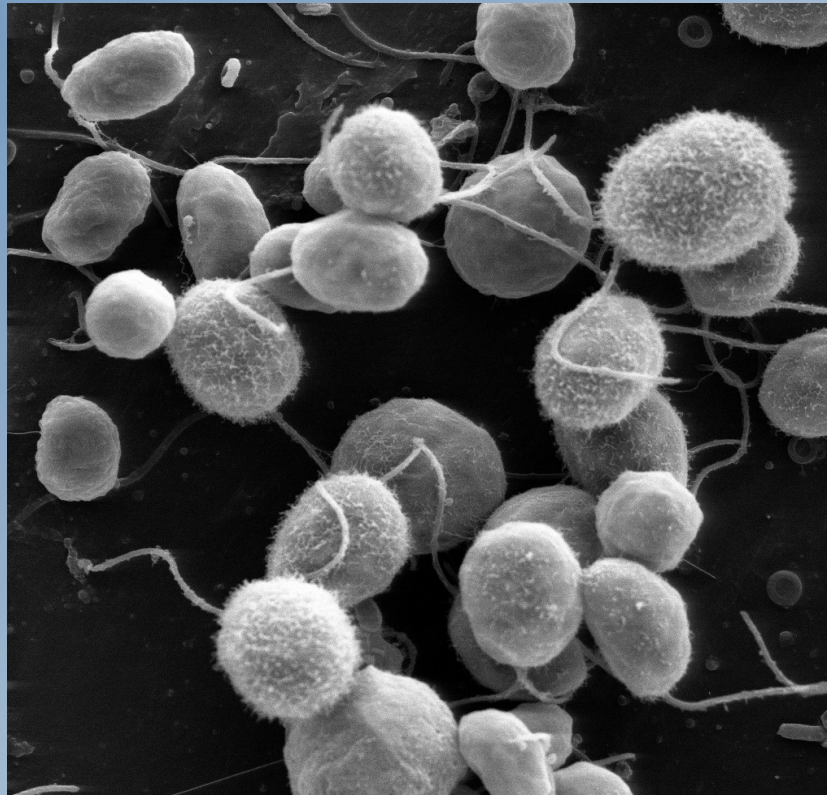


Caractérisation de la réponse photosynthétique de *Chlamydomonas reinhardtii* à la carence en S : effet de la source d'azote et influence de l'oxydase alternative mitochondriale.

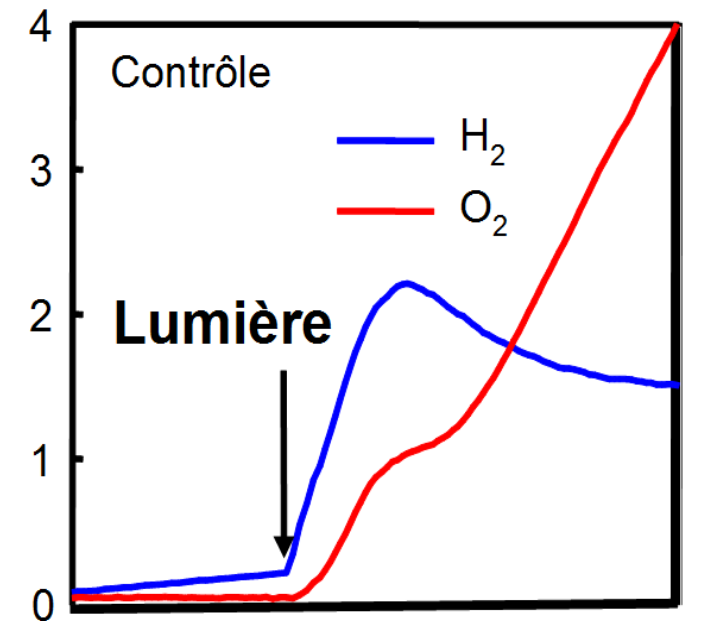
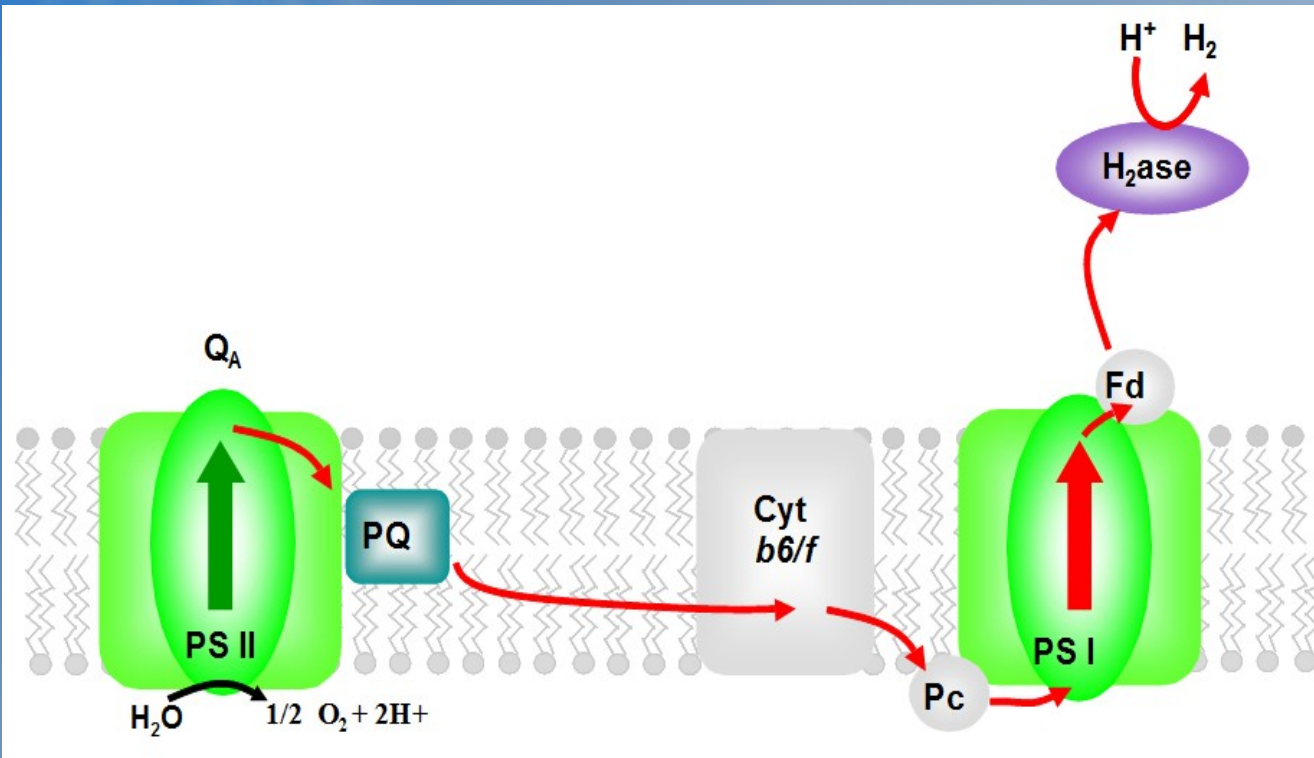
Mémoire présenté par Thomas de Marchin en vue de l'obtention du grade de master en Biochimie, Biologie Moléculaire et Cellulaire



Juin 2010

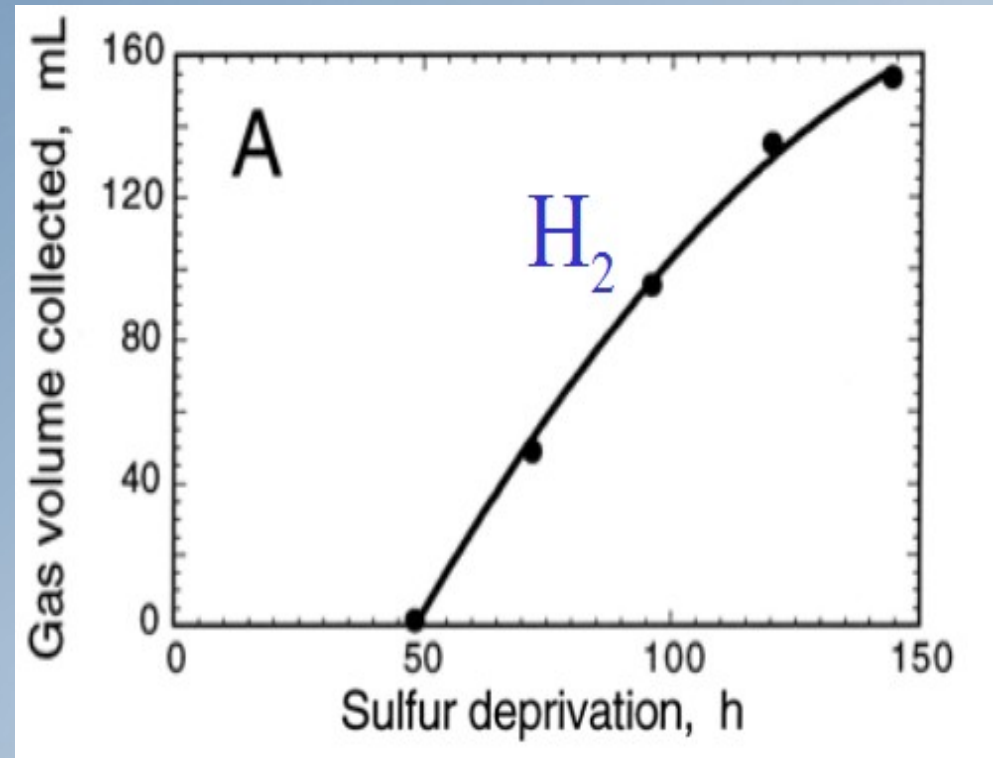
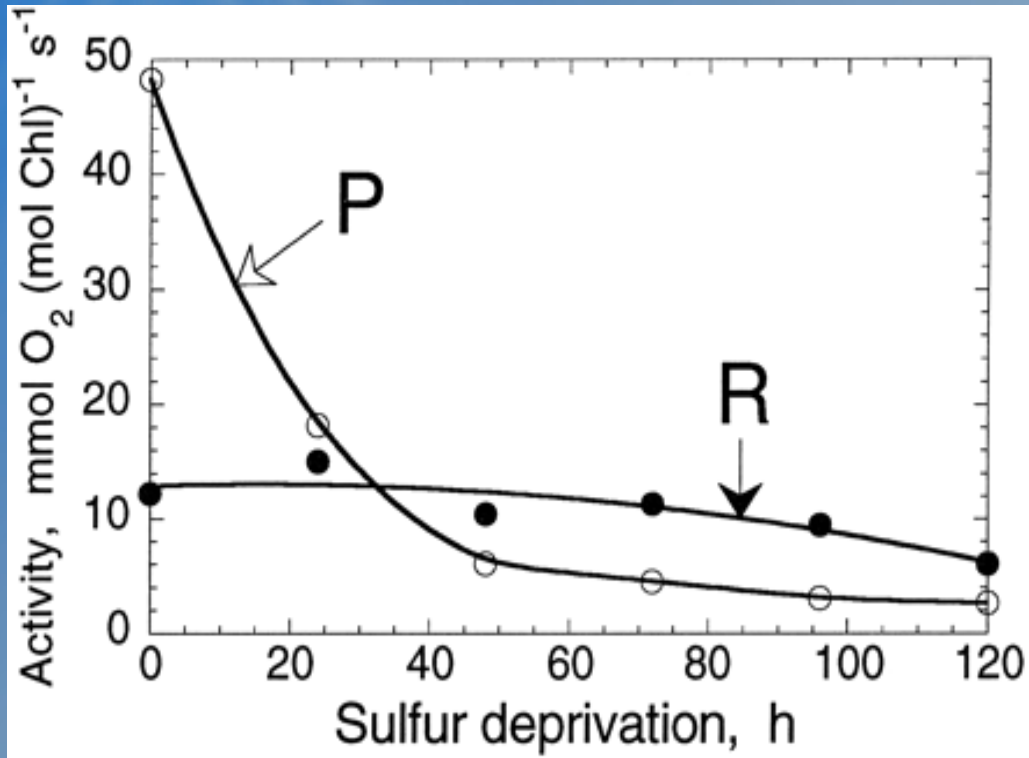
Prof. F.FRANCK

La production d'hydrogène



- *C. reinhardtii* produit de l'hydrogène à la lumière
- Hydrogénase inhibée par O_2

La carence en soufre



Carence en S \rightarrow passage en anoxie et production d'hydrogène

Réponses à la carence en soufre

Réponses :

- Ralentissement du métabolisme
- Accumulation d'amidon
- Augmentation du diamètre de la cellule

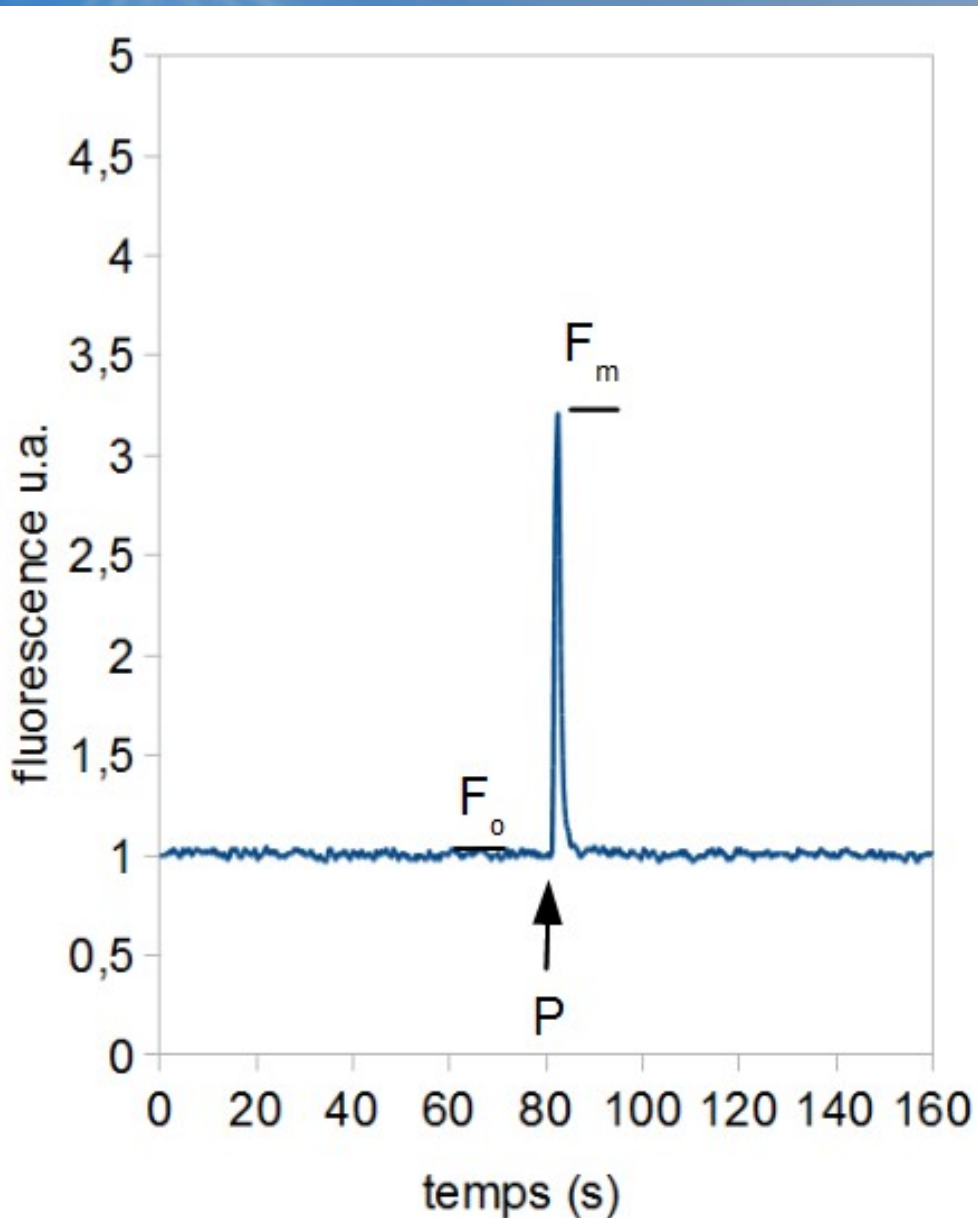
Au niveau photosynthétique : Déclin général des capacités

- Diminution de la production d'O₂
- Dégradation de la Rubisco
- Perturbation du turn-over de D1



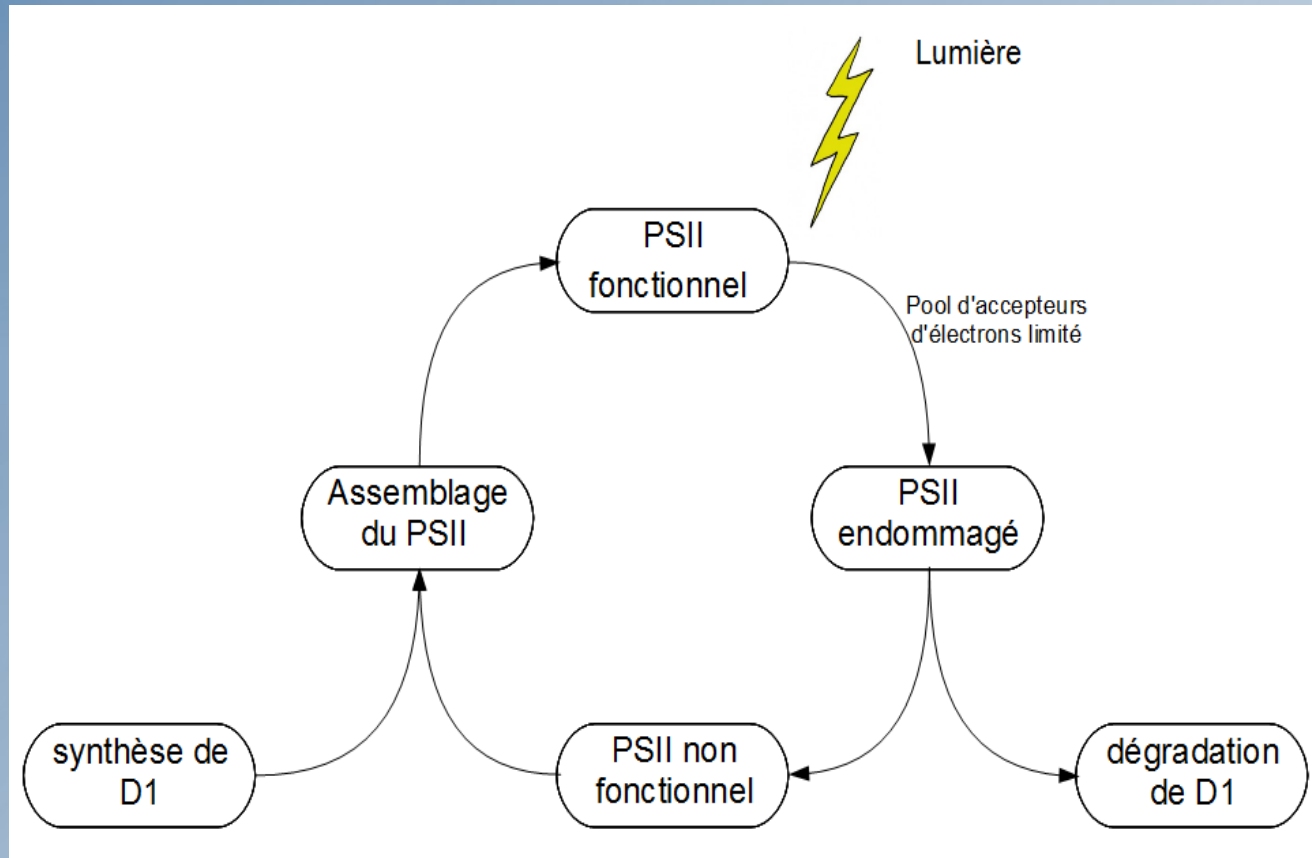
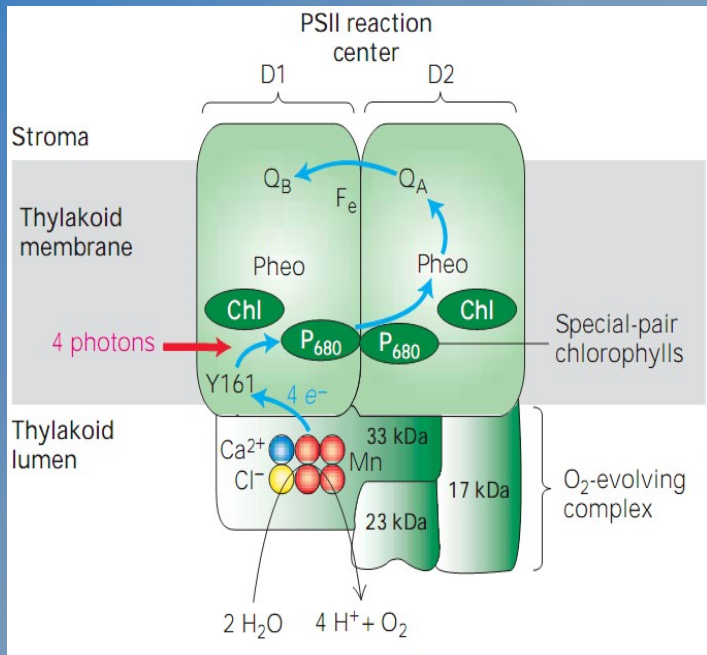
Diminution du rendement photochimique du PSII (Ψ PSII)

Le paramètre ψ PSII



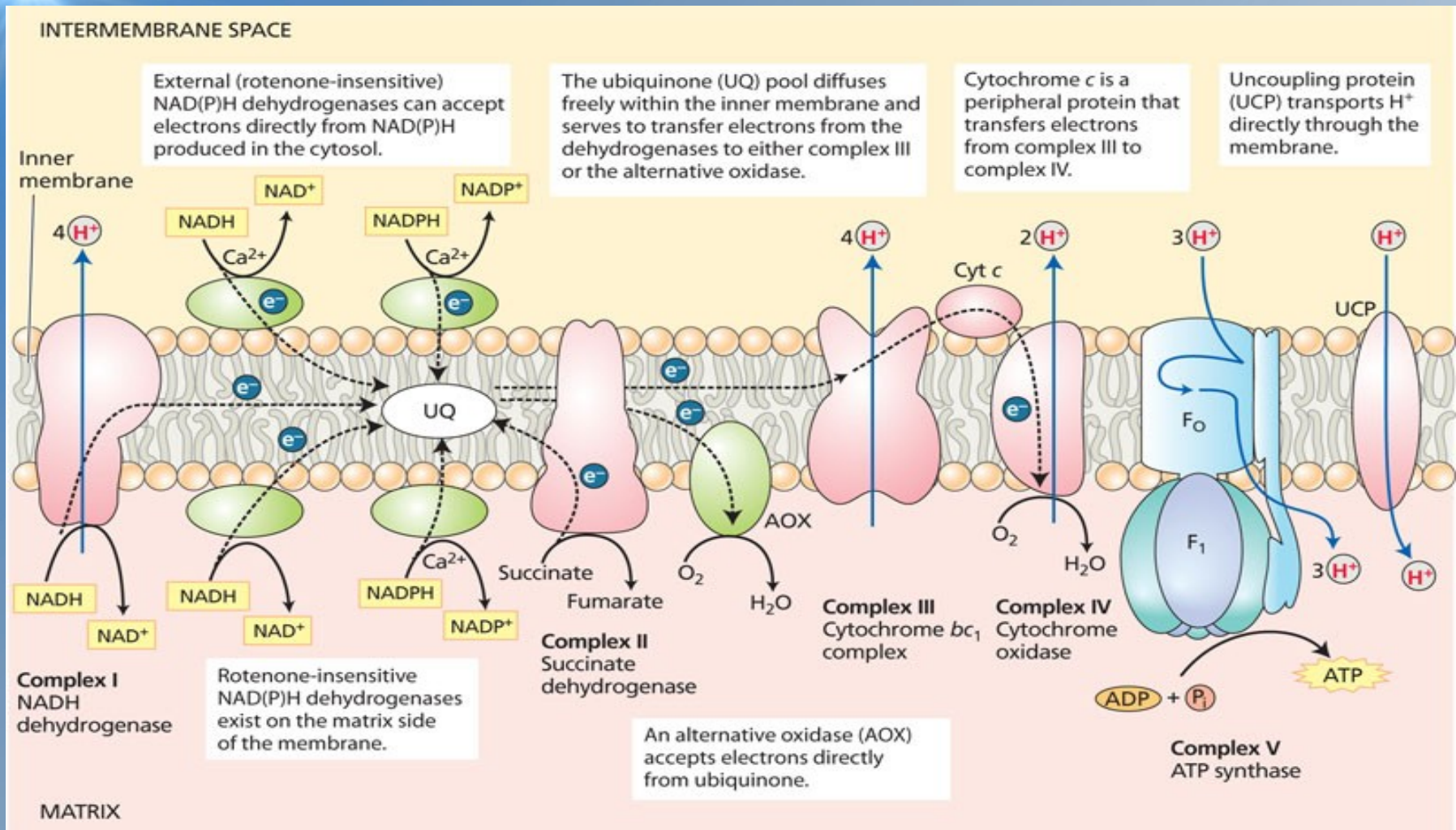
- $\Psi_{PSII} = (F_m - F_o) / F_m$
- Ψ_{PSII} : rendement photochimique du PSII
- Ψ_{PSII}_{dark} et Ψ_{PSII}_{light}
- Une chute de Ψ_{PSII}_{dark} traduit une baisse de la capacité photochimique du PSII généralement due à une photoinhibition

Le turn-over de D1



Photoinhibition = perturbation du turn-over de D1

L'oxydase alternative mitochondriale



- Rôle : dissipation du pouvoir réducteur en excès afin, entre autre, d'éviter la production de ROS (espèce réactive de l'oxygène)
- Voie induite par NO₃⁻ mais pas par NH₄⁺

But du travail

- Souche T2 = souche témoin
- Souche 530 = souche AOX⁻
- Expérience préliminaire : comparaison de la production d'hydrogène entre les 2 souches sur NO₃⁻ (afin d'induire le phénotype de la souche AOX⁻) => pas d'anoxie => pas de production d'hydrogène

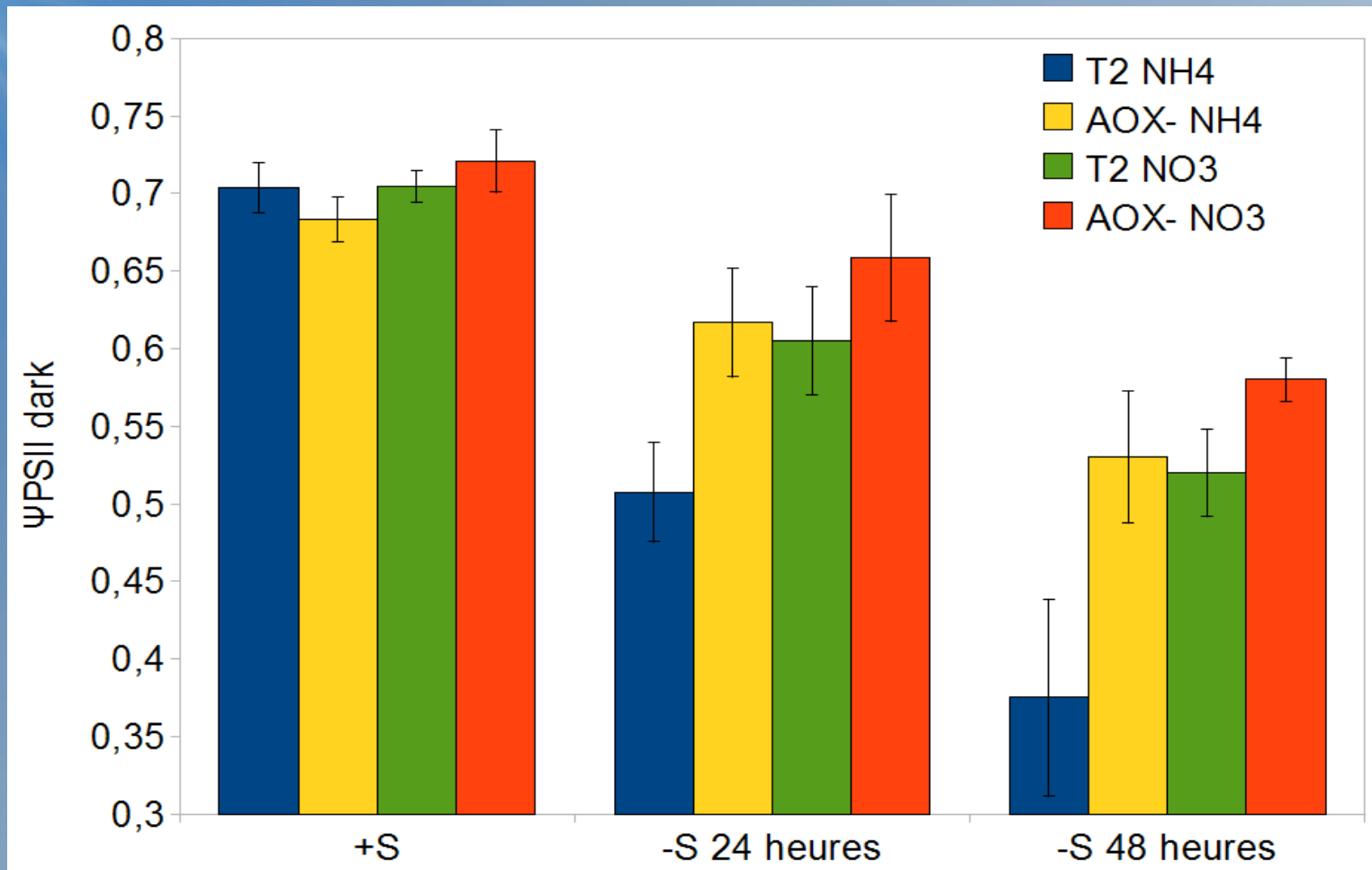
But du travail : caractériser la réponse photosynthétique à la carence en S chez la souche contrôle T2 et chez le mutant AOX⁻ sur NH₄⁺ ou sur NO₃⁻

- T2 NH₄⁺ : situation habituellement décrite dans la littérature



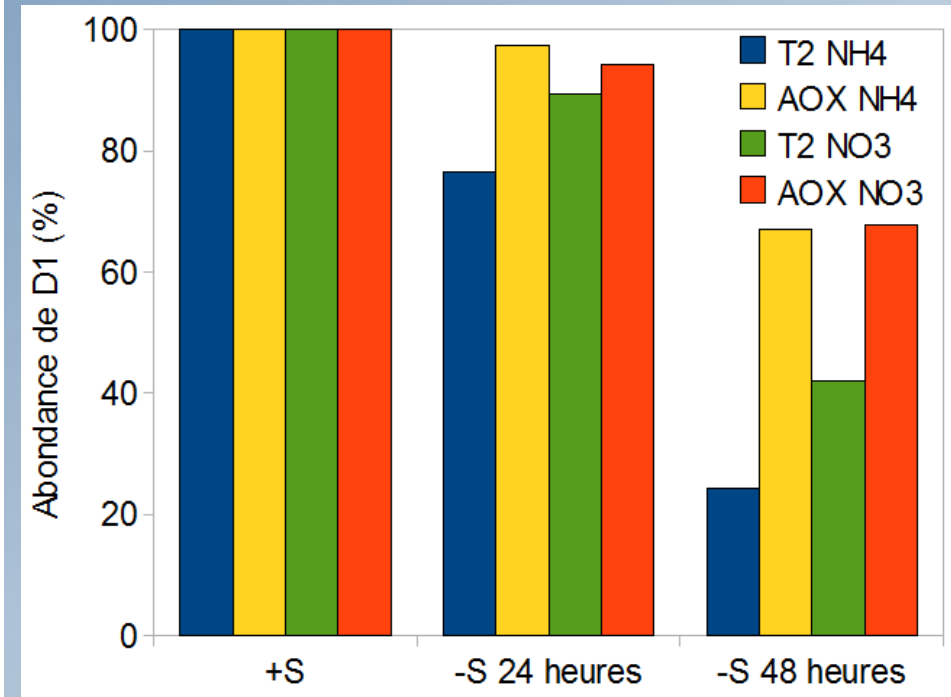
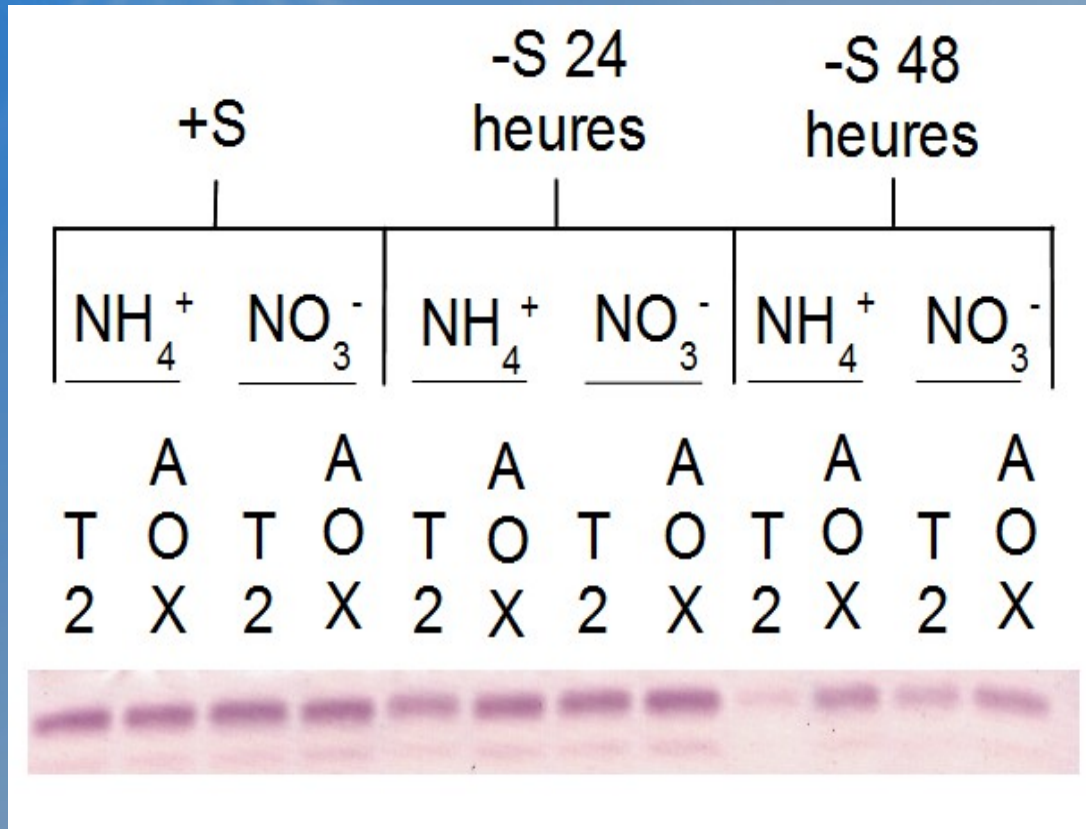
Résultats

Évolution du paramètre ψ_{PSII}^{dark}



- T2 NH_4^+ : chute du ψ_{PSII} plus rapide → Photoinhibition plus rapide
- Effet de la souche et de la source de N

Évolution de l'abondance de D1

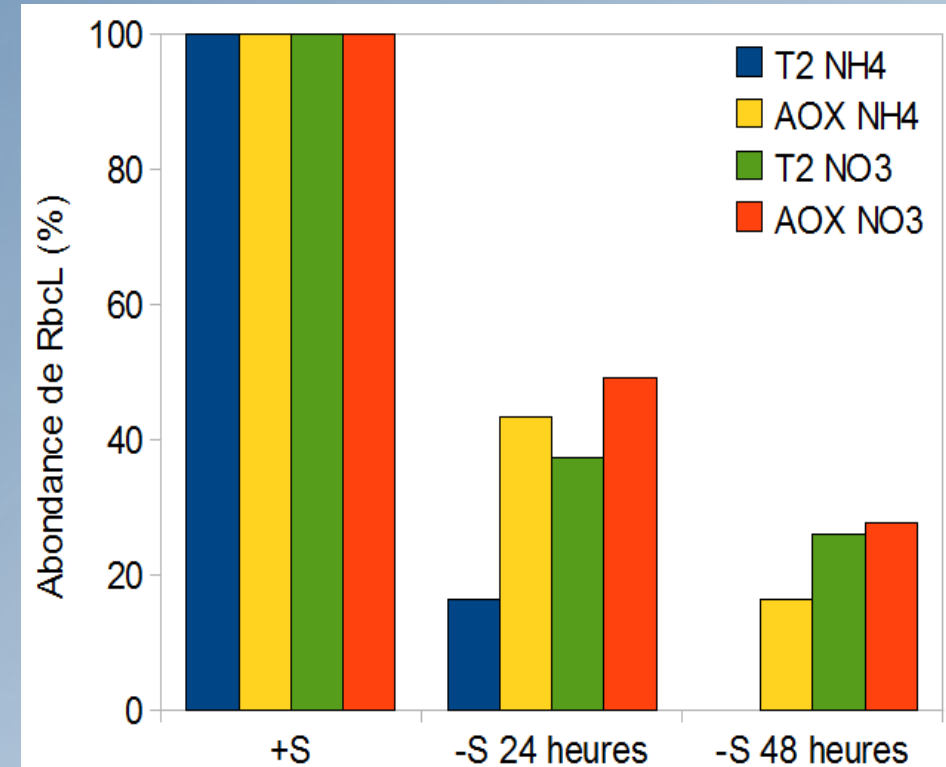
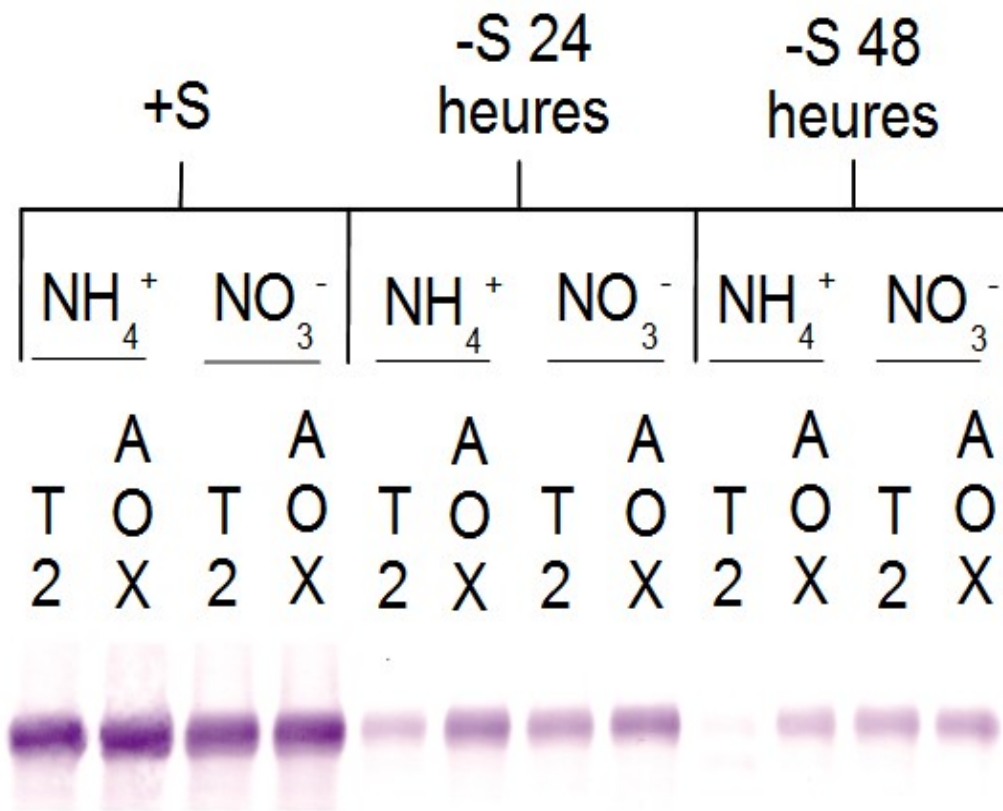


- T2 NH₄⁺ : chute de D1 plus rapide

- Profil similaire à la chute du ψ PSII_{dark}  la chute du ψ PSII_{dark} est

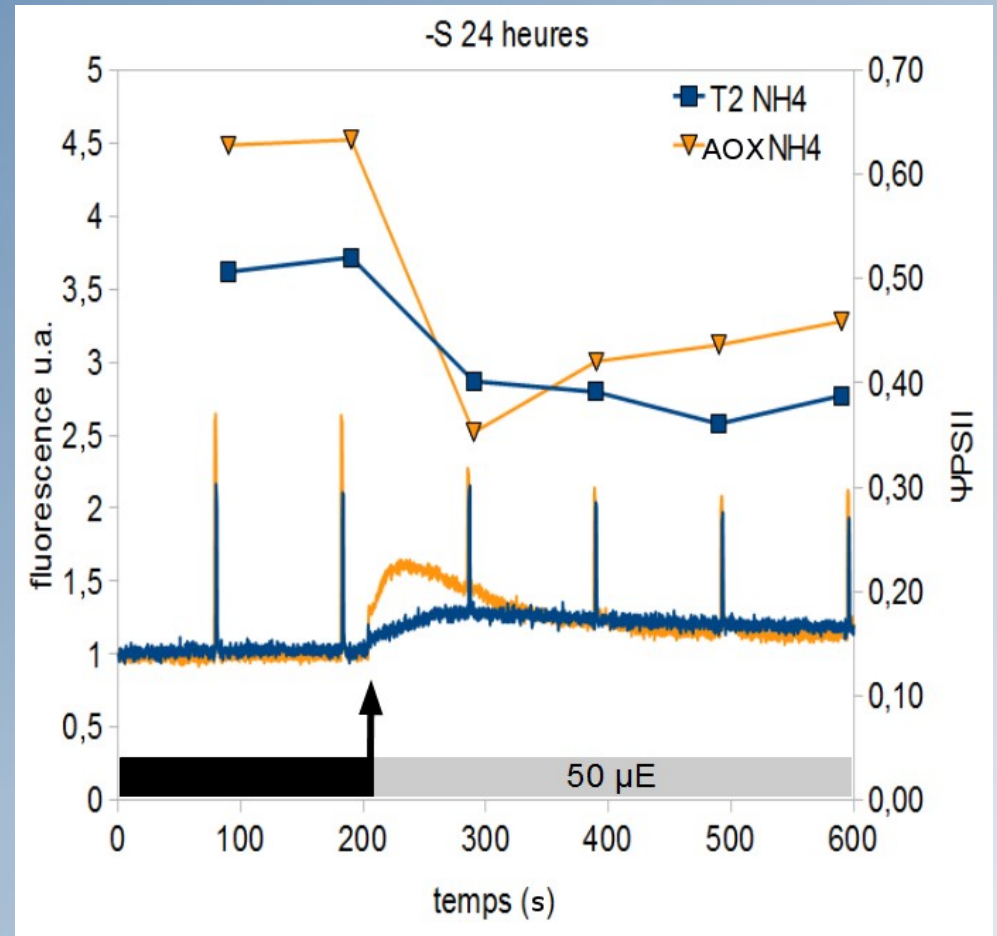
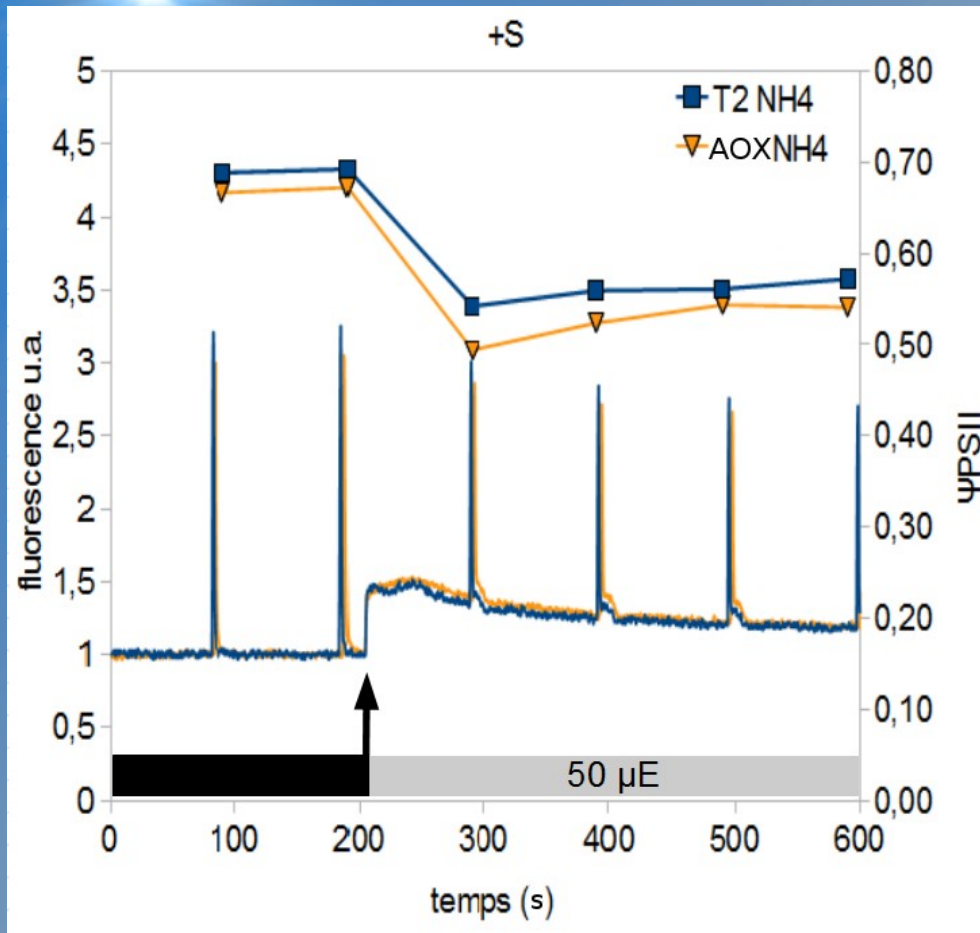
bien due à une photoinhibition

Évolution de l'abondance de RbcL



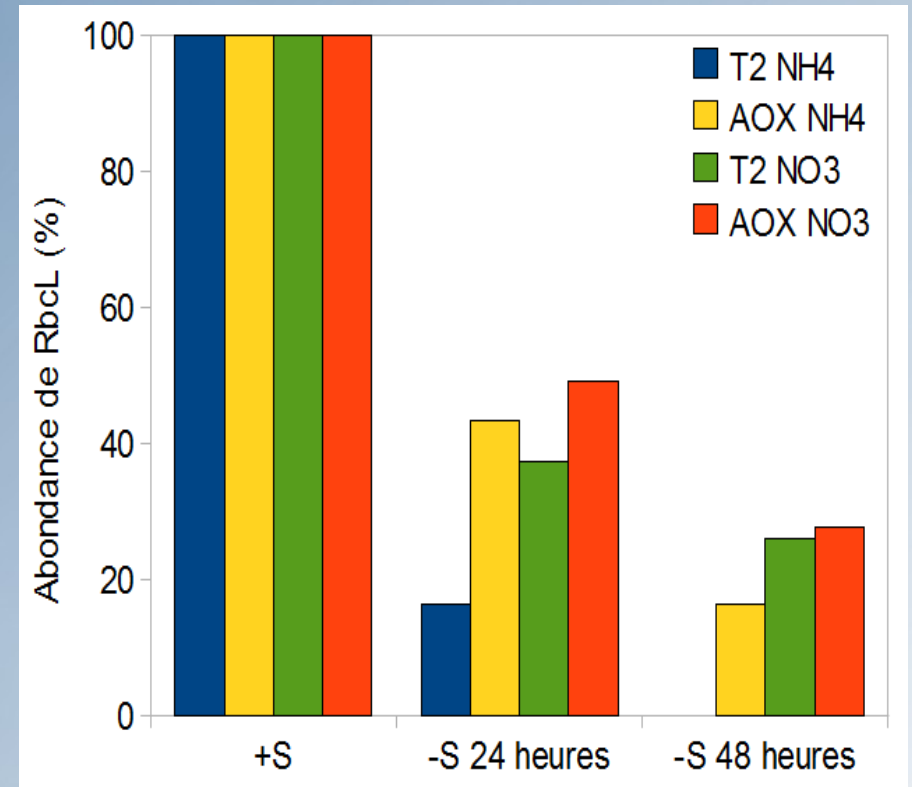
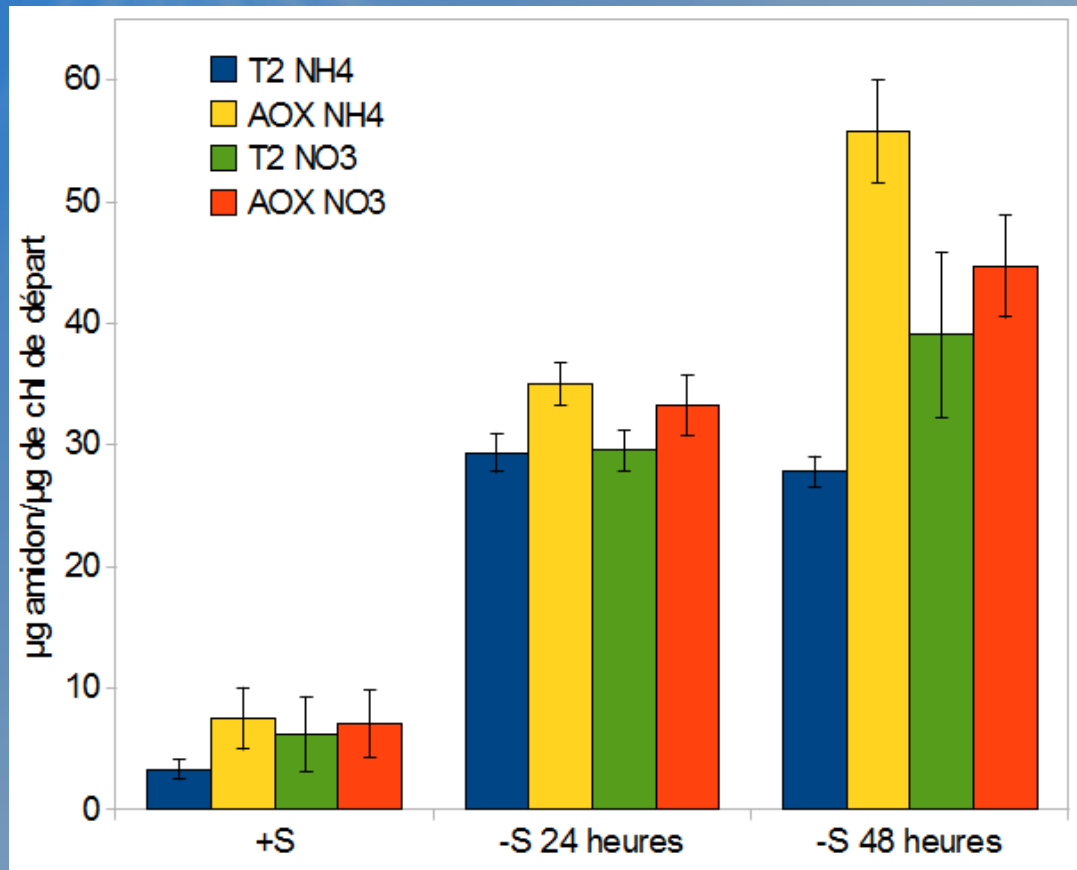
- T2 NH_4^+ : chute de RbcL (grande sous-unité de la Rubisco) plus rapide
- T2 NH_4^+ : disparition de RbcL après 48h de carence
- Profil de la chute de RbcL similaire à celui de la chute de D1 mais amplitude des variations plus importantes

Évolution de la fluorescence de la chla



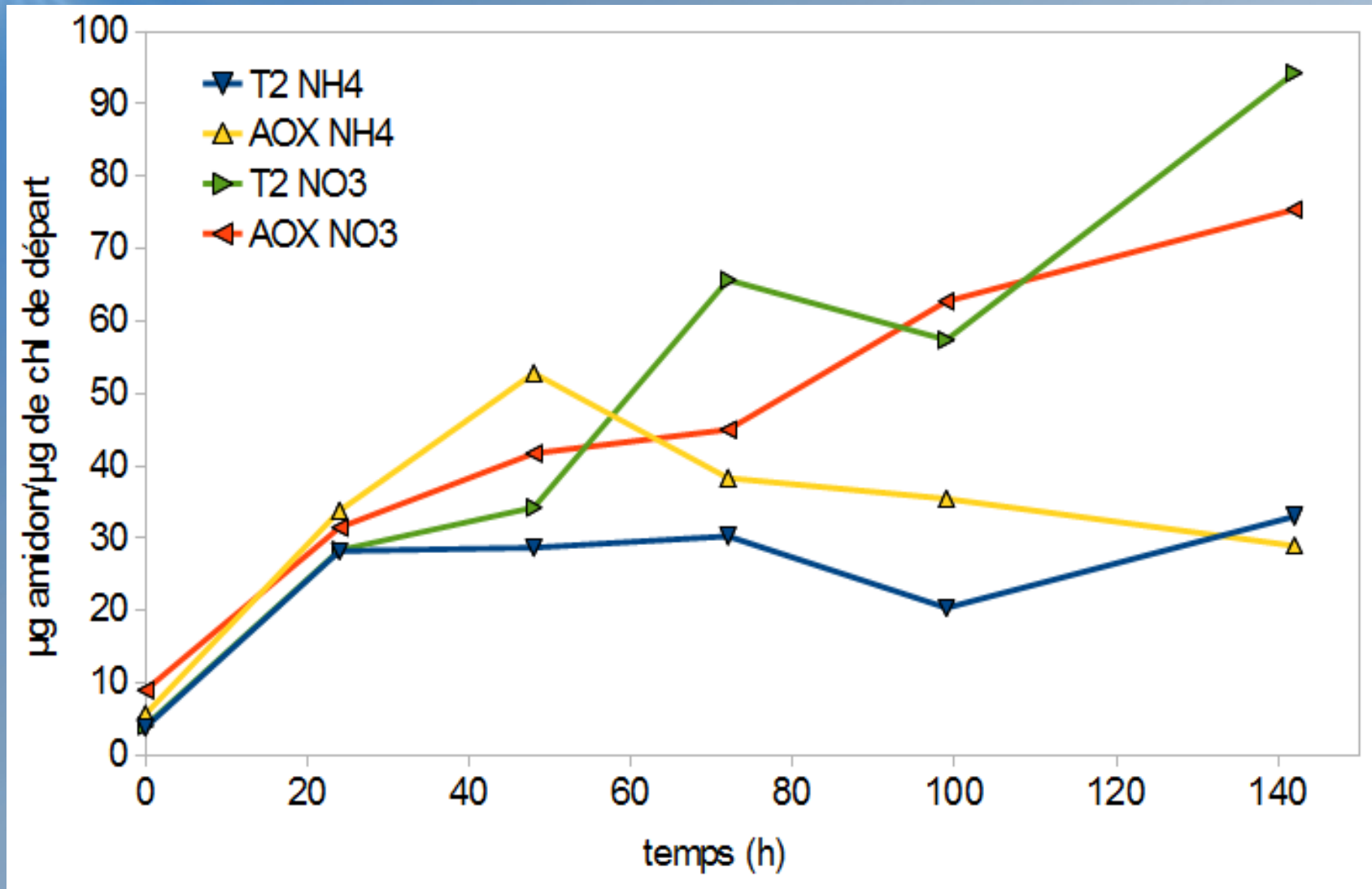
- T2 NH₄⁺ : Fluctuation typique altérée après 24h de carence => changement dans l'activité du cycle de Calvin
- Corrélation avec le blot de RbcL
- T2 NH₄⁺ : vitesse de transport plus faible après 24h de carence

Étude de la production d'amidon sur 3 jours



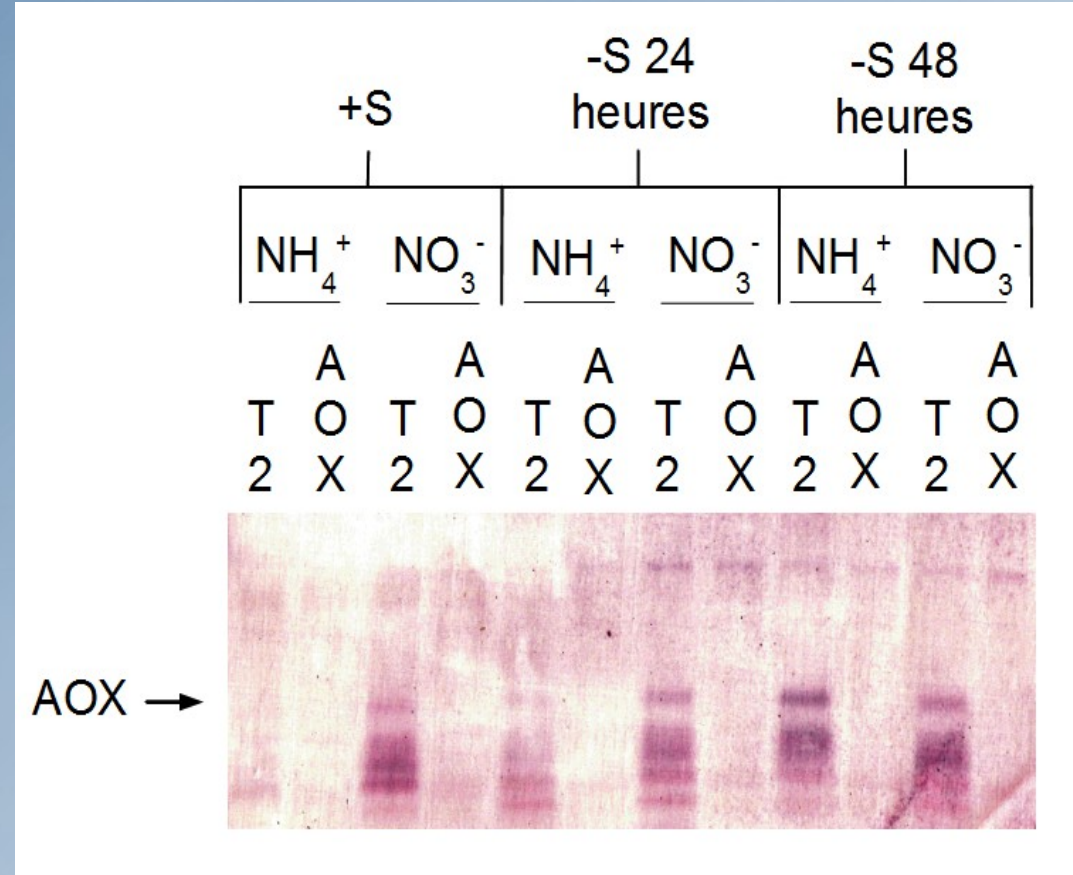
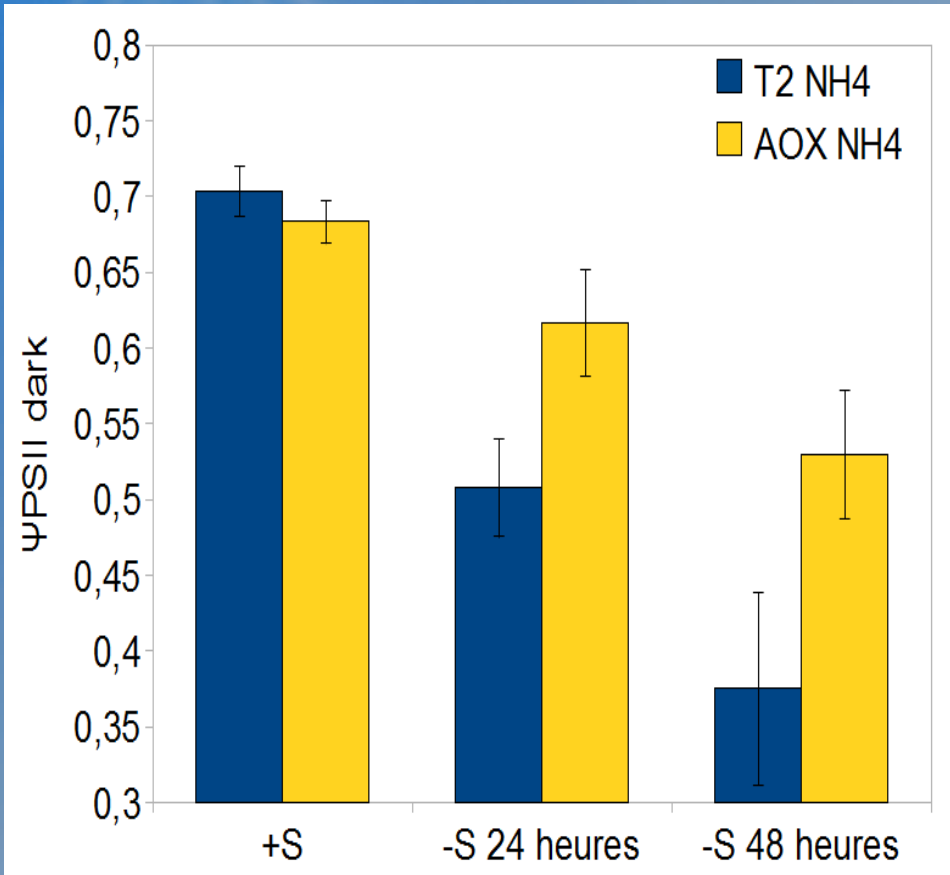
- T2 NO₃⁻, AOX⁻ NH₄⁺ et AOX⁻ NO₃⁻ continuent à accumuler de l'amidon après 24h de carence
- Corrélation avec le blot de RbcL

Étude de la production d'amidon sur 7 jours



- T2 et AOX⁻ en NO₃⁻ multiplient par 20 leur concentration en amidon de départ

Implication de AOX dans la réponse à la carence en soufre



• Différence phénotypique uniquement au cours de la carence en S ➡

Expression d'AOX stimulée par la carence en S

Capacité apparente de la voie alternative

	+S	-S 24 heures	-S 48 heures
T2 NH₄⁺	-2,28 (19%) $R_{\text{tot}} = -11,82$	-4,19 (59%) $R_{\text{tot}} = -7,11$	-3,55 (58%) $R_{\text{tot}} = -6,12$
AOX⁻ NH₄⁺	-0,20 (2%) $R_{\text{tot}} = -8,09$	-0,24 (3%) $R_{\text{tot}} = -8,66$	-0,22 (4%) $R_{\text{tot}} = -6,08$

Unité : $\mu\text{mol O}_2 \cdot \text{g chl}^{-1} \cdot \text{s}^{-1}$

- Expression d'AOX stimulée par la carence en S
- A réaliser sur des mitochondries isolées



Discussion

Influence de l'AOX sur la réponse photosynthétique à la carence en soufre

- La carence en S stimule l'expression de l'AOX
- T2 $\text{NH}_4^+ \leftrightarrow \text{AOX}^- \text{NH}_4^+$: déclin des paramètres photosynthétiques plus lent chez la souche AOX^-

L'absence d'AOX semble ralentir l'impact de la carence en S sur la photosynthèse

Études antérieures : Up-régulation des enzymes impliquées dans la dégradation des ROS chez $\text{AOX}^- \Rightarrow$ stress oxydatif de la carence en S est mieux toléré par la souche AOX^- que par la souche T2.

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

T2 NH_4^+ <> T2 NO_3^- : déclin des paramètres photosynthétiques plus lent sur NO_3^-

La présence de NO_3^- semble ralentir l'impact de la carence en S sur la photosynthèse

L'assimilation du NO_3^- fait intervenir une réduction du NO_2^- en NH_4^+ dans le chloroplaste

Assimilation du NO_3^- : puits d'électron pour consommer le pouvoir réducteur généré en excès par la photosynthèse => ralentissement de la photoinhibition