

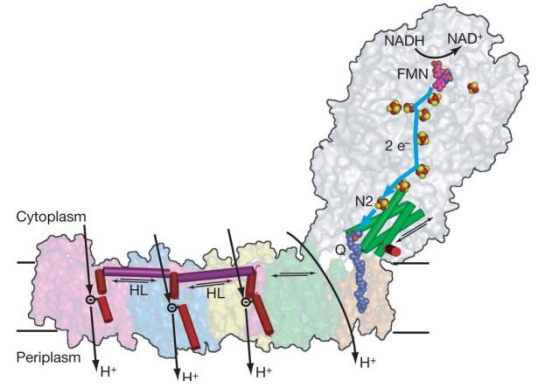
Nouvelle méthode de criblage de mutants respiratoires du complexe I chez *Chlamydomonas*

Simon Massoz, Véronique Larosa, Benjamin Bailleul, Pierre Cardol, Claire Remacle
Laboratoire de génétique et physiologie des microalgues, Ulg, Belgique

Introduction

Le complexe I (NADH:ubiquinone oxydoréductase) d'une taille ~1000kDa est impliqué dans la respiration cellulaire mitochondriale. Il oxyde le NADH et transfère ses électrons au pool d'ubiquinones. Il possède ±45 sous-unités structurales et une dizaine de facteurs d'assemblage ont été identifiés.

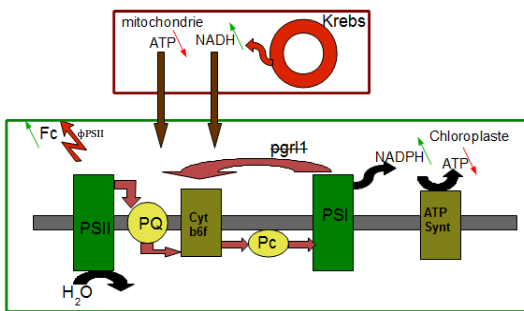
Objectifs: développement d'une nouvelle méthode de criblage, basée sur l'interaction chloroplaste/mitochondrie afin d'identifier de nouveaux facteurs d'assemblage du complexe I. Pour cela, nous avons utilisé une souche *pgr1* déficiente dans le transport cyclique électrons chloroplastique ainsi qu'une souche déficiente dans le complexe I mitochondriale (*Cl-*). Nous avons produit et analysé un double mutant *pgr1/Cl-*. Nous avons ensuite transformé des souches *pgr1* et recherché les transformants qui possèdent un phénotype similaire à notre double mutant de référence.



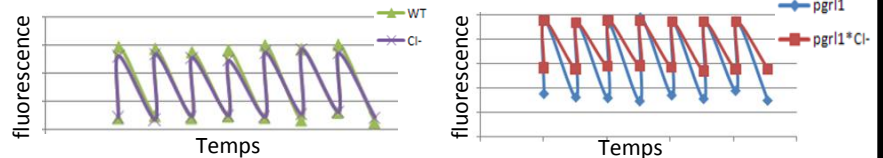
Rouslan G. Efremov et al. Nature, 2010

Caractérisation du double mutant *pgr1/Cl-*

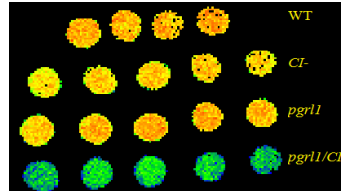
A. Schéma simplifié des interactions mitochondrie/chloroplaste Chez le double mutant *Cl-/pgr1*



B. Profil de fluorescence (Φ PSII)



C. Analyse de fluorescence en milieu solide



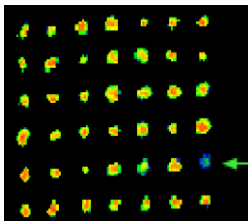
D. Valeurs de Φ PSII pour chaque souche

Souches	Φ PSII
WT	0,58 ± 0,014
<i>Cl-</i>	0,56 ± 0,015
<i>pgr1</i>	0,59 ± 0,01
<i>pgr1/Cl-</i>	0,34 ± 0,012

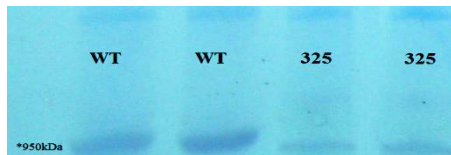
A. Modification de la balance ATP/NADH chez le double mutant *pgr1/Cl-*. Une souche *pgr1* n'est pas capable de réaliser le transport cyclique d'électrons autour du PSI. La capacité d'une souche *Cl-* à réoxyder le NADH dans la mitochondrie diminue fortement et amène à un transfert d'une partie du NADH vers le chloroplaste. L'import additionnel de NADH mitochondrial vers le chloroplaste, combiné à une diminution de la capacité de production d'ATP dans la cellule, amène à des perturbations de la chaîne photosynthétique, visibles sur base du profil de fluorescence (Fc) sous forme d'une diminution du rendement de la photosynthèse (Φ PSII). B. Comparaison du profil de fluorescence des différentes souches (Φ PSII). Il n'est possible de distinguer un mutant du *Cl-* par fluorescence que lorsqu'il est associé à la mutation *pgr1*. C. Analyse de fluorescence sur milieu solide en fausse couleur, obtenue à l'aide d'une caméra. Possibilité de distinguer les doubles mutants sur boîte rapidement par une simple mesure de fluorescence. Les souches ont été cultivées sur milieu TAP pendant 2 jours préalablement. D. Valeurs de Φ PSII pour les différentes souches à 500 μ E/m².s

Obtention d'un mutant complexe I (325) par mutagenèse insertionnelle aléatoire à partir de la souche réceptrice *pgr1*

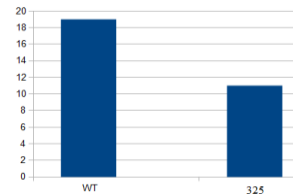
A. Criblage des transformants par fluorescence (Φ PSII)



B. Mise en évidence de l'activité CI sur gel natif



C. Activité CI sur extraits membranaires



La souche *pgr1* a été transformée par électroporation avec un plasmide de résistance à l'hygromycine. Les transformants sont récupérés après 2 semaines de culture sur TAP + hygromycine solide et repiqués en vue de l'analyse de leur profil de fluorescence. A. Sélection d'un transformant au profil de fluorescence d'intérêt. Tous les clones sont cultivés sur TAP pendant 2 jours. B. Visualisation de l'activité du complexe I sur gel d'électrophorèse en condition native. 100 μ g d'extraits membranaires ont été déposés par puits. L'activité du complexe I est mise en évidence par une coloration NADH/NBT (mauve). C. Test d'activité CI (NADH:duroquinone oxydoréductase) réalisé *in vitro* sur extraits membranaires. Activités exprimées en μ moles de NADH oxydés. min⁻¹.mg protéines⁻¹

Conclusion

L'utilisation d'une souche *pgr1* comme souche réceptrice lors de mutagenèses insertionnelles permet l'identification de mutants du complexe I par des mesures de la fluorescence du PSII.