

# Mise en évidence de l'activité respiratoire chez une algue verte unicellulaire (*Chlamydomonas reinhardtii*)

Génétique des microorganismes

Claire Remacle

## *Chlamydomonas reinhardtii*

*Chlamydomonas reinhardtii* est une algue verte unicellulaire de 7 µm de long appartenant à l'ordre des Chlamydomonales. Cultivée en milieu liquide, elle se déplace à l'aide de deux flagelles (observation microscopique), cultivée sur milieu gélosé, elle perd ses flagelles et forme des colonies (observation de colonies sur boîte d'agar). Elle possède un noyau haploïde, un chloroplaste unique et de nombreuses mitochondries. Plusieurs raisons en font un organisme de choix pour les études de génétique, physiologie et biologie moléculaire: (1) son cycle de vie est court et parfaitement contrôlé en laboratoire, (2) deux génomes (chloroplastique et mitochondrial) sont entièrement séquencés et les résultats complets du séquençage du génome nucléaire sont attendus pour cet été, (3) il est relativement aisé d'obtenir des mutants par mutagenèse classique ou insertionnelle.

## La chaîne respiratoire mitochondriale

La chaîne respiratoire mitochondriale comprend quatre complexes enchassés dans la membrane interne de la mitochondrie qui transfèrent les électrons des équivalents réducteurs (provenant du cycle de Krebs) à l'oxygène moléculaire (schéma).

Le complexe I ou NADH:ubiquinone oxydoréductase transfère les électrons du NADH au pool d'ubiquinone.

Le complexe II ou succinate déshydrogénase transfère les électrons du succinate au pool d'ubiquinone.

Le complexe III ou ubiquinol cytochrome c oxydoréductase transfère les électrons de pool d'ubiquinone réduit au cytochrome c.

Le complexe IV ou cytochrome c oxydase transfère les électrons du cytochrome c à l'oxygène moléculaire.

Les complexes I, III et IV sont dits phosphorylants (\*) car ils participent au gradient de protons nécessaire à la synthèse d'ATP par le complexe V ou ATP synthase.

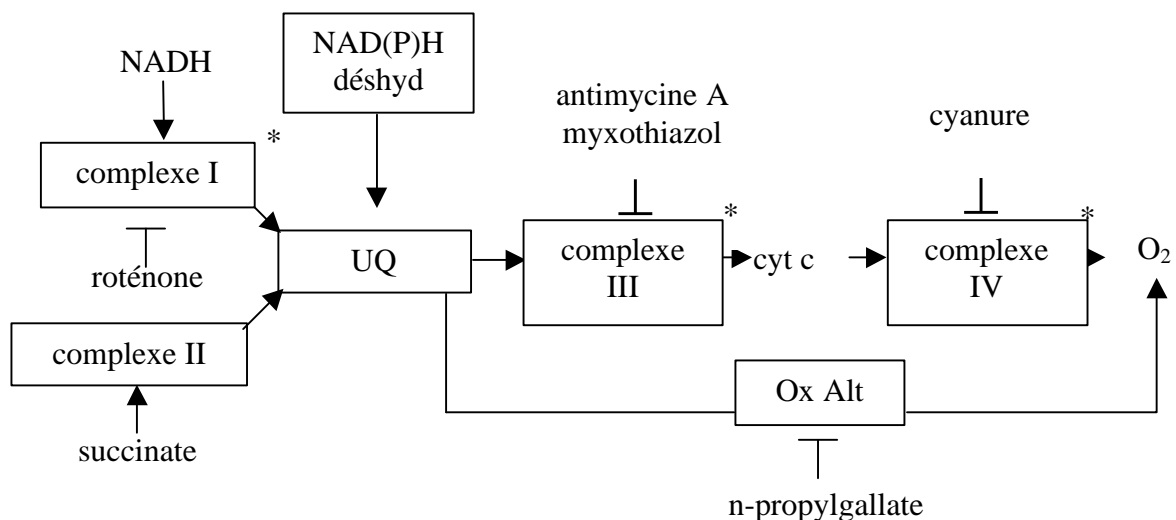
# Mise en évidence de l'activité respiratoire chez une algue verte unicellulaire (*Chlamydomonas reinhardtii*)

Génétique des microorganismes

Claire Remacle

Diverses substances peuvent inhiber spécifiquement l'activité des complexes (⊥). Ainsi la roténone inhibe le complexe I, le myxothiazol et l'antimycine A inhibent le complexe III, le cyanure inhibe le complexe IV.

Chez les plantes et de nombreux microorganismes (dont l'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas*), il existe une voie dite alternative (oxydase alternative, Ox Alt) qui transfère les électrons directement du pool d'ubiquinone réduit à l'oxygène sans passer par les complexes III et IV. Cette voie est non phosphorylante et l'énergie est dissipée sous forme de chaleur. Elle est insensible au cyanure mais répond au n-propylgallate. Il existe également une ou plusieurs NAD(P)H déshydrogénases, insensibles à la roténone, qui court-circuite(nt) le complexe I.



## Les mutants déficients respiratoires

Chez *Chlamydomonas*, différents mutants de la chaîne respiratoire affectés au niveau des complexes III ou IV ont été isolés. Ces mutants respirent toujours, de façon moindre que la souche sauvage, via la voie alternative. Leur respiration est donc insensible au myxothiazol, à l'antimycine A et au cyanure mais répond au n-propylgallate. La synthèse d'ATP liée aux complexes III et IV est perdue. Cela se traduit phénotypiquement par une incapacité de croître à l'obscurité en présence d'une source de carbone organique. Récemment des doubles mutants affectés au

# Mise en évidence de l'activité respiratoire chez une algue verte unicellulaire (*Chlamydomonas reinhardtii*)

Génétique des microorganismes

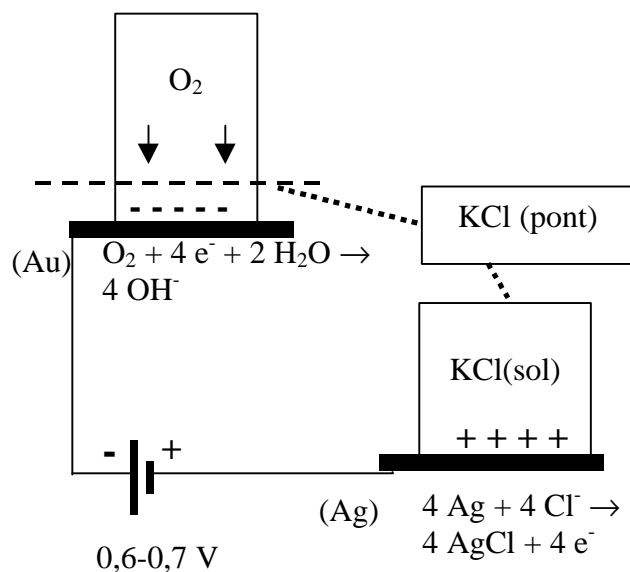
Claire Remacle

niveau des complexes I et III ou I et IV ont été isolés. Ils respirent toujours très faiblement via les NAD(P)H déshydrogénases, le complexe II et l'oxydase alternative. Leur respiration est donc insensible à la roténone et au cyanure. Il est remarquable de constater que ces mutants ont perdu toute capacité de synthèse d'ATP via la chaîne respiratoire mitochondriale. La fourniture en énergie est dans ce cas assurée via la glycolyse et la photosynthèse.

## Mesures de respiration

Pour illustrer ces différentes notions, la respiration sera mesurée à l'obscurité à partir de cellules entières de différentes souches avec et sans inhibiteurs. Les mesures seront réalisées à l'aide d'une électrode à oxygène (électrode de Clark).

Electrode à oxygène



L'appareil de mesure est composé d'une chambre de culture (1 à 3 ml) contenant les algues et d'une chambre contenant deux électrodes, l'une d'or et l'autre d'argent. Les deux chambres sont séparées par une membrane semi-perméable, permettant la diffusion de l'oxygène dissous du milieu de culture vers la chambre contenant les

# Mise en évidence de l'activité respiratoire chez une algue verte unicellulaire (*Chlamydomonas reinhardtii*)

Génétique des microorganismes

Claire Remacle

électrodes (schéma). Le principe de l'appareil est le suivant: quand une différence de potentiel (0,6-0,7 V) est appliquée entre les deux électrodes, l'électrode en or (Au) se charge négativement (cathode) tandis que l'électrode d'argent se charge positivement (anode). Quand l'oxygène dissous dans le milieu de culture diffuse à travers la membrane semi-perméable, il est réduit à la cathode de sorte qu'un courant se forme à travers le circuit (relié par une solution de KCl servant d'électrolyte). L'argent est oxydé et du chlorure d'argent se dépose à l'anode. Le courant qui est généré est proportionnel à la quantité d'oxygène dissous.

## Test in vivo

Des souches déficientes pour la respiration (complexes III et IV) peuvent être distinguées de la souche sauvage par un test de coloration sur boîte de Pétri. Celui-ci met en jeu le le chlorure de 2,3,5-triphenyltetrazolium (TTC). En conditions anaérobies, ce dernier peut être réduit en formazan (précipité rouge) par les électrons provenant de la cytochrome c oxydase. C'est ainsi que la souche sauvage se colore en rouge après incubation d'environ 1/2h à l'obscurité en présence de TTC tandis que les colonies mutantes restent vertes.