

Physiologie membranaire et moléculaire du chloroplaste

Rapport Hcéres

► **To cite this version:**

Rapport d'évaluation d'une entité de recherche. Physiologie membranaire et moléculaire du chloroplaste. 2013, Université Pierre et Marie Curie - UPMC, Centre national de la recherche scientifique - CNRS. hceres-02031100

HAL Id: hceres-02031100

<https://hal-hceres.archives-ouvertes.fr/hceres-02031100>

Submitted on 20 Feb 2019

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



agence d'évaluation de la recherche
et de l'enseignement supérieur

Section des Unités de recherche

Evaluation de l'AERES sur l'unité :
Physiologie Membranaire et Moléculaire du
Chloroplaste

sous tutelle des établissements et
organismes :

Université Paris 6 – Pierre et Marie Curie

Centre National de la Recherche Scientifique





agence d'évaluation de la recherche
et de l'enseignement supérieur

Section des Unités de recherche

Le Président de l'AERES

Didier Houssin

Section des Unités
de recherche

Le Directeur

Pierre Glaudes



Notation

À l'issue des visites de la campagne d'évaluation 2012-2013, les présidents des comités d'experts, réunis par groupes disciplinaires, ont procédé à la notation des unités de recherche relevant de leur groupe (et, le cas échéant, des équipes internes de ces unités). Cette notation (A+, A, B, C) a porté sur chacun des six critères définis par l'AERES.

NN (non noté) associé à un critère indique que celui-ci est sans objet pour le cas particulier de cette unité ou de cette équipe.

- Critère 1 - C1 : Production et qualité scientifiques ;
- Critère 2 - C2 : Rayonnement et attractivité académique ;
- Critère 3 - C3 : Interaction avec l'environnement social, économique et culturel ;
- Critère 4 - C4 : Organisation et vie de l'unité (ou de l'équipe) ;
- Critère 5 - C5 : Implication dans la formation par la recherche ;
- Critère 6 - C6 : Stratégie et projet à cinq ans.

Dans le cadre de cette notation, l'unité de recherche concernée par ce rapport a obtenu les notes suivantes.

- Notation de l'unité : **Physiologie Membranaire et Moléculaire du Chloroplaste**

| C1 | C2 | C3 | C4 | C5 | C6 |
|----|----|----|----|----|----|
| A+ | A+ | A+ | A+ | A+ | A+ |



Rapport d'évaluation

Nom de l'unité : Physiologie Membranaire et Moléculaire du Chloroplaste

Acronyme de l'unité :

Label demandé : UMR

N° actuel : UMR 7141

Nom du directeur
(2012-2013) : M. Francis-André WOLLMAN

Nom du porteur de projet
(2014-2018) : M. Francis-André WOLLMAN

Membres du comité d'experts

Président : M^{me} Claire REMACLE

Experts :

M. Jean-François BRIAT, Montpellier

M^{me} Roberta CROCE, Amsterdam, Pays-Bas

M. Eric LELIEVRE, absent excusé, Angers (représentant du CNU)

M. Soufian OUCHANE, Orsay (représentant du CoNRS)

M. Jean-David ROCHAIX, Genève, Suisse

M. Norbert ROLLAND, Grenoble

Délégué scientifique représentant de l'AERES :

M. Steven BALL

Représentant(s) des établissements et organismes tutelles de l'unité :

M. Thierry GAUDE, CNRS

M^{me} Catherine JESSUS, UPMC



1 • Introduction

Historique et localisation géographique de l'unité :

Le laboratoire de Physiologie membranaire et moléculaire du chloroplaste est localisé 13, rue Pierre et Marie Curie à 75005 PARIS, dans l'Institut de Biologie Physico-Chimique (IBPC). L'IBPC a été fondé en 1927 et inauguré en 1930. Il regroupe 5 laboratoires (laboratoire de Biologie physico-chimique des protéines membranaires, laboratoire de Biochimie théorique, laboratoire de Biologie moléculaire et cellulaire des eucaryotes, laboratoire de Physiologie membranaire et moléculaire du chloroplaste, laboratoire d'Expression génétique microbienne) et est dirigé par M. Francis-André WOLLMAN depuis 2006. Le laboratoire de Physiologie membranaire et moléculaire, fondé par M. Pierre JOLIOT au début des années 60, est également dirigé par M. Francis-André WOLLMAN. Quatre personnes assurent la gestion du groupe : une secrétaire assure la gestion administrative, tandis que 3 autres sont responsables respectivement de l'instrumentation scientifique, de la banque génétique et de la préparation des milieux.

Sur la période d'évaluation, entre le 1^{er} janvier 2007 et le 30 juin 2012, date de l'élaboration du rapport, le nombre de postes permanents est resté relativement stable. Le nombre de maîtres de conférence reste inchangé (2) avec le départ et l'arrivée d'une personne, de même que le nombre de directeurs de recherche du CNRS (5) et le nombre de personnel ITA (5), avec le départ et l'arrivée de 2 personnes. On constate le départ d'un chargé de recherche au CNRS pendant la période (3 à 2).

En terme de postes non permanents, durant la même période (1^{er} janvier 2007 et le 30 juin 2012), il y a eu 7 thèses soutenues. Une dernière thèse a été soutenue en septembre 2012, et il reste un doctorant dans l'équipe au moment de la visite du laboratoire en décembre 2012. Il y eu 8 postdoctorants qui ont passé au moins 12 mois pendant la période et on en dénombre 4 au 30 juin 2012.

Le laboratoire possède une expertise unique de la photosynthèse, depuis la dissection du mécanisme de transfert des électrons au sein des protéines jusqu'à la mise en place de l'appareil photosynthétique. Son bilan scientifique est remarquable et se traduit par la publication de nombreux articles dans des journaux à haut facteur d'impact et de nombreuses conférences sur invitation dans les congrès les plus prestigieux du domaine. Outre les aspects de recherche fondamentale, le laboratoire est également actif dans le domaine du transfert et de l'exploitation du savoir car il possède un brevet et de bonnes connections avec de petites firmes. Sur la période, le laboratoire a obtenu une dizaine de contrats au niveau national et international. Son rayonnement scientifique est attesté par l'accueil de nombreux visiteurs éminents du domaine de la photosynthèse venus collaborer de façon étroite avec le laboratoire.

Équipe de Direction :

M. Francis-André WOLLMAN

Nomenclature AERES :

SVE2_LS3, SVE1_LS1, SVE1_LS2



Effectifs de l'unité :

| Effectifs de l'unité | Nombre au 30/06/2012 | Nombre au 01/01/2014 | 2014-2018 Nombre de produisants du projet |
|--|----------------------|----------------------|--|
| N1 : Enseignants-chercheurs titulaires et assimilés | 2 | 2 | 2 |
| N2 : Chercheurs des EPST ou EPIC titulaires et assimilés | 6 | 6 | 6 |
| N3 : Autres personnels titulaires (n'ayant pas d'obligation de recherche) | 4 | 4 | |
| N4 : Autres enseignants-chercheurs (PREM, ECC, etc.) | | | |
| N5 : Autres chercheurs des EPST ou EPIC (DREM, Post-doctorants, visiteurs etc.) | 7 | 5 | 5 |
| N6 : Autres personnels contractuels (n'ayant pas d'obligation de recherche) | 1 | 1 | |
| | 20 | 18 | 13 |
| Taux de producteurs | 100% | | |

| Effectifs de l'unité | Nombre au 30/06/2012 | Nombre au 01/01/2014 |
|---|----------------------|----------------------|
| Doctorants | 2 | |
| Thèses soutenues | 7 | |
| Post-doctorants ayant passé au moins 12 mois dans l'unité * | 8 | |
| Nombre d'HDR soutenues | 1 | |
| Personnes habilitées à diriger des recherches ou assimilées | 7 | 6 |



2 • Appréciation sur l'unité

Points forts et possibilités liées au contexte :

La force de l'unité repose sur sa multidisciplinarité et sa cohésion. Par des approches très variées, passant de la biophysique à la génétique moléculaire, l'unité a acquis une expertise unique au monde dans le domaine de la photosynthèse, depuis la dissection du mécanisme de transfert des électrons au sein des protéines jusqu'à la mise en place de l'appareil photosynthétique.

Points à améliorer et risques liés au contexte :

La gestion des ressources humaines pourrait représenter un problème dans les années à venir. Au niveau des personnels permanents, il serait hautement souhaitable que deux chercheurs soient recrutés, l'un pour participer au développement de la biophysique en biologie marine et l'autre pour assurer le support bioinformatique. Par ailleurs, la gestion et le développement de l'instrumentation, indispensables pour maintenir le niveau d'excellence du groupe dans le domaine de la biophysique, devront être assurés.

Le recrutement d'étudiants en thèse semble difficile (une seule thèse en cours actuellement), alors que l'unité assure un encadrement excellent et qu'elle participe à un module de cours en M2 à l'UPMC. L'amélioration de la visibilité de l'unité au sein de l'UPMC pourrait passer par le recrutement d'enseignants-chercheurs venant d'autres laboratoires et l'augmentation du nombre de cours dispensés par les membres de l'équipe.

De plus, un vieillissement des cadres est constaté, dont il faudra se préoccuper au cours des années à venir en vue d'assurer la continuité de l'unité et son niveau d'excellence.

Recommandations :

D'un point de vue scientifique, vu la très haute qualité des productions publiées ces dernières années, le comité d'évaluation encourage les membres de l'équipe à répondre aux différents appels européens, notamment ceux de type ERC.

Le comité d'évaluation a été interpellé par certains besoins criants de l'unité en bioinformatique, et en instrumentation. Le premier poste pourrait être envisagé non pas au niveau de l'unité mais au sein de l'institut, spécialement avec l'arrivée de gros projets comme Dynamo et Cascis. Au niveau de l'instrumentation scientifique, l'unité est performante mais cette performance repose sur la collaboration étroite avec un ingénieur à la retraite. Une solution à long terme devra être trouvée.

Enfin, le comité est préoccupé par la pyramide des âges. Pour assurer la pérennité de la structure telle qu'elle fonctionne actuellement, le prochain contrat devra être mis à profit pour assurer la continuité et anticiper le changement de direction.



3 • Appréciations détaillées

Appréciation sur la production et la qualité scientifiques :

Le laboratoire est centré sur l'étude de la fonction photosynthétique et de l'expression génétique et l'assemblage protéique dans le chloroplaste. L'un des points remarquables est que l'unité est extrêmement performante sur l'ensemble de ses recherches, avec 97 publications pour un total de 9 chercheurs permanents. Différents faits marquants illustrent cette recherche de haut niveau: démonstration de la dispensabilité du cycle Q dans le CytB6f (Nat Comm 2, 301 2011), caractérisation mécanistique du processus CES (par exemple Plant Cell 23, 333, 2011), mise en évidence d'interactions entre chloroplaste et mitochondries (par exemple Proc Natl Acad Sci 106, 15979, 2009), identification de facteurs d'assemblage de l'hème ci (par exemple J Cell Biol 185, 1195, 2009). La grande cohésion de l'équipe et sa multidisciplinarité sont sans aucun doute des facteurs prépondérants permettant cette production scientifique remarquable.

Appréciation sur le rayonnement et l'attractivité académiques :

Le rayonnement scientifique de l'unité est attesté par le fait que celle-ci a accueilli de nombreux postdoctorants, et une dizaine de professeurs éminents du domaine de la photosynthèse venant de différents pays (allemands, japonais, italiens, américains, ...) dont 2 professeurs en sabbatique. L'unité a également collaboré avec plusieurs laboratoires français et ses membres ont été invités à donner 58 conférences dont 49 au niveau international. L'unité a obtenu 5 ANR durant la période, toutes coordonnées par un membre de l'équipe, à l'exception d'une seule ; elle coordonne un labex (Dynamo) et participe à un equipex (CASCICE), 2 projets européens et un PICS avec les Etats-Unis. Le dynamisme de l'équipe est donc remarquable.

Appréciation sur l'interaction avec l'environnement social, économique et culturel :

L'unité prend part de manière active aux grands débats de société qui relèvent de l'activité scientifique (agriculture, énergie solaire). Elle participe au transfert des connaissances vers le secteur privé (obtention d'une licence d'exploitation d'un brevet du CNRS -Biologic, d'un accord de collaboration et de confidentialité avec la firme VIGiCell, création de la firme Beambio). Elle gère également une banque génétique de plus de 500 souches, qu'elle distribue à la demande.

Appréciation sur l'organisation et la vie de l'unité :

L'animation scientifique de même que l'encadrement des chercheurs en thèse et l'accueil des postdoctorants sont excellents. Les réunions sont hebdomadaires et abordent les thèmes scientifiques et de gouvernance et tous les membres de l'unité, y compris le personnel assurant la gestion y participent. Tous les membres mettent en avant l'ambiance chaleureuse de l'unité et le très haut niveau scientifique.

Tous les chercheurs, y compris les non-permanents, sont amenés à participer à des congrès internationaux (Gordon conference, International Conference on Photosynthesis, ...) et leur passage au sein de l'unité constitue un tremplin effectif pour leur future carrière professionnelle. La gouvernance est basée sur la mutualisation des budgets, ce qui renforce la cohésion du groupe. Le personnel est encouragé à suivre des formations (par exemple en management, passage au niveau ingénieur).

Appréciation sur l'implication dans la formation par la recherche :

L'unité organise un module M2 de l'UMPC (NV606) au cours duquel elle accueille une dizaine d'étudiants au laboratoire pendant une quinzaine de jours. Durant la période, le laboratoire a également accueilli une quarantaine de stagiaires pour des séjours de 1 à 40 semaines.



Appréciation sur la stratégie et le projet à cinq ans :

Les différents thèmes ont été tous considérés comme excellents (voir détails plus bas des appréciations détaillées). Ils sont soutenus par différents crédits.

Le thème 'régulations physiologiques de la photosynthèse' a été très bien reçu, spécialement la partie membranaire qui est très originale, très prometteuse et pour laquelle l'équipe pourra apporter une contribution substantielle. La partie de biochimie structurale pourrait être soutenue par des collaborations extérieures et/ou le recrutement d'un nouvel investigateur. Ce nouvel investigateur sera en outre capable de développer une ligne de recherche en biologie marine en se basant sur la solide expérience du groupe en biophysique et l'apport en biologie moléculaire du groupe Falciatore/Bowler.

Le thème 'expression génétique et assemblage du chloroplaste' est très fort, très bien structuré et novateur. L'équipe dispose des outils moléculaires pour développer la recherche. Il s'agit d'un projet à l'avant-garde de ce qui se fait au niveau international.

Le thème 'modifications post-traductionnelles dans le chloroplaste' est divisé en 3 parties, bien intégrées, et tous les outils sont disponibles pour ces études. Il dispose d'une bonne complémentarité avec une autre équipe de l'IBPC pour les approches protéomiques portant par exemple sur l'étude de la nitrosylation et modifications redox au sein des chloroplastes.

Le thème 'Approches génomique et bioinformatique du métabolisme photosynthétique' est fédérateur, au service du groupe et de la communauté scientifique au sens large. Il est déjà soutenu par des collaborations nationales et internationales (projet européen) qui financent le salaire d'un bioinformaticien. La présence d'un bioinformaticien de façon pérenne au sein de l'unité est hautement souhaitée et indispensable pour maintenir et assurer le niveau d'excellence de l'unité.

En résumé, le comité dans son ensemble trouve que le projet de l'unité est excellent, ambitieux et soutenu par les moyens humains et financiers adéquats. L'approche multidisciplinaire, intégrant biophysique et génétique, est hautement appréciée.



4.1 • Analyse thème par thème (selon organigramme de 2007)

Thème 1 :

Dynamique des transferts de protons et d'électrons dans la membrane photosynthétique

Nom du responsable :

M. Fabrice RAPPAPORT

• Appréciations détaillées

Le thème est divisé en 3 lignes de recherche distinctes. La ligne 1 est aussi subdivisée en sous-projets, ciblant des composants spécifiques de la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons.

Ligne 1 : Relation structure/fonction des composants individuels de la chaîne photosynthétique de transfert d'électrons.

Dans cette ligne de recherche, les complexes membranaires participant aux réactions de la phase claire de la photosynthèse ont été étudiés dans le but de comprendre les détails de transfert d'électrons au niveau moléculaire.

Le photosystème II (PSII) représente le composant majeur de l'appareil photosynthétique comme il est capable de réaliser la photolyse de l'eau. Ceci entraîne un intérêt majeur, non seulement pour la communauté scientifique liée à la photosynthèse mais aussi pour la communauté des 'bioinorganiciens' qui essaient de reproduire ses caractéristiques uniques dans le but d'une production durable d'énergie. Dans son étude du transfert d'électrons au sein du PSII, le groupe utilise une nouvelle approche incluant des 'mutants inorganiques' pour poser des questions spécifiques qui ne peuvent être résolues par l'approche classique de mutagenèse dirigée. Cette approche permet d'introduire de très petits changements dans l'environnement, ce qui limite l'effet perturbateur de la mutation. L'exemple le plus brillant est l'étude de la tyrosine Yz du PSII, dans lequel cet acide aminé est remplacé par une fluorotyrosine. Ceci a permis de dissocier le transfert de protons du transfert d'électrons, montrant que le premier précède toujours le second dans le PSII, à la différence de ce qui est observé avec les composants classiques. Une approche similaire a été utilisée pour étudier le rôle du Ca et du Cl dans l'oxydation de l'eau, conduisant à une nouvelle hypothèse sur leur fonction.

Cytochrome b6f (Cytb6f): ce complexe est largement étudié à l'IBPC, qui a contribué de manière essentielle à la compréhension de sa structure et de sa fonction. Le nouveau défi dans l'étude du Cytb6f est la compréhension du rôle de cofacteurs additionnels, tel que l'hème ci, qui a été observé dans sa structure. En utilisant une approche de mutagenèse dirigée, le groupe a montré que le rôle de l'hème ci est de contrôler la réactivité des quinones par la modulation de leur potentiel rédox. Des études visant à mieux comprendre le rôle de cet hème ont amené à la construction d'un mutant à un seul hème qui peut toujours croître en conditions phototrophes, démontrant que le cycle Q peut être court-circuité.

Photosystème I (PSI) : l'étude du PSI se concentre sur la cinétique de transfert secondaire des électrons et est réalisée en collaboration avec d'autres groupes.

Ligne 2 : Régulation du transfert cyclique d'électrons

Cette ligne de recherche est dédiée à la compréhension de la transition entre le transfert cyclique (CEF) et le transfert linéaire d'électrons (LEF). Un nouvel acteur du CEF a été identifié, PGRL1, chez les plantes et les algues. Une nouvelle hypothèse sur le rôle des transitions d'état et du CEF dans la photoprotection du PSII et du PSI a été proposée.

Ligne 3 : Analyse de la chaîne de transfert mitochondriale d'électrons

Il s'agit d'une nouvelle ligne de recherche intéressante, dans laquelle les effets de l'organisation supramoléculaire des complexes dans la membrane et la diffusion des transporteurs mobiles d'électrons sont étudiés grâce au développement d'une nouvelle méthode d'analyse développée au laboratoire.



Conclusion :

- Avis global sur le thème :

Le thème est très intéressant, spécialement la partie traitant du PSII et de la photolyse de l'eau. La revue écrite par M. Fabrice RAPPAPORT et M. Bruce DINER en 2008 a été très bien reçue. L'approche utilisée dans toutes ces études est originale et la recherche est soutenue par des mesures précises et des interprétations solides. Toutes les lignes de recherche ont été publiées récemment dans des journaux à haut impact (Nat Comm, Febs Letters, J American Soc, J Biol Chem, Energy and Environmental Sciences, Bioch Biophys Acta). S'il est encore trop tôt pour juger l'impact effectif de ces publications, il convient cependant de souligner que l'animateur de ce thème a été invité comme conférencier à pratiquement toutes les conférences majeures de photosynthèse durant les 5 dernières années. Ceci atteste de l'importance de la recherche conduite dans ce thème et de la haute réputation du groupe concerné.

- Points forts et possibilités liées au contexte :

Ce thème est construit sur une grande expérience de la mesure du transport d'électrons, qui repose sur la capacité de réaliser des mesures de grande qualité et des interprétations solides. Le réseau étoffé de collaborations et la reconnaissance internationale du groupe permettent de garder le spectre des activités de recherche très large. La force du groupe repose aussi dans sa multidisciplinarité, ce qui permet d'aborder la question scientifique sous des aspects différents.

- Points à améliorer et risques liés au contexte :

Alors que les études du PSII et du CytB6f représentent le point fort de ce thème et sont clairement liées aux thèmes du laboratoire dans son ensemble, les études du PSI et du CEF dépendent pour le moment largement de collaborations externes.

- Recommandations :

La recommandation est d'exploiter les formidables possibilités données par la multidisciplinarité du groupe dans son ensemble. La collaboration étroite entre ses membres peut représenter une plus value aussi dans le cadre des études du PSI et du CEF.



4.2 • Analyse thème par thème (selon organigramme de 2007)

Thème 2 : Physiologie comparative et écologie fonctionnelle de la photosynthèse

Nom du responsable : M. Giovanni FINAZZI

• Appréciations détaillées

La séquence du génome de nombreux organismes photosynthétiques a permis de mettre en évidence la variabilité structurale des différents complexes impliqués dans la fonction photosynthétique. Cette observation est à la base du projet de ce thème qui avait pour but principal de caractériser au niveau fonctionnel les conséquences de cette variabilité génétique entre espèces photosynthétiques.

Deux axes principaux, subdivisés en sous-éléments structurent ce thème :

Axe 1: Etude comparative de la fonction photosynthétique chez différentes algues unicellulaires.

- ***Balance du rapport ATP / NADPH: flux cyclique d'électrons, Etat de transition et interactions entre respiration et photosynthèse.***

Un des mécanismes permettant la modulation du flux d'excitons entre le PSI et le PSII est la transition d'état (ST), qui consiste en une redistribution du LHCII qui s'associe au PSI dans les régions non granaires à l'état phosphorylé, et au PSII au niveau des grana quand il est non phosphorylé. L'absence de phénotype chez un mutant de *Chlamydomonas* altéré dans la kinase responsable de la phosphorylation du LHCII n'est interprétable que si la balance ATP / NADPH via la transition d'état est compensée par d'autres voies métaboliques. La comparaison d'un mutant ST, d'un mutant affecté dans la respiration mitochondriale et du double mutant affecté au deux niveaux a en fait permis de montrer que la synthèse d'ATP mitochondrial peut compenser les conséquences de la mutation ST sur la synthèse d'ATP d'origine photosynthétique. Le dialogue chloroplastes / mitochondries a été étudié plus avant en analysant le flux cyclique d'électrons dans des conditions aérobies et les flux provenant de la chlororespiration. Ceci a permis de mettre en évidence que la contribution de la chlororespiration au flux cyclique d'électrons ne dépassait pas 20 %.

- ***Variabilité fonctionnelle en réponse à des changements environnementaux : exemple de l'algue marine *Ostreococcus****

Ostreococcus a la particularité d'être composé de différents écotypes ayant des performances photosynthétiques contrastées. Deux de ces écotypes, l'un vivant en surface près des côtes dans des zones riches en fer (OTH95) et l'autre vivant en profondeur dans des zones pauvres en fer (RCC809) ont été utilisés. L'analyse de la chaîne de transport d'électrons de ces deux souches a révélé que RCC809 avait une taille supérieure de l'antenne de son PSII, et un contenu moindre de PSI. Cette situation est favorable à la production d'espèces réactives de l'oxygène et au développement d'un stress oxydatif. Cette situation potentiellement délétère est en fait prévenue par un niveau élevé d'expression de PTOX qui favorise un cycle eau / eau autour du PSII.

- Avis global sur le thème : Axe 1

Travaux de grande qualité sur l'analyse de la variabilité fonctionnelle de l'appareil photosynthétique des algues unicellulaires. Intégration remarquable chloroplastes / mitochondries en ce qui concerne l'explication de l'absence de phénotype de mutants de transition d'état. Utilisation judicieuse de la variabilité naturelle chez *Ostreococcus* ayant permis de montrer le processus adaptatif qui permet à une souche profonde de ne pas être soumise à des dommages radicalaires dûs au turn-over élevé du PSII.

Cette qualité est attestée par 4 publications dans des revues internationales à comité de lecture (3 PNAS et un BBA)



Axe 2: Photoprotection et quenching non-photochimique

- Relation entre dynamiques du NPQ et ΔpH induit par la lumière chez les plantes

Il est bien établi chez les plantes que la réponse aux fortes intensités lumineuses est en partie prise en charge par le quenching non photochimique (NPQ), permettant de dissiper l'excès d'énergie lumineuse en chaleur, diminuant ainsi son transfert aux pièges photochimiques. Le paramètre entraînant le NPQ est l'augmentation du pH du lumen qui active ainsi la Violaxanthin DeEpoxydase responsable de la conversion de la violaxanthine en zéaxanthine. En utilisant différents mutants affectés dans la conversion des caroténoïdes, il a pu être montré que le NPQ et le ΔpH se relâchent en même temps et que ce relâchement est contrôlé par le ratio ATP / ADP + Pi. En conditions transitoires, le NPQ présente une phase d'attente, dépendante de la taille de l'antenne du PSII et de l'importance du flux cyclique des électrons.

- La réponse à la lumière des diatomées : un nouveau membre de la famille des complexes collecteurs de lumière recrutés dans la famille des protéines de stress.

Le NPQ joue un rôle plus important pour dissiper l'énergie chez les diatomées que chez les plantes terrestres. La diatomée *P. tricornutum* possède des gènes de la famille de protéines LHCSR (Light Harvesting Complex Stress related). Un de ces gènes (LHCSR1) est constitutivement exprimé. L'invalidation de ce gène montre qu'il joue un rôle important pour l'établissement du NPQ. Il est également important dans la variabilité naturelle de la photoréponse observée chez différents écotypes, ayant des niveaux différents de LHCSR1, corrélés à leur capacité de NPQ.

● Avis global sur le thème : Axe 2

Travaux de grande qualité sur la compréhension de la mise en place et de la régulation du NPQ tant chez les plantes terrestres que chez les diatomées. A noter un usage bien raisonné à la fois des mutants de plantes et de la variabilité naturelle des diatomées. Utilisation judicieuse de la variabilité naturelle chez *Ostreococcus* ayant permis de montrer le processus adaptatif qui permet à une souche profonde de ne pas être soumise à des dommages radicalaires dûs au turn-over élevé du PSII.

La qualité de cet axe est attestée par 2 publications dans des revues internationales à comité de lecture (PNAS).

Conclusion :

● Points forts et possibilités liées au contexte :

Le point fort de ce thème réside dans l'utilisation de la variabilité structurale naturelle des complexes de l'appareil photosynthétique de différents organismes pour analyser le fonctionnement des mécanismes d'adaptation à des conditions de stress, tel que la transition d'état et le NPQ. La prise en compte de l'intégration des interactions entre organites cellulaires (mitochondrie, chloroplaste) constitue également un point remarquable.

● Points à améliorer et risques liés au contexte :

La diversité des organismes utilisés (plantes, *Chlamydomonas*, diatomées, *Ostreococcus*) a favorisé une approche horizontale très intéressante, mais potentiellement génératrice de dispersion et de perte de compétitivité par rapport à des concurrents centrés sur un seul organisme modèle.

● Recommandations :

L'utilisation de la variabilité génétique pourrait être envisagées selon deux stratégies différentes :

- 1- conduire une approche horizontale sur plusieurs modèles différents (*Chlamydomonas*, plantes, diatomées, *Ostreococcus* ...);
- 2- intégrer les différentes approches sur un ou deux modèles au maximum (une plante, une algue), en les choisissant sur (i) leurs différences de comportement dans leur utilisation respective de la transition d'état et du NPQ, (ii) les ressources génétiques disponibles pour ces deux modèles (mutants mais aussi richesse de la variabilité naturelle des écotypes).

Il serait intéressant de conduire une réflexion pour mesurer les avantages et les inconvénients entre ces deux options non nécessairement exclusives.



4.3 • Analyse thème par thème (selon organigramme de 2007)

Thème 3 : Régulation de l'expression protéique du chloroplaste

Nom du responsable : M. Yves CHOQUET

• Appréciations détaillées

Les interactions entre le nucléo-cytosol et le chloroplaste jouent un rôle essentiel dans la biogenèse et la régulation de l'appareil de photosynthèse. Ces interactions interviennent dans les différentes étapes de l'expression des gènes du chloroplaste, en particulier lors de la maturation des ARNs messagers, de leur stockage et de leur dégradation ainsi que de leur traduction. L'un des points forts de l'équipe a été la mise en évidence et la caractérisation du processus CES qui permet un assemblage coordonné des sous-unités d'un même complexe. L'analyse a été particulièrement poussée avec la caractérisation du mode de fonctionnement des facteurs MCA1 et TCA1 impliqués dans la stabilité et la traduction de l'ARN messenger *petA*, encodant le cytochrome *f*. A côté de ces deux facteurs, plusieurs autres facteurs ont été étudiés, notamment MDH1 et TDA1 pour l'ATPsynthase et enfin MRL1 pour la Rubisco. Ces travaux ont fait l'objet de plusieurs publications dans des journaux scientifiques de très haut niveau (*Plant J*, *Plant Cell*, *Mol Cell Biol*, *PNAS*, *EMBO J*).

Conclusion :

Le laboratoire a réussi à identifier, cloner et exprimer différents facteurs CES. Ceci constitue une avancée scientifique très significative. Il dispose maintenant de tout un arsenal de facteurs dont il pourra étudier le mode de fonctionnement dans des conditions environnementales différentes (lumière, température, milieu de croissance). Ces études devraient sensiblement améliorer notre compréhension de l'expression des gènes du chloroplaste et de l'assemblage des complexes photosynthétiques.



4.4 • Analyse thème par thème (selon organigramme de 2007)

Thème 4 : Biogenèse des cofacteurs et des holoprotéines du chloroplaste

Nom du responsable : M^{me} Catherine DE VITRY

• Appréciations détaillées

La thématique de recherche “Biogenèse des cofacteurs et des holoprotéines du chloroplaste” correspondait à un axe de l’unité porté, dans le cadre du contrat 2007-2012, par un DR CNRS et deux personnels sur contrat (un post-doc et un PhD). Le bilan des travaux est centré sur l’identification des facteurs nucléaires (CCB) impliqués dans la maturation d’un hème ci identifié précédemment dans la structure du CytB6f. Les approches génétiques développées ont permis d’identifier 5 facteurs CCB impliqués dans cette fonction. On note aussi que le chercheur impliqué dans ces travaux, a aussi réalisé une étude ciblant la régulation de l’expression des protéines chloroplastiques, et en particulier le rôle de la protéase FtsH. Les résultats des travaux de cette partie constituent un des faits marquants de la recherche effectuée dans cette Unité au cours du contrat écoulé.

Conclusion :

• Avis global sur le thème :

Ces travaux sont très originaux. Ils ont une très bonne visibilité nationale et internationale, comme l’atteste la qualité des revues dans lesquelles ils ont été publiés.

• Points forts et possibilités liées au contexte :

Il existe une excellente capacité des différents collègues de l’unité à développer en toute autonomie des approches complémentaires de génétique, biochimie, biologie moléculaires et biophysiques pour répondre à une question biologique de premier plan.



4.1 bis • Analyse thème par thème (projet d'Unité 2014-2018)

Thème 1 : Régulations physiologiques de la photosynthèse

Nom du responsable : M. Fabrice RAPPAPORT

• Appréciations détaillées

Ce thème, tout comme celui de la période passée est divisé en 3 parties qui seront analysées séparément.

Ligne 1 : Relation structure/fonction

L'étude du PSII repose sur les avancées de la période précédente et sur le fait qu'en 2010, une nouvelle structure à 1.9 Å a été publiée, détaillant la liaison à l'eau. De nouveaux mutants seront construits et combinés à des substitutions d'ions pour élucider le mécanisme de photolyse de l'eau. Le groupe est en excellente position pour apporter des contributions majeures à ce sujet très étudié pour le moment.

La continuation de l'étude du Cytb6f (hème ci) est aussi très importante et prometteuse, notamment par le fait de l'existence de la forte collaboration à l'intérieur de l'unité, qui peut conduire à la construction des mutants *ad hoc*. L'analyse en parallèle des enzymes respiratoires et photosynthétiques est intéressante et bien soutenue par une collaboration interne au sein de l'IBPC. L'intention d'étudier le système photosynthétique *in vitro* sur des supercomplexes purifiés est en principe une bonne stratégie, bien que très compétitive.

Ligne 2 : Conséquences fonctionnelles de l'organisation supramoléculaire des protéines membranaires

Cette ligne de recherche est un sujet nouveau et beaucoup de laboratoires dans le monde y sont intéressés. De fait, il a été observé que la fonctionnalité de l'appareil photosynthétique est largement dépendante de sa flexibilité et sa capacité à répondre à un environnement fluctuant. Ceci signifie que l'organisation des complexes à l'intérieur des membranes doit jouer un rôle majeur. En ce qui concerne les membranes photosynthétiques, l'analyse sera faite *in vitro* et *in vivo*, en utilisant une série de mutants de *Chlamydomonas* déjà disponible - chez lesquels l'organisation/composition de l'appareil photosynthétique est altérée- ou en développant de nouveaux outils qui conduisent à modifier les rapports entre le LEF et le CEF. Cette ligne de recherche représente une nouvelle étape dans l'étude du CEF et des transitions d'état.

Par ailleurs, l'analyse des membranes mitochondriales sera réalisée grâce au développement d'une nouvelle méthode qui permettra de mesurer la diffusion des transporteurs d'électrons. Un des buts de cette recherche est de déterminer le rôle du respirasome et de l'arrangement supramoléculaire des complexes. Il faut souligner qu'il y a un réel besoin d'études fonctionnelles de ces supercomplexes, car pour le moment, toutes les hypothèses sont basées sur des analyses structurales.

Ligne 3 : Biologie marine des espèces de phytoplancton et idiosyncrasies photosynthétiques

Cette nouvelle ligne de recherche a pour but d'explorer la diversité des organismes photosynthétiques pour déterminer comment leurs adaptations et leur acclimatation ont influencé leur succès. Une partie de ce projet est dédiée à la recherche de signatures spécifiques de la photosynthèse qui permettent de différencier les organismes. La seconde partie sera dédiée à l'étude du NPQ et de l'acclimatation à la lumière vive chez une série d'organismes qui partagent Lhcx mais vivent dans des environnements complètement différents. Le but de ce projet est de déterminer si ces organismes utilisent les mêmes mécanismes.

Cette recherche est nouvelle bien que dans la suite du thème précédent portant sur l'analyse fonctionnelle de l'appareil photosynthétique. Elle requiert la venue d'un nouvel investigateur avec de l'expérience en biologie marine et en biophysique. Il/elle sera capable de développer cette ligne de recherche en se basant sur la solide expérience du groupe en biophysique et l'apport en biologie moléculaire du groupe Falcitore/Bowler. Cet environnement est optimal pour la personne engagée. L'idée générale est intéressante et l'exploration de nouveaux organismes ne peut qu'enrichir notre compréhension de l'acclimatation et des mécanismes de photoprotection.



Conclusion :

- Points forts et possibilités liées au contexte :

Originalité de la recherche. Intérêt de la communauté scientifique pour les 3 lignes de recherche, en particulier pour la photolyse de l'eau dans le PSII. Possibilité d'approches multidisciplinaire et de collaborations à l'intérieur et à l'extérieur de l'IBPC bien établies.

- Points à améliorer et risques liés au contexte :

Une partie des études proposées requiert la purification de supercomplexes (PSI-LHCII-Cytb6f...respirasome), ce qui reste très compétitif. Les études de l'organisation supramoléculaire des membranes et des protéines membranaires demandent des informations sur l'organisation structurale des complexes et la topologie des membranes. L'expertise en biologie structurale au niveau membranaire ne semble pas être présente pour le moment dans le groupe.

- Recommandations :

Les lignes de recherches proposées requièrent un support croissant en biochimie et en biologie structurale, par comparaison aux lignes de recherche précédentes. Il est donc recommandé de prendre en compte ce point durant la phase de recrutement d'un nouvel investigateur.



4.2 bis • Analyse thème par thème (projet d'Unité 2014-2018)

Thème 2 : Approches génomique et bioinformatique du métabolisme photosynthétique

Nom du responsable : M. Olivier VALLON

• Appréciations détaillées

La thématique de recherche "Génomique et Génétique de *Chlamydomonas*" correspondait à un axe transversal de l'unité. Les travaux se sont focalisés sur 2 types d'approches : i) développement d'outils pour faciliter les approches de génétique directe ou de génétique inverse chez *Chlamydomonas*, et ii) approches de génomique à l'échelle du génome de *Chlamydomonas*.

Les approches génomiques ont été rendues possibles suite au séquençage du génome de *Chlamydomonas*. Lorsque ce génome a été rendu disponible, la communauté nationale et internationale s'est fortement impliquée dans l'annotation du génome de l'algue. La thématique de recherche est très porteuse, dans un contexte international, puisqu'elle vise à fournir à l'ensemble de la communauté des outils et des bases de données qui pourront être exploités pour les analyses fonctionnelles ultérieures.

Sur ces thématiques, la production scientifique de l'unité est scindée en deux parties : i) production d'outils pour faciliter les approches de génétique. Dans ce cadre l'unité a produit 2 articles sur la période 2011-2012 (*Eukaryot Cell*, *Plant Methods*). A ces 2 articles peuvent être ajoutés 7 articles publiés dans de très bonnes à excellentes revues internationales sur la période 2007-2012 (*Science* 2007, 2 x *Genetics* 2008, *Photosynthesis Res* 2010, *Proteomics* 2011 et *Mol Biol Evol* 2012). Ces travaux ont plus particulièrement impliqué un chercheur permanent de l'unité qui a été un acteur majeur de l'annotation du génome de l'algue verte. Sur cette période, la production scientifique correspondant à cette thématique transversale peut donc être considérée comme de très bon niveau. Plusieurs chapitres d'ouvrages (2008) publiés dans "The *Chlamydomonas* Source Book", suite au travail d'annotation important réalisé sur différentes familles de gènes complète la production primaire d'articles scientifiques.

Le porteur de ces thématiques dans l'unité a une très bonne visibilité nationale et internationale. Ceci se traduit par la publications de plusieurs articles de collaboration avec des collègues étrangers, mais aussi par des invitations récurrentes, tant au niveau international (2) qu'au niveau national (3), à donner des conférences dans des congrès ("International *Chlamydomonas* conferences") ou des séminaires sur invitation.

Appréciation sur la stratégie et le projet à cinq ans :

Dans le cadre du projet 2014-2018 de l'unité, cette thématique transversale est désormais identifiée comme l'un des axes de recherche de l'unité. Elle repose désormais sur plusieurs personnels (2 chercheurs et deux personnels sur contrats) :

- Stratégie scientifique : La thématique « Approches génomiques et bioinformatique du métabolisme photosynthétique » est dans la continuité de la recherche exposée dans le bilan. Elle vise à poursuivre l'étude globale de la photosynthèse chez *Chlamydomonas reinhardtii*, à l'échelle du génome entier. Pour ce faire, trois approches complémentaires sont proposées :

1) Développer des outils génétiques permettant d'identifier très rapidement les gènes affectés par des mutations (faciliter les cribles génétiques). Cette approche repose sur les techniques émergentes de séquençage haut débit. En particulier, une base de données de SNPs sera mise en place pour contourner les difficultés liées aux mutations présentes dans les différentes souches couramment utilisées dans les laboratoires de la communauté utilisant le modèle *Chlamydomonas* (Europe, USA).

2) Utiliser des approches génétiques pour identifier (approche systématique) des mutants affectés dans une famille de gènes. L'approche résidera en particulier sur la génération d'une banque de mutants d'insertions chez *Chlamydomonas*. La preuve de concept a été réalisée sur une centaine de mutants (séquençage FSTs). Un financement est recherché pour développer une étude sur plusieurs milliers de mutants. La banque ainsi générée sera exploitable par l'ensemble de la communauté.



3) Générer les séquences des génomes de deux autres algues photosynthétiques et transférer la connaissance issue du modèle *Chlamydomonas* à ces autres modèles (annotation). Améliorer la séquence de référence du génome de *Chlamydomonas* à l'aide du séquençage des génomes des mutants qui seront analysés. Enfin, créer une base de données « omics » ciblant *Chlamydomonas*, au service de la communauté nationale et internationale du domaine.

- Stratégie de recrutement : La thématique est globalement très ambitieuse et au service d'une communauté internationale. Elle est portée au sein de l'unité par un DR2 CNRS, un enseignant-chercheur, 1 IR2 sur contrat et un post-doc. Il faut noter que certains projets seront réalisés en collaboration et avec le soutien de plusieurs autres membres de l'unité (approches ciblant une famille de gènes), mais aussi dans le cadre d'interactions au niveau international (USA, Italie, Canada).

- Stratégie de financement : Pour progresser rapidement, ces stratégies vont impliquer des financements assez importants (séquençage haut débit, personnels, gestion et stockage des souches...). A ce jour, certaines parties du projet ne sont pas encore soutenues financièrement.

Conclusion :

- Points forts et possibilités liées au contexte :

Dynamisme du porteur de la thématique en terme de production scientifique.

Thématique porteuse au niveau national et international au sein de la communauté *Chlamydomonas* qui attend ces outils génétiques et soutiendra assurément la mise en place des bases de données.

Bon réseau de collaborations nationales et surtout internationales (Europe, USA, Canada).

Preuve de concept déjà réalisée pour certaines approches envisagées.

Emergence de domaines applicatifs potentiels sur les algues photosynthétiques qui doivent permettre de financer les projets les plus ambitieux.

- Points à améliorer et risques liés au contexte :

Le seul facteur de risque est clairement affiché dans le projet : la corrélation entre ambition du projet, au service d'une communauté scientifique internationale, et les moyens humains disponibles sur ces différents axes de recherche.

- Recommandations :

Comme signalé dans le projet, les preuves de concept ayant été apportées, identifier des sources de financement (personnels en particulier) pour développer ces approches.



4.3 bis • Analyse thème par thème (projet d'Unité 2014-2018)

Thème 3 : Expression génétique et assemblage protéique chloroplastique

Nom du responsable : M. Yves CHOQUET

Effectifs

• Appréciations détaillées

Le projet est en continuité directe avec les travaux de la période précédente et trois axes le structurent.

Axe 1 : Appareil nucléolytique du chloroplaste

La machinerie nucléolytique du chloroplaste comprend plusieurs endo- et exo-nucléases d'origine procaryotique. Certains transcrits primaires sont polycistroniques et sont maturés par ces nucléases pour donner naissance à des ARNs monocistroniques qui sont traduits par les ribosomes du chloroplaste. Alors que les exonucléases 3'-5' sont relativement bien connues, cela n'est pas le cas pour les exonucléases 5'-3'. Pourtant la RNase J est un candidat potentiel. Cet enzyme a été choisi pour mieux comprendre son mode de fonctionnement par des approches classiques telles que l'expression de la protéine recombinante et la réalisation de tests d'activité *in vitro* sur des ARNs substrats définis, la production d'anticorps et l'étiquetage de la protéine pour permettre la co-purification de ses partenaires *in vivo* ainsi que l'inhibition de son expression par micro ARNs et enfin l'impact de sa répression sur le transcriptome du chloroplaste. Finalement, la recherche d'autres nucléases du chloroplaste est prévue dans ce projet ainsi que l'étude de leur fonction par la génétique inverse.

Ce projet sur le métabolisme de l'ARN du chloroplaste est relativement nouveau pour ce laboratoire et devrait permettre de mieux comprendre le mode de fonctionnement des exonucléases qui attaquent les extrémités 5' des ARNs du chloroplaste. L'étude des ribonucléases 5'-3' est d'une grande importance pour comprendre le métabolisme global de l'ARN des chloroplastes. Alors que les approches biochimiques proposées utilisent des méthodes standards, l'approche génétique choisie est plus originale mais aussi plus risquée. Cela dépendra de la fiabilité des cribles utilisés pour rechercher ces mutants. Ce domaine particulier est assez compétitif avec la présence d'autres équipes qui ont plus d'expertise dans ce domaine particulier. Il faudra donc veiller à trouver une niche nouvelle. A ce sujet, l'insertion de l'équipe dans le consortium Dynamo va créer des synergies nouvelles et prometteuses avec un groupe spécialisé dans l'étude du métabolisme de l'ARN chez les procaryotes.

Axe 2 : Caractérisation des ARNs non-codants du chloroplaste

Les ARNs non-codants du chloroplaste sont encore très mal connus et l'étude proposée pour les identifier et les caractériser est certainement valable surtout en utilisant des approches basées sur le séquençage global de l'ARN.

Ce projet est nouveau et il pourrait apporter des informations nouvelles et importantes sur le rôle des ARNs non-codants dans l'expression des gènes du chloroplaste. Certains de ces ARNs représentent les empreintes de facteurs qui se lient à leur ARN-cible du moins chez les plantes supérieures où leur existence a été démontrée. Ainsi la mise en évidence de tels ARNs pourrait permettre l'identification de nouveaux facteurs impliqués dans l'expression des gènes du chloroplaste. Pour l'instant il n'est pas certain que les ARNs non-codants existent aussi chez les algues vertes. Toutefois l'exploration de cette piste est certainement souhaitable.

Axe 3 : Caractérisation des facteurs d'origine nucléaire qui agissent en trans

Ce projet s'inscrit dans la continuité des travaux antérieurs qui ont porté sur l'étude de ces facteurs. Au cours de la dernière période des progrès importants et remarquables ont été réalisés avec la caractérisation de plusieurs facteurs M et T. Ces facteurs d'origine nucléaire jouent un rôle important dans le métabolisme de l'ARN et de la traduction des ARNs messagers du chloroplaste. Pourtant l'analyse de ces facteurs au niveau mécanistique s'est heurtée à des problèmes d'ordre technique en raison de leur faible abondance et de leur insolubilité lorsqu'ils sont exprimés comme protéines recombinantes. Ce projet vise précisément à obtenir de meilleures préparations de ces facteurs en utilisant de nouveaux outils tels que les bactéries psychrophiles et des systèmes de synthèse acellulaires, en introduisant des étiquettes (tags) sur les facteurs considérés pour permettre la purification de leurs complexes et enfin en effectuant des analyses phylogénétiques pour élucider les structures secondaires des régions 5'UTR, cibles de ces facteurs.



D'autres projets ambitieux sont proposés. L'un concerne la famille des protéines OPR qui comprend plus de 100 membres chez *Chlamydomonas* et dont certains sont impliqués dans différentes étapes post-transcriptionnelles du chloroplaste. Il s'agit en particulier d'élucider le mode de fonctionnement de ces protéines et de déterminer le code qui relie les séquences des répétitions OPR à la séquence nucléotidique de leurs ARNs cibles, un projet difficile mais réalisable avec la technologie actuelle.

Un autre projet concerne la mise au point d'un système de traduction *in vitro* avec des mini-ARNs contenant une région 5'UTR en présence de son facteur M/T correspondant. Il s'agit d'un objectif particulièrement ambitieux et important. En effet un tel système permettrait de comprendre comment ces facteurs agissent au niveau moléculaire.

Conclusion :

- Avis global sur le thème :

Le thème « Expression Génétique et Assemblage protéique chloroplastique » constitue un point fort de ce projet et il est lié de manière étroite à d'autres thèmes tels que « Génomique et Génétique de *Chlamydomonas* » et « Modifications post-traductionnelles dans le chloroplaste ». Il représente un prolongement bien structuré des travaux antérieurs qui ont particulièrement bien progressé au cours des dernières années. Dans ce domaine particulier, l'équipe possède des atouts incontestables et des outils uniques qui devraient lui permettre d'avancer rapidement et de se maintenir à l'avant-garde sur la scène internationale.

- Points forts et possibilités liées au contexte :

L'ensemble de ce thème est bien structuré, original et novateur. L'unité participe actuellement à des réseaux de recherche internationaux sur la même thématique, ce qui lui a permis de mettre à profit des synergies avec d'autres groupes de recherche.

- Points à améliorer et risques liés au contexte :

Il s'agit d'un projet très vaste et il faudra prendre garde à éviter la dispersion.

- Recommandations :

Ce projet a remarquablement progressé et s'il continue sur la même lancée, il est certain qu'il fournira des données nouvelles et importants sur la base moléculaire du processus CES.

L'unité dans son ensemble a fait preuve d'un grand dynamisme qui s'est traduit par un nombre impressionnant d'articles publiés dans des revues internationales de haut niveau. Ces données devraient permettre de postuler pour un subside ERC.



4.4 bis • Analyse thème par thème (projet d'Unité 2014-2018)

Thème 4 : Modifications post-traductionnelles dans le chloroplaste

Nom du responsable : M^{me} Catherine DE VITRY

• Appréciations détaillées

Les modifications post-traductionnelles contribuent fortement à la mise en place de l'appareil photosynthétique, par exemple en dégradant les protéines endommagées ou en modifiant des protéines régulatrices. Trois axes structurent ce projet :

Axe 1: Dégradation des protéines chloroplastiques.

Les protéases chloroplastiques jouent un rôle important dans la réponse au stress oxydatif. Les deux classes de protéases chloroplastiques qui seront étudiées dans le cadre de ce projet sont les protéases FtsH ATP-dépendantes des thylakoides, dont le site actif fait face au stroma, et les protéases Deg ATP-indépendantes.

Les protéases FtsH sont des hexamères composés de deux types de sous-unités, codées par un seul gène pour chacune d'elles chez *Chlamydomonas*. Le laboratoire a isolé deux mutants bloquant l'accumulation de *FtsH1* de *Chlamydomonas* grâce à un crible suppresseur d'une souche *ccb* et propose de les caractériser, en particulier pour déterminer leurs substrats en conditions de stress nutritionnels. Une attention particulière sera portée à la dégradation du PSI et du PSII mais d'autres protéines cibles seront également recherchées par des approches de protéomique. Un nouveau crible sera également entrepris pour tenter d'obtenir un mutant *ftsH2*. En cas d'échec du crible, le « silencing » de ce gène sera réalisé par une approche de type micro-ARN. Les régulations de l'expression et de l'activité des FtsH seront également étudiées en réponse à différents stress. Les mutants *ftsH* pourront être utilisés comme un outil facilitant l'étude de la biogenèse des complexes protéiques photosynthétiques, dont certains intermédiaires sont en trop faible quantité dans le fond génétique sauvage. Enfin la biogenèse du complexe (FtsH1-FtsH2)₆ sera analysée dans le mutant *ftsH1*, afin de déterminer si un contrôle transcriptionnel ou post-transcriptionnel intervient.

Un mutant affecté dans la protéase luménale DegP5 de *Chlamydomonas* a également été obtenu récemment par le laboratoire, et son phénotype sera analysé, en particulier en ce qui concerne un éventuel rôle dans la dégradation du PSI, par analogie avec un travail équivalent dans un autre laboratoire avec un mutant *degP10*.

D'autre part, afin d'analyser les effets d'éventuelles interactions des différentes protéases chloroplastiques dans la dégradation des protéines des thylakoides, des combinaisons des mutations dans les protéases FtsH, Deg et Clp seront réalisées, permettant une analyse approfondie de leurs rôles respectifs.

Commentaire :

Cette partie du projet est cohérente et réaliste car fondée sur des outils (mutants) qui ont été obtenus récemment au laboratoire. Concernant le mutant DegP5, son étude *sensu stricto* ne sera peut être pas très novatrice en raison des travaux équivalents réalisés par un laboratoire concurrent avec un mutant *degP10*. Il pourrait être utile, dans ce contexte, d'obtenir par exemple des mutants multiples *degP5-1-8* du fait d'une forte probabilité de redondance entre ces différentes protéases.

Axe 2 : Biogenèse des cofacteurs et conversion des apo- en holo-protéines.

L'assemblage des cofacteurs sur leurs apoprotéines dans les complexes photosynthétiques est peu connu. Le laboratoire a récemment identifié 4 facteurs CCB impliqués dans la liaison de l'hème c' sur le cystochrome *b6* de *Chlamydomonas*. Un cinquième facteur est en cours de caractérisation. L'étude de la fonction des facteurs CCB déjà identifiés dans l'assemblage de l'hème c' sera poursuivie, en particulier par des approches de mutagenèse dirigées, et de nouveaux mutants du *cytb6f* seront recherchés pour caractériser de nouveaux gènes contrôlant cet assemblage.



Par ailleurs plusieurs mutants affectés dans l'organisation de leur antenne photocollectrice ont été obtenus. Une analyse génétique sera développée pour définir lesquels de ces mutants sont alléliques. Les gènes concernés seront identifiés. Ces mutants seront également caractérisés physiologiquement en mesurant leur impact sur la biomasse, sur la composition en pigments et en protéines, ainsi que sur leur profil d'émission de fluorescence à différentes intensités lumineuses. L'accumulation de LHC sera vraisemblablement faible dans ces mutants. Ils pourront donc être introgressés dans un fond déficient en FtsH afin de les stabiliser pour faciliter l'étude de la liaison des pigments au LHC. La même logique sera appliquée pour étudier la biogenèse du PSI dans les mutants *ycf3* et *ycf4* qui seront croisés avec un mutant *ftsh*. L'impact des mutants *ycf* sur la liaison de la chlorophylle au PSI pourra ainsi être étudié. Concernant le PSII, deux mutants déficients dans la synthèse de la protéine D1 ont été obtenus. Le gène correspondant à l'un d'eux a été identifié et code une protéine, homologue aux protéines d'antenne, qui pourrait amener la chlorophylle à la protéine D1 en cours de traduction. Des supprimeurs de cette mutation seront recherchés, et le gène du deuxième mutant sera identifié.

Le mutant *y1* ne synthétise plus de chlorophylle à l'obscurité et reverdit à la lumière. Il a été caractérisé en détail en utilisant des cellules de *Chlamydomonas* en population. Une étude plus prospective, comportant une dimension méthodologique forte, est proposée afin de caractériser ce mutant au niveau cellule unique. Outre le fait de déterminer si le processus de reverdissement est homogène (contrôle génétique strict et / ou signalisation intercellulaire) ou hétérogène (comportement stochastique) entre les cellules, le développement de cet outil permettrait à terme de cribler efficacement des collections de mutants étendues.

Commentaire :

L'essentiel de cette partie du projet se situe dans la continuité de travaux entrepris au cours du contrat précédent, et repose donc sur des outils bien établis. Il faut noter une bonne intégration de cet axe avec l'axe 1, en proposant l'utilisation des mutants *ftsh* pour pouvoir étudier les mutants déficients dans l'assemblage de chlorophylle sur le PSI et le PSII. L'étude « cellule unique » du mutant *y1* est prospective et devrait permettre le développement d'un outil utile à d'autres objectifs ; ce type d'analyse ne pourrait-il pas être favorable à l'introduction d'approches de modélisation ?

Axe 3 : Modification covalentes des protéines (phosphorylation, nitrosylation, formation de ponts disulfures)

Les modifications post-transcriptionnelles des protéases chloroplastiques, ainsi que celles de leurs substrats, seront étudiées en réponse à des stress environnementaux (photoinhibition, carence azotée), afin de comprendre leur mode de fonctionnement. L'étude de ces modifications post-transcriptionnelles, en particulier les phosphorylations, sera étendue aux facteurs M et T, ainsi qu'à l'appareil de traduction et de dégradation des ARNm, en fonction de conditions de croissance différentes.

Ce projet d'études des modifications post-traductionnelles des protéases et des facteurs M et T est original et complémentaire des études des autres niveaux de régulation de l'expression des gènes codant des protéines chloroplastiques de l'appareil photosynthétique. Du point de vue de la forme, il n'est peut-être pas nécessaire de présenter cet axe de façon autonome. Il pourrait très bien s'intégrer dans d'autres axes du projet (axe 1 pour la partie protéase par exemple).

Conclusion :

- Points forts et possibilités liées au contexte :

Le point fort de ce projet réside dans son originalité et sa complémentarité avec les autres niveaux de régulation de l'expression génétique. La régulation de la stabilité des protéines des complexes et de l'assemblage des co-facteurs en réponse à des facteurs environnementaux sont des éléments déterminants de la plasticité de l'appareil photosynthétique, conditionnant en partie la production de biomasse.

- Points à améliorer et risques liés au contexte :

L'approche « cellule unique » semble être fortement orientée vers sa dimension méthodologique. L'introduction d'outils de modélisation pourrait être judicieuse pour intégrer les mesures qui seront obtenues sur un grand nombre de cellules individuelles.

- Recommandations :

Il pourrait être intéressant de renforcer les interactions entre ce thème du projet et celui consacré à l'étude de l'« expression génétique et de l'assemblage protéique chloroplastique ». En particulier les travaux sur les protéases et sur les modifications post-traductionnelles (phosphorylation, nitrosylation...) ont potentiellement des prolongements vers des événements de signalisation régulant l'expression et l'assemblage.



5 • Déroulement de la visite

Dates de la visite :

Début : 12 décembre 2012 à 8h30

Fin : 13 décembre 2012 à 16h

Lieu de la visite : Laboratoire de Physiologie membranaire et moléculaire du chloroplaste

Institution : IBPC

Adresse: 13, rue Pierre et Marie Curie, 75005 Paris

Déroulement ou programme de visite :

La visite de l'unité s'est déroulée dans d'excellentes conditions. La matinée du 12 décembre a été consacrée aux exposés scientifiques, précédés de la présentation des procédures d'évaluation et des membres du comité par le délégué scientifique AERES. L'après-midi a été consacré à la réunion de concertation du comité d'évaluation à huis-clos. La rencontre avec les chercheurs permanents puis non-permanents a eu lieu le 13 décembre matin. La matinée s'est achevée par la rencontre avec les tutelles (CNRS, UPMC) et le directeur de l'unité. La visite s'est alors terminée par la délibération à huit clos du comité jusqu'à 16h.



6 • Statistiques par domaine : SVE au 10/06/2013

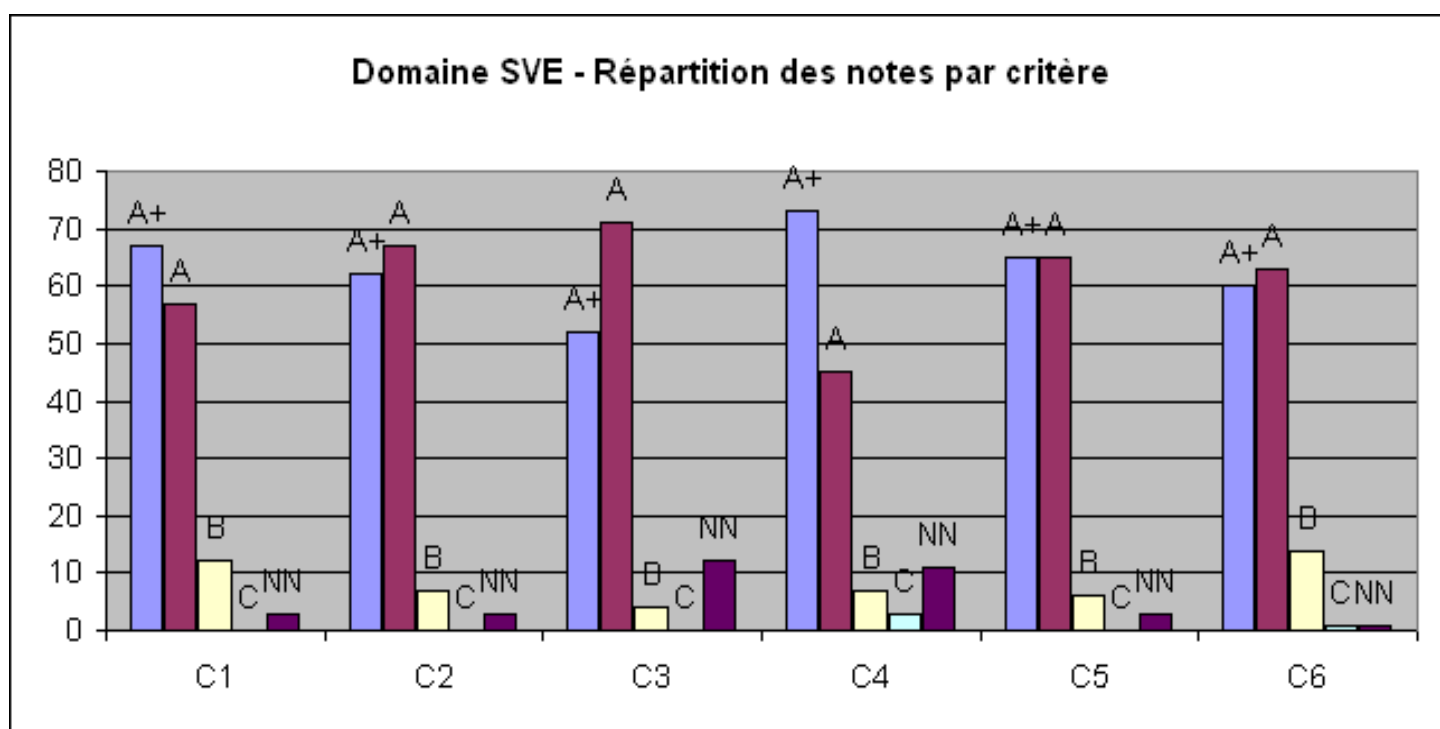
Notes

| Critères | C1 Qualité scientifique et production | C2 Rayonnement et attractivité académiques | C3 Relations avec l'environnement social, économique et culturel | C4 Organisation et vie de l'entité | C5 Implication dans la formation par la recherche | C6 Stratégie et projet à cinq ans |
|----------|---------------------------------------|--|--|------------------------------------|---|-----------------------------------|
| A+ | 67 | 62 | 52 | 73 | 65 | 60 |
| A | 57 | 67 | 71 | 45 | 65 | 63 |
| B | 12 | 7 | 4 | 7 | 6 | 14 |
| C | 0 | 0 | 0 | 3 | 0 | 1 |
| Non Noté | 3 | 3 | 12 | 11 | 3 | 1 |

Pourcentages

| Critères | C1 Qualité scientifique et production | C2 Rayonnement et attractivité académiques | C3 Relations avec l'environnement social, économique et culturel | C4 Organisation et vie de l'entité | C5 Implication dans la formation par la recherche | C6 Stratégie et projet à cinq ans |
|----------|---------------------------------------|--|--|------------------------------------|---|-----------------------------------|
| A+ | 48% | 45% | 37% | 53% | 47% | 43% |
| A | 41% | 48% | 51% | 32% | 47% | 45% |
| B | 9% | 5% | 3% | 5% | 4% | 10% |
| C | 0% | 0% | 0% | 2% | 0% | 1% |
| Non Noté | 2% | 2% | 9% | 8% | 2% | 1% |

Domaine SVE - Répartition des notes par critère





7 • Observations générales des tutelles

Paris le 10 04 2013

Le Président
Didier Houssin
Agence d'évaluation de la recherche
et de l'enseignement supérieur
20 rue Vivienne - 75002 PARIS

M. le Président,

Nous avons pris connaissance avec le plus grand intérêt de votre rapport concernant le projet de laboratoire de Physiologie membranaire et moléculaire du chloroplaste, porté par M. Wollman. Nous tenons à remercier l'AERES et le comité pour l'efficacité et la qualité du travail d'analyse qui a été conduit.

Ce rapport a été transmis au directeur du laboratoire. Nous prenons acte des recommandations qui ont été formulées et qui n'appellent aucun commentaire particulier de notre part.

Restant à votre disposition pour de plus amples informations, je vous prie de croire, M. le Président, à l'expression de mes salutations respectueuses.

Le Vice -Président Recherche et Innovation

Paul Indelicato

