lipase-related protein 2, *Biochim Biophys Acta*, 2010, **1801**, 508-16.

50. F. Carrière, C. Renou, V. Lopez, J. De Caro, F. Ferrato, H. Lengsfeld, A. De Caro, R. Laugier and R. Verger, The specific activities of human digestive lipases measured from the in vivo and in vitro lipolysis of test meals, *Gastroenterology*, 2000, **119**, 949-60.

51. L. Couedelo, S. Amara, M. Lecomte, E. Meugnier, J. Monteil, L. Fonseca, G. Pineau, M. Cansell, F. Carriere, M. C. Michalski and C. Vaysse, Impact of various emulsifiers on ALA bioavailability and chylomicron synthesis through changes in gastrointestinal lipolysis, *Food Funct*, 2015, **6**, 1726-1735.

52. A. Hjorth, F. Carrière, C. Cudrey, H. Wöldike, E. Boel, D. M. Lawson, F. Ferrato, C. Cambillau, G. G. Dodson, L. Thim and R. Verger, A structural domain (the lid) found in pancreatic lipases is absent in the guinea pig (phospho)lipase, *Biochemistry*, 1993, **32**, 4702-4707.

53. B. Sias, F. Ferrato, P. Grandval, D. Lafont, P. Boullanger, A. De Caro, B. Leboeuf, R. Verger and F. Carriere, Human pancreatic lipase-related protein 2 is a galactolipase, *Biochemistry*, 2004, **43**, 10138-10148.

54. M. Record, S. Amara, C. Subra, G. Jiang, G. D. Prestwich, F. Ferrato and F. Carrière, Bis (monoacylglycero) phosphate interfacial properties and lipolysis by pancreatic lipase-related protein 2, an enzyme present in THP-1 human monocytes., *Biochim Biophys Acta*, 2011, **1811**, 419-430.

55. A. A. Kelly and P. Dormann, DGD2, an arabidopsis gene encoding a UDP-galactose-dependent digalactosyldiacylglycerol synthase is expressed during growth under phosphate-limiting conditions, *J Biol Chem*, 2002, **277**, 1166-73.

56. N. Barouh, J. Wind, V. Chuat, V. Gagnaire, F. Valence, C. Bourlieu-Lacanal and M. Subileau, Variations in Chlorella lipid content in commercial and in-lab produced biomass, *OCL - Oilseeds and fats, Crops and Lipids*, 2024, **31**, 9.

57. L. Balduyck, S. Bijttebier, C. Bruneel, G. Jacobs, S. Voorspoels, J. Van Durme, K. Muylaert and I. Foubert, Lipolysis in T-Isochrysis lutea during wet storage at different temperatures, *Algal Research*, 2016, **18**, 281–287.

58. L. Balduyck, T. Stock, S. Bijttebier, C. Bruneel, G. Jacobs, S. Voorspoels, K. Muylaert and I. Foubert, Integrity of the microalgal cell plays a major role in the lipolytic stability during wet storage, *Algal Research*, 2017, **25**, 516–524.

59. E. Becker, Micro-algae as a source of protein, *Biotechnol. Adv.*, 2007, **25**, 207–210.

60. F. J. Fields, F. Lejzerowicz, D. Schroeder, S. M. Ngoi, M. Tran, D. McDonald, L. Jiang , C. J.T., R. Knight and S. Mayfield, Effects of the microalgae Chlamydomonas on gastrointestinal health, *Journal of Functional Foods*, 2020, **65**, 103738.

SUPPLEMENTARY INFORMATION

Digestion and bioconversion of microalgal galactolipids by direct action of lipolytic enzymes on *Chlamydomonas reinhardtii* biomass

Beatriz Rodrigues Fachini[a], Cassy Gérard[a], Achille Marchand[a], Olivier Bornet[b], Valérie Gros[c], Claire Vigor[c], Camille Oger[c], Guillaume Reversat[c], Thierry Durand[c], Goetz Parsiegla[a], Brigitte Gontero[a], Hélène Launay[a] and Frédéric Carrière[a*]

[a] Aix Marseille Univ, CNRS, UMR7281 Bioénergétique et Ingénierie des Protéines, 31 Chemin Joseph Aiguier, Marseille, France.

[b] NMR Platform, Institut de Microbiologie de la Méditerranée, Aix Marseille Univ, Marseille, France

[c] Institut des Biomolécules Max Mousseron (IBMM), Pôle Chimie Balard Recherche, UMR 5247 CNRS, Université de Montpellier, ENSCN, France

[*]Corresponding authors: carriere@imm.cnrs.fr

Contents:

- Figure S1: HSQC NMR spectra of the lipid extract obtained from non-blanched *Chlamydomonas reinhardtii* cells.
- Figure S2: Zoom on 1H-NMR spectra of *C. reinhardtii* lipid extracts from 3 to 5 ppm.
- Data for Figures 5A, 8A, 8B, 9C and 10

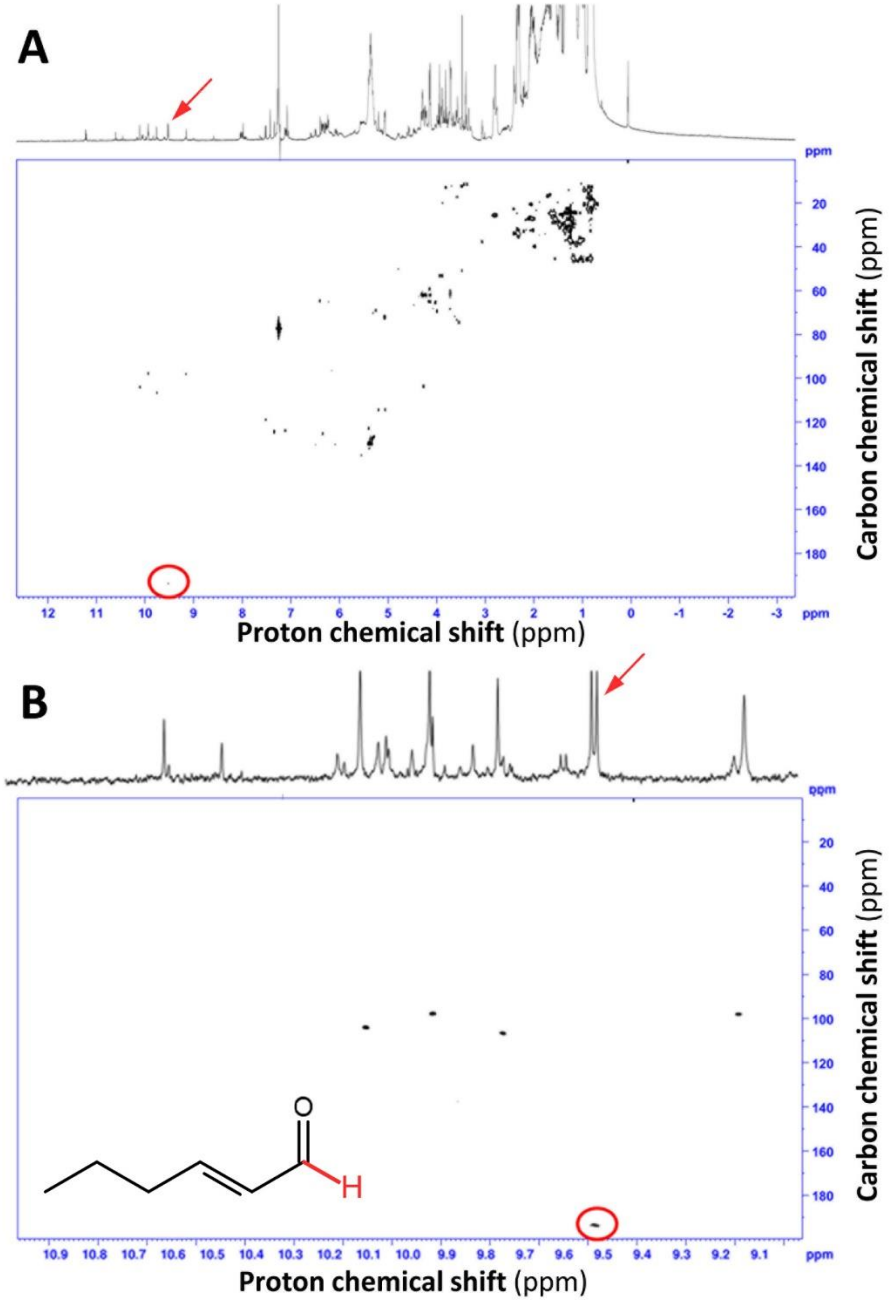


Figure S1: *HSQC NMR spectra of the lipid extract obtained from non-blanched Chlamydomonas reinhardtii cells*. Panel A: whole HSQC spectra, showing all proton-carbon single bond correlations. Panel B: Zoom on the proton dimension from 11 to 9ppm, with the corresponding 1D ^{1}H-NMR spectrum projection. Horizontal dimension is proton chemical shift and vertical is carbon chemical shift. The doublet at ~9.5 ppm that correlates with a ^{13}C-NMR signal at 194 ppm in the HSQC spectrum (red circle) is typical of an aldehydic proton bound to a carbonyl carbon. The doublet can be attributed to a conjugated aldehyde that could be 2-hexenal, a final product of polyunsaturated fatty acid oxidation.

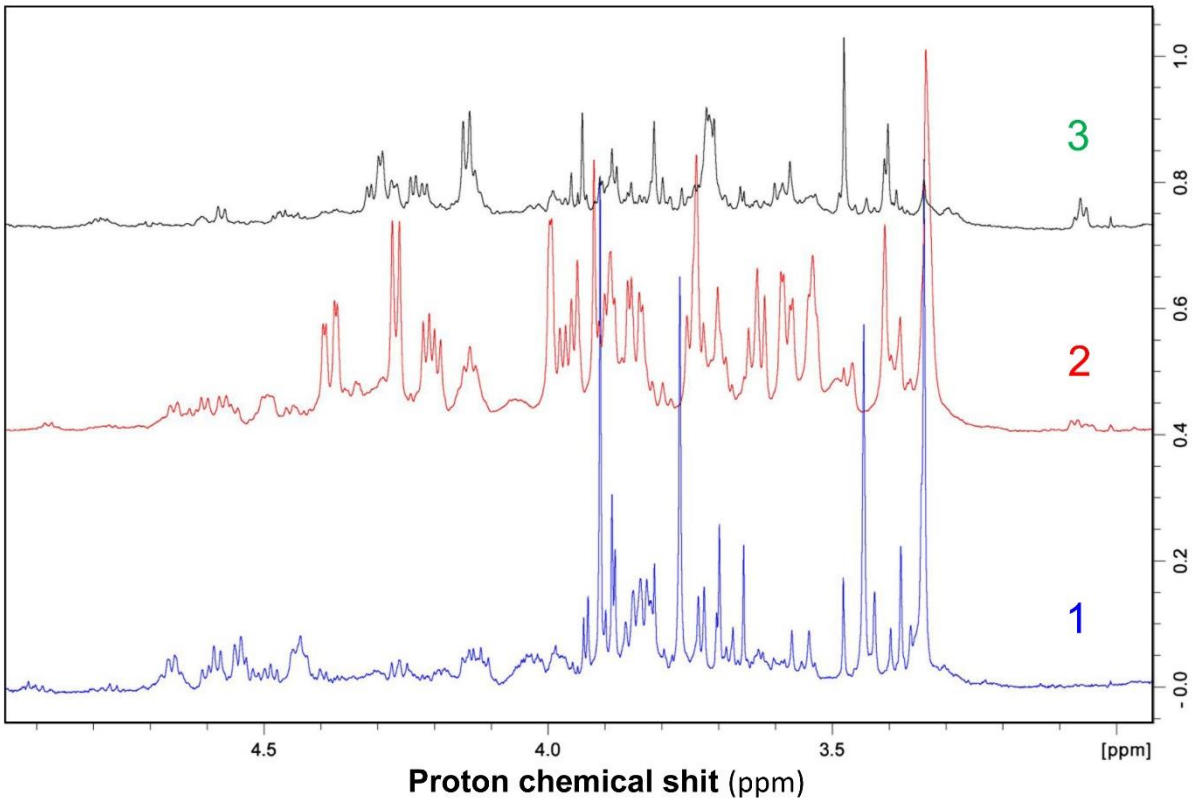


Figure S2: *Zoom on ^{1}H-NMR spectra of C. reinhardtii lipid extracts from 3 to 5 ppm*. Spectra were acquired for sample 1 (blanched *C. reinhardtii* cells treated with GPLRP2), 2 (blanched *C. reinhardtii* cells without added enzyme), 3 (non-blanched *C. reinhardtii* cells).

Data for Figure 5A:

Conditions	Compound Name	Concentration (pg/g)	
		Mean	SD
Blanched cells treated with GPLRP2	ent-16-epi-16-F1t-PhytoP	506.46	203.39
	9-F1t-PhytoP	3461.54	3672.03
	ent-16-F1t-PhytoP	356.31	24.07
	9-epi-9-F1t-PhytoP	1471.14	1639.98
	16-B1t-PhytoP	3354.95	1362.36
	9-L1t-PhytoP	12565.20	14346.56
	18(S)-18-F3t-IsoP	10233.14	2188.47
	PGF2	3129.71	293.72
Blanched cells	ent-16-epi-16-F1t-PhytoP	346.34	48.08
	9-F1t-PhytoP	632.51	126.33
	ent-16-F1t-PhytoP	303.60	71.94
	9-epi-9-F1t-PhytoP	289.82	16.86
	16-B1t-PhytoP	1460.81	26.73
	9-L1t-PhytoP	1301.45	30.17
	18(S)-18-F3t-IsoP	13437.32	360.16
	PGF2	1399.26	473.23
Non-blanched cells	ent-16-epi-16-F1t-PhytoP	1083.56	313.23
	9-F1t-PhytoP	15957.99	2761.94
	ent-16-F1t-PhytoP	1047.67	450.39
	9-epi-9-F1t-PhytoP	5386.08	747.02
	16-B1t-PhytoP	2555.35	536.92
	9-L1t-PhytoP	11723.75	894.70
	18(S)-18-F3t-IsoP	8856.35	626.13
	PGF2	3234.89	452.13

Data for Figure 8A:

Sample	Time (h)	Compound	Concentration (mM)	Mean FFA (mM)	SD FFA
1	0.5	FFA	1.957	2.316	0.226
	1	FFA	1.337	1.795	0.212
	2	FFA	1.320	1.793	0.229
	4	FFA	1.125	2.292	0.679
	8	FFA	1.525	2.425	0.400
	24	FFA	1.236	1.924	0.341
2	0.5	FFA	2.128		
	1	FFA	1.812		
	2	FFA	1.768		
	4	FFA	1.849		
	8	FFA	2.541		
	24	FFA	1.859		
3	0.5	FFA	2.861		
	1	FFA	2.235		
	2	FFA	2.291		
	4	FFA	3.902		
	8	FFA	3.208		
	24	FFA	2.677		
Sample	**Time (h)**	**Compound**	**Concentration (mM)**	**Mean FAEE (mM)**	**SD FAEE**
1	0.5	FAEE	1.156	1.218	0.029
	1	FAEE	1.179	1.263	0.039
	2	FAEE	1.311	1.396	0.049
	4	FAEE	1.408	1.583	0.080
	8	FAEE	1.647	1.807	0.076
	24	FAEE	1.867	1.923	0.049
2	0.5	FAEE	1.218		
	1	FAEE	1.266		
	2	FAEE	1.364		
	4	FAEE	1.593		
	8	FAEE	1.972		
	24	FAEE	1.860		
3	0.5	FAEE	1.279		
	1	FAEE	1.343		
	2	FAEE	1.512		
	4	FAEE	1.748		
	8	FAEE	1.801		
	24	FAEE	2.042		

Data for Figure 8B:

Sample	Point	Compound	Concentration (mM)	Mean FFA (mM)	SD FFA
1	4	FFA	3.611	2.351	0.547
	8	FFA	4.335	3.149	0.557
	24	FFA	2.471	2.018	0.194
	48	FFA	2.595	2.908	0.147
	72	FFA	2.466	2.119	0.145
2	4	FFA	1.327		
	8	FFA	1.972		
	24	FFA	1.668		
	48	FFA	2.910		
	72	FFA	2.009		
3	4	FFA	2.115		
	8	FFA	3.139		
	24	FFA	1.915		
	48	FFA	3.220		
	72	FFA	1.881		
Sample	**Point**	**Compound**	**Concentration (mM)**	**Mean FAEE (mM)**	**SD FAEE**
1	4	FAEE	1.994	1.318	0.295
	8	FAEE	2.330	1.528	0.331
	24	FAEE	1.924	1.503	0.189
	48	FAEE	2.121	1.907	0.113
	72	FAEE	2.131	2.001	0.127
2	4	FAEE	0.758		
	8	FAEE	1.020		
	24	FAEE	1.128		
	48	FAEE	1.649		
	72	FAEE	1.692		
3	4	FAEE	1.201		
	8	FAEE	1.234		
	24	FAEE	1.456		
	48	FAEE	1.950		
	72	FAEE	2.180		

Data for Figure 9C:

Time (min)	Mean MGDG	SD MGDG	Mean MGMG	SD MGMG	Mean FFA	SD ALA
0	1.893	0.329	0	0.000	0	0.000
15	1.889	0.102	0	0.000	0	0.000
29	1.945	0.366	0	0.000	0	0.000
35	0.490	0.253	0.208	0.118	0.643	0.129
40	0.642	0.048	0.592	0.133	1.221	0.134
45	0	0.000	0.474	0.070	0.787	0.169
60	0	0.000	0.697	0.100	1.765	0.329
90	0	0.000	0.538	0.107	2.058	0.344

Data for Figure 10:

Fatty acids	FAME of *Chlamydomonas reinhardtii* total lipids				
	A1	**A2**	**A3**	**Mean**	**SD**
12:0	0.37%	0.35%	0.38%	0.37%	0.01%
14:0	0.27%	0.30%	0.27%	0.28%	0.02%
14:1	0.30%	0.33%	0.32%	0.32%	0.02%
16:0	11.60%	11.66%	11.58%	11.61%	0.04%
16:1	0.71%	0.73%	0.71%	0.71%	0.01%
16:2	0.52%	0.50%	0.45%	0.49%	0.04%
16:3 n-3	3.83%	3.85%	3.84%	3.84%	0.01%
16:4 n-3	18.51%	18.66%	18.50%	18.56%	0.09%
18:0	5.44%	5.44%	5.41%	5.43%	0.02%
18:1D9	2.69%	2.66%	2.66%	2.67%	0.02%
18:1D11	4.58%	4.64%	4.56%	4.59%	0.04%
18:2D9,12	5.12%	5.14%	5.10%	5.12%	0.02%
18:3D9,12,15	27.52%	27.74%	27.43%	27.56%	0.16%
18:3D5,9,12	4.20%	4.21%	4.21%	4.21%	0.01%
18:4D5,9,12,15	2.59%	2.61%	2.56%	2.59%	0.03%
NI, non-identified	11.73%	11.17%	11.99%	11.63%	0.42%
	FAME of free fatty acids released upon digestion				
	B1	**B2**	**B3**	**Mean**	**SD**
12:0	0.29%	0.28%	0.29%	0.28%	0.00%
14:0	0.23%	0.25%	0.24%	0.24%	0.01%
14:1	0.30%	0.30%	0.30%	0.30%	0.01%
16:0	13.85%	13.74%	13.60%	13.73%	0.12%
16:1	2.69%	2.66%	2.64%	2.67%	0.03%
16:2	1.00%	1.01%	1.03%	1.01%	0.01%
16:3 n-3	1.87%	1.85%	1.81%	4.80%	0.06%
16:4 n-3	4.86%	4.81%	4.73%	4.80%	0.06%
18:0	4.17%	4.16%	4.10%	4.14%	0.04%
18:1D9	2.13%	2.13%	2.14%	2.13%	0.01%
18:1D11	6.55%	6.58%	6.47%	6.53%	0.05%
18:2D9,12	5.56%	5.53%	5.43%	5.51%	0.07%
18:3D9,12,15	37.30%	37.21%	36.51%	37.00%	0.43%
18:3D5,9,12	4.36%	4.35%	4.27%	4.33%	0.05%
18:4D5,9,12,15	2.59%	2.61%	2.56%	2.59%	0.03%
NI, non-identified	12.26%	12.39%	13.87%	12.84%	0.90%