

# Table des matières

## Chapitre I. Introduction

|  |           |
|--|-----------|
| <b>1. Catabolisme énergétique dans la mitochondrie</b>                   | <b>1</b>  |
| <b>2. Le génome mitochondrial : structure, transmission et mutations</b> | <b>3</b>  |
| <b>3. Le complexe I</b>  | <b>5</b>  |
| <b>3.1. Composition protéique</b>  | <b>5</b>  |
| <b>3.2. Structure et topologie</b>                                       | <b>7</b>  |
| 3.2.1. Microscopie électronique  | 7         |
| 3.2.2. Fractionnement de l'enzyme  | 8         |
| 3.2.3. Mise en évidence d'interactions entre sous-unités                 | 8         |
| <b>3.3. Activité catalytique</b>   | <b>9</b>  |
| 3.3.1. NADH et FMN   | 10        |
| 3.3.2. Centres Fe-S  | 10        |
| 3.3.3. Ubiquinone  | 11        |
| 3.3.4. Mécanisme d'éjection des protons                                  | 12        |
| <b>3.4. Modèles des étapes d'assemblage</b>                              | <b>12</b> |
| 3.4.1. <i>Neurospora crassa</i> : mutants <i>nuo</i>                     | 12        |
| 3.4.2. <i>Homo sapiens</i>   | 14        |
| <b>3.5. Fonction des sous-unités</b>                                     | <b>14</b> |
| 3.5.1. Sous-unités du cœur de l'enzyme                                   | 14        |
| 3.5.1.1. Sous-unités TYKY, PSST, 24, 30, 49, 51 et 75 kDa                | 14        |
| 3.5.1.2. Sous-unités ND1-6, 4L : mutants mitochondriaux                  | 15        |
| 3.5.2. Sous-unités surnuméraires présentes chez les eucaryotes           | 16        |
| 3.5.2.1. La sous-unité SDAP ( <i>acyl-carrier protein</i> )              | 16        |
| 3.5.2.2. La sous-unité de 39 kDa   | 17        |
| 3.5.2.3. La sous-unité AQDQ  | 17        |
| 3.5.2.4. La sous-unité MWFE  | 17        |
| 3.5.2.5. La sous-unité B16.6   | 18        |
| 3.5.2.6. La sous-unité B14.7   | 18        |
| <b>4. <i>Chlamydomonas reinhardtii</i></b>                               | <b>19</b> |
| <b>4.1. Organisme modèle</b>   | <b>19</b> |
| <b>4.2. Le génome nucléaire</b>  | <b>19</b> |
| <b>4.3. Le génome mitochondrial</b>                                      | <b>20</b> |
| 4.3.1. Structure, composition  | 20        |
| 4.3.2. Héritéité de l'ADN mitochondrial                                  | 21        |
| <b>4.4. La chaîne respiratoire chez <i>Chlamydomonas</i></b>             | <b>21</b> |
| <b>4.5. Les mutations des fonctions mitochondriales</b>                  | <b>21</b> |
| 4.5.1. Les mutants ponctuels.  | 22        |
| 4.5.2. Les mutants de délétion.  | 22        |
| 4.5.3. Assemblage du complexe I chez le mutant <i>dum24</i>              | 22        |

## Chapitre II. Résultats

|   |           |
|---|-----------|
| <b>1. Caractérisation du complexe I de <i>C. reinhardtii</i></b>  | <b>23</b> |
| Publication 1. Higher plant-like subunit composition of the mitochondrial complex I from <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> : 31 conserved components among eukaryotes. Cardol P., Vanrobaeys F., Devreese B., Van Beeumen J., Matagne R. F., Remacle C. soumis à <i>Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics</i> . | 24        |
| <b>2. Analyse de mutants du complexe I de <i>C. reinhardtii</i> : étude du rôle des sous-unités ND dans l'activité et l'assemblage du complexe I</b>  | <b>25</b> |
| 2.1. Mutations affectant les séquences codantes des gènes mitochondriaux <i>nd1</i> , <i>nd4</i> , <i>nd4+nd5</i> et <i>nd6</i> , et l'extrémité 3' non codante du gène <i>nd5</i> .  | 25        |

**Publication 2. Remacle C., Baurain D., Cardol P., Matagne RF. (2001) Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in mitochondrial complex I: characterization of two mutations affecting the *nd1* coding sequence. *Genetics* 158(3):1051-60. \_\_\_\_\_ 27**

**Publication 3. Cardol P., Matagne RF., Remacle C. (2002) Impact of mutations affecting ND mitochondria-encoded subunits on the activity and assembly of complex I in *Chlamydomonas*. Implication for the structural organization of the enzyme. *J. Mol. Biol.* 319(5):1211-21. \_\_\_\_\_ 28**

**2.2. Recherche de nouveaux mutants. Caractérisation d'une mutation affectant la séquence codante du gène *nd5* \_\_\_\_\_ 29**

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 2.2.1. | Isolement de deux nouveaux mutants insensibles à la roténone _____                               | 29 |
| 2.2.2. | Analyse génétique et moléculaire des mutants PC7 ( <i>dum23</i> ) et PC10 ( <i>dum27</i> ) _____ | 29 |
| 2.2.3. | Activités enzymatiques du mutant <i>dum23</i> _____  | 31 |
| 2.2.4. | Analyse de l'assemblage du complexe I chez les mutants <i>dum23</i> et <i>dn26</i> _____         | 32 |
| 2.2.5. | Topologie du sous-complexe de 700 kDa _____  | 33 |
| 2.2.6. | Analyse protéomique préliminaire du sous-complexe de 700 kDa _____                               | 34 |

**2.3. Inactivation de l'expression des gènes nucléaires *ND4L* et *ND9* par interférence ARN \_\_\_\_\_ 36**

|          |   |    |
|----------|---|----|
| 2.3.1.   | Construction des vecteurs d'inactivation pour l'interférence ARN _____                                | 36 |
| 2.3.1.1. | Stratégie _____   | 36 |
| 2.3.1.2. | Séquence et structure du gène <i>ND9</i> _____  | 37 |
| 2.3.1.3. | Construction du vecteur pND9-RNAi _____   | 38 |
| 2.3.1.4. | Séquence et structure du gène <i>ND4L</i> _____   | 40 |
| 2.3.1.5. | Construction du vecteur pND4L-RNAi _____  | 41 |
| 2.3.2.   | Intégration des cassettes d'expression RNAi et criblage des transformants _____                       | 41 |
| 2.3.2.1. | Co-transformation avec les plasmides pND9-RNAi et pND4L-RNAi. _____                                   | 41 |
| 2.3.2.2. | Sélection et criblage des co-transformants _____  | 41 |
| 2.3.2.3. | Régulation de l'inactivation par le promoteur inductible PNIT/TUB _____                               | 44 |
| 2.3.3.   | Analyse des transcrits _____  | 44 |
| 2.3.4.   | Impact de l'inactivation de l'expression des gènes sur l'activité et l'assemblage du complexe I _____ | 45 |

**3. Impact de déficiences de la chaîne respiratoire mitochondriale sur l'activité photosynthétique et les transitions d'état \_\_\_\_\_ 47**

**3.1. Introduction \_\_\_\_\_ 47**

|          |  |    |
|----------|--|----|
| 3.1.1.   | La Photosynthèse _____   | 47 |
| 3.1.1.1. | La phase claire _____  | 48 |
| 3.1.1.2. | La phase sombre _____  | 49 |
| 3.1.2.   | Les transitions d'état _____   | 49 |
| 3.1.2.1. | Description du phénomène _____   | 49 |
| 3.1.2.2. | Bases moléculaires _____   | 49 |
| 3.1.2.3. | La kinase _____  | 49 |
| 3.1.2.4. | Le mécanisme d'activation de la kinase. _____                          | 50 |
| 3.1.2.5. | Le rôle physiologique des transitions d'état _____                     | 50 |
| 3.1.3.   | La chlororespiration et son influence sur les transitions d'état _____ | 51 |

**3.2. Résumé du travail \_\_\_\_\_ 52**

**Publication 4. Cardol P., Gloire G., Havaux M., Remacle C., Matagne RF., Franck F. (2003) Photosynthesis and State Transitions in Mitochondrial Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* Affected in Respiration. *Plant Physiol.* 133(4):2010-20. \_\_\_\_\_ 53**

## Chapitre III. Discussion

|      |  |    |
|------|--|----|
| 1.   | Le complexe I mitochondrial de <i>C. reinhardtii</i> _____   | 55 |
| 2.   | Isolement, caractérisation et impact de mutations affectant les sous-unités ND du complexe I chez <i>Chlamydomonas</i> _____ | 57 |
| 3.   | Rôle des sous-unités ND dans l'assemblage du complexe I _____  | 60 |
| 3.1. | ND1 _____  | 60 |
| 3.2. | ND4L _____   | 60 |
| 3.3. | ND4 et ND5 _____   | 61 |
| 3.4. | ND6 _____  | 63 |
| 3.5. | ND9 _____  | 63 |
| 4.   | NADH :ubiquinone oxydoréductases mitochondriales additionnelles de <i>Chlamydomonas</i> _____                                | 64 |
| 5.   | Assemblage et composition de modules du complexe I chez <i>Chlamydomonas</i> _____   | 65 |
| 6.   | Interaction photosynthèse-respiration. _____   | 66 |

## Chapitre IV. Matériel et méthodes

|        |  |    |
|--------|--|----|
| 1.     | Matériel   | 69 |
| 1.1.   | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> : souches et conditions de culture      | 69 |
| 1.2.   | <i>Escherichia coli</i> : souche et conditions de culture                | 69 |
| 1.3.   | Plasmides  | 69 |
| 1.4.   | Oligonucléotides   | 69 |
| 2.     | Techniques microbiologiques  | 70 |
| 2.1.   | Transformation de <i>Chlamydomonas</i>                                   | 70 |
| 2.2.   | Transformation d' <i>Escherichia coli</i>                                | 70 |
| 2.3.   | Mutagenèse aléatoire   | 70 |
| 2.4.   | Analyses phénotypiques   | 71 |
| 2.5.   | Analyses génétiques  | 71 |
| 3.     | Techniques de biologie moléculaire                                       | 71 |
| 3.1.   | Extraction d'ADN plasmidique de <i>E. coli</i>                           | 71 |
| 3.2.   | Extraction des acides nucléiques de <i>Chlamydomonas</i>                 | 71 |
| 3.3.   | Amplification d'ADN par PCR  | 71 |
| 3.4.   | Séquençage de l'ADN  | 71 |
| 3.5.   | Restriction de l'ADN   | 71 |
| 3.6.   | Électrophorèse d'acides nucléiques                                       | 71 |
| 3.7.   | Purification des fragments d'ADN   | 72 |
| 3.8.   | Ligation de fragments d'ADN  | 72 |
| 3.9.   | Hybridation d'ARN sur Northern blot                                      | 72 |
| 4.     | Techniques biochimiques  | 73 |
| 4.1.   | Préparation des membranes cellulaires totales de <i>Chlamydomonas</i>    | 73 |
| 4.2.   | Purification et fractionnement des mitochondries de <i>Chlamydomonas</i> | 73 |
| 4.3.   | Dosage des protéines   | 73 |
| 4.4.   | Mesure de la respiration in vivo   | 73 |
| 4.5.   | Dosage d'activités enzymatiques spécifiques                              | 73 |
| 4.6.   | Electrophorèse de protéines  | 73 |
| 4.6.1. | BN-PAGE  | 73 |
| 4.6.2. | SDS-PAGE   | 73 |
| 4.6.3. | Coloration des protéines au Bleu de Coomassie                            | 73 |
| 4.6.4. | Mise en évidence de l'activité NADH déshydrogénase                       | 74 |
| 4.7.   | Détection des protéines sur Western Blot                                 | 74 |
| 4.8.   | Analyse des peptides par spectrométrie de masse                          | 74 |
| 5.     | Analyses bioinformatiques  | 74 |
|        | Liste bibliographique  | 75 |



# 1. Catabolisme énergétique dans la mitochondrie

L'ensemble des processus impliqués dans la vie d'une cellule requiert un apport constant d'énergie (Rawn, 1990). Cette énergie est fournie par la rupture des liaisons anhydrides unissant les acides phosphoriques de l'ATP (Adénosine 5'-triphosphate). Chez les eucaryotes photosynthétiques, la synthèse de cette molécule s'effectue essentiellement dans les mitochondries et dans les chloroplastes. Les aspects liés au chloroplaste seront envisagés ultérieurement.

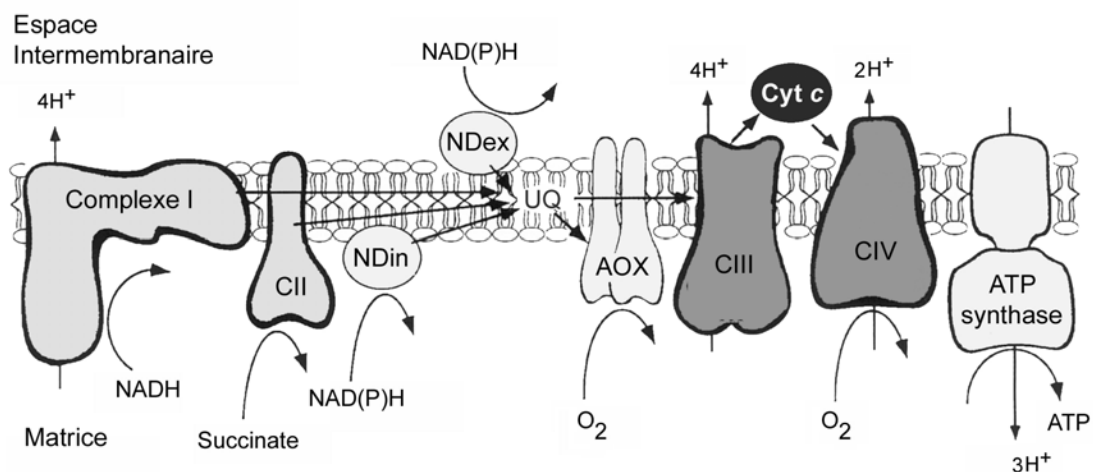
Les mitochondries sont des organites cytoplasmiques complexes limités par deux membranes qui définissent deux compartiments : l'espace intermembranaire et la matrice, délimitée par la membrane interne. Celle-ci s'invagine dans l'espace matriciel en une série de replis connus sous le nom de crêtes mitochondriales.

La membrane externe contient de nombreux canaux protéiques (porines) qui permettent la diffusion passive des protéines de masse moléculaire inférieure à 5 kDa. De ce fait, l'espace intermembranaire a une composition chimique équivalente à celle du cytosol en ce qui concerne les petites molécules. Par contre, la membrane interne comporte plusieurs transporteurs actifs qui la rendent sélectivement perméable aux petits métabolites et aux ions.

La synthèse d'ATP dans la mitochondrie est liée à la dégradation oxydative de composés organiques (glucides, lipides et certains acides aminés) en acétyl

CoA qui constitue l'un des composants du cycle de Krebs (cycle des acides tricarboxyliques). Ce cycle se déroule dans la matrice mitochondriale et comprend huit étapes distinctes catalysées par des systèmes enzymatiques bien caractérisés. La dégradation d'une molécule d'acétyl CoA fournit deux molécules de dioxyde de carbone ainsi que des coenzymes réduits: trois molécules de nicotinamide adénine dinucléotide réduit (NADH) et une molécule de flavine adénine dinucléotide réduit (FADH<sub>2</sub>). D'autres voies cataboliques (glycolyse,  $\beta$ -oxydation des acides gras) produisent également du FADH<sub>2</sub> et du NADH, mais leur participation au pool d'équivalents réducteurs est faible par rapport à la contribution du cycle de Krebs.

L'oxydation des équivalents réducteurs du cycle de Krebs (NADH et succinate/FADH<sub>2</sub>) est réalisée au sein de la membrane interne mitochondriale par une chaîne enzymatique qui utilise l'oxygène moléculaire comme accepteur final d'électrons. Cette voie comporte classiquement quatre complexes protéiques qui sont désignés en fonction de la réaction d'oxydoréduction qu'ils catalysent. Les électrons en provenance du NADH sont transférés jusqu'à l'oxygène moléculaire par la NADH:ubiquinone oxydoréductase (complexe I), l'ubiquinol:cytochrome *c* oxydoréductase (complexe cytochrome *bc1* ou complexe III) et la cytochrome *c* oxydase (complexe IV).



**Figure 1.** Chaîne de transport d'électrons dans la membrane mitochondriale interne des végétaux (adapté de Rasmusson *et al.*, 1998). UQ: pool d'ubiquinones; AOX: oxydase alternative; ND(ex/in): NAD(P)H déshydrogénase alternative (externe/interne); cyt *c*: cytochrome *c*.

Les électrons en provenance du succinate suivent le même chemin à l'exception du complexe d'entrée qui est la succinate:ubiquinone oxydoréductase (complexe II) (Figure 1). Le transfert des électrons par les complexes I, III et IV est phosphorylant, c'est-à-dire qu'il génère une différence de potentiel électrochimique ( $\Delta\mu_{\text{H}^+}$ ) en déplaçant des protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Ce gradient électrochimique, formé d'un potentiel de membrane ( $\Delta\psi$ ) et d'un gradient de protons ( $\Delta\text{pH}$ ), est utilisé par un complexe enzymatique, la  $\text{F}_0\text{F}_1$ -ATP synthase (complexe V), et permet de synthétiser l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique. Oxydation et phosphorylation sont ainsi couplées de part et d'autre de la membrane interne mitochondriale (théorie chimiosmotique de Mitchell). Le transfert des électrons peut être bloqué au niveau des différents complexes par des inhibiteurs plus ou moins spécifiques : roténone et piéricidine pour le complexe I, malonate et thénylfluoroacétone pour le complexe II, antimycine A et myxothiazol pour le complexe III, cyanure et monoxyde de carbone pour le complexe IV. Chacun de ces complexes comporte plusieurs polypeptides. Le complexe I, le plus volumineux, est constitué de 30 à 45 sous-unités; les autres complexes en contiennent de 7 à 13. Les sous-unités qui forment la partie membranaire des complexes possèdent un ou plusieurs segments hydrophobes qui traversent la membrane et présentent le plus souvent une structure de type hélice  $\alpha$ . Les protéines périphériques sont associées aux membranes par des liaisons électrostatiques ou hydrophobes. Il y a vingt ans, l'organisation spatiale des enzymes au sein de la membrane interne de la mitochondrie s'envisageait dans le cadre de la théorie de "l'état fluide" de la bicouche lipidique. On considérait que les complexes étaient distribués de manière aléatoire et diffusaient librement dans la membrane. Cependant, des données récentes suggèrent plutôt une organisation des

complexes en de vastes structures. Ainsi, il a été montré que chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, les complexes III et IV sont liés au sein de la membrane interne (Cruciat *et al.*, 2000). Dans les mitochondries de mammifères, de tels supercomplexes ont été également mis en évidence. Ils incluent le complexe I, un dimère de complexe III et jusqu'à quatre unités du complexe IV (Schagger et Pfeiffer, 2000). Chez les plantes supérieures, une association entre le complexe I et un dimère de complexe III a également été mise en évidence (Eubel *et al.*, 2003). Ce type d'agencement devrait permettre une utilisation locale de l'ubiquinol et du cytochrome *c*, indépendamment de la présence d'un pool fonctionnel, ainsi qu'une augmentation du potentiel catalytique par réduction du temps de diffusion de ces intermédiaires (Schagger et Pfeiffer, 2000).

Outre les cinq complexes décrits ci-dessus, il existe chez de nombreux végétaux, champignons, et microorganismes, plusieurs oxydoréductases supplémentaires, non phosphorylantes. Au moins deux NAD(P)H déshydrogénases insensibles à la roténone ont été identifiées. L'une, localisée sur la face externe de la membrane interne mitochondriale, se charge des équivalents réducteurs cytosoliques; l'autre, présente sur la face interne, entre en compétition avec le complexe I pour l'oxydation du NADH matriciel (Kerscher, 2000; Melo *et al.*, 1999; Rasmusson et Moller, 1991; Rasmusson *et al.*, 1999). Tout comme le complexe II, ces NADH déshydrogénases alimentent le pool d'ubiquinone en électrons en court-circuitant le premier site de translocation de protons. Enfin, il existe une possibilité de transfert des électrons du pool d'ubiquinol directement à l'oxygène via une ubiquinol oxydase communément appelée oxydase alternative (Figure 1). Le cyanure est sans effet sur cette voie qui possède néanmoins ses inhibiteurs propres (*e.g.* acide salicylhydroxamique et *n*-propyl gallate).

## 2. Le génome mitochondrial : structure, transmission et mutations

Les mitochondries sont des organites semi-autonomes. Leur structure et leur activité fonctionnelle sont sous le double contrôle du génome nucléaire et du génome mitochondrial. Ce dernier, de forme circulaire ou plus rarement linéaire, est présent en copies multiples dans chaque cellule. Il est de taille variable, comprise entre 16 kb environ pour les plus petits (cas des mammifères et animaux supérieurs) et plusieurs centaines à plusieurs milliers de kb dans le cas des plantes supérieures (revue par Gillham, 1994). Le génome mitochondrial des plantes supérieures contient de nombreuses séquences répétées capables de recombiner et de générer des molécules subgénomiques de taille variable. La quantité de chaque molécule dépend de l'équilibre entre sa fréquence de recombinaison et sa vitesse de réplication au sein de la mitochondrie (Abdelnoor *et al.*, 2003; Lelandais *et al.*, 1998).

Le nombre de gènes encodés dans l'ADN mitochondrial est également variable, mais il reste néanmoins relativement réduit en regard du nombre de constituants macromoléculaires de la mitochondrie (revue par Vedel *et al.*, 1999). En dépit de cette diversité, on note cependant un certain nombre de constantes. Sont généralement présents dans le génome mitochondrial 7 à 9 gènes *nad* ou *nd*, codant pour des sous-unités du complexe I (enzyme absent chez *Saccharomyces cerevisiae*); le gène *cob* codant pour l'apocytochrome *b*, constituant du complexe III; trois gènes *cox* (*cox1*, 2 et 3) codant pour des sous-unités du complexe IV; 2 à 3 gènes de sous-unités de l'ATP synthase (*atp6*, 8 et 9) (Tableau 1); les gènes codant pour les rRNAs de la grande et de la petite sous-unité du ribosome mitochondrial et un nombre variable (3 à 27) de gènes codant pour des tRNAs. Ont également été identifiés chez certains organismes des gènes codant pour des protéines ribosomales ainsi que des séquences provenant du génome du chloroplaste ou du noyau chez certains végétaux supérieurs.

Lors de croisements, le génome mitochondrial est généralement transmis de manière uniparentale : le zygote et/ou ses produits méiotiques ne possèdent que le génome d'un des deux parents, le plus souvent le parent maternel. Divers mécanismes, souvent mal connus, sont

mis en œuvre pour qu'ait lieu l'élimination du génome d'un des deux partenaires. Dans certains cas cependant, comme chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'hérédité est biparentale : le zygote hérite des copies des deux parents et les génomes ségrégent au cours des divisions successives. Après une vingtaine de générations, les cellules sont devenues homoplasmiques et ne contiennent plus que le génome de l'un ou l'autre parent (revue par Birky, 2001).

|                     | R.a. | P.w. | M.p. | A.t. | C.r. | B.t. | N.c. | S.c. |
|---------------------|------|------|------|------|------|------|------|------|
| <b>Complexe I</b>   |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <i>nd1</i>          | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | -    |
| <i>nd2</i>          | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | -    |
| <i>nd3</i>          | +    | +    | +    | +    | -    | +    | +    | -    |
| <i>nd4</i>          | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | -    |
| <i>nd4L</i>         | +    | +    | +    | +    | -    | +    | +    | -    |
| <i>nd5</i>          | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | -    |
| <i>nd6</i>          | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | -    |
| <i>nd7</i>          | +    | +    | +    | +    | -    | -    | -    | -    |
| <i>nd8</i>          | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>nd9</i>          | +    | +    | +    | +    | -    | -    | -    | -    |
| <i>nd10</i>         | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>nd11</i>         | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <b>Complexe II</b>  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <i>sdh2</i>         | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>sdh3</i>         | +    | -    | +    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>sdh4</i>         | +    | -    | +    | +    | -    | -    | -    | -    |
| <b>Complexe III</b> |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <i>cob</i>          | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    |
| <b>Complexe IV</b>  |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <i>cox1</i>         | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    | +    |
| <i>cox2</i>         | +    | +    | +    | +    | -    | +    | +    | +    |
| <i>cox3</i>         | +    | +    | +    | +    | -    | +    | +    | +    |
| <b>Complexe V</b>   |      |      |      |      |      |      |      |      |
| <i>atp1</i>         | +    | +    | +    | +    | -    | -    | -    | -    |
| <i>atp3</i>         | +    | -    | -    | -    | -    | -    | -    | -    |
| <i>atp6</i>         | +    | +    | +    | +    | -    | +    | +    | +    |
| <i>atp8</i>         | +    | -    | -    | -    | -    | +    | +    | +    |
| <i>atp9</i>         | +    | +    | +    | +    | -    | -    | +    | +    |

**Tableau 1.** Constituants de la chaîne respiratoire mitochondriale encodés par le génome mitochondrial chez divers organismes (adapté de Vedel *et al.*, 1999). R.a., *Reclinomonas americana*; P.w., *Prototheca wickerhamii*; M.p., *Marchantia polymorpha*; A.t., *Arabidopsis thaliana*; C.r., *Chlamydomonas reinhardtii*; B.t., *Bos taurus*; N.c., *Neurospora crassa*; S.c., *Saccharomyces cerevisiae*. + ou - indique la présence ou l'absence du gènes mitochondrial.

Le génome mitochondrial peut subir des mutations qui conduisent à l'inactivation de certaines fonctions de l'organite. La levure *S. cerevisiae* a longtemps été l'organisme modèle en matière de génétique extrachromosomique dans la mesure où, contrairement à la majorité des eucaryotes, elle peut parfaitement survivre en absence de respiration aérobie. De nombreux mutants de levure, incapables de croître en présence de glycérol mais viables sur un substrat fermentable (tel le glucose), ont été isolés et caractérisés. Ces mutants se répartissent en trois classes: les mutants  $\text{mit}^-$ , dont le complexe III, IV ou V est devenu inactif; les mutants  $\text{syn}^-$ , incapables de réaliser la synthèse protéique mitochondriale; les mutants  $\rho$  ( $\rho^-$  ou  $\rho^0$ ) dont le génome mitochondrial est délété ou absent. Chez les autres organismes, les mutations mitochondriales sont souvent très délétères, sinon létales, à l'état homoplasmique. De ce fait, peu d'entre elles ont été caractérisées.

Chez l'homme, on rencontre des mutations, souvent hétéroplasmiques, affectant notamment les gènes *cob*, *nd1-6*, *nd4L*, *cox1-3*, *atp6* ainsi que les gènes de certains tRNAs. Ces mutations sont la cause de désordres neurologiques divers telle que la neuropathie optique héréditaire de Leber, et de dégénérescences musculaires (myopathies), toujours héritées par la voie maternelle (cf. 3.5.1.2).

Chez le champignon *Neurospora crassa*, divers mutants "Stopper" (altération de la croissance) présentent des déficiences majeures de la chaîne

respiratoire. Chez ces mutants, on observe la présence simultanée de copies sauvages et de copies délétées du génome mitochondrial. La délétion, souvent de grande taille (40 kb), peut inclure les gènes *cob*, *cox1*, *oli2* (sous-unité de l'ATP synthase) ou encore certains gènes *nd* (Almasan et Mishra, 1988).

Des mutations CMS (*cytoplasmic male sterility*) ont été décrits chez plus de 140 espèces de plantes supérieures. Les mutants CMS présentent un phénotype normal mais ne produisent pas de pollen fonctionnel. Dans les quelques cas étudiés au niveau moléculaire, la stérilité mâle est liée à l'absence de certains polypeptides et à la présence de protéines anormales (Gutierrez *et al.*, 1999; Gutierrez *et al.*, 1997). Des mutants NCS (*non chromosomal stripe*) ont également été décrits chez *le maïs*. Ils sont caractérisés par une croissance lente et une faible production de graines. L'homoplasmie de la mutation entraîne la létalité du caryopse tandis que l'hétéroplasmie conduit à une ségrégation des mitochondries dans les plantules. Les plantes présentent alors des lignées de cellules foliaires dépigmentées et des secteurs de caryopses avortés sur les épis. Parmi les mutants NCS caractérisés, on note la présence de délétions affectant divers gènes tels que *nd4*, *cox2* ou encore des gènes encodant des protéines ribosomales (Marienfeld et Newton, 1994; Newton *et al.*, 1989; Yamato et Newton, 1999).

Les mutants du complexe I, brièvement évoqués ci-dessus, seront décrits plus en détails dans la suite de l'introduction (cf. 3.5.1.2).



## 3. Le complexe I

### 3.1. Composition protéique

Parmi les complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire, le complexe I est incontestablement le plus volumineux. Chez le bœuf (*Bos taurus*) et chez l'homme, il comporte 45 sous-unités et sa masse moléculaire est de 980 kDa (Hirst *et al.*, 2003). Une 46<sup>ème</sup> sous-unité, non encore séquencée, est également présente dans le complexe bovin. Chez les mammifères, sept constituants du complexe I sont encodés par le génome mitochondrial (ND1-6, 4L) tandis que les autres polypeptides sont le produit de gènes nucléaires et donc importées du cytoplasme dans la mitochondrie.

La composition du complexe I a été également étudiée chez quelques autres eucaryotes. Une compilation des données les plus récentes est présentée dans le Tableau 2. Chez le champignon *Neurospora crassa*, le complexe I est constitué d'au moins 33 sous-unités parmi lesquelles 30 sont homologues des constituants du complexe I bovin (Videira et Duarte, 2002). Chez le nématode *Caenorhabditis elegans*, une étude *in silico* révèle que 34 gènes encodent des homologues potentiels des sous-unités mammaliennes. En combinant approche génomique et analyse protéomique chez *Arabidopsis thaliana* et *Oriza sativa*, Heazlewood *et al.* (2003) ont suggéré que le complexe I des plantes supérieures est constitué de 40 sous-unités, pour une masse moléculaire totale de l'ordre de 1000 kDa. Des 29 composants communs entre plantes et mammifères, 23 sont présentés par ces auteurs comme étant également conservés chez les champignons (Heazlewood *et al.*, 2003). Les données du suggèrent qu'il y aurait 27 sous-unités conservées entre les mammifères, les champignons et les plantes.

Malgré un degré de conservation relativement important au sein des eucaryotes, plusieurs sous-unités pourraient être spécifiques à chaque règne : c'est le cas de 8 sous-unités chez les mammifères, deux chez les champignons et une dizaine chez les plantes supérieures (Heazlewood *et al.*, 2003).

Il faut signaler que la nomenclature utilisée pour désigner les sous-unités du complexe I varie selon les organismes. Par souci de clarté, nous utiliserons le plus souvent dans ce travail la nomenclature du bœuf pour désigner les homologues présents chez les autres organismes. Elle consiste à nommer les sous-unités en fonction de leur masse moléculaire (*e.g.* 75 kDa, B13)

ou par les quatre premiers acides aminés N-terminaux (*e.g.* AGGG, SGDH) (Walker, 1992).

Le Tableau 2 montre encore qu'il existe chez les bactéries *Escherichia coli*, *Paracoccus denitrificans* ou encore *Rhodobacter capsulatus* une NADH :UQ oxydoréductase constituée seulement de 14 sous-unités (Dupuis *et al.*, 1998a; Finel, 1998; Friedrich, 1998; Yagi *et al.*, 1998). Notons que le nombre de gènes chez les bactéries est parfois de treize en raison de la fusion entre les gènes *nuoC* et *nuoD* (cas d'*E. coli* (Friedrich, 1998)). Les quatorze sous-unités sont les homologues de constituants du complexe I mitochondrial. Sept polypeptides correspondent aux sous-unités hydrophobes encodées par le génome mitochondrial (ND1-6, 4L) tandis que les autres sont équivalents aux sous-unités de 75, 51, 49, 30, 24, 23 (TYKY) et 20 kDa (PSST). Il est communément admis que ces quatorze protéines constituent le minimum requis pour former un complexe I capable d'assurer le transfert d'électrons du NADH à l'ubiquinone et la translocation de protons au travers de la membrane. Les raisons de la complexification du complexe I chez les eucaryotes sont encore inconnues. Sur base des connaissances actuelles, seul un nombre restreint des sous-unités surnuméraires possède une activité catalytique (Heazlewood *et al.*, 2003; Walker, 1992) (*cf.* Tableau 2 et point 3.5).

---

**Tableau 2 (verso).** Compilation des données relatives à la composition polypeptidique du complexe I chez *R. capsulatus* (Dupuis *et al.*, 1998a), *B. taurus*, *H. sapiens* (Hirst *et al.*, 2003), *C. elegans* (Tsang et Lemire, 2003), *N. crassa* (Videira et Duarte, 2002), *A. thaliana* et *O. sativa* (Heazlewood *et al.*, 2003). S.H.I. : séquence homologue identifiée ; N.I. : non identifié.

**Procarvotés**

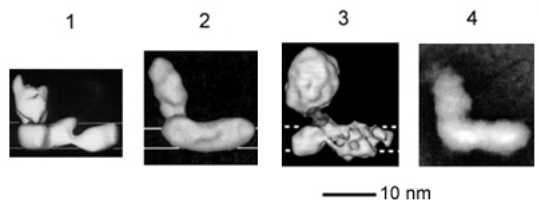
**Eucaryotes**

| Procarvotés                                   |                  | Eucaryotes        |                   |                  |                                       |   |
|---|------------------|-------------------|-------------------|------------------|---------------------------------------|---|
|   |                  | Animaux           |                   | Mycètes          | Plantes sup.                          |   |
| <i>R. capsulatus</i> ,<br><i>E. coli</i> ,... |                  | Mammifères        | Nématodes         | <i>N. crassa</i> | <i>A. thaliana</i> , <i>O. sativa</i> | Fonctions, propriétés   |
|   | <i>B. taurus</i> | <i>H. sapiens</i> | <i>C. elegans</i> |                  |                                       |   |
| 14 s.-u.                                      | 45 sous-unités   |                   | 34 s.-u.          | 33 s.-u.         | 40 sous-unités                        |   |
| NUOB  | PSST (20)        | NDUFS7            | W10D5.2           | 19.3             | At5g11770                             | liaison centre Fe-S, interaction quinone ?                        |
| NUOI  | TYKY (23)        | NDUFS8            | T20H4.5           | 21.3c            | At1g16700                             | liaison centre Fe-S   |
| NUOE  | 24               | NDUFV2            | F53F4.10          | 24               | At4g02580                             | liaison centre Fe-S, fixation NAD                                 |
| NUOC  | 30               | NDUFS3            | T10E9.7           | 30.4             | ND9                                   |   |
| NUOD  | 49               | NDUFS2            | T26A5.3           | 49               | ND7                                   | liaison centre Fe-S, interaction quinone ?                        |
| NUOF  | 51               | NDUFV1            | C09F10.3          | 51               | At5g08530                             | liaison centre Fe-S, fixation NADH et FMN                         |
| NUOG  | 75               | NDUFS1            | Y45G12B.1         | 78               | At5g37510                             | liaison centre Fe-S   |
| NUOH  | ND1              | ND1               | ND1               | ND1              | ND1                                   | interaction quinone ?   |
| NUON  | ND2              | ND2               | ND2               | ND2              | ND2                                   | antiport Na/H+  |
| NUOA  | ND3              | ND3               | ND3               | ND3              | ND3                                   |   |
| NUOM  | ND4              | ND4               | ND4               | ND4              | ND4                                   | antiport Na/H <sup>+</sup> ; interaction quinone ?                |
| NUOK  | ND4L             | ND4L              | ND4L              | ND4L             | ND4L                                  | antiport Na/H <sup>+</sup>  |
| NUOL  | ND5              | ND5               | ND5               | ND5              | ND5                                   | antiport Na/H <sup>+</sup> ; interaction quinone ?                |
| NUOJ  | ND6              | ND6               | ND6               | ND6              | ND6                                   |   |
|   | MWFE (7.5)       | NDUFA1            | N.I.              | 9.8              | At3g08610                             | antiport Na/H <sup>+</sup>  |
|   | B8               | NDUFA2            | B63D3A.7          | 10.5             | At5g47890                             |   |
|   | SDAP (8)         | NDUFAB1           | Y56A3A.19         | ACP (9.6)        | At1g65290                             | groupement phosphopantéthine                                      |
|   | B13              | NDUFA5            | C33A12.1          | 29.9             | At5g52840                             |   |
|   | 13 -a            | NDUFS6            | F22D6.4           | 13               | At3g03070                             |   |
|   | B14              | NDUFA6            | Y57G11C.12        | 14.8             | At3g12260                             |   |
|   | PGIV (19)        | NDUFA8            | Y54F10AM.5        | 20.8             | At5g18800                             |   |
|   | B17.2            | DAP13             | Y94H6A.8          | 13.4             | At3g03100                             |   |
|   | B18              | NDUFB7            | D2030.4           | S.H.I.           | At2g02050                             |   |
|   | AQDQ (18)        | NDUFS4            | ZK973.10          | 21               | At5g67590                             | phosphorylable  |
|   | B22              | NDUFB9            | C16A3.5           | S.H.I.           | At4g34700                             |   |
|   | PDSW (22)        | NDUFB10           | F59C6.5           | 12.3             | At4g16450                             |   |
|   | 39               | NDUFA9            | Y53G8AL.2         | 40               | At2g20360                             | fixation NADPH  |
|   | PFFD (15)        | NDUFS5            | Y54E10134BL.      | N.I.             | At3g62790                             |   |
|   | B16.6            | GRIM-19           | C34B2.8           | N.I.             | At1g04630                             | implication dans l'apoptose                                       |
|   | ASHI (19)        | NDUFB8            | Y51H1A.3          | S.H.I.           | N.I.                                  |   |
|   | B14.5b           | NDUFC2            | Y71H2AM.4         | N.I.             | N.I.                                  |   |
|   | AGGG (8)         | NDUFB2            | F44G4.2           | N.I.             | N.I.                                  |   |
|   | 42               | NDUFA10           | K04G7.4A          | N.I.             | N.I.                                  |   |
|   | B14.5a           | NDUFA7            | F45H10.3          | N.I.             | N.I.                                  |   |
|   | SGDH (16)        | NDUFB5            | C25H3.9A          | N.I.             | N.I.                                  |   |
|   | B14.7            | NDUFA11           | N.I.              | 21.3b            | N.I.                                  | homologie avec Tim17,22,23  |
|   | B9               | NDUFA3            | N.I.              | 9.5              | N.I.                                  | interaction quinone ?   |
|   | 10               | NDUFV3            | N.I.              | N.I.             | N.I.                                  |   |
|   | ESSS (14.5)      | NP17.3            | N.I.              | N.I.             | N.I.                                  |   |
|   | KFYI (6)         | NDUFC1            | N.I.              | N.I.             | N.I.                                  |   |
|   | MNLL (7)         | NDUFB1            | N.I.              | N.I.             | N.I.                                  |   |
|   | B12              | NDUFB3            | N.I.              | N.I.             | N.I.                                  |   |
|   | B15              | NDUFB4            | N.I.              | N.I.             | N.I.                                  |   |
|   | B17              | NDUFB6            | N.I.              | N.I.             | N.I.                                  |   |
|   | MLRQ (9)         | NDUFA4            | N.I.              | N.I.             | N.I.                                  |   |
|   | N.I.             | N.I.              | N.I.              | 20.9             | At4g16450                             |   |
|   | N.I.             | N.I.              | N.I.              | 17.8             | N.I.                                  |   |
|   | N.I.             | N.I.              | N.I.              | 21.3a            | N.I.                                  |   |
|   | N.I.             | N.I.              | N.I.              | N.I.             | At3g57785                             |   |
|   | N.I.             | N.I.              | N.I.              | N.I.             | AK059007                              |   |
|   | N.I.             | N.I.              | N.I.              | N.I.             | At2g31490                             |   |
|   | N.I.             | N.I.              | N.I.              | N.I.             | At4g20150                             |   |
|   | N.I.             | N.I.              | N.I.              | N.I.             | At2g27730                             |   |
|   | N.I.             | N.I.              | N.I.              | N.I.             | At1g67350                             |   |
|   | N.I.             | N.I.              | N.I.              | N.I.             | At5g66510                             |   |
|   | N.I.             | N.I.              | N.I.              | N.I.             | At1g47260                             | similaire à des protéines bactériennes liant des ferripyochélines |
|   | N.I.             | N.I.              | N.I.              | N.I.             | At3g48680                             |   |
|   | N.I.             | N.I.              | N.I.              | N.I.             | At5g63510                             |   |

## 3.2. Structure et topologie

### 3.2.1. Microscopie électronique

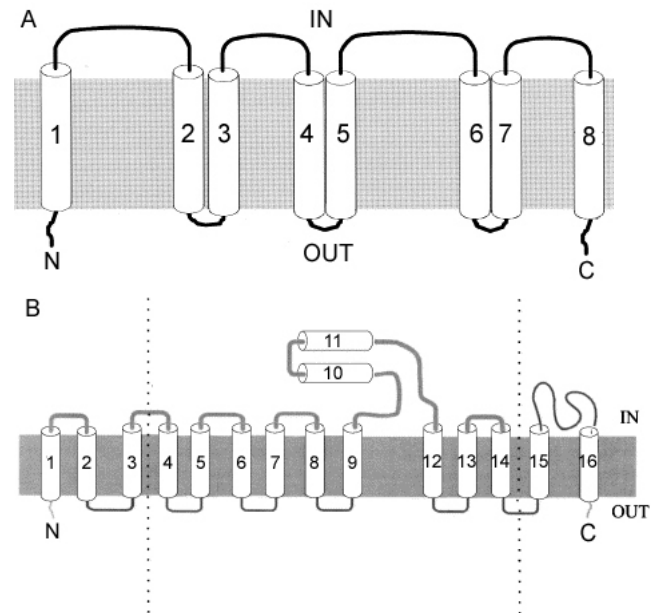
Parmi les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale, seul le complexe I n'a pu être cristallisé. La cause majeure de cet échec réside certainement dans la nature multi-protéique très complexe de l'enzyme et dans le caractère particulièrement hydrophobe de plusieurs de ses sous-unités. Des études ultrastructurales du complexe I de *B. taurus* (Grigorieff, 1998), *N. crassa* (Guenebaut *et al.*, 1997; Hofhaus *et al.*, 1991), *Yarrowia lipolytica* (Djafarzadeh *et al.*, 2000) et de la NADH : déshydrogénase d'*E. coli* (Guenebaut *et al.*, 1998) et d'*Aquifex aeolicus* (Peng *et al.*, 2003) ont néanmoins permis de révéler la structure générale de l'enzyme. Le complexe I présente une forme de L avec un bras hydrophobe enchâssé dans la membrane interne de la mitochondrie (membrane plasmique chez les bactéries) et un bras périphérique qui fait saillie dans la matrice (dans le cytosol chez les bactéries) (Figure 2).



**Figure 2.** Structure établie en microscopie électronique des complexes I mitochondriaux de *N. crassa* (1,2) (Guenebaut *et al.*, 1997; Hofhaus *et al.*, 1991), de *B. taurus* (3) (Grigorieff, 1998) et de *Y. lipolytica* (4) (Djafarzadeh *et al.*, 2000). La membrane est schématisée par les traits.

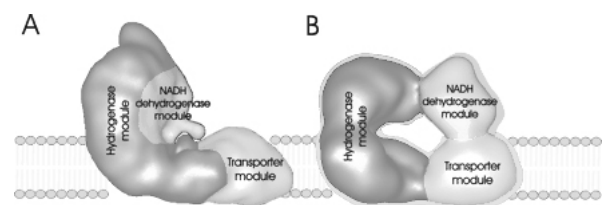
Le bras périphérique serait exclusivement composé de sous-unités à caractère hydrophile, toutes encodées dans le noyau (à l'exception des sous-unités ND7 et ND9 chez les plantes). Quant au long bras ancré dans la membrane interne, il contiendrait les sous-unités ND1-6 et ND4L, toutes encodées dans le génome mitochondrial, ainsi que plusieurs sous-unités d'origine nucléaire. Les sept sous-unités ND comportent en tout plus de cinquante segments hydrophobes, de vingt-cinq résidus de moyenne, pouvant définir des domaines transmembranaires (Fearnley et Walker, 1992). Récemment, sur base d'expériences d'expression de polypeptides résultant de la fusion entre la phosphatase alcaline PhoA et des formes tronquées des protéines NuoL et NuoH de la bactérie *R. capsulatus* (homologues de ND5 et ND1), un modèle de topographie transmembranaire a été proposé pour les

homologues bactériens des sous-unités ND1, ND2, ND4 et ND5 (Mathiesen et Hagerhall, 2002; Roth et Hagerhall, 2001) (Figure 3).



**Figure 3.** Modèle de topologie transmembranaire chez *Rhodobacter capsulatus*. IN et OUT indiquent respectivement l'espace matriciel et l'espace intermembranaire. A. Sous-unité NuoH (ND1) (Roth et Hagerhall, 2001). B. Sous-unité NUOL (ND5) (Mathiesen et Hagerhall, 2002). La région comprise entre les deux traits discontinus correspond à la région conservée entre NuoL, NuoN (ND2) et NuoM (ND4).

En 1998, Yamaguchi *et al.* ont suggéré que la fixation de substrats ou d'inhibiteurs entraînait des changements de conformation du complexe I bovin (Yamaguchi *et al.*, 1998). Récemment, une étude ultrastructurale du complexe d'*E. coli* a montré que l'enzyme présentait au moins deux conformations stables : la structure en forme de L décrite ci-dessus et une structure en fer à cheval où les deux domaines viennent se placer côte à côte (Figure 4).

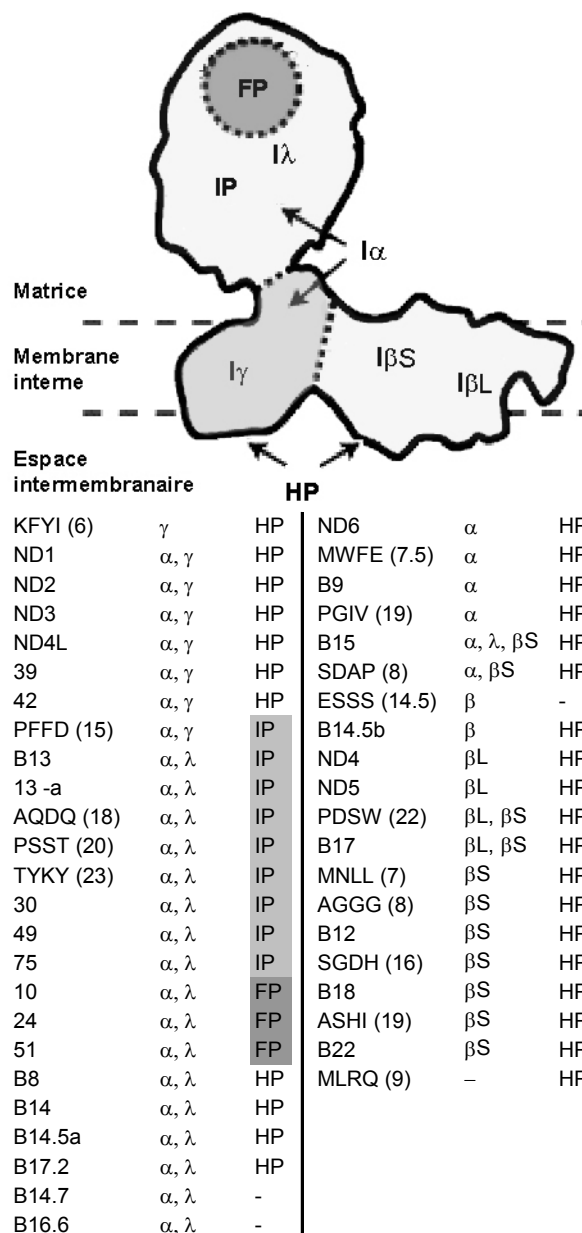


**Figure 4.** Représentation schématique des conformations de la NADH:ubiquinone oxydoréductase de *E. coli*, dans des conditions de force ionique élevée (A) ou faible (B) (Bottcher *et al.*, 2002).

Seule la conformation en fer à cheval est active et pourrait correspondre à la forme native chez *E. coli* (Bottcher *et al.*, 2002). Ces observations n'ont cependant pas été répétées par le groupe de Sazanov qui considère que la structure en L est la forme active *in vivo* (Sazanov *et al.*, 2003).

### 3.2.2. Fractionnement de l'enzyme

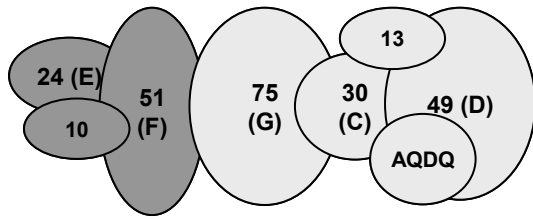
L'utilisation d'agents chaotropes a permis de dissocier le complexe I bovin en divers sous-complexes dont la composition polypeptidique a été déterminée. Dès 1985, l'utilisation du perchlorate de potassium a conduit à l'isolement de trois fractions : une fraction FP (Flavo-Protein), une fraction IP (Iron-Protein) et une fraction HP (Hydrophobic-Protein) (Hatefi, 1985). La fraction FP contient les sous-unités de 51, 24 et 10 kDa, une molécule de FMN, et des ions Fer. La fraction IP est caractérisée par un grand nombre d'atomes de fer. Elle contient entre autres les sous-unités B13, TYKY, PSST, PFFD, AQDQ, 13a, 30, 49 et 75 kDa. Enfin, la fraction HP est constituée des sept sous-unités encodées dans la mitochondrie et de plusieurs sous-unités d'origine nucléaire (Figure 5). Notons qu'à cette époque, plusieurs composants du complexe I n'avaient pas encore été identifiés. Plus récemment, une expérience de fractionnement, réalisée à l'aide de N,N-diméthyl dodécylamine N-oxyde (LDAO) et de  $\beta$ -mercaptoéthanol, a conduit à l'obtention de deux fractions :  $I\alpha$  et  $I\beta$ . Le sous-complexe  $I\alpha$ , qui possède une activité NADH:ubiquinone oxydoréductase insensible à la roténone, comprend 22 sous-unités dont notamment celles identifiées au préalable dans les fractions IP et FP (Finel *et al.*, 1992). Quinze protéines majoritairement hydrophobes sont dénombrées dans le sous-complexe  $I\beta$ . Une expérience similaire menée par Sazanov *et al.* en 2000 a permis de localiser quatre sous-unités additionnelles (ND1,3,4L et KFYI) et de définir deux fractions au sein de chacun des deux sous-complexes :  $I\alpha$  comprend les fragment  $I\lambda$  et  $I\gamma$  tandis que  $I\beta$  se dissocie en  $I\beta L$  et  $I\beta S$  (Figure 5). Enfin, la localisation des trois dernières sous-unités identifiées [B16.6 (Fearnley *et al.*, 2001), B14.7 et ESSS (Carroll *et al.*, 2002)] a été élucidée récemment (Hirst *et al.*, 2003). La Figure 5 reprend les données majeures de la littérature.



**Figure 5.** Localisation des 45 sous-unités du complexe I bovin au sein des sous-complexes obtenus par dissociation de l'enzyme et relations structurelles entre les sous-complexes [compilation de données (Finel *et al.*, 1992; Hatefi, 1985; Hirst *et al.*, 2003; Sazanov *et al.*, 2000)]

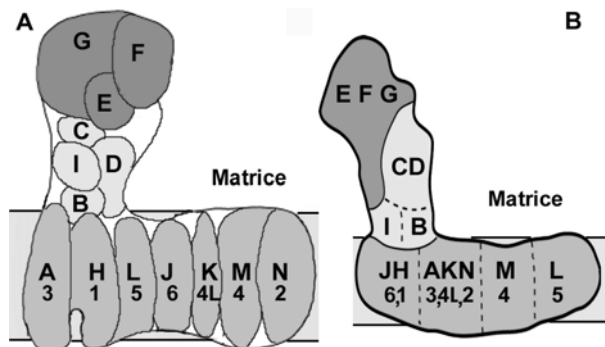
### 3.2.3. Mise en évidence d'interactions entre sous-unités

Chez le bœuf, des expériences de liaison chimique et d'immunoprécipitation ont montré qu'il existe des interactions entre les sous-unités 10, 24 et 51 kDa ; 75, 30 et 51 kDa ; 49 kDa, AQDQ, 13a et 30 kDa ; et enfin entre la sous-unité de 30 kDa et les sous-unités AQDQ et 13a (Cleeter et Ragan, 1985; Yamaguchi et Hatefi, 1993). Ceci conduit au modèle d'interaction présenté à la Figure 6.



**Figure 6.** Représentation schématique des interactions entre les sous-unités appartenant aux fragments FP (gris foncé) et IP (gris clair) du complexe I bovin (adapté de (Cleeter et Ragan, 1985; Yamaguchi et Hatefi, 1993)). Les lettres entre parenthèses correspondent à la nomenclature des sous-unités bactériennes.

Des études plus récentes menées sur les sous-unités du bras périphérique de l'enzyme de *R. capsulatus* suggèrent que les sous-unités NuoE et NuoF (24 et 51 kDa) d'une part (Duborjal *et al.*, 1997), NuoB, C, D et I (PSST, 30 kDa, 49 kDa, TYKY) d'autre part (Dupuis *et al.*, 2001), sont associées. Ces deux fragments correspondent respectivement aux fragments FP et IP identifiés chez le bœuf. De plus, chez *Aquifex aeolicus*, la sous-unité NuoG (75 kDa) semble être associée de manière stable aux sous-unités NuoE et NuoF (Peng *et al.*, 2003). Si les auteurs s'accordent assez bien sur la topologie des sous-unités majeures du bras périphérique de l'enzyme, l'organisation des sept protéines ND est encore controversée (Dupuis *et al.*, 2001; Holt *et al.*, 2003). Deux modèles récents relatifs à l'organisation des sous-unités bactériennes sont présentés à la Figure 7.

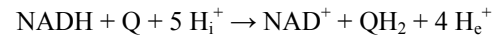


**Figure 7.** Modèles d'organisation des sous-unités NuoA-N bactériennes. A, *R. capsulatus* (Dupuis *et al.*, 2001) ; B, *E. coli* (Holt *et al.*, 2003). Les numéros des sous-unités ND mitochondriales correspondantes sont également indiqués.

De façon intéressante, une étude de cryo-cristallographie réalisée chez le bœuf indique que la sous-unité ND5 est située à l'extrémité du bras membranaire (fragment I $\beta$ ) (Sazanov et Walker, 2000). La dissociation du complexe bovin suggère par ailleurs que les sous-unités ND4/ND5 d'une part et ND1/2/3/4L d'autre part font partie de deux sous-complexes distincts (Figure 5) (Sazanov *et al.*, 2000). Ces données sont en bon accord avec le modèle proposé par Holt *et al.* (2003) pour l'enzyme d'*E. coli* (Figure 7b).

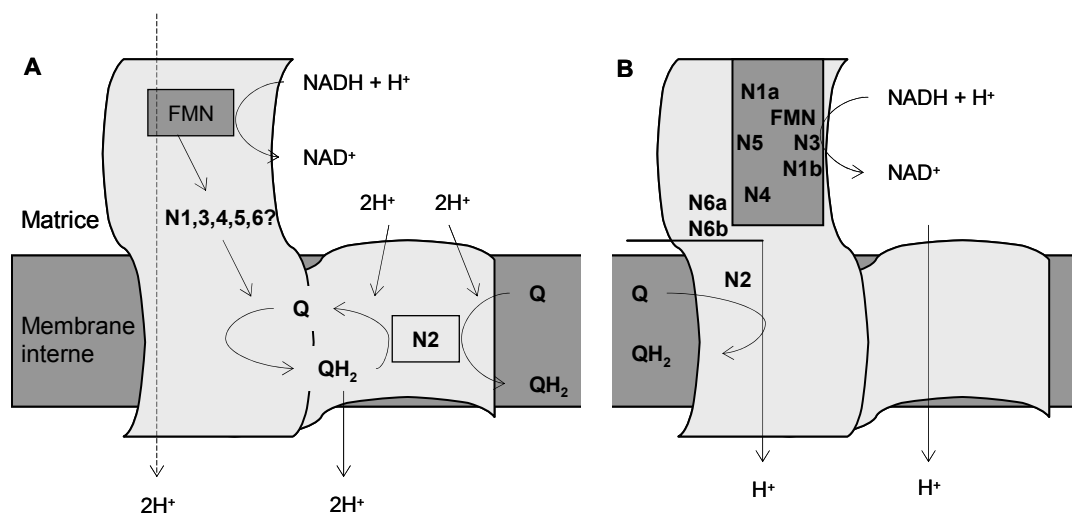
### 3.3. Activité catalytique

Le complexe I constitue la voie d'entrée principale des électrons dans la chaîne respiratoire mitochondriale. Le transfert de deux électrons du NADH à l'ubiquinone y est couplé à un transport de 4 protons à travers la membrane interne de la mitochondrie, en accord avec l'équation générale suivante:



où  $\text{Q}$  représente l'ubiquinone, et  $\text{H}_i^+$ ,  $\text{H}_e^+$  les protons prélevés de la face interne (i) de la membrane interne et délivrés à sa face externe (e), dans l'espace intermembranaire (Walker, 1992; Weiss *et al.*, 1991). Cette réaction d'oxydoréduction entre le NADH et l'ubiquinone fait intervenir une série de cofacteurs liés à l'enzyme : une flavine mononucléotide (FMN) liée de manière non-covalente, huit à neuf centres fer-soufre (Fe-S), une (ou deux) ubiquinone(s), et un site de fixation pour le NADH.

Le trajet exact des électrons du NADH à l'ubiquinone via les groupements prosthétiques et le mécanisme de pompage de protons sont encore loin d'être élucidé (*cf.* ci-après). Deux modèles schématiques sont présentés à la Figure 8. Comme on le voit, le modèle proposé par Friedrich et Böttcher en 2004 (Figure 8b) n'a pas considérablement évolué par rapport à celui proposé par Weiss treize ans plus tôt (Figure 8a) (Weiss *et al.*, 1991).



**Figure 8.** Représentations schématiques du transfert des électrons et de protons au sein du complexe I (A (Weiss *et al.*, 1991), B (Friedrich et Bottcher, 2004))

### 3.3.1. NADH et FMN

La nicotinamide adénine dinucléotide (NADH) est un composé hydrosoluble formé d'un mononucléotide de nicotinamide et d'un acide adénylique liés entre eux par une liaison pyrophosphate.

Le site catalytique d'oxydation du NADH a été identifié au sein du complexe I : l'utilisation d'analogues photoactivables du  $\text{NAD}^+$  a permis de marquer la protéine de 51 kDa dont la séquence contient par ailleurs deux motifs similaires au motif consensus des sites de fixation du NADH (Walker, 1992).

Le NADH fournit deux électrons au groupement flavinique du complexe I (flavine mono-nucléotide ou FMN). Par analogie avec le site de fixation du FMN sur la phtalate dioxygénase, Walker a proposé un site de fixation du FMN également sur la sous-unité de 51 kDa. L'interruption du gène encodant cette protéine chez *N. crassa*, conduit à l'assemblage d'un complexe dépourvu de la sous-unité de 51 kDa, de FMN et incapable de fixer le NADH (Fecke *et al.*, 1994).

### 3.3.2. Centres Fe-S

Le nombre et la localisation des centres Fe-S du complexe I ont été étudiés par résonance paramagnétique électronique (RPE), par analyse d'homologie de séquences (résidus cystéine conservés), ainsi que par des expériences de mutagenèse.

Brièvement, les centres Fer-Soufre (Fe-S) identifiés au sein du complexe I appartiennent à deux groupes :

(i) les centres bi-nucléaires  $[2\text{Fe-2S}]$  sont composés de deux atomes de fer qui sont pontés par deux atomes de soufre inorganique et liés à quatre groupements thiol de la chaîne polypeptidique;

(ii) les centres tétra-nucléaires  $[4\text{Fe-4S}]$  contiennent quatre atomes de fer et quatre atomes de soufre disposés en une structure cubique où chaque atome de fer est lié à un groupement thiol de la chaîne polypeptidique.

La réduction des centres Fe-S entraîne le passage du fer d'un état d'oxydation +2 à un état d'oxydation +1. Dans l'état d'oxydation +1, le centre possède un électron non apparié et présente donc un signal RPE spécifique (dépendant de l'environnement).

Ces analyses ont montré qu'il existait au moins huit centres Fe-S : deux  $[2\text{Fe-2S}]$  nommés N1a et N1b, et six  $[4\text{Fe-4S}]$  nommés N2-5, N6a et N6b (Friedrich *et al.*, 2000; Ohnishi, 1998; Rasmussen *et al.*, 2001).

Les motifs potentiels de liaison au sein des sous-unités du complexe I sont donnés dans le Tableau 3. Tous les centres seraient liés à la partie hydrophile du complexe I, à l'exception du centre N2  $[4\text{Fe-4S}]$  qui serait associé à une protéine amphiphile située à la jonction entre le bras périphérique et le domaine hydrophobe. Ce centre serait directement impliqué dans la réduction de l'ubiquinone présente dans le bras membranaire.

|             |   |
|-------------|---|
| NuoF/51 kDa | -CxxC-xx-C-x <sub>39</sub> -C-, [4Fe-4S] <sub>N3</sub> , sites de liaison du NADH et d'un FMN   |
| NuoE/24 kDa | -CxxxxC-x <sub>35</sub> -CxxxC-, [2Fe-2S] <sub>N1a ou N1b?</sub>  |
| NuoG/75 kDa | -D-x <sub>6</sub> -E-x <sub>19</sub> -C-x <sub>10</sub> -CxxC-x <sub>11-13</sub> -C-x <sub>35</sub> -CxxCxxxxxC-x <sub>38</sub> -CxxCxxCx <sub>43-46</sub> -CP-, [2Fe-2S] <sub>N1b ou N1a?</sub> , [4Fe-4S] <sub>N4</sub> , [4Fe-4S] <sub>N5?</sub> |
| NuoB/PSST   | -CCxxE-x <sub>60</sub> -C-x <sub>30</sub> -CP [4Fe-4S] <sub>N2?</sub>   |
| NuoI/TYKY   | -CxxCxxCxxxCP-x <sub>27-28</sub> -CxxCxxCxxxCP- deux [4Fe-4S] <sub>N6 ou N2?</sub>  |

**Tableau 3.** Motifs potentiels de liaison des cofacteurs du complexe I (Ohnishi, 1998).

La nature de la sous-unité liant ce centre est encore incertaine. La modification de résidus conservés de la sous-unité PSST de *N. crassa* (Duarte *et al.*, 2002) ou de la sous-unités de 49 kDa de *Y. lipolytica* (Kashani-Poor *et al.*, 2001b) a pour effet de perturber le centre N2, suggérant que chacune des deux sous-unités contiendrait des ligands.

Notons également que d'autres données suggèrent encore que des protéines spécifiques des eucaryotes, et donc absentes de l'enzyme bactérien (*e.g.* PGIV), pourraient intervenir dans la liaison de centres Fe-S (Videira, 1998)

### 3.3.3. Ubiquinone

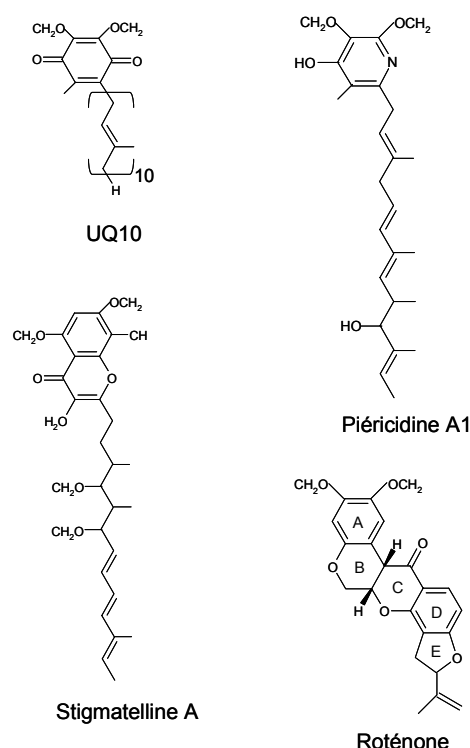
L'accepteur final d'électrons du complexe I est l'ubiquinone. Il s'agit d'une molécule liposoluble constituée d'un noyau 1,4-benzoquinonique possédant une chaîne latérale hydrophobe polyisoprène (Figure 9). L'ubiquinone fonctionne comme un médiateur mobile pour le transfert des électrons au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale. Elle présente trois états d'oxydation possibles : la forme oxydée (ou quinone), la forme radicalaire (semi-quinone) et la forme réduite (hydroquinone ou quinol).

La nature et le nombre de sites de fixation de l'ubiquinone au complexe I sont sujets à controverse.

La sous-unité ND1 a été initialement proposée comme site de fixation de l'ubiquinone sur base d'expériences de marquage à la dihydroroténone triciée réalisée chez le boeuf (Earley *et al.*, 1987). Une diminution d'affinité pour l'ubiquinone est également observée lors de la substitution de résidus glutamate conservés dans l'homologue de ND1 chez *Paracoccus denitrificans* (Kurki *et al.*, 2000). La sous-unité ND1 semble donc bien impliquée dans la fixation du substrat.

D'autres études de marquage suggèrent cependant que la piéricidine et la roténone, deux

inhibiteurs du complexe I analogues à l'ubiquinone (Figure 9) se fixent à la fois aux protéine PSST et ND1 (Schuler et Casida, 2001). Ces mutations affectent aussi le centre Fe-S N2, potentiellement lié à la sous-unité NuoB/PSST.



**Figure 9.** Structure de l'ubiquinone (UQ10) et de trois de ses principaux inhibiteurs.

Par ailleurs, chez *R. capsulatus* et *Y. lipolytica*, des mutations ponctuelles affectant la sous-unité NuoD (49 kDa) modifient la liaison de la piéricidine et d'autres analogues de l'ubiquinone au complexe I (Darrouzet *et al.*, 1998; Kashani-Poor *et al.*, 2001b; Prieur *et al.*, 2001) S'appuyant sur l'hypothèse que le site de fixation la piéricidine est celui de l'ubiquinone,

ces auteurs suggèrent que le site de liaison de l'ubiquinone pourrait être constitué d'une poche hydrophobe localisée dans la sous-unité ND1 et d'une tête polaire portée par la sous-unité de 49 kDa ou située à l'interface des protéines PSSST et 49 kDa (Darrouzet *et al.*, 1998; Prieur *et al.*, 2001). Il est intéressant de remarquer que le motif de liaison des quinones dans les centres réactionnels chez les bactéries photosynthétiques (L-X<sub>3</sub>-H-X<sub>2,3</sub>-L/T/S) est présent dans la région N-terminale hautement conservée de la sous-unité de 49 kDa (Prieur *et al.*, 2001). Ce motif a aussi été identifié dans la séquence du cytochrome *b* du complexe III, dans la séquence des oxydases alternatives mitochondriales, ainsi que dans les protéines ND4 et ND5 du complexe I. Sur cette base, il a été suggéré que ND4 et/ou ND5 pourraient également contenir un site de fixation de l'ubiquinone (Fisher et Rich, 2000). Il faut également signaler que l'utilisation d'un dérivé radioactif de l'azido-ubiquinone permet de marquer la sous-unité NuoM (ND4) chez *E. coli* (Gong *et al.*, 2003) tandis que l'utilisation d'un analogue marqué du fenpyroximate (inhibiteur du complexe I) conduit au marquage de la protéine ND5 chez le bœuf (Nakamaru-Ogiso *et al.*, 2003). Enfin, l'emploi d'un autre analogue de l'ubiquinone chez *N. crassa* marque la sous-unité hydrophobe de 9,5 kDa, absente du complexe bactérien (Heinrich et Werner, 1992). Prises dans leur ensemble, ces données plaident en faveur de l'existence de deux sites de fixation de l'ubiquinone : l'un impliquant la triade ND1/PPST/49 kDa situé à la jonction des deux bras de l'enzyme, l'autre, membranaire, lié aux sous-unités ND4/ND5(9,5 kDa).

### 3.3.4. Mécanisme d'éjection des protons

Le mécanisme par lequel le complexe I génère un gradient électrochimique qui contribue à la synthèse d'ATP fait l'objet de plusieurs hypothèses dans lesquelles le nombre de sites de fixation de l'ubiquinone et les centres réactionnels sont souvent différents. Brièvement, il existe deux modèles généraux de couplage entre le transfert d'électrons et l'éjection de protons. L'un assume que certains transporteurs d'électrons sont localisés dans la partie membranaire de l'enzyme et sont directement impliqués dans la translocation de protons. Dans ce cas, les sites de liaison à l'ubiquinone et la machinerie de translocation des protons doivent être localisés près des centres rédox pour permettre une interaction directe. Dans le second modèle, le module de transfert d'électrons est éloigné du module d'éjection de protons et la transduction

d'énergie a lieu via des changements de conformation à longue distance (Friedrich, 2001; Mamedova *et al.*, 2004).

Quelles sont les sous-unités susceptibles d'intervenir dans ce processus chez les bactéries ? Une famille d'antiporteurs (MrpA,D) à ions/protons contient une séquence similaire à une région des protéines membranaires ND2, ND4 et ND5 (Mathiesen et Hagerhall, 2002). Sur cette base, les sous-unités NuoL/ND5, NuoM/ND4 et NuoN/ND2 pourraient être impliquées dans le mécanisme de translocation de protons (Friedrich, 2001; Steuber, 2001). Par ailleurs, les sous-unités NuoK/ND4L (Mathiesen et Hagerhall, 2003) et MWFE (Marques *et al.*, 2003) présentent des similitudes respectivement avec un antiporteur Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (MrpC) et avec la sous-unité nqrA de la Na<sup>+</sup>-NADH:quinone oxydoréductase bactérienne. Divers éléments expérimentaux indiquent que le complexe est capable de transférer des ions sodium : la NADH:UQ oxydoréductase de la bactérie *Klebsiella pneumoniae* fonctionnerait comme pompe à sodium primaire (Gemperli *et al.*, 2003) ; la protéine ND5 bovine a été marquée avec des inhibiteurs des antiports Na<sup>+</sup>/H<sup>+</sup> (Nakamaru-Ogiso *et al.*, 2003) ; enfin, la partie C-terminale de la protéine NuoL (ND5) d'*E. coli* est responsable d'un transport de Na<sup>+</sup> dans des vésicules membranaires reconstituées (Steuber, 2003). Trois mécanismes généraux de translocation de protons et d'ions sodium peuvent être envisagés selon que l'oxydation du NADH est couplée au transfert de H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> en un site unique d'expulsion H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup>, en deux sites distincts H<sup>+</sup> et Na<sup>+</sup>, ou encore en deux sites, le premier étant un pompe à H<sup>+</sup> et le second un antiporteur H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> (Steuber, 2003). Des données récentes suggèrent que l'enzyme d'*E. coli* n'est capable d'antiport H<sup>+</sup>/Na<sup>+</sup> que de façon secondaire (Stolpe et Friedrich, 2004).

Comme on le voit, beaucoup d'inconnues subsistent encore quant au mode de génération de la force-proton motrice à partir des réactions d'oxydoréduction (Hirst, 2003).

## 3.4. Modèles des étapes d'assemblage

### 3.4.1. *Neurospora crassa* : mutants *nuc*

Chez *Neurospora crassa*, l'identification du rôle des sous-unités nucléaires dans l'assemblage du complexe I est facilitée par l'existence d'une série de mutants *nuc* obtenus par interruption de gènes ou par RIP (repeat-induced point-mutation) (Duarte *et al.*, 1995).

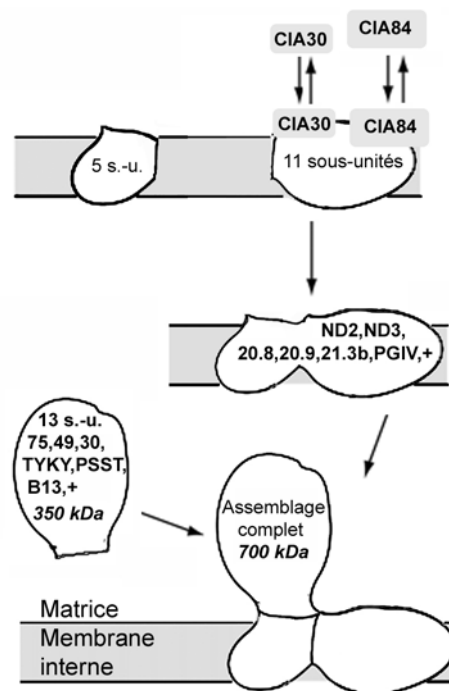


| Mutant de <i>N.crassa</i> | Sous-unité bovine | Assemblage détecté   | Références                         |
|---------------------------|-------------------|--|------------------------------------|
| <i>nuo40</i>              | 39 kDa            | complexe I sans 39 kDa   | (Schulte <i>et al.</i> , 1999)     |
| <i>nuo51</i>              | 51 kDa            | complexe I sans 51 kDa   | (Fecke <i>et al.</i> , 1994)       |
| <i>nuo24</i>              | 24 kDa            | complexe I sans 24 kDa   | (Almeida <i>et al.</i> , 1999)     |
| <i>nuo21</i>              | AQDQ              | complexe I sans AQDQ   | (Ferreirinha <i>et al.</i> , 1999) |
| <i>nuo12.3</i>            | PDSW              | bras membranaire et bras périphérique sans PDSW  | (Duarte <i>et al.</i> , 1995)      |
| <i>nuo21.3a</i>           | N.I.              | complexe I sans 21.3a et bras périphérique   | (Alves et Videira, 1994)           |
| <i>nuo49</i>              | 49 kDa            | bras membranaire   | (Schulte et Weiss, 1995)           |
| <i>nuo78</i>              | 78 kDa            | bras membranaire   | (Harkness <i>et al.</i> , 1995)    |
| <i>nuo30.4</i>            | 30 kDa            | bras membranaire   | (Duarte <i>et al.</i> , 1998)      |
| <i>nuo29.9</i>            | B13               | bras membranaire   | (Duarte <i>et al.</i> , 1995)      |
| <i>nuo19.3</i>            | PSST              | bras membranaire   | (Duarte <i>et al.</i> , 2002)      |
| <i>nuo21.3c</i>           | TYKY              | bras membranaire   | (Duarte et Videira, 2000)          |
| <i>nuo20.9</i>            | N.I.              | bras périphérique + petit intermédiaire du bras membranaire  | (Schulte et Weiss, 1995)           |
| <i>nuo21.3b</i>           | B14.7             | bras périphérique + deux intermédiaires du bras membranaire (le plus grand en association avec les protéines CIA-30 et CIA-84) | (Nehls <i>et al.</i> , 1992)       |
| <i>nuo20.8</i>            | PGIV              | bras périphérique + deux intermédiaires du bras membranaire  | (da Silva <i>et al.</i> , 1996)    |
| <i>nuo9.8</i>             | MWFE              | Aucun assemblage   | (Marques <i>et al.</i> , 2003)     |
| <i>nuo9.3</i>             | SDAP              | bras membranaire incomplet   | (Schneider <i>et al.</i> , 1995)   |

**Tableau 4.** Assemblages de sous-unités du complexe I détectés chez les différents mutants *nuo* de *Neurospora crassa* (voir détails dans le texte). CIA: chaperonne de l'assemblage intermédiaire du bras membranaire. N.I. (non identifié), pas d'homologue décrit chez le bœuf.

Bien que la composition exacte en polypeptides n'ait pas encore été déterminée pour la plupart des mutants, des conclusions provisoires peuvent être tirées sur base de l'analyse des sous-complexes isolés par sédimentation en gradient de saccharose (Tableau 4). L'analyse des mutant *nuo* de *Neurospora* démontre que les deux bras (membranaire et périphérique) du complexe I peuvent s'assembler de manière stable et indépendante. Ces résultats ont été confirmés par des expériences de marquage radioactif (Tuschen *et al.*, 1990). Par ailleurs, en présence de chloramphénicol, inhibiteur de la synthèse protéique dans la mitochondrie, seule une forme tronquée du complexe I (350 kDa, 13 sous-unités nucléaires) correspondant au bras périphérique est détectée (Friedrich *et al.*, 1989). A l'inverse, sur milieu pauvre en manganèse, l'assemblage du bras périphérique est perturbé alors que le bras membranaire est présent (Schmidt *et al.*, 1992). L'analyse du mutant *nuo21.3b* indique par ailleurs que la formation du bras membranaire est précédée de la formation de deux sous-complexes (Nehls *et al.*, 1992). Le plus petit résulte de l'assemblage d'au moins 2 protéines d'origine mitochondriale et de 3 d'origine nucléaire. L'autre sous-complexe, composé de 5 protéines mitochondriales et de 6 protéines nucléaires se rencontre en association avec deux protéines chaperonnes CIA (*complex I intermediate associated*, CIA30 et CIA84). Celles-ci sont absentes du complexe I

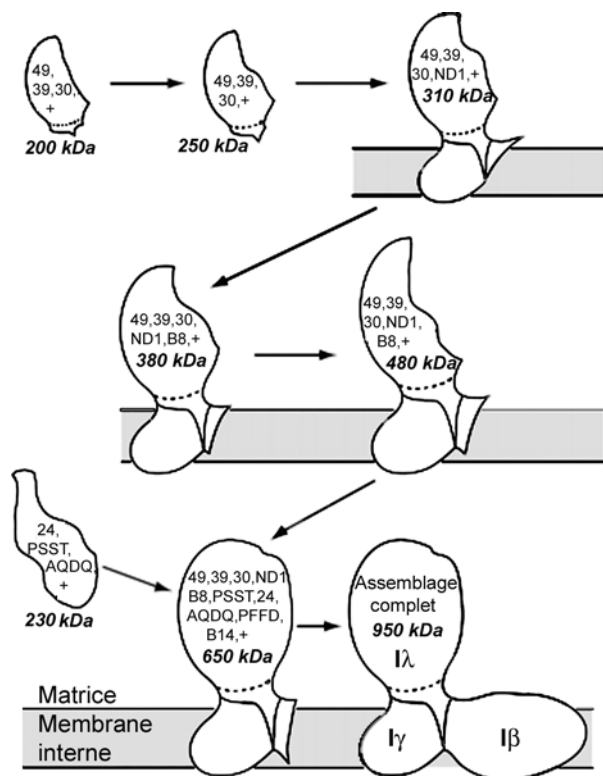
final et l'interruption de leur gène empêche la formation du sous-complexe membranaire (Kuffner *et al.*, 1998). Les principales observations relatives à l'assemblage du complexe I chez *Neurospora* sont synthétisées dans la Figure 10.



**Figure 10.** Modèle d'assemblage du complexe I de *N. crassa* (700 kDa) basé sur les observations des sous-complexes présents chez les mutants *nuo* (*cf.* texte).

### 3.4.2. *Homo sapiens*

L'analyse par électrophorèse en conditions natives (BN-PAGE) de l'assemblage du complexe I dans les mitochondries de divers patients humains et dans des lignées cellulaires humaines mutantes a permis de détecter plusieurs sous-complexes. Leurs constituants ont été séparés par électrophorèse en gel SDS et la présence des sous-unités 49 kDa, 39 kDa, 30 kDa, TYKY, AQDQ, B17, PFFD, B14, B8 et ND1 a été déterminée à l'aide d'anticorps. Ces travaux permettent de proposer un modèle d'assemblage qui concerne essentiellement les sous-unités du bras périphérique (Figure 11) (Antonicka *et al.*, 2003). Dans ce modèle, il est suggéré que le bras périphérique s'assemble par étapes et que le fragment I $\beta$  ne s'associe que lorsque I $\gamma$  et I $\lambda$  sont assemblés, ce qui diffère du modèle proposé pour *Neurospora* (Figure 10).



**Figure 11.** Modèle d'assemblage du complexe I des mammifères basé sur l'études des sous-complexes présents dans des lignées humaines mutantes ainsi que des sous-complexes identifiés par dissociation du complexe bovin (Antonicka *et al.*, 2003).

## 3.5. Fonction des sous-unités

### 3.5.1. Sous-unités du cœur de l'enzyme

Comme évoqué précédemment, on considère que les homologues des quatorze constituants de la NADH déshydrogénase bactérienne constituent le cœur du complexe I mitochondrial chez les eucaryotes. Sept de ces sous-unités sont présentes dans chacun des deux bras de l'enzyme.

#### 3.5.1.1. Sous-unités TYKY, PSST, 24, 30, 49, 51 et 75 kDa

Le rôle de ces protéines du bras périphérique dans l'activité catalytique de l'enzyme a déjà été évoqué ci-avant. Parmi les sous-unités du complexe I, ces protéines présentent le plus haut degré de conservation entre organismes (Hirst *et al.*, 2003). Elles sont responsables de la liaison du NADH, de tous les groupements prosthétiques (centres Fe-S, FMN) et interviendrait dans la liaison de l'ubiquinone à l'enzyme.

Chez *Neurospora*, la dislocation des gènes encodant les homologues des sous-unités PSST, TYKY, 30, 49 et 75 kDa entraîne l'absence du bras périphérique du complexe sans interférer avec l'assemblage du bras membranaire (Duarte *et al.*, 1998; Duarte *et al.*, 2002; Duarte et Videira, 2000; Harkness *et al.*, 1995; Schulte et Weiss, 1995) (Tableau 4). A l'opposé, les mutants *nuo51* et *nuo24* assemblent un complexe I inactif, incapable de fixer le NADH et dont seules les sous-unités de 24 et 51 kDa semblent être absentes (Tableau 4) (Almeida *et al.*, 1999; Fecke *et al.*, 1994). Ces données confirment le rôle de la fraction FP dans l'activité de l'enzyme.

Signalons ici l'existence des mutants CMS (cytoplasmic male sterility) de *Nicotiana glauca* présentant des délétions affectant le gène mitochondrial *nd7* (sous-unité bovine de 49 kDa). Le mutant CMSI possède une délétion de 14 kb affectant l'extrémité 5' de l'exon 3 et le mutant CMSII, une délétion de 62 kb couvrant l'entièreté du gène. Le complexe I de ces mutants est dépourvu de la protéine ND7 (49 kDa), mais également des protéines ND9 (30 kDa) et 38 kDa (39 kDa), ce qui suggère un défaut de l'assemblage du complexe I et une protéolyse rapide des sous-unités non intégrées (Gutierrez *et al.*, 1997). Il est intéressant de noter que ces trois sous-unités pourraient appartenir au

bras périphérique du complexe I des plantes et faire partie d'un sous-complexe identique à celui identifié chez *Neurospora crassa* (Gutierrez *et al.*, 1999; Gutierrez *et al.*, 1997).

### 3.5.1.2. Sous-unités ND1-6, 4L : mutants mitochondriaux

Le rôle et la localisation des sept protéines hydrophobes encodées dans le génome mitochondrial sont davantage sujets à caution (*cf.* 3.2 et Figure 7). Certaines seraient impliquées dans la liaison de l'ubiquinone et dans le transfert des protons (*cf.* 3.3 et 3.3.4).

La dislocation des gènes homologues chez *R. capsulatus* (ND1, 2, 5, 6 et 4L) entraîne l'absence d'un

enzyme fonctionnel. Aucun assemblage des sous-unités n'est détecté chez ces mutants (Dupuis *et al.*, 1998b). Chez les eucaryotes, l'absence de techniques comparables à celles mises en œuvre chez les bactéries limite les possibilités d'étudier ces protéines. Des données sont néanmoins disponibles grâce à l'étude de mutants spontanés des sous-unités ND chez l'homme, *Neurospora* et chez les plantes supérieures et de lignées obtenues par mutagenèse aléatoire chez la souris et chez l'homme (Tableau 5). Le mutant de *Neurospora crassa* E35 'stopper', altéré au niveau des gènes *nd2* et *nd3*, produit un complexe I dépourvu de son bras membranaire. La sous-forme observée paraît être identique à celle obtenue chez le type sauvage cultivé en présence de chloramphénicol (Alves et Videira, 1998).

| Organisme                                      | Mutation     | Gène affecté                   | Hom. | Assemblage du complexe I (et syndrome pathologique) | Références   |
|--|--------------|--------------------------------|------|---|--|
| <b><i>N. crassa</i></b>                        | E35 stopper  | délétion <i>nd2,nd3</i>        | +    | bras périphérique                                   | (Alves et Videira, 1998)   |
| <b><i>H. sapiens</i></b><br>(patients)         | G3460A       | substitution <i>nd1</i>        | -    | n.dét. (LHON)                                       | (Brown <i>et al.</i> , 2000; Carelli <i>et al.</i> , 1997)                                       |
|  | G11778A      | substitution <i>nd4</i>        | -    | n.dét. (LHON)                                       | (Brown <i>et al.</i> , 2000; Carelli <i>et al.</i> , 1997)                                       |
|  | 10663C       | substitution <i>nd4L</i>       | -    | n.dét. (LHON)                                       | (Brown <i>et al.</i> , 2002)   |
|  | A12770G      | substitution <i>nd5</i>        | -    | n.dét. (MELAS)                                      | (Liolitsa <i>et al.</i> , 2003)  |
|  | A13045C      | substitution <i>nd5</i>        | -    | n.dét. (MELAS, LHON,                                | (Liolitsa <i>et al.</i> , 2003)  |
|  | T398A        | substitution <i>nd5</i>        | -    | n.dét. (symptôme oculaire)                          | (Batandier <i>et al.</i> , 2000)   |
|  | G13513A      | substitution <i>nd5</i>        | -    | n.dét. (MELAS, syndrome de Leigh)                   | (Chol <i>et al.</i> , 2003)  |
|  | A13514G      | substitution <i>nd5</i>        | -    | n.dét. (MELAS)                                      | (Corona <i>et al.</i> , 2001)  |
|  | A13084T      | substitution <i>nd5</i>        | -    | n.dét. (MELAS, syndrome de Leigh)                   | (Crimi <i>et al.</i> , 2003)   |
|  | T10191C      | substitution <i>nd3</i>        | -    | n.dét. (épilepsie)                                  | (Taylor <i>et al.</i> , 2001)  |
|  | T14487C      | substitution <i>nd6</i>        | -    | assemblage altéré ? (syndrome de Leigh)             | (Ugalde <i>et al.</i> , 2003)  |
|  | T14484C      | substitution <i>nd6</i>        | -    | n.dét. (LHON)                                       | (Brown <i>et al.</i> , 2000; Carelli <i>et al.</i> , 1999)                                       |
|  | G14459A      | substitution <i>nd6</i>        | -    | n.dét. (LHON)                                       | (Carelli <i>et al.</i> , 1999; Jun <i>et al.</i> , 1994)   |
|  | 14 mutations | substitutions ( <i>nd1-6</i> ) | -    | n.dét. (maladie de Parkinson)                       | (Kosel <i>et al.</i> , 1998)   |
| <b><i>H. sapiens</i></b><br>(lignées mutantes) | C4T          | frameshift <i>nd4</i>          | +    | pas d'assemblage des sous-unités ND ?               | (Hofhaus et Attardi, 1993; Hofhaus et Attardi, 1995)   |
|  | C9T          | frameshift <i>nd5</i>          | +/-  | assemblage non affecté ?                            | (Hofhaus et Attardi, 1995)   |
| <b><i>M. musculus</i></b>                      | 3AT20-4      | frameshift <i>nd5</i>          | +/-  | assemblage non affecté ?                            | (Bai <i>et al.</i> , 2000)   |
|  | 4AT1         | frameshift <i>nd6</i>          | +    | pas d'assemblage ?                                  | (Bai et Attardi, 1998)   |
| <b><i>Z. mays</i></b>                          | NCS2         | délétion <i>nad4</i>           | -    | bras périphérique accroché à la membrane            | (Karpova et Newton, 1999; Marienfeld et Newton, 1994)  |
| <b><i>N. sylvestris</i></b>                    | CMSI, II     | délétion <i>nad7</i>           | +/-  | non dét.  | (Gutierrez <i>et al.</i> , 1999; Gutierrez <i>et al.</i> , 1997; Lelandais <i>et al.</i> , 1998) |

**Tableau 5.** Mutants mitochondriaux des gènes *nd*. +, - et +/- dans la colonne "Hom." indiquent que les lignées sont respectivement homoplasmiques, hétéroplasmiques et homoplasmiques à 95 %. A l'exception des lignées C4T et C9T, les nombres associés aux mutations humaines renseignent sur la base mutée du génome mitochondrial humain. n.dét. : non déterminé.

Chez l'homme, plus de cinquante mutations ponctuelles localisées dans les gènes *nd* sont responsables de déficiences du complexe I et sont associées à diverses pathologies : myopathies, encéphalomyopathies (syndrome de Leigh, MELAS : *Mitochondrial encephalomyopathy with lactic acidosis and stroke-like episode*), neuropathies (épilepsie, LHON ou *Leber's hereditary optic neuropathy*), maladies neurodégénératives (maladie de Parkinson, dystonie). Quelques exemples de mutations sont repris dans le Tableau 5. Cependant, dans la majorité de ces pathologies, le rôle de la mutation n'est pas clair en raison du degré important d'hétéroplasmie et de la présence fréquentes d'autres mutations dans le même génome.

Chez l'homme et chez la souris (*Mus musculus*), des lignées cellulaires mutantes homoplasmiques ont été isolées après traitement mutagène. Des mutations frameshift dans les gènes *nd4* et *nd5* humains (Hofhaus et Attardi, 1993; Hofhaus et Attardi, 1995) et dans les gènes *nd5* et *nd6* murins (Bai et Attardi, 1998; Bai *et al.*, 2000) ont été identifiées et sont la cause de la réduction drastique, voire totale, de l'activité du complexe I. Aucune donnée n'est cependant disponible concernant l'assemblage du complexe I dans les mitochondries de ces lignées. Sur base de marquages radioactifs en présence de cycloheximide, suivis d'une immunoprécipitation, ces auteurs suggèrent que l'absence de la sous-unité ND4 empêcherait l'assemblage des autres sous-unités encodées par le génome mitochondrial. De même, la sous-unité ND6 interférerait avec l'assemblage du complexe alors que l'absence de la protéine ND5 n'empêcherait pas cet assemblage.

La mutation NCS2 de *Zea mays* correspond à la délétion de l'extrémité 3' du gène *nd4* et à un réarrangement de l'ADN mitochondrial par recombinaison entre deux motifs répétés de 16 pb, ce qui, entraîne la fusion de la partie 5' du gène *nd4* avec la séquence codante du gène *nd7* (Marienfeld et Newton, 1994). Chez ce mutant, plusieurs sous-unités sont présentes en quantité réduite : il s'agit notamment des sous-unités ND7 et ND9 dont les homologues appartiennent au bras périphérique de *Neurospora crassa*. D'autres sous-unités sont indétectables : c'est le cas des protéines ND1-4 et ND4L, toutes encodées par le génome mitochondrial et entrant dans la composition

du bras membranaire. Par BN-PAGE (Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis), il a été montré qu'un sous-complexe I est présent dans les mitochondries NCS2. Ce sous-complexe, déficient pour une partie de ses sous-unités membranaires, reste cependant encore faiblement ancré dans la membrane. Il présente une activité NADH déshydrogénase, activité qui chez *N. crassa* est localisée dans le bras périphérique de l'enzyme. De ces observations, il a été suggéré que ce sous-complexe est essentiellement constitué de sous-unités assemblées au niveau du bras périphérique (Karpova et Newton, 1999).

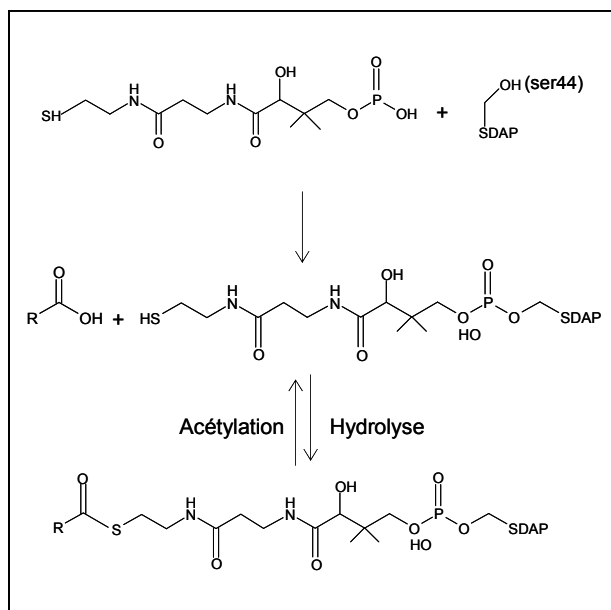
### 3.5.2. Sous-unités surnuméraires présentes chez les eucaryotes

Trente et une protéines absentes de l'enzyme bactérien ont été identifiées dans le complexe I bovin (Hirst *et al.*, 2003). Parmi ces protéines, douze seulement ont été identifiées chez l'ensemble des eucaryotes étudiés (Tableau 2). La fonction de ces 31 protéines additionnelles, parfois appelées "périphériques" ou encore "accessoires", est largement méconnue. Dans les mitochondries du boeuf, les complexes III (cytochrome bc1) et IV (cytochrome c oxydase) comportent également plus de sous-unités que leurs homologues présents chez le procaryote *P. denitrificans* (11 contre 3, 13 contre 4).

Ces sous-unités surnuméraires sont peut-être impliquées dans la protection des centres réactionnels des complexes contre le stress oxydant ou dans la stabilité structurelle des enzymes. Elles pourraient également occuper des fonctions particulières dans la régulation de l'activité ou dans l'assemblage des complexes (Carroll *et al.*, 2002).

#### 3.5.2.1. La sous-unité SDAP (*acyl-carrier protein*)

Le complexe I (*B. taurus* et *N. crassa*) contient une sous-unité apparentée aux protéines ACP (*acyl-carrier protein*). Chez les bactéries et dans les chloroplastes de plantes, les protéines ACP sont impliquées dans la biosynthèse des acides gras. Chez le boeuf comme chez *Neurospora*, un groupement pantéthéine-4'-phosphate, modifié par un groupement acyle, a été détecté sur la protéine SDAP (Hirst *et al.*, 2003) (Figure 12).



**Figure 12.** Modifications post-traductionnelles de la sous-unité SDAP. Le groupement acyle (ROOH) peut être soit la biotine, soit l'acide 3-hydroxytétradécanoïque (Hirst *et al.*, 2003).

La dislocation du gène codant pour la sous-unité SDAP de *Neurospora* (mutant *nuo9.6*) entraîne un assemblage incorrect du complexe I, mais aussi une augmentation importante de la teneur en lysophospholipides dans les membranes mitochondriales (Schneider *et al.*, 1995). Dès lors, le rôle de la protéine SDAP pourrait être de recycler les phospholipides en cédant son groupement acyle aux hydroperoxydes lipidiques formés sous l'action des phospholipases (revue par Hirst *et al.*, 2003).

### 3.5.2.2. La sous-unité de 39 kDa

Un site de fixation du NADPH a été proposé au sein de la séquence de la sous-unité bovine de 39 kDa et de son homologue de 40 kDa chez *N. crassa* (Schulte *et al.*, 1999; Walker, 1992). Cette hypothèse est étayée par diverses données expérimentales. Des essais de protéolyse *in vitro* montre que le NADPH empêche la dégradation de la protéine bovine de 39 kDa (Yamaguchi *et al.*, 1998). Le mutant *nuo40* de *Neurospora* dépourvu de la protéine de 39 kDa accumule un complexe fonctionnel, mais incapable de fixer le NADPH, à l'inverse de l'enzyme sauvage (Schulte *et al.*, 1999). De plus, des comparaisons de séquences indiquent que la sous-unité de 39 kDa est apparentée à des protéines SDR (*Short-chain/Dehydrogenase/Reductase*; *e.g.* stéroïde et cholestérol déshydrogénases, dyhydroflavanol réductase, ...) qui utilisent le NAD(P)H comme

cofacteur (Fearnley et Walker, 1992). A ce jour, il est encore difficile de tirer des conclusions à partir de cette similarité de séquence. Des interactions entre protéines SDR et transporteurs de groupement acyle (*Acyl-Carrier Protein* ou ACP) ont été identifiées. La protéine de 39 kDa pourrait ainsi être impliquée dans une activité distincte de l'activité catalytique du complexe I, au sein d'un module avec la protéine SDAP (ACP) (Hirst *et al.*, 2003).

### 3.5.2.3. La sous-unité AQDQ

La dislocation du gène encodant la protéine AQDQ chez *Neurospora* (mutant *nuo21*) ne modifie pas la quantité de complexe I assemblé et la respiration de la souche mutante demeure sensible à la roténone. Néanmoins, le transfert d'électrons du NADH à des accepteurs d'électrons artificiels dans les membranes est plus faible chez le mutant que chez la souche sauvage (Ferreirinha *et al.*, 1999). Papa *et al.* ont suggéré que la sous-unité AQDQ (18 kDa) est phosphorylée par une protéine kinase cAMP-dépendante. Par ailleurs, chez un patient humain atteint d'un syndrome neurologique important, une duplication de 5bp abolit un site potentiel de phosphorylation. La phosphorylation permet peut-être de réguler l'activité catalytique du complexe, en induisant des changements de conformation (Papa *et al.*, 2002). Ce rôle potentiel doit être mis en relation avec la proximité de la sous-unité AQDQ et des sous-unités impliquées dans le transfert d'électrons au sein du sous-complexe IP (Figure 6).

### 3.5.2.4. La sous-unité MWFE

La sous-unité MWFE a été identifiée au sein du sous-complexe I $\alpha$  (Figure 5). Une hélice transmembranaire est prédite pour cette protéine et il est probable qu'elle forme une partie du sous-complexe membranaire I $\gamma$  (Hirst *et al.*, 2003). Des lignées cellulaires mutantes, isolées chez le hamster chinois, présentent des altérations sévères de l'activité enzymatique et de l'assemblage du complexe I (Yadava *et al.*, 2002). La dislocation du gène homologue chez *Neurospora* (mutant *nuo9.8*) empêche également l'assemblage des deux bras du complexe I (Marques *et al.*, 2003). Enfin, comme il en a été fait mention au point 3.3.4, cette protéine pourrait intervenir dans le transfert de protons (Marques *et al.*, 2003).

### 3.5.2.5. La sous-unité B16.6

La séquence de la sous-unité B16.6 du complexe I bovin est identique à 83% à la séquence de la protéine humaine GRIM-19 (*gene-associated with retinoid-IFN induced mortality*) (Fearnley *et al.*, 2001). Chez l'homme, GRIM-19 a d'abord été identifiée comme facteur impliqué dans l'induction de la mort cellulaire programmée. Des études ont montré que cette protéine était la cible d'au moins deux protéines virales et qu'il s'agit d'un régulateur négatif de l'expression d'un gène nucléaire dont le produit exerce un rôle dans le développement cellulaire et pour empêcher l'apoptose. Toutefois, GRIM-19 a également été identifié comme constituant du complexe I mitochondrial humain (Devreese *et al.*, 2002). Ce double rôle de GRIM-19/B16.6 suggère un nouveau lien entre mitochondrie et apoptose (revue par Hirst *et al.*, 2003). Signalons enfin qu'un homologue de B16.6 a été identifié comme composant du complexe I chez les plantes supérieures *A. thaliana* et *O. sativa* (Heazlewood *et al.*, 2003).

### 3.5.2.6. La sous-unité B14.7

La sous-unité B14.7 bovine partage seulement 24% d'identité avec la protéine 21.3b du complexe I *Neurospora crassa*. La correspondance de leur profil d'hydrophobicité, suggérant quatre segments transmembranaires, supporte l'idée selon laquelle les deux protéines sont homologues (Carroll *et al.*, 2002). Le mutant *nuo21.3b* de *Neurospora* présente un défaut d'assemblage du complexe I. Le bras périphérique s'assemble normalement et possède une activité NADH déshydrogénase alors que deux sous-complexes du bras membranaires sont identifiés, suggérant un rôle clé de la protéine dans l'assemblage final du complexe I (Nehls *et al.*, 1992).

La séquence de B14.7 partage également un profil d'hydrophobicité similaire (respectivement 25, 18 et 21% d'identités) avec les protéines Tim17, Tim22 et Tim23 (Carroll *et al.*, 2002). Ces protéines font partie des complexes impliqués dans la translocation à travers la membrane interne de la mitochondrie. Il est intéressant de signaler que chez certains organismes, des composants du complexe III (core I et core II) jouent le rôle de peptidase (MPP ou *mitochondrial processing peptidase*) afin de cliver les signaux d'import des protéines. Carroll *et al.* ont suggéré que la protéine B14.7 pourrait être impliquée dans l'import de certaines protéines du complexe I (Carroll *et al.*, 2002).

## 4. Chlamydomonas reinhardtii

### 4.1. Organisme modèle

Depuis plus de 40 ans, l'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* est utilisée comme modèle de cellule eucaryote photosynthétique (Harris, 2001). Cet organisme unicellulaire et haploïde a fait l'objet de nombreuses études sur la photosynthèse, la respiration, les rythmes circadiens, le phototactisme, l'assimilation du nitrate, la mobilité cellulaire, l'homéostasie des ions métalliques, la tolérance aux métaux lourds ou encore la structure des flagelles et du corps basal.

Son cycle reproductif (différenciation en gamètes, production de zygotes, isolement de souches diploïdes) (Figure 13) est aisément contrôlable en laboratoire, ce qui fait de *Chlamydomonas* un puissant outil d'analyse génétique (Harris, 2001; Remacle et Matagne, 1998).

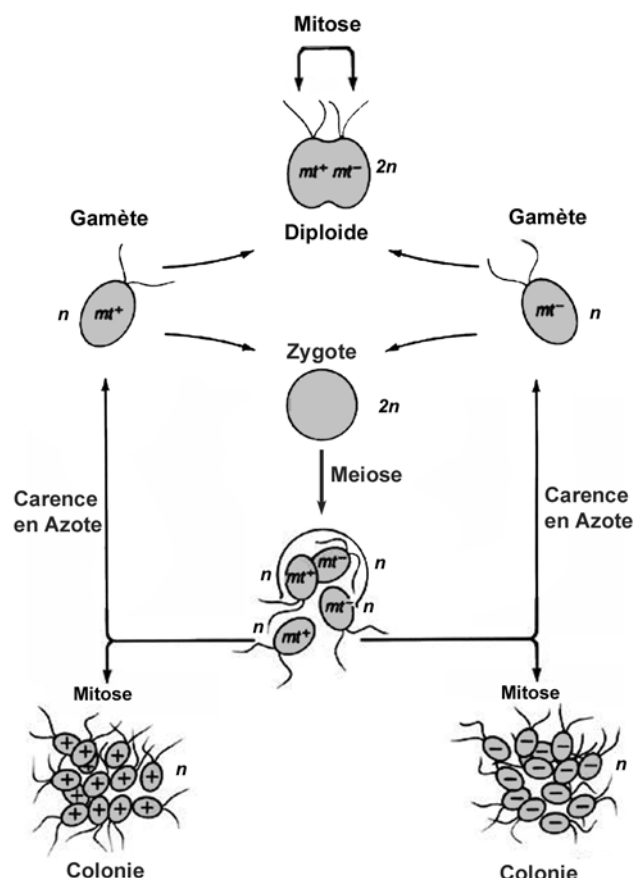


Figure 13. Cycle reproductif de *Chlamydomonas*.

Au cours des quinze dernières années, le statut d'organisme modèle de l'algue a été renforcé par le développement de nombreuses techniques de biologie moléculaire, incluant l'inactivation de gènes nucléaires par ARN interférence (Fuhrmann, 2002). *Chlamydomonas reinhardtii* est le seul organisme où la transformation des génomes nucléaire, chloroplastique et mitochondrial a été réalisée avec succès. Les génomes du chloroplaste et de la mitochondrie sont par ailleurs complètement séquencés.

### 4.2. Le génome nucléaire

Avec le "Genome Project" initié en 1999, *Chlamydomonas* est entré dans l'ère de la génomique (Grossman *et al.*, 2003; Shrager *et al.*, 2003). Ce projet inclut :

- (i) la construction de cartes moléculaire et physique du génome nucléaire ;
- (ii) le séquençage du génome nucléaire.

La seconde ébauche de la séquence génomique a été publiée en avril 2004 sur le site internet du "US Department of Energy Joint Genome Institute". De l'ordre de 2,19 millions de séquences issues d'un "shotgun" sur l'ensemble du génome sont incluses dans cet assemblage. Elles sont regroupées dans 3211 ensembles (ou *scaffolds*) totalisant 125 Mb. A peu près la moitié du génome est contenu dans 72 "*scaffolds*" ;

(iii) la génération de banques d'EST (*expressed sequence tag*). Des banques d'ADNc ont été construites à partir d'ARN messagers extraits de cellules soumises à différentes conditions (déflagellation, différenciation en gamètes/zygotes, stress variés, différentes teneurs en CO<sub>2</sub>, hypoxie, ...). Plus de 100.000 EST ont été séquencés et sont actuellement regroupés en 9581 assemblages (publiés le 6 décembre 2002 sur le site internet du "*Chlamydomonas Genome Project*").

La nomenclature des gènes chez *Chlamydomonas* est la suivante. Gènes nucléaires : italiques majuscules (e.g. *COX2a* ou *COX3*) ; gènes mitochondriaux : italiques minuscules (e.g. *cox1*, *nd1*). Les protéines correspondantes s'écrivent respectivement Cox2a, Cox3, COX1 et ND1.

### 4.3. Le génome mitochondrial

#### 4.3.1. Structure, composition

Il y a vingt-cinq ans, la génétique mitochondriale chez *Chlamydomonas reinhardtii* était encore inconnue et on pensait que les mutations au sein de ce génome n'étaient pas viables. La caractérisation biochimique et biophysiques du génome mitochondrial a débuté à la fin des années 70 (Ryan *et al.*, 1978).

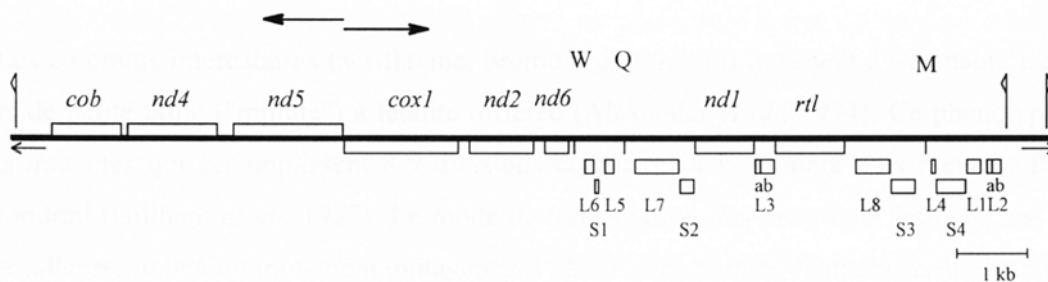
A partir de mitochondries purifiées, des molécules d'ADN, de masse de  $9,78 \cdot 10^6$  Da et linéaires pour la plupart ont été identifiées. La transition de la forme circulaire, rare, à la forme linéaire se ferait par rupture en un site spécifique (Grant et Chiang, 1980; Ryan *et al.*, 1978).

Le séquençage des régions télomériques montre une structure particulière, constituée de deux séquences identiques (531 pb) disposées en orientation inverse. Les 86 nucléotides les plus externes se retrouvent en outre dans une séquence interne située à l'extrémité 3'-OH du gène *L2* (Figure 14). Des interactions entre la séquence interne et les deux séquences externes seraient impliquées dans le processus de répllication des extrémités (Vahrenholz *et al.*, 1993).

Le génome mitochondrial (15.758 pb) de *Chlamydomonas* est entièrement séquencé depuis 1993 (numéro d'accèsion Genbank U08343). Contrairement à celui des plantes supérieures et de façon analogue à celui des mammifères, il est organisé de façon très

compacte. Les 13 gènes ne possèdent pas d'intron et les séquences non codantes sont très peu nombreuses (Figure 14). Sept des gènes mitochondriaux codent pour des constituants de la chaîne respiratoire: *cob*, gène de l'apocytochrome b; *nd1*, *nd2*, *nd4*, *nd5*, *nd6*, gènes des sous-unités ND de la NADH:ubiquinone oxydoréductase (complexe I); *cox1*, gène de la sous-unité 1 de la cytochrome c oxydase. Parmi les six gènes restants, *rtl* code pour une protéine "exotique" de type transcriptase reverse, trois gènes codent pour des ARN de transfert spécifiant la glutamine, la méthionine et le tryptophane (Q, M, W) et enfin les deux gènes des ARN ribosomiaux sont éclatés et organisés en modules: S1 à S4 pour les fragments de l'ARN de la petite sous-unité; L1, L2a, L2b, L3a, L3b, L4 à L8 pour les fragments de la grande sous-unité. Boer et Gray (1988) ont proposé que la formation des sous-unités fonctionnelles des ribosomes se ferait par appariements intermoléculaires non-covalents des différents fragments des ARNr (Boer et Gray, 1988). Divers arguments génétiques plaident en faveur de cette hypothèse (Matagne et Baurain, 2001).

Il existe vraisemblablement deux unités de transcription qui progressent en orientation inverse à partir d'un site unique situé à la jonction des gènes *cox1* et *nd5*. Les ARN matures sont générés par clivage endonucléotidique de ces deux longs précurseurs au niveau de sites précis situés dans les régions intergéniques (Boer et Gray, 1991; Duby *et al.*, 2001; Vahrenholz *et al.*, 1985).



**Figure 14.** Carte génétique du génome mitochondrial de *Chlamydomonas reinhardtii* (Vahrenholz *et al.*, 1993). Les gènes sont indiqués par des rectangles (explications dans le texte). Les deux flèches en gras indiquent la direction de transcription, les drapeaux les trois répétitions de 86 pb, et les deux flèches en trait mince, les séquences répétées inversées des extrémités télomériques.



#### 4.3.2. Hérité de l'ADN mitochondrial

C'est suite à la découverte d'un polymorphisme de restriction entre les espèces interfertiles *Chlamydomonas reinhardtii* et *Chlamydomonas smithii* que l'étude de la transmission du génome mitochondrial a débuté. En effet, l'ADN mitochondrial de *C. smithii* possède un intron de 1 kb dans le gène *cob* et 7 sites de restriction spécifiques à l'espèce ont été identifiés (Boynton *et al.*, 1987; Colleaux *et al.*, 1990). Ces marqueurs physiques ont permis de suivre la transmission du génome lors de croisements et de démontrer que les zygotes méiotiques transmettent quasi exclusivement le génome mitochondrial d'origine paternelle (*mt*) alors que la transmission du génome chloroplastique suit clairement un schéma d'hérité préférentiellement maternelle (Boynton *et al.*, 1987).

Chez les rares zygotes qui se divisent mitotiquement pour donner naissance à une lignée diploïde stable, le mode de transmission du génome mitochondrial n'est plus uniparental paternel. Chez ces zygotes végétatifs, la transmission est biparentale et l'existence d'un processus de recombinaison génétique au niveau du génome mitochondrial, évoqué par Boynton *et al.* (1987), a été clairement démontré (Remacle *et al.*, 1995; Remacle et Matagne, 1993). Ce phénomène implique qu'il y ait à un moment donné contact puis fusion des mitochondries des deux parents dans la cellule diploïde.

#### 4.4. La chaîne respiratoire chez *Chlamydomonas*

Les complexes majeurs de la chaîne respiratoire de *Chlamydomonas reinhardtii* ont été identifiés par BN-PAGE à partir de mitochondries purifiées (Tableau 6): la F1-F0-ATP synthase, exclusivement à l'état dimérique, la NADH:ubiquinone oxydoréductase (monomère et dimère), l'ubiquinol:cytochrome c oxydoréductase, la cytochrome c oxydase et la succinate déshydrogénase (Duby *et al.*, 2001; van Lis *et al.*, 2003). Leurs composants ont été séparés par SDS-PAGE et certains d'entre eux ont été identifiés par séquençage N-terminal (dégradation d'Edman). En particulier, trois sous-unités du complexe I ont été analysées et la séquence de deux d'entre elles s'apparente à celles des sous-unités de 24 et 51 kDa du complexe I bovin (van Lis *et al.*, 2003).

| Complexe | Masse moléculaire estimée (kDa) | Nombre de sous-unités observées |
|----------|---------------------------------|---------------------------------|
| V        | 2000                            | 14                              |
| I        | 1000                            | 25                              |
| III      | 500                             | 9                               |
| IV       | 240                             | 10                              |
| II       | 140                             | n.d.                            |

**Tableau 6.** Données sur les complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale chez *Chlamydomonas reinhardtii* (van Lis *et al.*, 2003)

Les gènes *cox2*, *cox3*, *nd3*, *nd4L*, *atp6*, typiquement encodés dans le génome mitochondrial de la plupart des organismes (Tableau 1), sont absents du génome mitochondrial de *Chlamydomonas*. En ce qui concerne les gènes *COX2*, *COX3* et *ATP6*, ils ont été identifiés dans le génome nucléaire (Funes *et al.*, 2002; Perez-Martinez *et al.*, 2001; Perez-Martinez *et al.*, 2000). Deux gènes nucléaires encodant des oxydases alternatives (gènes *AOX1* et *AOX2*) ont également été séquencés (Dinant *et al.*, 2001). Enfin, l'existence de NADH déshydrogénases mitochondriales alternatives a été suggérée (Atteia, 1994).

#### 4.5. Les mutations des fonctions mitochondriales

Chez *C. reinhardtii*, les colorants intercalaires de l'ADN bicaténaire (acriflavine, bromure d'éthidium) induisent à très haute fréquence des mutants de petite taille ("minute") à létalité différée (Alexander *et al.*, 1974). Ce phénotype résulte de cellules mutantes qui accomplissent 8-9 divisions cellulaires à la lumière puis meurent faute d'ADN mitochondrial (Gillham *et al.*, 1987).

Par ailleurs, suite à un traitement mutagène à la N-méthyl-N'-nitro-N-nitrosoguanidine, des mutants nucléaires incapables de croître en conditions hétérotrophes et montrant une activité cytochrome oxydase réduite, ont été isolés par Wiseman *et al.* (1977).

Par la suite, des mutants mitochondriaux viables ont été obtenus par traitement des cellules sauvages à l'acriflavine (Matagne *et al.*, 1989). Ces mutants ont une respiration sensible au cyanure altérée et sont phototrophes obligatoires (phénotype dark<sup>-</sup> ou dk<sup>-</sup>). Comme la transmission de ce caractère se fait de façon uniparentale paternelle, ces mutants ont été appelé *dum* pour "*dark uniparental transmission by the*

*minus parent*" (Dorthu *et al.*, 1992; Matagne *et al.*, 1989). Des analyses génétiques et moléculaires ont permis de séparer l'ensemble de ces mutants en deux classes principales (Tableau 7).

#### 4.5.1. Les mutants ponctuels.

Ils se caractérisent par l'absence d'altération d'ADN détectable par hybridation moléculaire. Des mesures d'activité des complexes enzymatiques de la chaîne respiratoire couplées à des analyses de séquences de gènes ont montré que ces mutations affectaient les gènes *cob* ou *cox1* (mutants dk<sup>-</sup>) codant pour des constituants essentiels des complexes III et IV.

#### 4.5.2. Les mutants de délétion.

Une étude par hybridation moléculaire fait apparaître que les souches *dum1*, *2*, *3*, *4*, *11*, *14* et *16* contiennent au moins deux types de molécules d'ADN mitochondrial : des monomères délétés (délétion de 0,7 à 1,7 kb) ayant perdu l'extrémité terminale gauche incluant le gène *cob*, et des dimères résultant de la fusion de deux monomères par leur extrémité délétée.

Les mutants *dum22* et *dum24* possèdent un génome très altéré et présentent une croissance réduite à la lumière. Deux types de monomères délétés et deux types de dimères ont été identifiés. La délétion minimale de *dum24* est de 3,5 kb et affecte les gènes *cob*, *nd4* et l'extrémité 3' du gène *nd5* (Duby et Matagne, 1999) alors que chez *dum22*, il a été démontré que la délétion minimale atteint l'extrémité 3' du gène *nd4* (Remacle *et al.*, 2001b).

#### 4.5.3. Assemblage du complexe I chez le mutant *dum24*

Au cours de notre mémoire de licence, nous avons montré par des analyses par BN-PAGE et Western blot réalisées à partir d'extraits membranaires totaux que le complexe I de *Chlamydomonas reinhardtii* possède une masse moléculaire d'environ 850 kDa. Une étude comparable que nous avons réalisée a révélé que chez le mutant *dum24*, le complexe I n'est que partiellement assemblé (650 kDa) mais possède encore l'activité NADH déshydrogénase associée au bras périphérique (Duby *et al.*, 2001).

| Classe | Mutant   | Altération biochimique | Gènes affectés                       | Nature de la mutation                               | Références  |
|--------|--|------------------------|--------------------------------------|---|---|
| 1      | <i>dum18</i>   | complexe IV            | <i>cox1</i>                          | addition d'une thymine au niveau du codon 145       | (Colin <i>et al.</i> , 1995; Dorthu <i>et al.</i> , 1992; Matagne <i>et al.</i> , 1989) |
|        | <i>dum19</i>   |                        |                                      | délétion d'une thymine au niveau du codon 152       | (Matagne <i>et al.</i> , 1989)  |
|        | <i>dum15</i>   | complexe III           | <i>cob</i>                           | double substitution au niveau du codon 140          | (Colin <i>et al.</i> , 1995)  |
|        | <i>dum21</i>   |                        |                                      | substitution (mutation stop) au niveau du codon 166 | (Remacle <i>et al.</i> , 2001b)   |
| 2      | <i>dum1</i> , <i>2</i> , <i>3</i> , <i>4</i> , <i>11</i> , <i>14</i> , <i>16</i> | complexes I et III     | <i>cob</i> , <i>nd4</i> , <i>nd5</i> | délétion de 0,7 à 1,7 kb                            | (Colin <i>et al.</i> , 1995; Dorthu <i>et al.</i> , 1992; Matagne <i>et al.</i> , 1989) |
|        | <i>dum24</i>   |                        |                                      | délétion de 3,5 kb                                  | (Duby et Matagne, 1999)   |
|        | <i>dum22</i> *   | ND                     | <i>cob</i> , <i>nd4</i>              | délétion de 3 kb                                    | (Remacle <i>et al.</i> , 2001b)   |

**Tableau 7.** Mutations mitochondriales caractérisées chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Classe 1: mutations ponctuelles; classe 2: mutations de délétion. \*Ce mutant a été isolé à partir d'un clone possédant un intron dans le gène *cob* (1,1 kb).

## 1. Caractérisation du complexe I de *C. reinhardtii*

Depuis l'identification du complexe I mitochondrial bovin par Hatefi au début des années 60 (Hatefi *et al.*, 1961), diverses méthodes de purification de l'enzyme eucaryote ou de son équivalent bactérien ont été mises au point. De nombreuses espèces ont ainsi fait l'objet d'investigations quant à la taille, la composition et l'organisation de cet enzyme de haut poids moléculaire (>500 kDa) : c'est le cas des procaryotes *Rhodobacter capsulatus* (Dupuis *et al.*, 1998a), *Escherichia coli* (Friedrich, 1998) et *Paracoccus denitrificans* (Yagi *et al.*, 1998); des mammifères *Bos taurus*, *Homo sapiens* et *Mus musculus* (Cleeter et Ragan, 1985; Walker, 1992); des champignons *Neurospora crassa* (Videira, 1998) et *Yarrowia lipolytica* (Kashani-Poor *et al.*, 2001a); du trypanosome *Trypanosoma brucei* (Fang *et al.*, 2001) et des plantes supérieures *Vicia faba* (Leterme et Boutry, 1993), *Beta vulgaris* (Rasmusson *et al.*, 1994), *Zea mais* (Karpova et Newton, 1999) et *Triticum aestivum* (Combettes et Grienenberger, 1999). Pourtant, au bout de quatre décennies de recherches, seuls trois enzymes étaient caractérisées en détails : l'enzyme bactérien comporte 14 protéines (Dupuis *et al.*, 1998a; Dupuis *et al.*, 1998b; Yagi *et al.*, 1998) tandis que les complexes bovin et fongique (*N. crassa*) possèdent respectivement 42 et plus de 30 protéines, 14 d'entre elles étant homologues aux constituants bactériens (Videira, 1998; Walker, 1992; Weiss *et al.*, 1991). En ce qui concerne les organismes photosynthétiques, seuls les 14 homologues du complexe bactérien étaient identifiés parmi une trentaine de constituants (Rasmusson *et al.*, 1998).

Au début du 21<sup>ème</sup> siècle, l'avènement de la génomique et les avancées en matière de spectrométrie de masse pour l'analyse des peptides ont ouvert de nouvelles perspectives pour l'étude de la composition sous-unitaire du complexe I. Ainsi, des analyses récentes de l'enzyme bovin ont permis d'identifier 3 nouvelles sous-unités, portant à 45 le nombre de ses constituants (Carroll *et al.*, 2002; Fearnley *et al.*, 2001). De même, des études comparatives ont conduit à identifier 23 à 27 protéines conservées chez *N. crassa*, *Caenorhabditis elegans*, *Arabidopsis thaliana* et *Oriza sativa* en prenant le complexe I du bœuf comme référence (Heazlewood *et al.*, 2003; Hirst *et al.*, 2003; Tsang et Lemire, 2003; Videira et Duarte, 2002).

Cependant, ces travaux suggèrent également qu'il existe des sous-unités spécifiques à chacun des trois règnes au sein des eucaryotes.

Chez les plantes inférieures, il n'existe aucune donnée relative à la composition du complexe I en dehors d'une étude protéomique très préliminaire réalisée sur les composants de la chaîne respiratoire mitochondriale de *Chlamydomonas reinhardtii* (van Lis *et al.*, 2003). Par ailleurs, le projet de séquençage du génome de *Chlamydomonas*, qui a permis jusqu'ici d'acquérir une vaste collection de séquences pour la plupart non encore annotées (Grossman *et al.*, 2003; Shrager *et al.*, 2003), ouvre des perspectives intéressantes pour l'identification de nouveaux gènes.

Dans la première partie de ce travail, en combinant approches génomique et protéomique, nous avons entrepris d'analyser la composition du complexe I chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Après purification de l'enzyme et analyse de ses sous-unités constitutives par spectrométrie de masse, 30 polypeptides ont pu être identifiés. La comparaison des séquences protéiques identifiées chez les mammifères, nématodes, champignons et plantes supérieures à celles présentes dans le "*Chlamydomonas Genome Project*" nous a amené à proposer que le complexe I de *C. reinhardtii* comporte 42 sous-unités, représentant une masse moléculaire totale de 970 kDa. Outre les 27 composants largement conservés chez tous les eucaryotes, nous avons également identifié 4 nouvelles protéines susceptibles d'être présentes à la fois chez les animaux, les végétaux et les champignons. Il s'agit des homologues des protéines B12, B16.6, ESSS et PFFD du complexe I bovin. Une trente-deuxième sous-unité (B14.7) pourrait être commune aux mammifères, champignons et aux algues mais n'a pas été identifiée chez les plantes supérieures. Par ailleurs, diverses sous-unités seraient spécifiques à l'un ou l'autre règne et dans le cas particulier des eucaryotes photosynthétiques, 9 polypeptides seraient conservés.

Cette recherche a bénéficié de la collaboration du laboratoire de biochimie et d'ingénierie des protéines des prof. J. Van Beeumen et B. Devreese (Université de Gand) pour l'analyse et l'identification des peptides par spectrométrie de masse.

**Publication 1. Higher plant-like subunit composition of the mitochondrial complex I from *Chlamydomonas reinhardtii* : 31 conserved components among eukaryotes. Cardol P., Vanrobaeys F., Devreese B., Van Beeumen J., Matagne R. F., Remacle C. soumis à *Biochim. Biophys. Acta Bioenergetics*.**

## Higher plant-like subunit composition of mitochondrial complex I from *Chlamydomonas reinhardtii*: 31 conserved components among eukaryotes

Pierre Cardol<sup>a</sup>, Frank Vanrobaeys<sup>b</sup>, Bart Devreese<sup>b</sup>, Jozef Van Beeumen<sup>b</sup>, René F. Matagne<sup>a</sup> and Claire Remacle<sup>a,\*</sup>

<sup>a</sup>Genetics of Microorganisms, Department of Life Sciences, B22, University of Liège, B4000 Liège, Belgium

<sup>b</sup>Laboratory of Protein Biochemistry and Protein Engineering, Ghent University, Ghent, Belgium

### Abstract

The rotenone-sensitive NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) is the most intricate membrane-bound enzyme of the mitochondrial respiratory chain. Notably the bovine enzyme comprises up to 45 subunits, while 27 subunits could be considered as widely-conserved among eukaryotic complex I. By combining proteomic and genomic approaches we characterized the complex I composition from the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. After purification by BN-PAGE, constitutive subunits were analyzed by SDS-PAGE coupled to tandem mass spectrometry (MS) that allowed the identification of 30 proteins. We compared the known complex I components from higher plants, mammals, nematodes and fungi with this MS dataset and the translated sequences from the algal genome project. This revealed that the *Chlamydomonas* complex I is likely composed of 42 proteins, for a total molecular mass of about 970 kDa. In addition to the 27 typical components, we have identified four new complex I subunit families (bovine ESSS, PFFD, B16.6, B12 homologues), extending the number of widely-conserved eukaryote complex I components to 31. In parallel, our analysis showed that a variable number of subunits appear to be specific to each eukaryotic kingdom (animals, fungi or plants). Protein sequence divergence in these kingdom specific sets is significant and currently we cannot exclude the possibility of missing homology between them.

Keywords: complex I, *Chlamydomonas* mitochondria, proteomics, bioinformatics.

\*Corresponding author. Department of Life Sciences, B22, Genetics of microorganisms, University of Liege, B-4000 Liege, Belgium. Tel.:xx324-3663812; Fax:xx3243663840.  
E-mail address : [c.remacle@ulg.ac.be](mailto:c.remacle@ulg.ac.be) (C. Remacle)

### 1. Introduction

The NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I; EC 1.6.5.3) is the most complicated energy-transducing enzyme complex of the mitochondrial inner membrane. To date, it is known to contain 45 subunits in bovine mitochondria (~900 kDa) [1, 2] and 33 subunits in *Neurospora crassa* mitochondria (>700 kDa) [3]. Because of this complexity, information on its structure and mechanism of action is still limited. A simpler membrane-associated enzyme has been characterized in detail in bacteria. It is made of 14 subunits, all being conserved in mammalian and fungal complex I. The bacterial enzyme is considered to be the minimal structure required to ensure electron transfer coupled to proton translocation [4, 5]. Seven of these subunits represent homologues of the hydrophobic complex I ND1-6 and ND4L subunits encoded in the mitochondrial genome in fungi and mammals. Both the bacterial NADH:UQ oxidoreductase and the eukaryotic complex I contain a non covalently-bound FMN molecule and 8-9 iron-sulphur clusters [6, 7]. As revealed by electron microscopy studies, the enzyme has a L-shaped structure with a membrane-embedded arm perpendicular to an arm protruding in the matrix. The former is made of hydrophobic subunits within the lipid bilayer, whereas the latter consists of hydrophilic

subunits that are responsible for dehydrogenase activity and bears all the known prosthetic groups [8, 9].

Complex I has also been purified from a variety of higher plants [10-12]. Recently, the dissection of complex I protein components from *Arabidopsis* and rice mitochondria showed that the two higher plants contain the 14 subunits characteristic of prokaryotes as well as a set of 9 proteins widely found in other eukaryotes [13]. At least ten proteins present in the bovine complex I and absent from the fungal enzyme are also missing in the complex I from plants and are not encoded in their genomes. Furthermore, a series of plant-specific complex I associated subunits, most of them of unknown function, have been identified as well [13].

Complex I from the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* has also been purified and very partially characterized. With a molecular mass of approximately 850-1000 kDa [14-16], the enzyme is made of more than 25 subunits which can be separated by electrophoresis [16]. Four of these subunits, all present in other eukaryotic complexes I, have been identified by antibody cross reaction [15] or by N-terminal sequencing [16]. In *Chlamydomonas*, only five complex I subunits (ND1,2,4,5 and 6) are encoded in the mitochondrial genome [17]. The presence in the algal nuclear genome of the proteins generally encoded in the mitochondrial DNA (ND3,4L in mammals and

fungi; ND3,4L,7, and 9 in higher plants) has never been demonstrated. The nearly complete sequencing of the *C. reinhardtii* nuclear genome now provides the opportunity for a more complete characterization of the nuclear-encoded components from the alga [18].

The blue-native polyacrylamide gel electrophoresis technique (BN-PAGE) allows a separation of membrane complexes under native form [19]. It has been successfully applied to detect complex I assembly of *Chlamydomonas* wild-type and mutant strains deficient in complex I activity [14-16]. This technique also constitutes a rapid procedure for purification of small amounts of complex I usable in mass spectrometry-based identification of proteins using standard gel electrophoresis approaches [13, 20].

In the present study, complex I from *Chlamydomonas* has been purified by BN-PAGE and a number of subunits have been identified by mass spectrometry. In view to enlarge the comparison between the algal complex I and its eukaryotic and prokaryotic counterparts, we have complemented this proteomic information by searching the *Chlamydomonas* nuclear genome for homologous sequences of complex I subunits identified in plants, mammals, fungi and bacteria. Our data show that *Chlamydomonas* complex I is a higher plant-like enzyme, probably composed of 42 subunits. These include a set a 31-32 components widely-conserved among eukaryotes whereas nine protein founds in the *Chlamydomonas* enzyme but missing in the mammalian or fungal enzyme have been also detected in the complex I from higher plants.

## 2. Materials and methods

### 2.1. Isolation of mitochondria

The strain of *Chlamydomonas reinhardtii* used in this work is the cell-wall less mutant strain *cw15 mt<sup>+</sup>*. Cells were routinely grown under light (75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) in TAP liquid medium. Mitochondria were isolated by digitonin treatment according to a published procedure [21] with minor modifications [15]. The protein content was determined by the Bradford method [22]. The mitochondrial preparation from 2 L of cultures ( $10^{10}$  cells) gave  $2.0 \pm 0.4$  mg protein in the crude mitochondrial fraction ; the chlorophyll content was  $<0.1 \mu\text{g.mg}^{-1}$  protein.

### 2.2. BN-PAGE and second dimensional SDS-PAGE

Sample preparation and BN-PAGE were carried out according to a published procedure [19] with the following modifications. Mitochondria (500  $\mu\text{g}$ ) were solubilized by addition of 100  $\mu\text{l}$  of 0.75 mM  $\epsilon$ -amino-n-caproic acid, 0.5 mM EDTA, 50 mM Bis-Tris-HCl (pH 7.0) and n-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (1.5 % [w/v]). After electrophoresis, the NADH dehydrogenase activities were detected by incubating the gel in 100 mM MOPS-KOH (pH 8.0) containing 100 mM NADH and 1  $\text{mg ml}^{-1}$  NBT [23].

To resolve complex I into its constitutive subunits, the gel slice corresponding to the 850-1000 kDa stained activity was cut out from the BN-gel, treated 15 minutes at 60°C in standard BN-Buffer containing 1% SDS and 1%  $\beta$ -mercaptoethanol, washed in BN-buffer [24], sealed vertically on 8% (w/v) acrylamide SDS-PAGE stacking gel, and laid on a 15% (w/v) acrylamide SDS-PAGE separating gel (see [20] for details). Two different gels, using Tris-Tricine or Tris-Glycine buffer were used to obtain an optimal separation of all protein bands [19, 25].

For the detection of proteins, the gels were incubated 16 h in 50% (v/v) ethanol, 2% (v/v) phosphoric acid, washed in water, stained for 1h in a solution containing 0.2% (w/v) Coomassie blue G-250, 17% (w/v) ammonium sulphate, 34 % (v/v) methanol and 3% (v/v) phosphoric acid, washed twice in water and then destained in a 30% (v/v) methanol solution. The apparent molecular mass of proteins was estimated using Precision Plus Dual Color (Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA) and Multi Mark Pre-Stained Protein Standards (Invitrogen, Carlsbad, CA).

### 2.3. Mass spectrometric analyses

Individual bands of the 2D-gels were excised and collected in individual Eppendorf tubes. The gel slices were then digested with trypsin and the resultant peptides were extracted and dried as described elsewhere [26]. For mass spectrometric analyses, the peptide mixture was dissolved in 12  $\mu\text{l}$  of 0.1% formic acid in water. One microliter of this digest mixture was added to an equal volume of matrix solution (100mM alpha-cyano-4-hydroxycinnamic acid in 50% acetonitrile/0.1% TFA in water) and 1  $\mu\text{l}$  of the resultant mix was co-crystallized onto the target plate. Analysis was performed on a 4700 Proteomics Analyzer, a MALDI tandem time-of-flight mass spectrometer (Applied Biosystems, Framingham, CA, USA). The mass spectrometer was externally calibrated with a standard peptide mixture in both the MS and MS/MS mode. The samples were first analyzed in the MS mode, and detected peptides were further submitted to MS/MS analysis. The acquired fingerprint data and the concomitant MS/MS data were then submitted to our local MASCOT server ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)). If the protein band could not be identified by this method, we used an hyphenated strategy. We therefore coupled an automated nano-HPLC system (LC Packings, The Netherlands) to an electrospray ionisation-linear ion trap mass spectrometer (Q-TRAP LC-MS/MS system, Applied Biosystems). The experimental set-up of the HPLC system has been described elsewhere [20]. Briefly, the peptide mixture was loaded onto a nano-column (Zorbax 3.5  $\mu\text{m}$ , 150 mm x 75  $\mu\text{m}$  I.D., Agilent Technologies) using an in-line pre-concentration step on a micro pre-column cartridge (2 mm x 800  $\mu\text{m}$  I.D., LC Packings), and separated using a linear gradient (50 min). The instrument performed a MS scan as survey scan and selected the two most intense ions for an enhanced resolution scan. If their charge state was two

or three, the peptides were automatically selected for an enhanced product ion scan (MS/MS). The eluted peptides were detected 'on-line' by the mass spectrometer. The total cycle time of the set-up of the instrument was approximately 4.5 sec. The acquired MS and MS/MS data were then submitted to the MASCOT server.

#### 2.4. Bioinformatic analyses for gene identification

Protein sequences were obtained from the National Center for Biotechnology Information (NCBI) server (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>). *Chlamydomonas* homologous sequences were identified using the WU-TBLASTN 2.0 facility ([http://www.biology.duke.edu/chlmy\\_genome/](http://www.biology.duke.edu/chlmy_genome/)) with *N. crassa*, *B. taurus*, *A. thaliana*, *O. sativa* and *C. elegans* proteins against the "20021010" *Chlamydomonas* EST assembly (v3.0 released on December 6, 2002; distributed by the *Chlamydomonas* genetic resource center), a draft genome sequence of *Chlamydomonas* (v1.0 released on February 4, 2003; distributed by the DOE Joint Genome Institute) and the sequences of individual EST clones from NCBI.

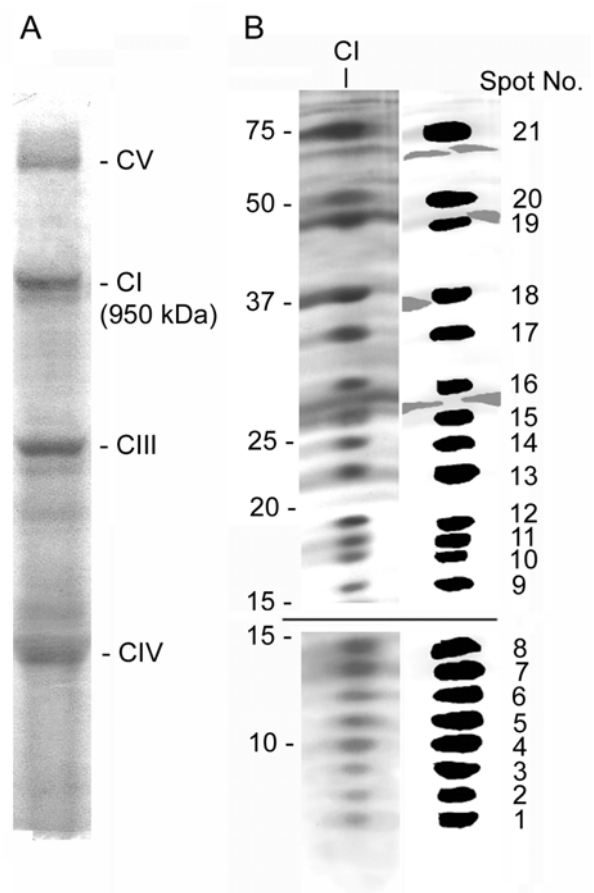
Ipsort [27] (<http://hypothesiscreator.net/iPSORT/>), Mitopred [28] (<http://mitopred.sdsc.edu/>) and TargetP v1.0 [29] (<http://www.cbs.dtu.dk/services/TargetP/>) targeting predictions were determined using full-length predicted protein sequences. Eukaryotic homologous sequences were identified using BLASTP, TBLASTN, RPS-BLAST, PSI-BLAST, CDART tools available at the NCBI server. Calculations of the molecular masses and hydropathy profiles of amino acid sequences were done with the compute pI/MW tool [30] and with the Plotscale tool using a window of 7 residues [31], respectively, both from the ExPaSy molecular Biology Server (<http://au.expasy.org/>). Multiple sequence alignments were performed with the ClustalW tool (v1.8) [32] from the Baylor College of Medicine (BCM) (<http://searchlauncher.bcm.tmc.edu/>) and shaded with the BoxShade 3.21 tool ([http://www.ch.embnet.org/software/BOX\\_form.html](http://www.ch.embnet.org/software/BOX_form.html)).

### 3. Results

#### 3.1. Isolation of mitochondrial complex I of *C. reinhardtii* and identification of its constitutive subunits

Purification of mitochondria from green algae is complicated by the presence of a rigid cell wall that is difficult to rupture, and by the low content of mitochondria per cell (less than 1%). In *C. reinhardtii*, this problem can however be overcome by using mutant cells lacking a cell wall [21, 33]. After disruption of cells using a digitonin treatment and purification of organelles, we obtained a mitochondrial fraction that was essentially free of chlorophyll-associated protein contaminants (see Material and methods). After solubilization by n-dodecyl- $\beta$ -D-maltoside (1.5% final concentration), the mitochondrial protein complexes were separated by blue-native polyacrylamide gel

electrophoresis (BN-PAGE). Following Coomassie Blue staining, the protein profile exhibited four major bands (Fig. 1a) corresponding to the native complexes I, III, IV and V [16], as well as several additional weaker bands representing unknown protein complexes. Recent data on the higher plant complex I indicate a molecular mass over 1000 kDa [13]. This would modify the estimated molecular mass of the band on BN-PAGE corresponding to the *C. reinhardtii* complex I to 950 kDa instead of 850 kDa, as previously published [14, 15]. We confirmed that the protein band localized at circa 950 kDa corresponded to complex I by incubating the gel with NADH and nitrobluetetrazolium (NBT) to provide evidence of NADH dehydrogenase activity (data not shown).



**Figure 1.** A. Coomassie-Blue stained image of the main respiratory-chain complexes from *Chlamydomonas* mitochondria separated by BN-PAGE. B. Coomassie-Blue stained image of native complex I (obtained by BN-PAGE) separated into its subunits by SDS-PAGE. Apparent molecular mass of markers is shown in kDa. The top panel shows a Tris-Glycine buffer separation. The lower panel shows proteins separated in Tris-Tricine buffer. Alongside the gel is a schematic representation of the protein spots analyzed by MS (Table 1).

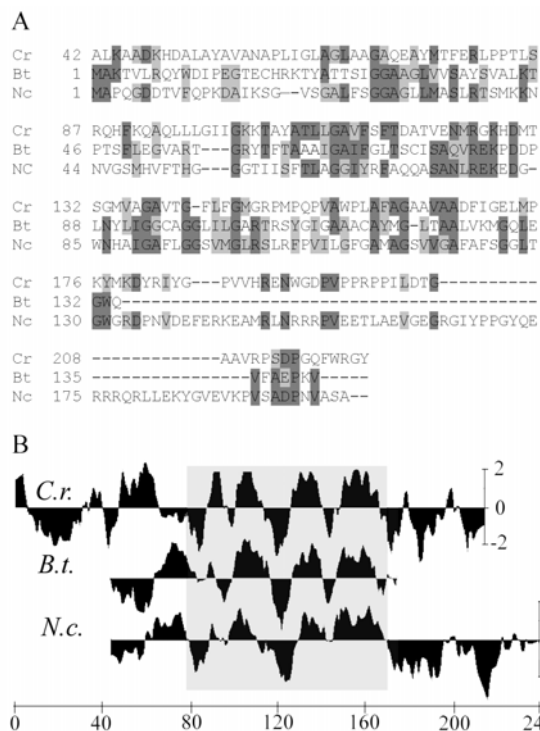
The band corresponding to complex I was excised from the BN-gel and its constitutive subunits were then separated by SDS-PAGE. To separate polypeptides in the ranges >15 kDa and <15kDa, we used Tris-Glycine

and Tris-Tricine gel running buffers, respectively. A minimum of 21 bands were observed after Coomassie Blue staining (Fig. 1b). The estimated molecular masses of the individual protein bands are given on Table 1. In order to systematically identify the proteins, the 21 bands were excised from the gel and digested with trypsin. The resultant peptides were analyzed MALDI-MS using peptide mass fingerprint (PMF). In cases where PMF was not sufficient for unambiguous identification, MALDI-MS/MS and nanoflow LC-MS/MS on an electrospray Q-TOF instrument were performed to provide MS/MS data [20].

Thirty proteins representing a total molecular mass of about 700 kDa were identified from the 21 bands of *Chlamydomonas* complex I in this manner (Table 1). Database searching revealed that 18 of these proteins were clear orthologues of the following bovine complex I subunits : B8, B18, 13 kDa-A, ND3, B14, B16.6, PDSW, PSST, B17.2, B13, AQDQ, TYKY, 30 kDa, 24 kDa, 39 kDa, 49 kDa, 51 kDa and 75 kDa.

Two additional proteins could also be orthologues of bovine complex I components. The 23 kDa AAS58499 protein sequence is 15-20% identical to the bovine B14.7 complex I subunit and its related component 21.3b in the fungus *Neurospora crassa*. The alignment was performed at the exclusion of the first forty-one N-terminal residues in the *Chlamydomonas* sequence which were not found in bovine and fungal sequences (see Fig. 2a for alignment and accession numbers). In spite of the differences in length between these subunits, the fact that their hydrophobicity profiles matched in the regions aligned with the bovine sequence (Fig. 2b) is additional evidence to consider these proteins as being orthologues.

The 9 kDa AAS58498 polypeptide shares 15% identity and 25% similarity with the bovine complex I AGGG subunit (also 9 kDa) (data not shown). The protein is predicted to be targeted to mitochondria by the topology programs Mitopred, IPsort and TargetP 1.0 (Table 1). However, taking into account that the hydropathy profiles of these two proteins do not match (data not shown) and that we have not found any related sequences in fungi or higher plants genomes, it is hard to conclude that the *Chlamydomonas* AAS58498 protein belongs to the AGGG complex I protein family. Beside counterparts of complex I proteins from mammals, seven homologues to fungal or plant complex I components that were not before described as having counterparts in the bovine enzyme, were identified in the *Chlamydomonas* preparation (Table 1). Three proteins (27, 29 and 32 kDa) belong to a gene family related to bacterial siderophores, known as ferripyochelin-binding proteins (FBP). Such FBP-like proteins have already been found in association with complex I from *Arabidopsis* and rice mitochondria [13], whereas no homologous gene has ever been detected in mammalian or fungal genomes.



**Figure 2.** Comparison of the sequences of *C. reinhardtii* 23 kDa (AAS58499), *B. taurus* B14.7 (NP\_783649) and *N. crassa* 21.3b (S14277) complex I subunits. **A**, Clustal W alignment of the protein sequences. Amino acids conserved in at least two sequences are shown on a grey background, similar residues are shown on a light-grey background. **B**, Comparison of the hydrophobicity profiles of amino acid sequences, aligned vertically according to (A).

A series of small molecular mass proteins (<20 kDa) were purified along with the *Chlamydomonas* complex I. The sequence of the 13 kDa AAQ64641 protein clearly matches to the 20.9 kDa complex I component in *N. crassa* and its newly discovered counterpart in higher plants (*Arabidopsis* 9 kDa At4g16450 gene product [13]). The 86 amino-acid AAS58501 protein is similar to the 6 kDa At4g20150 gene product from *A. thaliana* (25 % identity) and to an 81 amino-acid polypeptide from rice (BAC79719). The 142 amino-acid AAS48193 sequence matches to the *Arabidopsis* 8 kDa At2g31490 gene product (33 % identity) and to the rice BAB67906 protein (30 % identity). Both these subunits are predicted to be addressed to mitochondria by three different prediction programs (Table 1) and their homologues have been found in preparations of complex I from *Arabidopsis* and rice [13]. Their presence in complex I of the green alga *Chlamydomonas* provides additional evidence for these two proteins to be part of complex I in photosynthetic eukaryotes.

The 17-kDa AAS48192 protein sequence shows 26-31 % identity with members of a protein family found in complex I preparations from higher plants (*Arabidopsis* At2g42310/At3g57785 and rice AK108131 gene products; the rice sequence was previously described as 3605.m00182 TIGR entry [13]). The plant proteins and their homologue in *C. reinhardtii* moreover display



significant similarity to an 11.7 kDa unknown protein of *N. crassa*. Interestingly, a position-specific iterative BLAST analysis (PSI-BLAST) suggests that the four proteins are distant relatives of the 14.5 kDa bovine complex I (ESSS subunit) and of its putative homologue in *C. elegans* (see Fig. 3a for alignment and accession numbers). Despite great differences in length between the sequences of these proteins, the correspondence of their hydrophobicity profiles

supports the view that these proteins are homologues (Fig. 3b).

Finally, the *Chlamydomonas* AAS58500, AAS58502 and AAS58503 proteins do not show any similarity to known complex I-associated proteins in eukaryotes. The AAS58502 polypeptide shares 25% identity with the *A. thaliana* At3g07480 gene product and both the proteins are addressed to mitochondria by multiple prediction programs.

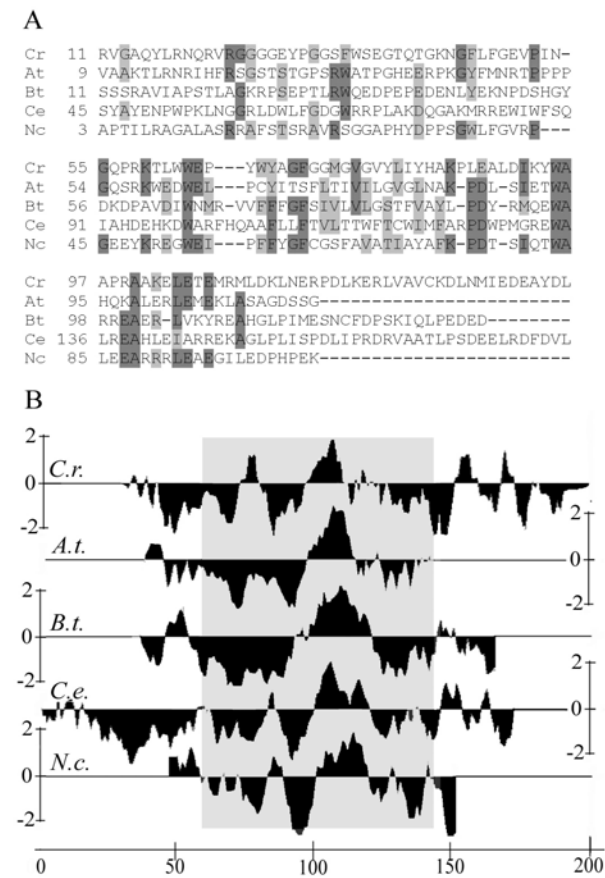
**Table 1. Subunit identification in the purified *Chlamydomonas* complex I preparation**

| spot | kDa | NP   | <i>Chlamydomonas</i> entry | MM | Protein identification                   | TP | MP | IP |
|------|-----|------|----------------------------|----|--|----|----|----|
| 1    | 7   | N.I. | -                          | -  | -  |    |    |    |
| 2    | 8   | N.I. | -                          | -  | -  |    |    |    |
| 3    | 9   | 1    | AAS58500                   | 12 | CI-AGGG ?                                | M  | M  | M  |
| 4    | 10  | 2    | AAS58501                   | 10 | CI-6 kDa subunit ( <i>A. thaliana</i> )  | M  | M  | -  |
| 5    | 11  | 2    | AAQ63699                   | 11 | CI-B8 subunit                            | M  | M  | M  |
| 6    | 12  | 3    | AAQ73135                   | 11 | CI-B18 subunit                           | -  | -  | -  |
| 7    | 13  | 2    | AAQ64641                   | 13 | CI-20.9 kDa subunit ( <i>N. crassa</i> ) | -  | -  | -  |
|      |     | 1    | AAQ64639                   | 16 | CI-13 kDa-A subunit                      | M  | -  | M  |
|      |     | 3    | AAS48193                   | 16 | CI-8 kDa subunit ( <i>A. thaliana</i> )  | M  | M  | M  |
| 8    | 14  | 1    | AAQ55461                   | 14 | CI-ND3 subunit                           | M  | -  | M  |
|      |     | 4    | AAQ84469                   | 16 | CI-B14 subunit                           | M  | M  | -  |
| 9    | 16  | 4    | AAS58503                   | 15 | unknown protein                          | -  | -  | -  |
|      |     | 4    | AAQ64637                   | 17 | CI-B16.6 subunit                         | -  | -  | -  |
| 10   | 17  | 4    | AAQ55459                   | 18 | CI-PDSW subunit                          | -  | -  | -  |
|      |     | 4    | AAS48192                   | 20 | CI-13 kDa ( <i>A. thaliana</i> )         | M  | M  | M  |
| 11   | 18  | 4    | AAQ63698                   | 19 | CI-PSST subunit                          | -  | -  | -  |
|      |     | 8    | AAQ64638                   | 18 | CI-B17.2 subunit                         | -  | M  | M  |
|      |     | 2    | AAQ73139                   | 18 | CI-B13 subunit                           | M  | M  | M  |
| 12   | 19  | 10   | AAQ64640                   | 22 | CI-AQDQ subunit                          | M  | M  | M  |
|      |     | 4    | AAS58500                   | 22 | unknown protein                          | M  | M  | M  |
|      |     | 3    | AAS58502                   | 22 | like NP_566309 ( <i>A. thaliana</i> )    | M  | M  | M  |
| 13   | 23  | 7    | AAQ63697                   | 27 | CI-TYKY subunit                          | M  | M  | M  |
|      |     | 4    | AAS58499                   | 23 | CI-B14.7 subunit?                        | M  | -  | -  |
| 14   | 25  | 4    | AAQ55457                   | 32 | CI-30 kDa subunit (ND9)                  | -  | M  | M  |
| 15   | 27  | 6    | AAQ63695                   | 31 | CI-24 kDa subunit                        | M  | -  | M  |
|      |     | 2    | AAS48195                   | 25 | FBP-like ( <i>A. thaliana</i> )          | -  | M  | -  |
| 16   | 29  | 5    | AAS48196                   | 31 | FBP-like ( <i>A. thaliana</i> )          | M  | M  | M  |
| 17   | 32  | 11   | AAS48197                   | 33 | FBP-like ( <i>A. thaliana</i> )          | -  | -  | -  |
| 18   | 38  | 12   | AAQ55458                   | 40 | CI-39 kDa subunit                        | M  | M  | M  |
| 19   | 43  | 9    | AAQ63700                   | 53 | CI-49 kDa subunit (ND7)                  | M  | M  | M  |
| 20   | 50  | 6    | AAQ63696                   | 53 | CI-51 kDa subunit                        | M  | -  | M  |
| 21   | 75  | 12   | AAQ73136                   | 76 | CI-75 kDa subunit                        | M  | -  | M  |

MS/MS spectra derived from trypsinated peptides of proteins were matched at local Mascot against a custom protein database and against a translated EST contig database (release October 10, 2002; available at [ftp://ftp.biology.duke.edu/pub/chlamy\\_genome/](ftp://ftp.biology.duke.edu/pub/chlamy_genome/)). Deduced protein sequences from *Chlamydomonas* were blasted against protein or translated NCBI databases (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>).

Table headings : spot, protein spot number from Fig. 1 ; kDa, observed molecular mass in kDa (these values are somewhat different from those previously published [16], especially concerning the small molecular mass proteins. However, the use of different molecular mass markers may explain the slight differences in protein band mass estimations; NP, number of peptides matching to predicted protein sequence (N.I.: not identified); *Chlamydomonas* entries are accession numbers from Genbank ; MM, predicted molecular mass of matched sequence in kDa ; protein identification, the complex I subunits are named according to the bovine nomenclature, except for those where another species is mentioned. Protein sequences were analyzed by three targeting prediction programs: TargetP v1.01 (TP), MitoPred (MP) and IPsort (IP). M indicates mitochondrial targeting; a dash (-) indicates no prediction of mitochondria targeting.

Concerning the AAS58500 and AAS58503 gene products, none are predicted having a mitochondrial localization. In order to identify distant relatives or to detect conserved domains and architecture homologies, their sequences were submitted to various BLAST analyses against sequences from other organisms but no matches were obtained. These three proteins thus need to be studied further in order to confirm their association with complex I. While we cannot exclude the possibility that co-elution or non-specific association of proteins occurred during the one-step purification process used in our work, it should be mentioned, however, that we did not find any known mitochondrial protein in our complex I sample.



**Figure 3.** Comparison of the ESSS-like proteins of *C. reinhardtii* (AAS48192), *A. thaliana* (At3g57785), *B. taurus* (Q8HXG5), *C. elegans* (NP\_501358) and *N. crassa* (XP\_324110). **A**, Clustal W alignment of the protein sequences. Amino acids conserved in at least three sequences are shown on a grey background, similar residues are shown on a light-grey background **B**, Comparison of the hydrophobicity profiles of amino acid sequences, aligned vertically according to (A).

### 3.2 Searching for homologues of complex I subunits from a genomic analysis using *Chlamydomonas* and eukaryotic databases

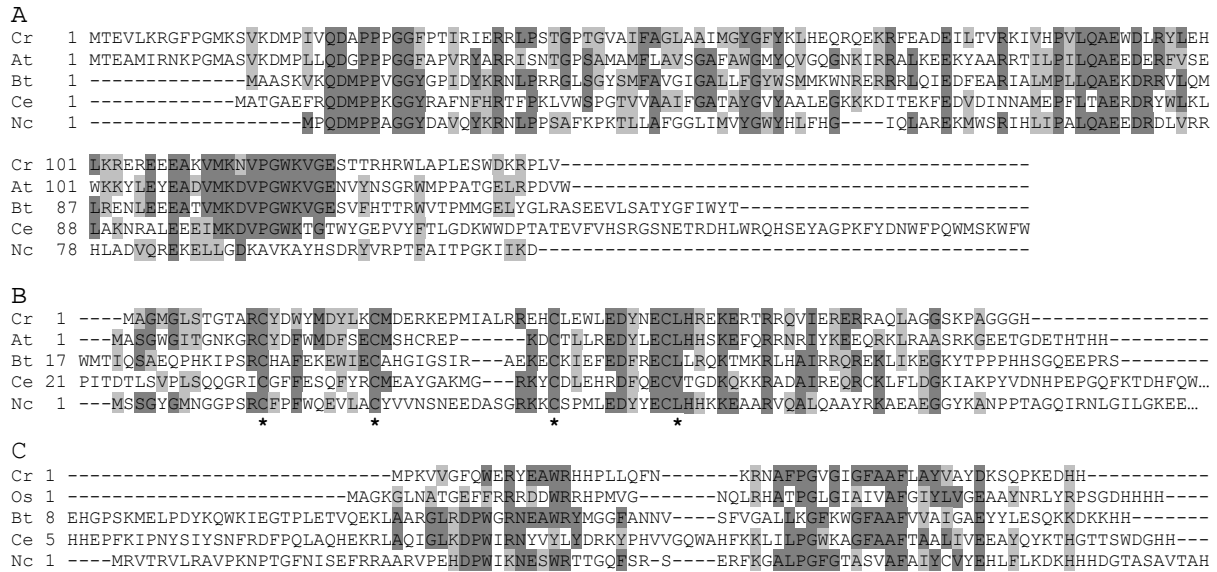
A number of complex I subunits identified in mammals, fungi and higher plants were not found in our proteomic analysis of *Chlamydomonas* complex I, maybe because some components, in particular small or hydrophobic subunits, have escaped detection using our experimental approach. In this context, a 12 kDa protein not found in

the present study was detected in *Chlamydomonas* mitochondria after immunological tests using a rabbit polyclonal antibody directed against the SDAP bovine complex I subunit (Gift from Dr. J. Hirst) (data not shown), but was not found by mass spectrometry (Table 1). Thus, to extend our proteomic study, we searched the *Chlamydomonas* genome for counterparts to known complex I subunits identified in unrelated organisms. In a first step, we examined the data of the literature concerning the subunit composition of the prokaryotic dehydrogenase enzyme and of complex I from mammals (*B. taurus*), fungi (*N. crassa*) and higher plants (*A. thaliana*).

The bovine genes coding for the 38 nuclear-encoded proteins and the 7 mitochondria-encoded subunits (ND proteins) of complex I have all been sequenced [2]. The bovine subunits are named according to their molecular mass and, in some cases, following their first four amino acids [34]. This nomenclature has been used as a helpful basis for Table 2.

The seven mitochondria-encoded ND subunits in mammals are orthologues of the bacterial NUOA, NUOH and NUOJ-N products. The five proteins responsible for binding iron-sulphur clusters and FMN (75 kDa, 51 kDa, 24 kDa, TYKY and PSST) along with the 49 kDa and 30 kDa subunits (encoded by the mitochondrial *nad7* and *nad9* genes in higher plants) are counterparts of the bacterial NUOB-NUOG and NUOI proteins [35]. These 14 proteins corresponding to the minimal bacterial enzyme are also detected both at genomic and proteomic levels in the fungus *N. crassa* [3], in the worm *C. elegans* [36] and in higher plants [13]. By compiling recent data on the complex I subunit conservation among eukaryotes [3, 13, 36], it appears that thirteen other bovine complex I proteins, absent in the prokaryotic enzyme, are highly conserved among eukaryotes (MWFE, SDAP, B8, B13, 13 kDa-A, B14, B17.2, B18, AQDQ, PGIV, B22, PDSW and 39 kDa) (Table 2).

Though the 9.5 kDa protein (A44210) from fungal complex I was also proposed to be homologous to B9 bovine subunit (Q02371) [37] various BLAST analyses performed at the NCBI website failed to find any significant similarity between the two polypeptide sequences. Furthermore, considering that their hydrophathy profiles do not match at the exception of a 15 amino-acid hydrophobic stretch (data not shown), and that we have not found any related sequences in genomes of non-mammalian animals and in higher plants, we conclude that the 9.5 kDa and B9 subunits are probably not homologues. A set of three other *N. crassa* complex I components (17.8, 20.9, 21.3a) have also no known counterparts in the mammalian enzyme [3]. Finally, a set of ten proteins have been recently proposed to be plant-specific: the 11 and 16 kDa NADH dehydrogenase subunits, at least four ferripyochelin binding protein-like subunits and four non-related proteins of small molecular masses [13].



**Figure 4.** Clustal W multiple sequence alignments of complex I PFFD-like, B16.6-like and B12-like subunits. **A**, PFFD-like proteins: *C. reinhardtii* AAQ98888, *A. thaliana* At3g62790, *B. taurus* Q02379, *C. elegans* NP\_491085, *N. crassa* EAA31476. **B**, B16.6-like proteins: *C.r.* AAQ64637, *A.t.* At1g04630, *B.t.* Q95KV7, *C.e.* NP\_492799, *N.c.* EAA29209. **C**, B12-like proteins: *C.r.* AAS48194, *O. sativa* AK059007, *B.t.* Q02365, *C.e.* NP\_495907, *N.c.* XP\_331394. Amino acids conserved in at least three sequences are shown on a grey background, similar residues are shown on a light-grey background and conserved cysteine residues from PFFD subunits are marked by asterisks.

Taking these data into account, the known complex I protein sequences were used to search mitochondrial, genomic and EST databases from the *Chlamydomonas* genome project ([http://www.biology.duke.edu/chlamy\\_genome/](http://www.biology.duke.edu/chlamy_genome/)) to identify algal sequences. In parallel, all available complex I protein sequences were used to search for homologous sequences among eukaryotes, using BLAST facilities from the NCBI server. In *Chlamydomonas*, orthologues of the 27 conserved subunits were identified (Table 2). These proteins include the five mitochondria-encoded subunits ND1,2,4,5 and 6. Among the 22 conserved nuclear genes, we found in particular the genes encoding the hydrophobic ND3 and ND4L proteins, which are located in the mitochondrial genome of all non-related organisms. In addition, we identified four new widely-conserved complex I component families. The PFFD subunit (15 kDa) and the newly described B16.6 protein of bovine complex I [38], which have counterparts identified in complex I preparations from plants [13] are homologous to predicted proteins of *N. crassa* (11.5 and 13.5 kDa, respectively) and *C. reinhardtii* (11 and 16 kDa, respectively). Homologous genes are also present in the worm *C. elegans* genome [36] (see Fig. 4a,b for alignments and accession numbers). The 7 kDa AK059007 gene product identified as a complex I component in rice (described as 2468.m001222 TIGR entry [13]) shows similarity with the predicted 6.5 kDa AAS48194 polypeptide of *Chlamydomonas*. Both sequences also match with the B12 subunit of mammal complex I and with *N.*

*crassa* 10.6 kDa and *C. elegans* 12.1 kDa unidentified proteins (see Fig. 4c for alignments and accession numbers). Finally, homologues of the bovine ESSS subunit are also present in all genomes investigated and orthologues were described above (Fig. 3). Taken together, our findings indicate that the PFFD, B16.6, B12 and ESSS subunits are conserved in all eukaryotes examined, which extends the number of conserved complex I components to 31.

Beside these widely-conserved complex I components, we also examined the remaining subunits presented in Table 2 as subunits previously identified in at least two lineages (mammals and fungi or fungi and plants) and lineage-specific subunits. Carroll et al. [1] pointed out the similarity between the bovine B14.7 subunit, the *Neurospora* 21.3b subunit and proteins of the mitochondrial inner membrane translocase (TIM17, 22 and 23). The *Chlamydomonas* 23 kDa complex I component (AAS58499) identified through our proteomic analysis also shares similarity with TIM proteins. When looking for homologous sequences to these proteins, we indeed found putative homologues of TIM17, 22 and 23 in plant genomes but also found the *Chlamydomonas* BI72446 EST product and the *Arabidopsis* At2g42210 gene product whose identification as B14.7 orthologues or as TIM family members was not possible on the sole basis of the sequences. Conversely, the two proteins identified by BLAST analysis in the databases of *C. elegans* (NP\_501427, NP\_500627) are clearly related to TIM17/22 proteins. While no plant sequence was found to be similar to B15 bovine subunit or to its homologue in *C. elegans* (NP\_492001), the *Neurospora* 7 kDa XP\_322246 protein lined up with the carboxyl-terminal part of the animal complex I subunit.

**Table 2. Genomic analysis of complex I subunits from model prokaryotic and eukaryotic organisms and identification of homologous sequences**

| <i>E. coli</i>   | Mammals ( <i>B. taurus</i> ) | Fungi ( <i>N. crassa</i> ) | Higher plants ( <i>A. thaliana</i> ) | Green algae ( <i>C. reinhardtii</i> ) | MS                    | % id              |                   |          |          |          |
|--|------------------------------|----------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|-----------------------|-------------------|-------------------|----------|----------|----------|
| 14 subunits  | 45 subunits                  | 38 subunits                | 41 subunits                          | 42 subunits                           |                       |                   |                   |          |          |          |
| <b>Bacterial NADH dehydrogenase orthologues (14 subunits)</b>    |                              |                            |                                      |                                       |                       |                   |                   |          |          |          |
| NUOB   | PSST (20)                    | P42026                     | 19.3                                 | O47950                                | 24                    | At5g11770         | 18                | AAQ63698 | *        | 76/72/83 |
| NUOI   | TYKY (23)                    | P42028                     | 21.3c                                | Q12644                                | 25.5                  | At1g16700         | 23                | AAQ63697 | *        | 75/70/78 |
| NUOE   | 24                           | M22539                     | 24                                   | X78083                                | 28.3                  | At4g02580         | 27                | AAQ63695 | *        | 54/46/53 |
| NUOC   | 30                           | P23709                     | 31                                   | P23710                                | ND9 (22.6)            | Q95748            | 25                | AAQ55457 | *        | 52/50/60 |
| NUOD   | 49                           | S04104                     | 49                                   | X54508                                | ND7 (44.6)            | P93306            | 43                | AAQ63700 | *        | 68/62/68 |
| NUOF   | 51                           | P25708                     | 51                                   | P24917                                | 53.5                  | At5g08530         | 50                | AAQ63696 | *        | 71/72/75 |
| NUOG   | 75                           | J02877                     | 78                                   | X57602                                | 81.5                  | At5g37510         | 75                | AAQ73136 | *        | 51/52/50 |
| NUOH   | ND1 (36)                     | P03887                     | ND1 (42)                             | P08774                                | ND1 (36)              | NP_085565         | ND1 (31.6)        | AAB93446 |          | 45/41/50 |
| NUON   | ND2 (39)                     | P03892                     | ND2 (66)                             | A25096                                | ND2 (55)              | NP_085584         | ND2 (42.4)        | AAB93444 |          | 14/24/26 |
| NUOA   | ND3 (13)                     | P03898                     | ND3                                  | Q35141                                | ND3 (14)              | NP_085553         | 14                | AAQ55461 | *        | 41/26/43 |
| NUOM   | ND4 (52)                     | P03910                     | ND4                                  | S02153 <sup>1</sup>                   | ND4 (55)              | NP_085518         | ND4 (48.7)        | AAB93441 |          | 34/39/38 |
| NUOK   | ND4L (11)                    | P03902                     | ND4L (10)                            | P05509                                | ND4L (11)             | NP_051111         | 24.2 <sup>3</sup> | AAO61142 |          | 27/32/31 |
| NUOL   | ND5 (67)                     | P03920                     | ND5 (80)                             | P05510                                | ND5 (74)              | NP_085478         | ND5 (59)          | AAB93442 |          | 27/35/41 |
| NUOJ   | ND6 (19)                     | P03924                     | ND6                                  | S02156 <sup>1</sup>                   | ND6 (23.5)            | NP_085495         | ND6 (17.7)        | AAB93445 |          | 15/27/28 |
| <b>Eukaryote-specific subunits (17 subunits)</b>                 |                              |                            |                                      |                                       |                       |                   |                   |          |          |          |
| MWFE (7.5)   | Q02377                       | 9.8                        | CAE85571                             | 7.5                                   | At3g08610             | 7.5 <sup>3</sup>  | AAS48198          |          | 16/20/21 |          |
| SDAP (8)   | P52505                       | 9.6                        | S17647                               | 14                                    | At1g65290             | 14 <sup>3</sup>   | AAQ73138          |          | 49/52/55 |          |
| B8   | X63219                       | 10.5                       | Q07842                               | 10.8                                  | At5g47890             | 11                | AAQ63699          | *        | 52/37/49 |          |
| B12  | Q02365                       | 10.6 <sup>3</sup>          | XP_331394                            | 7                                     | AK059007 <sup>2</sup> | 6.5 <sup>3</sup>  | AAS48194          |          | 33/30/37 |          |
| B13  | P23935                       | 29.9                       | P24919                               | 19.2                                  | At5g52840             | 18                | AAQ73139          | *        | 24/20/39 |          |
| 13a  | S28238                       | 18.4 <sup>3</sup>          | EAA26933                             | 12.2                                  | At3g03070             | 13 <sup>3</sup>   | AAQ64639          | *        | 28/31/53 |          |
| B14  | X63211                       | 14.8                       | CAA53963                             | 15                                    | At3g12260             | 14                | AAQ84469          | *        | 41/24/31 |          |
| ESSS (14.5)  | Q8HXG5                       | 11.7 <sup>3</sup>          | XP_324110                            | 13 <sup>3</sup>                       | At3g57785             | 17                | AAS48192          | *        | 10/28/31 |          |
| PFFD (15)  | Q02379                       | 11.5 <sup>3</sup>          | EAA31476                             | 14                                    | At3g62790             | 11                | AAQ98888          |          | 28/37/36 |          |
| B16.6  | Q95KV7                       | 13.5 <sup>3</sup>          | EAA29209                             | 16.1                                  | At1g04630             | 16                | AAQ64637          | *        | 42/37/45 |          |
| B17.2  | O97725                       | 13.4 <sup>3</sup>          | EAA31813                             | 18                                    | At3g03100             | 18                | AAQ64638          | *        | 25/23/34 |          |
| B18  | Q02368                       | 89.7 <sup>3</sup>          | EAA28195                             | 12                                    | At2g02050             | 12                | AAQ73135          | *        | 36/45/44 |          |
| AQDQ (18)  | X63215                       | 21                         | P25711                               | 17.1                                  | At5g67590             | 19                | AAQ64640          | *        | 48/34/44 |          |
| PGIV (19)  | P42029                       | 20.8                       | EAA35830                             | 12                                    | At5g18800             | 12.9 <sup>3</sup> | AAQ55460          |          | 28/18/31 |          |
| B22  | S28256                       | 18 <sup>3</sup>            | CAD60692 <sup>1</sup>                | 13.6                                  | At4g34700             | 13.9 <sup>3</sup> | AAQ73134          |          | 32/36/35 |          |
| PDSW (22)  | Q9DCS9                       | 12.3                       | X68965                               | 12.5                                  | At4g16450             | 17.8              | AAQ55459          | *        | 14/16/20 |          |
| 39   | X59418                       | 40                         | P25284                               | 44                                    | At2g20360             | 38                | AAQ55458          | *        | 40/35/41 |          |
| <b>Subunits identified in at least two lineages (4 subunits)</b> |                              |                            |                                      |                                       |                       |                   |                   |          |          |          |
| B14.7  | NP_783649                    | 21.3b                      | S14277                               | N.I. <sup>4</sup>                     |                       | 23                | AAS58499          | *        | 15/20/-  |          |
| B15  | P48305                       | 7 <sup>3</sup>             | XP_322246                            | N.I.                                  |                       | N.I.              |                   |          |          |          |
| ASHI (19)  | S28242                       | 20.1 <sup>3</sup>          | XP_332152                            | N.I. <sup>4</sup>                     |                       | N.I. <sup>4</sup> |                   |          |          |          |
| N.I.   |                              | 20.9                       | Q02854                               | 9                                     | At4g16450             | 13                | AAQ64641          | *        | -/24/29  |          |
| <b>Mammal-specific subunits (11 subunits)</b>                    |                              |                            |                                      |                                       |                       |                   |                   |          |          |          |
| KFYI (6) <sup>6</sup>  | Q02376                       | N.I.                       |                                      | N.I.                                  |                       | N.I.              |                   |          |          |          |
| MNLL (7)   | Q02378                       | N.I.                       |                                      | N.I.                                  |                       | N.I.              |                   |          |          |          |
| AGGG (8)   | Q02374                       | N.I.                       |                                      | N.I.                                  |                       | N.I. <sup>4</sup> |                   |          |          |          |
| B9 <sup>5,6</sup>  | Q02371                       | N.I. <sup>5</sup>          |                                      | N.I.                                  |                       | N.I.              |                   |          |          |          |
| MLRQ (9)   | Q01321                       | N.I.                       |                                      | N.I.                                  |                       | N.I.              |                   |          |          |          |
| 10 <sup>6</sup>  | P25712                       | N.I.                       |                                      | N.I.                                  |                       | N.I.              |                   |          |          |          |
| B14.5a   | Q05752                       | N.I.                       |                                      | N.I.                                  |                       | N.I.              |                   |          |          |          |
| B14.5b   | Q02827                       | N.I.                       |                                      | N.I.                                  |                       | N.I.              |                   |          |          |          |
| SGDH (16)  | Q02380                       | N.I.                       |                                      | N.I.                                  |                       | N.I.              |                   |          |          |          |
| B17  | Q02367                       | N.I.                       |                                      | N.I.                                  |                       | N.I.              |                   |          |          |          |
| 42   | P34942                       | N.I.                       |                                      | N.I.                                  |                       | N.I.              |                   |          |          |          |
| <b>Fungus-specific subunits (3 subunits)</b>                     |                              |                            |                                      |                                       |                       |                   |                   |          |          |          |
| N.I. <sup>5</sup>  |                              | 9.5 <sup>5</sup>           | A44210                               | N.I.                                  |                       | N.I.              |                   |          |          |          |
| N.I.   |                              | 17.8                       | X71414                               | N.I.                                  |                       | N.I.              |                   |          |          |          |
| N.I.   |                              | 21.3a                      | P19968                               | N.I.                                  |                       | N.I.              |                   |          |          |          |
| <b>Plant-specific subunits (12 subunits)</b>                     |                              |                            |                                      |                                       |                       |                   |                   |          |          |          |
| N.I.   |                              | N.I.                       |                                      | 6                                     | At4g20150             | 10                | AAS58501          | *        | -/1/25   |          |
| N.I.   |                              | N.I.                       |                                      | 8                                     | At2g31490             | 13                | AAS48193          | *        | -/1/33   |          |

|                   |  |      |  |                 |           |      |          |   |       |
|-------------------|--|------|--|-----------------|-----------|------|----------|---|-------|
| N.I.              |  | N.I. |  | 17 <sup>3</sup> | At3g07480 | 19   | AAS58502 | * | -/-25 |
| N.I.              |  | N.I. |  | 25 (FBP-like)   | At5g63510 | 27   | AAS48195 | * | -/-47 |
| N.I.              |  | N.I. |  | 27 (FBP-like)   | At3g48680 | N.I. |          |   |       |
| N.I.              |  | N.I. |  | 30 (FBP-like)   | At1g47260 | 32   | AAS48197 | * | -/-42 |
| N.I.              |  | N.I. |  | 32 (FBP-like)   | At5g66510 | 29   | AAS48196 | * | -/-45 |
| N.I.              |  | N.I. |  | 11 (NDH11)      | At1g67350 | N.I. |          |   |       |
| N.I.              |  | N.I. |  | 16 (NDH16)      | At2g27730 | N.I. |          |   |       |
| N.I. <sup>4</sup> |  | N.I. |  | N.I.            |           | 9    | AAS58498 | * | -/-   |
| N.I.              |  | N.I. |  | N.I.            |           | 16   | AAS58503 | * | -/-   |
| N.I.              |  | N.I. |  | N.I.            |           | 19   | AAS58500 | * | -/-   |

Mammal, fungal and plant protein sequences were blasted against *C. reinhardtii* databases and against the NCBI protein bank. Names and molecular masses of complex I components are based on published reviews [2, 3, 13]. The percentage of identity (%id) between Chlamydomonas proteins and its eukaryotic homologues are given when applicable. *N.I.* (not identified) indicates that no sequence of significant similarity was found. Asterisks in the column (MS) indicate the presence of the protein in the mass spectrometry identification records of Table 1.

Notes to Table 2 : ND proteins are mitochondria-encoded subunits. <sup>(1)</sup> *Podospora anserina* sequences. <sup>(2)</sup> *Oriza sativa* gene product identified in complex I [13]. <sup>(3)</sup> Molecular masses predicted from sequence analyses only (these subunits were not identified by proteomic analysis). <sup>(4)</sup> No clear homologous sequence was identified (see text for details). <sup>(5)</sup> Previously described as orthologues [37] (see text for details). <sup>(6)</sup> No related sequences in non-mammalian species have been identified for these three proteins (see text for details).

Bovine and fungal polypeptides share 24 % identity and 36 % similarity and their hydrophobicity profiles match closely in the region aligned with the fungal protein sequence (data not shown). The Neurospora XP\_332152 unknown protein (173 aa) is homologous to the mammalian complex I ASHI subunit (19 kDa) and to the *C. elegans* CAA21668 polypeptide: their protein sequences share 25% identity and similar hydrophobicity profiles (data not shown). Interestingly, the amino-terminal part of the fungal protein sequence aligns with the amino-terminal part of the Arabidopsis At1g02870 gene product (193 aa) and the Chlamydomonas B1718025 EST product (196 aa). However, the hydrophathy profiles of the plant proteins are different from those of fungal or mammal ASHI proteins and the consensus is not sufficient to conclude that the Arabidopsis and Chlamydomonas proteins belong to the complex I ASHI subunit family. Finally, the amino-terminal part of the 132 amino acid BU650459 EST product in Chlamydomonas was also found to share 29 % identity and 39% similarity with the bovine KFYI subunit (76 aa). However, the bovine and algal protein sequences have quite different hydrophobicity profiles (data not shown) which suggests that the similarity might be an accident.

Our searches in the genomes of plants, algae and fungi failed to identify homologous sequences for eleven mammalian-encoded complex I subunits (Table 2). However, at the exception of bovine KFYI, B9 and 10 kDa subunits, we have been able to identify homologous sequences in some non-mammalian animal model species (insects *D. melanogaster* or *A. gambiae*, zebrafish *D. rerio* and worm *C. elegans*). The B17, AGGG and 42 kDa bovine complex I subunits have clear homologues in *A. gambiae* (XP\_318629, XP\_312296, XP\_309517), *C. elegans* (NP\_723927, NP\_495919, NP\_741215) and *D. rerio* (AAH59684,

AAH59649, NP\_955872) and their sequences share 10-15% identity and 20-24% similarity. Mammal SGDH subunit family encompasses the *D. melanogaster* NP\_652042 and *C. elegans* NP\_741000 proteins and the three proteins are 13% identical and 23% similar. The bovine complex I B14.5a and B14.5b components have homologues in *A. gambiae* (XP\_308132, XP\_312024) and in *C. elegans* (CAE73341, AAK29975) and their sequences share only 10% identity and about 20% similarity. The putative BX008826 and NM\_168988 proteins from *A. gambiae* are 22-47% identical and 34-60% similar to the bovine MNLL and MLRQ subunits, respectively. These data reveal that the degree of conservation is very weak between the members of most of these animal complex I subunit families. Hence, we cannot exclude that homologous components do exist in higher plants, algae and fungi, but they were not identified in our analyses due to great divergence.

In this context, we have not identified in plant, algal or animal genomes either sequences similar to the *N. crassa* 9.5, 17.8 and 21.3a kDa complex I subunits, whereas homologues were identified in the protein databases from the two fungi *Magnaporthe grisea* (EAA47579, EAA47033, EAA53227) and *Aspergillus nidulans* (EAA60724, EAA64574, EAA60040). The degree of conservation of the fungal subunits is highly variable, the 17.8 kDa family members being the less conserved (19 % identity and 27 % similarity) and the 9.5 kDa family proteins being the most conserved (45% identity and 63% similarity). Concerning hypothetical lineage-specific subunits in plants, and with respect to the findings of the MS identifications (Table 1), there are only three genes coding for FBP-like proteins in Chlamydomonas, whereas four homologous genes have been identified in Arabidopsis [13]. Finally, no sequence related to higher plant 11 and 16 kDa subunits was identified, whereas all other plant-specific subunits identified by Heazlewood et al. [13] have counterparts

in *Chlamydomonas* complex I (see also the proteomic results).

#### 4. Discussion

##### 4.1. The multiprotein complex I of *Chlamydomonas reinhardtii*

By combined proteomic and genomic approaches, we have here analyzed the subunit composition of the mitochondrial complex I from the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. After isolation from a Blue-Native gel, the algal complex I was resolved into 21 bands by SDS-PAGE. While the two smallest polypeptide bands were not identified by mass spectrometric analysis, 30 coding sequences were identified out of the 19 remaining bands, for an approximate total molecular mass of 700 kDa. The finding of our genomic approach led to the identification of 42 protein sequences (Table 2), the sum of the individual molecular masses (about 970 kDa) being consistent with the native molecular mass of 950 kDa (adapted from [14])- 1000 kDa [16] for *Chlamydomonas* complex I. All predicted subunits that have not been found in the electrophoresis gel either have a predicted molecular mass less than 14 kDa or are extremely hydrophobic, which is very similar to the results obtained by similar approach on human complex I [20]. While some low molecular mass subunits may not be visualised by the Coomassie-blue staining, hydrophobic subunits may have been lost during the second electrophoresis. In particular, none of the five mitochondria-encoded subunits (ND1,2,4,5,6) was detected. Moreover, such proteins contain few tryptic cleavage sites, generating only a limited number of peptides in the mass range that can be used for PMF and peptide sequencing (1-3.5 kDa).

##### 4.2. Identification of ND3,4L,7 and 9 in the *Chlamydomonas* genome

*Chlamydomonas reinhardtii* as other related *Chlamydomonad* algae has a very low number of mitochondria-encoded proteins [39]. From the typical set of seven complex I subunits encoded by the mitochondrial genome of mammals and fungi (ND1-6, 4L), the ND3 and ND4L polypeptides are no longer encoded by the organelle genome in *Chlamydomonas*. In addition, the ND7 and ND9 genes present in the mitochondrial genome of higher plants are also missing in the mitochondrial genome of the alga. The question of whether these four genes were present in the nuclear genome of *Chlamydomonas* has been previously addressed [40]. The four genes were detected in the nucleic acid databases, and, with the exception of ND4L, the corresponding subunits were also identified at the protein level. It was proposed that ND3 and ND4L subunit, which classically possess three transmembrane domains [34], are too hydrophobic to be imported across the two membranes surrounding mitochondria [41]. Hydropathy profile analysis of *C. reinhardtii* ND3 and ND4L protein sequences also predicted three transmembrane stretches but with a

slightly reduced hydrophobicity (data not shown). This satisfies one of the criteria necessary for a protein whose gene has been translocated from the mitochondria to the nucleus. The presence of putative mitochondria targeting presequences is another criterion. When compared to ND3, ND4L, ND7 and ND9 sequences from other organisms, all the *Chlamydomonas* proteins exhibit long N-terminal extensions (up to 120 amino acids) with a putative targeting sequences (data not shown).

##### 4.3. Thirty-one widely-conserved subunits exist within eukaryotic complex I

As already pointed out by Heazlewood et al. [13], the achievement of many genome projects has considerably increased the number of complex I conserved subunits. In 1998, a total of 23 components common to the bovine and *Neurospora* enzymes were described [42]. In 2002-2003, data from several studies revealed 23 to 27 conserved components between the eukaryotic kingdoms [3, 13, 36]. Here we have now extended the number of complex I conserved proteins to 31 (Table 2). Besides the fourteen highly-conserved subunits homologous to the prokaryotic NADH dehydrogenase enzyme components, all the species examined (mainly the mammal *B. taurus*, the fungus *N. crassa*, the worm *C. elegans*, the higher plant *A. thaliana* and the green alga *C. reinhardtii*) clearly contain 17 additional conserved components. An eighteenth subunit could be widely-conserved: present in mammals, fungi and algae, B14.7 homologue is not clearly identified in worm and higher plant.

Generally considered as accessory proteins, since they do not have counterparts in the bacterial enzyme, the role of these subunits is still largely unknown. It was speculated that at least some of them form a frame or a stabilizer to keep the redox groups in the right position so as to prevent the electrons from escaping and forming reactive oxygen species [43]. In the bovine complex I, eleven of these proteins belong to the I $\alpha$  subcomplex (MWFE, B8, 13 kDa-A, B13, B14, B14.7, B16.6, B17.2, PFFD, PGIV, AQDQ, 39 kDa), five subunits are part of the I $\beta$  subcomplex (ESSS, B12, PDSW, B18, B22) and the acyl-carrier SDAP protein is associated to both the subcomplexes, which basically correspond to peripheral and membrane parts of the enzyme [1, 2]. During the last decade, progress has been made to determine the impact of some of these proteins (SDAP, 39 kDa, AQDQ, MWFE, B13, PGIV, PDSW) on the enzyme activity or assembly of assembly, either in mammals or in *N. crassa* (see discussion by Heazlewood et al. [13]).

The B16.6 and B14.7 subunits were identified only recently as complex I components in mammals [1, 38]. B16.6 is known as GRIM-19 protein, the product of a cell death regulatory gene induced by interferon- $\beta$  and retinoic acid [38]. Its presumed presence in all eukaryotic cells provides a new key to investigate a general link between mitochondrial electron transport chain and cell death.

Bovine B14.7 [1], *Neurospora* 21.3b [44] and *Chlamydomonas* 23 kDa proteins share 15-20% identity and similar hydropathy profiles with the TIM22 and TIM23 complex components involved in protein translocation across the inner mitochondrial membrane. A similar import function of complex I subunits that have no cleavable mitochondrial import sequence has been suggested for bovine protein B14.7 [1]. On the other hand, disruption of the 21.3b corresponding gene in *N. crassa* results in the absence of complex I assembly and in the formation of two major subcomplexes, corresponding to the membrane and matrix domains [44]. These protein homologues might thus play a central role in the eukaryotic complex I assembly pathway.

To our knowledge, there are no deletion phenotypes or roles attributed to ESSS, B8, B12, B14, B17.2, B18, B22, 13 kDa-A and PFFD proteins. B14 and B22 subunits have been placed in the same protein family (pfam05347) on the basis of a conserved tripeptide (LYR or LYK) located near to the N-terminus of these proteins. However, we failed to obtain a significant consensus from Clustal W alignment between the B14 and B22 sequences. Moreover, the so-called conserved motif is degenerated in many species (MYR in the *Chlamydomonas* B22 protein, LFK in the mice BAB24512 B14 homologue, FFR in the higher plants B14 polypeptides), which perhaps makes irrelevant the classification of B14 and B22 in the same protein family.

#### 4.4. The importance of a four regularly-spaced cysteine residue motif

In the PGIV bovine protein and in its homologue in *N. crassa* (20.8 kDa), eight cysteine residues separated from each other by an average of nine amino acids were suggested to be involved in disulphide bridges or to provide ligands for binding Fe-S clusters [42]. The eight Cys residues are also present in higher plant PGIV homologue. However, Cys residues 1,4,5,8 and 2,3 are absent in the *C. reinhardtii* and *C. elegans* (NP\_497574) homologues, respectively, which reduces to cysteines 6 and 7 the conserved residues (data not shown).

Looking for cysteine residues in other widely-conserved accessory subunits revealed us that PSDW family members also possess two conserved cysteine residues 11 amino acids apart (data not shown). In PFFD (Fig.4) and B18 (data not shown) protein families a motif of four regularly-spaced cysteine residues was also identified (C-X<sub>(9)</sub>-C-X<sub>(9-15)</sub>-C-X<sub>(9)</sub>-C) which aligns with four cysteines present in the two complex IV chaperones COX17 and COX19. COX17 is involved in copper import into mitochondria and replacement of its C-terminal cysteine residue in yeast leads to the absence of the protein and of complex IV assembly [45]. On the basis of the four conserved cysteine residues, COX19 is also suggested to perform a similar function [46]. Although most of the cysteine residues are probably involved in formation of disulphide bridges, it is reasonable to assume that PFFD, B18, PDSW or PGIV

subunits play a role in Fe-S cluster binding, or even in metal transport to mitochondria.

#### 4.5 Non-conserved complex I subunits: lineage-specific components?

While the number of conserved subunits in eukaryotes has increased, the number of lineage-specific complex I subunits has almost remains constant because new subunits continue to be described [1, 13]. Eleven proteins are specific to mammals, three of which having no identified counterparts in the other animal species, three are specific to fungi and at least nine are typical of the photosynthetic eukaryotes, including *C. reinhardtii* (Table 2). There are also two components conserved between fungi and animals which do not have counterparts in photosynthetic eukaryotes, and finally there is one subunit common to fungi and plants which is not found in animals (Table 2). In this context, the composition of *Chlamydomonas* complex I is very similar to that of the higher plant enzyme. Nevertheless, since the degree of conservation of most of these subunits within their class is rather low, and in the absence of comprehensive studies on complex I from various species, it is hard to know whether some of these proteins represent weakly-conserved orthologues, structural counterparts, or whether they are real lineage-specific components that would have been acquired or lost during the evolution of specific groups.

Based on current knowledge, it is tempting to speculate that a major part of these components are not required for electron transport in complex I but rather perform other functions, such as enzyme stability, or function against reactive oxygen species. The presence of ferripyochelin-binding protein-like subunits in photosynthetic eukaryotes is quite intriguing. Their putative function as sensor of Fe in the mitochondrion or their ability to bind and store iron for later assembly of Fe-S clusters [13, 47] awaits further investigation. Interestingly, the NUO-20.9 mutant of *Neurospora* fails to assemble a complete membrane arm while the matricial arm is present [48]. This subunit is also the only one that has no animal counterpart while it is present in photosynthetic eukaryote complex I, pointing out the central role of a non-conserved “accessory” subunit in the assembly of the membrane arm the in non-mammalian enzymes.

#### Acknowledgements

We are grateful to Dr. H. Millar (University of Western Australia) for critical comments to the manuscript. We thank Dr. J. Hirst (Cambridge University, UK) for the generous gift of the antibody against SDAP bovine subunit. This research was supported by grants from the Belgian Fonds National de la Recherche Scientifique (2.4.587.04.F). P.C. is a Research Fellow of the F.N.R.S. and F.V. is a grantee from the ‘Bijzonder Onderzoekfonds’ of Ghent University. J.V.B. and B.D. are indebted to the Fund for Scientific Research-Flanders for project G.0312.02, providing the mass

spectrometers. We also thank Dr D. Baurain for helpful hints on BLAST facilities and E. Lecocq and E. Schmetz for technical assistance.

- [1] J. Carroll, R.J. Shannon, I.M. Fearnley, J.E. Walker, J. Hirst, Definition of the nuclear encoded protein composition of bovine heart mitochondrial complex I. Identification two new subunits, *J. Biol. Chem.* 277 (2002) 50311-7.
- [2] J. Hirst, J. Carroll, I.M. Fearnley, R.J. Shannon, J.E. Walker, The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* 1604 (2003) 135-50.
- [3] A. Videira, M. Duarte, From NADH to ubiquinone in *Neurospora* mitochondria, *Biochim. Biophys. Acta* 1555 (2002) 187-91.
- [4] T. Friedrich, The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*, *Biochim. Biophys. Acta* 1364 (1998) 134-46.
- [5] A. Dupuis, M. Chevallet, E. Darrouzet, H. Duborjal, J. Lunardi, J.P. Issartel, The complex I from *Rhodobacter capsulatus*, *Biochim. Biophys. Acta* 1364 (1998) 147-65.
- [6] T. Ohnishi, Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I, *Biochim. Biophys. Acta* 1364 (1998) 186-206.
- [7] M. Chevallet, A. Dupuis, J.P. Issartel, J. Lunardi, R. van Belzen, S.P. Albracht, Two EPR-detectable [4Fe-4S] clusters, N2a and N2b, are bound to the NuO1 (TYKY) subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase (Complex I) from *Rhodobacter capsulatus*, *Biochim. Biophys. Acta* 1557 (2003) 51-66.
- [8] V. Guenebaut, R. Vincentelli, D. Mills, H. Weiss, K.R. Leonard, Three-dimensional structure of NADH-dehydrogenase from *Neurospora crassa* by electron microscopy and conical tilt reconstruction, *J. Mol. Biol.* 265 (1997) 409-18.
- [9] G. Hofhaus, H. Weiss, K. Leonard, Electron microscopic analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I), *J. Mol. Biol.* 221 (1991) 1027-43.
- [10] B. Combettes, J.M. Grienerberger, Analysis of wheat mitochondrial complex I purified by a one-step immunoaffinity chromatography, *Biochimie* 81 (1999) 645-53.
- [11] A.G. Rasmusson, J. Mendel-Hartvig, I.M. Moller, J.T. Wiskich, Isolation of the rotenone-sensitive NADH-ubiquinone reductase (complex I) from red beet mitochondria, *Physiol. Plant.* 90 (1994) 607-615.
- [12] S. Leterme, M. Boutry, Purification and preliminary characterization of mitochondrial complex I (NADH: ubiquinone reductase) from broad bean (*Vicia faba* L.), *Plant Physiol.* 102 (1993) 435-43.
- [13] J.L. Heazlewood, K.A. Howell, A.H. Millar, Mitochondrial complex I from *Arabidopsis* and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits, *Biochim. Biophys. Acta* 1604 (2003) 159-69.
- [14] F. Duby, P. Cardol, R.F. Matagne, C. Remacle, Structure of the telomeric ends of mt DNA, transcriptional analysis and complex I assembly in the dum24 mitochondrial mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*, *Mol. Genet. Genomics* 266 (2001) 109-14.
- [15] P. Cardol, R.F. Matagne, C. Remacle, Impact of mutations affecting ND mitochondria-encoded subunits on the activity and assembly of complex I in *Chlamydomonas*. Implication for the structural organization of the enzyme, *J. Mol. Biol.* 319 (2002) 1211-21.
- [16] R. van Lis, A. Atteia, G. Mendoza-Hernandez, D. Gonzalez-Halphen, Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach, *Plant Physiol.* 132 (2003) 318-30.
- [17] C. Vahrenholz, G. Riemen, E. Pratej, B. Dujon, G. Michaelis, Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii* : the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication, *Curr. Genet.* 24 (1993) 241-247.
- [18] J. Shrager, C. Hauser, C.W. Chang, E.H. Harris, J. Davies, J. McDermott, R. Tamse, Z. Zhang, A.R. Grossman, *Chlamydomonas reinhardtii* genome project. A guide to the generation and use of the cDNA information, *Plant Physiol.* 131 (2003) 401-8.
- [19] H. Schägger, G. Von Jagow, Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form, *Anal. Biochem.* 199 (1991) 223-231.
- [20] B. Devreese, F. Vanrobaeys, J. Smet, J. Van Beeumen, R. Van Coster, Mass spectrometric identification of mitochondrial oxidative phosphorylation subunits separated by two-dimensional blue-native polyacrylamide gel electrophoresis, *Electrophoresis* 23 (2002) 2525-33.
- [21] U. Klein, C. Chen, M. Gibbs, P.-a.K. A., Cellular fractionation of *chlamydomonas reinhardtii* with emphasis on the isolation of the chloroplast, *Plant Physiol.* 72 (1983) 481-487.
- [22] M.M. Bradford, A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.* 72 (1976) 248-54.
- [23] D.R. Kuonen, P.J. Roberts, I.R. Cottingham, Purification and analysis of mitochondrial membrane proteins on nondenaturing gradient polyacrylamide gels, *Anal. Biochem.* 153 (1986) 221-6.
- [24] I.R. Cottingham, A.L. Moore, Analysis of NADH dehydrogenases from plant [mung bean (*Phaseolus aureus*)] mitochondrial membranes on non-denaturing polyacrylamide gels and purification of complex I by band excision, *Biochem. J.* 254 (1988) 303-5.
- [25] U.K. Laemmli, Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature* 227 (1970) 680-5.
- [26] F. Vanrobaeys, B. Devreese, E. Lecocq, L. Rychlewski, L. De Smet, J. Van Beeumen, Proteomics of the dissimilatory iron-reducing bacterium *Shewanella oneidensis* MR-1, using a matrix-assisted laser desorption/ionization-tandem-time-of-flight mass spectrometer, *Proteomics* 3 (2003) 2249-57.
- [27] H. Bannai, Y. Tamada, O. Maruyama, K. Nakai, S. Miyano, Extensive feature detection of N-terminal protein sorting signals, *Bioinformatics* 18 (2002) 298-305.
- [28] C. Guda, E. Fahy, S. Subramaniam, MITOPRED: A genome-scale method for prediction of nuclear-encoded mitochondrial proteins, *Bioinformatics* (2004) in press.
- [29] O. Emanuelsson, H. Nielsen, S. Brunak, G. von Heijne, Predicting subcellular localization of proteins based on their N-terminal amino acid sequence, *J. Mol. Biol.* 300 (2000) 1005-16.
- [30] B. Bjellqvist, G.J. Hughes, C. Pasquali, N. Paquet, F. Ravier, J.C. Sanchez, S. Frutiger, D. Hochstrasser, The focusing positions of polypeptides in immobilized pH gradients can be predicted from their amino acid sequences, *Electrophoresis* 14 (1993) 1023-31.
- [31] J. Kyte, R.F. Doolittle, A simple method for displaying the hydropathic character of a protein, *J. Mol. Biol.* 157 (1982) 105-32.
- [32] J.D. Thompson, D.G. Higgins, T.J. Gibson, CLUSTAL W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice, *Nucleic Acids Res.* 22 (1994) 4673-80.
- [33] M. Eriksson, P. Gardestrom, G. Samuelsson, Isolation, purification and characterization of mitochondria from *Chlamydomonas reinhardtii*, *Plant Physiol.* 107 (1995) 479-483.



- [34] J.E. Walker, The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains, *Q. Rev. Biophys.* 25 (1992) 253-324.
- [35] T. Friedrich, A. Abelmann, B. Brors, V. Guenebaut, L. Kintscher, K. Leonard, T. Rasmussen, D. Scheide, A. Schlitt, U. Schulte, H. Weiss, Redox components and structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I), *Biochim. Biophys. Acta* 1365 (1998) 215-9.
- [36] W.Y. Tsang, B.D. Lemire, The role of mitochondria in the life of the nematode, *Caenorhabditis elegans*, *Biochim. Biophys. Acta* 1638 (2003) 91-105.
- [37] H. Heinrich, J.E. Azevedo, S. Werner, Characterization of the 9.5-kDa ubiquinone-binding protein of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Neurospora crassa*, *Biochemistry* 31 (1992) 11420-4.
- [38] I.M. Fearnley, J. Carroll, R.J. Shannon, M.J. Runswick, J.E. Walker, J. Hirst, GRIM-19, a cell death regulatory gene product, is a subunit of bovine mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I), *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 38345-8.
- [39] A.M. Nedelcu, R.W. Lee, Modes and tempos of mitochondrial and chloroplast genome evolution in *Chlamydomonas* : a comparative analysis. in *The Molecular biology of Chloroplast and Mitochondria in Chlamydomonas* (J.D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont, S. Merchant, eds.), Kluwer Academic Publishers, The Netherlands (1998) 63-91.
- [40] X. Perez-Martinez, M. Vazquez-Acevedo, E. Tolkunova, S. Funes, M.G. Claros, E. Davidson, M.P. King, D. Gonzalez-Halphen, Unusual location of a mitochondrial gene. Subunit III of cytochrome C oxidase is encoded in the nucleus of *Chlamydomonas* algae, *J. Biol. Chem.* 275 (2000) 30144-52.
- [41] H.L. Race, R.G. Herrmann, W. Martin, Why have organelles retained genomes?, *Trends Genet.* 15 (1999) 364-70.
- [42] A. Videira, Complex I from the fungus *Neurospora crassa*, *Biochim. Biophys. Acta* 1364 (1998) 89-100.
- [43] T. Friedrich, H. Weiss, Origine and evolution of the proton-pumping NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) in Origin and evolution of Biological conversion (H. Baltscheffsky, eds.), VCH publishers, Stockholm (1996) 205-220.
- [44] U. Nehls, T. Friedrich, A. Schmiede, T. Ohnishi, H. Weiss, Characterization of assembly intermediates of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) accumulated in *Neurospora* mitochondria by gene disruption, *J. Mol. Biol.* 227 (1992) 1032-42.
- [45] F.A. Punter, D.M. Glerum, Mutagenesis reveals a specific role for Cox17p in copper transport to cytochrome oxidase, *J Biol Chem* 278 (2003) 30875-80.
- [46] M.P. Nobrega, S.C. Bandeira, J. Beers, A. Tzagoloff, Characterization of COX19, a widely distributed gene required for expression of mitochondrial cytochrome oxidase, *J Biol Chem* 277 (2002) 40206-11.
- [47] R. Lill, G. Kispal, Maturation of cellular Fe-S proteins: an essential function of mitochondria, *Trends Biochem. Sci.* 25 (2000) 352-6.
- [48] U. Schulte, H. Weiss, Generation and characterization of NADH: ubiquinone oxidoreductase mutants in *Neurospora crassa*, *Methods Enzymol.* 260 (1995) 3-14.



## 2. Analyse de mutants du complexe I de *C. reinhardtii* : étude du rôle des sous-unités ND dans l'activité et l'assemblage du complexe I

Les sous-unités du complexe I ont une origine génétique double: la majorité d'entre elles sont encodées par le génome nucléaire tandis qu'un nombre restreint et variable de polypeptides sont encodés par les gènes *nd* du génome mitochondrial. Alors que le génome mitochondrial des animaux et des champignons encode sept protéines (ND1 à 6, ND4L), le génome mitochondrial des plantes supérieures en encodent deux de plus (ND7 et ND9). C'est chez le protozoaire *Reclinomonas americana* que l'on rencontre le plus grand nombre de gènes *nd* mitochondriaux (12 gènes). A l'inverse, plusieurs espèces du genre *Chlamydomonas* possèdent un génome mitochondrial de taille réduite, encodant seulement cinq sous-unités du complexe I (ND1, 2, 4, 5 et 6) (Nedelcu et Lee, 1998).

Le rôle de la majorité des sous-unités ND du complexe I est encore inconnu à ce jour. Cependant, comme il est actuellement possible d'inactiver l'expression de gènes nucléaires par interférence ARN ou par mutagenèse dirigée, on peut envisager d'appréhender dans un avenir proche la fonction des sous-unités encodées dans le noyau. Par contre, l'absence de techniques comparables pour le génome mitochondrial limite fortement l'étude de la fonction des sous-unités qui y sont encodées. Pourtant, l'intérêt porté à ces protéines hydrophobes va grandissant, notamment parce que des mutations affectant des gènes *nd* ont été associées à diverses myopathies et maladies neurodégénératives (maladie de Parkinson, neuropathie optique héréditaire de Leber, dystonie) (*cf.* introduction).

Chez *Chlamydomonas*, les douze gènes *nd* ont été identifiés : les gènes *nd1, 2, 4, 5* et *6* sont présents dans le génome mitochondrial tandis que les gènes *ND3, 4L, 7-11* ont été identifiés dans le génome nucléaire (*cf.* chapitre I). *Chlamydomonas* est un organisme de choix pour étudier le rôle des sous-unités ND dans l'activité et l'assemblage du complexe I. En effet, des mutations mitochondriales homoplasmiques stables et viables peuvent être obtenues par traitement mutagène à

l'acriflavine ou au bromure d'éthidium (Matagne *et al.*, 1989). Par ailleurs, la technique d'interférence ARN s'est récemment révélée applicable pour inactiver l'expression de gènes nucléaires (Fuhrmann *et al.*, 2001).

### 2.1. Mutations affectant les séquences codantes des gènes mitochondriaux *nd1*, *nd4*, *nd4+nd5* et *nd6*, et l'extrémité 3' non codante du gène *nd5*.

Dans cette partie du travail, cinq mutants isolés après un traitement mutagène à l'acriflavine et présentant une croissance lente en conditions hétérotrophes (phénotype *dk<sup>±</sup>*) ont été caractérisés. *In vivo*, ces mutants sont insensibles à la roténone, inhibiteur du complexe I. Des analyses génétiques ont montré que quatre mutations (*dum5*, *dum17*, *dum20* et *dum25*) affectent le génome mitochondrial alors que la cinquième est d'origine nucléaire (*dn26*). Ces mutations entraînent la perte de l'activité du complexe I (*dum17*, *dum20*, *dum25* et *dn26*) ou une forte réduction de celle-ci (~88%, *dum5*) (Tableau 8). Des analyses de recombinaison ont permis de conclure que *dum20* et *dum25* sont étroitement liées et affectent probablement la séquence du gène *nd1*, que *dum5* est située dans la région comprenant les gènes *nd4* et *nd5*, et que *dum17* est localisée dans le gène *nd2* ou *nd6*. L'analyse de ces séquences chez les quatre mutants a confirmé ces conclusions : *dum20* est une délétion d'une thymine au codon 243 du gène *nd1*; *dum25* correspond à la délétion de 6 pb qui élimine deux acides aminés conservés de la protéine ND1 (résidus 199-200); *dum17* entraîne la perte d'une thymine au codon 143 du gène *nd6*; enfin, *dum5* est également une délétion d'une thymine, 75 pb en aval du codon *Stop* du gène *nd5*. Chez ce dernier mutant, la quantité de transcrits du gène *nd5* est fortement réduite. Par ailleurs l'analyse *in silico* de l'extrémité 3' du gène *nd5* suggère que les structures secondaires du transcrit correspondant pourraient être altérées chez le mutant *dum5*.

L'impact des quatre mutations mitochondriales sur l'assemblage du complexe I a ensuite été évalué. Les mutants *dum22* et *dum24* préalablement isolés ont également été inclus dans cette analyse. Il s'agit de deux mutants phototrophes obligatoires (phénotype *dk<sup>-</sup>*) dont la respiration sensible à la roténone et au cyanure (inhibiteur du complexe IV) est altérée. Leur génome mitochondrial est affecté par une délétion couvrant le gène *cob* et l'extrémité 3' du gène *nd4* (*dum22*), et les gènes *cob*, *nd4* et l'extrémité 3' du gène *nd5* (*dum24*) (Duby, 2002; Duby et Matagne, 1999).

Après séparation des complexes protéiques mitochondriaux par BN-PAGE ou par centrifugation en gradient de saccharose, nous avons démontré d'une part que la diminution de la quantité des transcrits observée chez *dum5* est corrélée à une réduction importante (~85%) de la quantité du complexe I de 950 kDa. D'autre part, la perte des résidus 199-200 de la protéine ND1 (*dum25*) n'empêche ni l'assemblage du complexe I, ni l'activité NADH déshydrogénase de son bras périphérique, alors qu'en l'absence de la protéine ND1 (*dum20*) ou de la protéine ND6 (*dum17*), aucun assemblage n'est détecté. Enfin la perte des sous-unités ND4 (*dum22*) ou ND4/ND5 (*dum24*) conduit à la formation, en quantité réduite (~10%), d'un sous-complexe de 700 kDa. Celui-ci possède l'activité

NADH déshydrogénase liée au bras périphérique. Les caractéristiques majeures de ces mutants affectés au niveau du complexe I sont reprises dans le Tableau 8.

Ces résultats ont fait l'objet des publications 2 et 3 présentées ci-après. Notre contribution à la publication 2 s'est limitée à la caractérisation biochimique des mutants.

Dans la publication 3, les masses moléculaires du complexe I et du sous-complexe présent chez les mutants *dum22* et *dum24* étaient estimées respectivement à 850 et 650 kDa. Ces valeurs avaient été déterminées sur base d'une droite d'étalonnage en utilisant notamment comme marqueur le complexe I de *S. tuberosum* dont la masse moléculaire était à l'époque estimée à 890 kDa (Rasmusson *et al.*, 1998). Cependant, sur base des données récentes, la masse moléculaire du complexe I des plantes supérieures serait environ de 1000 kDa (Heazlewood *et al.*, 2003). Apportant cette modification à notre courbe étalon, les masses moléculaires approximatives du complexe I et du sous-complexe sont respectivement de 950 et 700 kDa. Cette valeur de 950 kDa pour le complexe I est en bon accord avec celle calculée sur base des données obtenues dans la publication 1.

| Souche       | Mutation  | Activité du complexe I (%) | Taille et quantité relative (%) du complexe I ou du sous-complexe |
|--------------|---|----------------------------|---|
| sauvage      |   | 100                        | 950 kDa (100)   |
| <i>dum5</i>  | -1T dans la région 3' non traduite du gène <i>nd5</i> (faible quantité de transcrits <i>nd5</i> ) | ~12                        | 950 kDa (~15)   |
| <i>dum17</i> | -1T dans le gène <i>nd6</i>   | 0                          | 950 kDa (1-2)   |
| <i>dum20</i> | -1T dans le gène <i>nd1</i>   | 0                          | 950 kDa (1-2)   |
| <i>dum22</i> | délétion du gène <i>cob</i> et de l'extrémité 3' du gène <i>nd4</i>                               | 0                          | 700 kDa (~10)   |
| <i>dum24</i> | délétion des gènes <i>cob</i> , <i>nd4</i> et de l'extrémité 3' du gène <i>nd5</i>                | 0                          | 700 kDa (~10)   |
| <i>dum25</i> | délétion des codons 199-200 du gène <i>nd1</i>  | 0                          | 950 kDa (100)   |
| <i>dn26</i>  | mutation nucléaire  | 0                          | n.d.  |

**Tableau 8.** Synthèse des données obtenues pour les mutants du complexe I dans les publications 2 et 3.

**Publication 2. Remacle C., Baurain D., Cardol P., Matagne RF. (2001) Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in mitochondrial complex I: characterization of two mutations affecting the *nd1* coding sequence. *Genetics* 158(3):1051-60.**



# Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* Deficient in Mitochondrial Complex I: Characterization of Two Mutations Affecting the *nd1* Coding Sequence

Claire Remacle, Denis Baurain, Pierre Cardol and René F. Matagne

Laboratory of Genetics of Microorganisms, Department of Plant Biology, University of Liège, B-4000 Liège Sart-Tilman, Belgium

Manuscript received October 2, 2000  
Accepted for publication April 17, 2001

## ABSTRACT

The mitochondrial rotenone-sensitive NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) comprises more than 30 subunits, the majority of which are encoded by the nucleus. In *Chlamydomonas reinhardtii*, only five components of complex I are coded for by mitochondrial genes. Three mutants deprived of complex I activity and displaying slow growth in the dark were isolated after mutagenic treatment with acriflavine. A genetical analysis demonstrated that two mutations (*dum20* and *dum25*) affect the mitochondrial genome whereas the third mutation (*dn26*) is of nuclear origin. Recombinational analyses showed that *dum20* and *dum25* are closely linked on the genetic map of the mitochondrial genome and could affect the *nd1* gene. A sequencing analysis confirmed this conclusion: *dum20* is a deletion of one T at codon 243 of *nd1*; *dum25* corresponds to a 6-bp deletion that eliminates two amino acids located in a very conserved hydrophilic segment of the protein.

THE rotenone-sensitive NADH:ubiquinone oxidoreductase, traditionally called complex I, catalyzes electron transfer from NADH to ubiquinone in a process coupled to proton transport across the inner mitochondrial membrane. Complex I is the most complicated enzyme of the respiratory chain and remains the least understood of the respiratory complexes. It comprises more than 30 subunits, the majority of which are encoded by nuclear genes and imported from the cytoplasm (reviewed by WEISS *et al.* 1991; WALKER 1992; RASMUSSEN *et al.* 1998). Seven subunits are coded for by mitochondrial genes (*nd1*, -2, -3, -4, -4L, -5, and -6) in mammals and *Neurospora crassa* and two additional ones (*nd7* and *nd9*) in plants. The NADH:ubiquinone oxidoreductase equivalent of complex I is much smaller in bacteria. It contains 13 or 14 proteins homologous to the 13 or 14 major subunits of the mitochondrial complex I, including the seven mitochondrially encoded ND subunits (DUPUIS *et al.* 1998a; FRIEDRICH 1998; YAGI *et al.* 1998). The reason for the complexity of complex I in eukaryotes is unknown. Electron microscopic analysis of the *Neurospora* enzyme has shown that complex I has an L-shaped structure with one arm buried in the mitochondrial membrane and the other protruding in the matrix (HOFHAUS *et al.* 1991; GUÉNEBAUT *et al.* 1997). The hydrophobic membrane arm contains all the mitochondrial ND subunits and bears the quinone binding sites as well as the proton pumping machinery. The matrix arm is made up entirely of nu-

clear encoded subunits, possesses the NADH dehydrogenase activity, and contains most of the prosthetic groups involved in electron transfer (WEISS *et al.* 1991).

Despite the knowledge of the primary structure of the mitochondrial DNA-encoded subunits, little is known about their functions, except for ND1, which binds rotenone and has been proposed to carry the ubiquinone-binding domain(s) (EARLEY *et al.* 1987). Useful information about their roles comes from the analysis of complex I-deficient mutants in different organisms. In *Neurospora*, the E35 "stopper" mutant is deficient for the *nd2* and *nd3* genes and assembles a subform of complex I, which seems to lack the membrane domain (ALVES and VIDEIRA 1998). In humans, point mutations in *nd1*, *nd4*, and *nd6* genes are responsible for complex I deficiencies and cause optic nerve degeneracy (SHAPIRA 1998). Activity of complex I is dramatically reduced or totally abolished in human or mouse cell lines that carry frameshift mutations in *nd4*, *nd5*, or *nd6* genes (HOFHAUS and ATTARDI 1993, 1995; BAI and ATTARDI 1998). In plants, mitochondrial *nd* mutations have been described in a nonchromosomal stripe mutant (NCS2) of *Zea mays* (MARIENFELD and NEWTON 1994) and in two cytoplasmic male sterile mutants (CMSI and CMSII) of *Nicotiana sylvestris* (PLA *et al.* 1995). Both types of mutants display a reduced complex I activity. Their analysis is made complicated because mutations occur through extensive genomic rearrangements or because they generally cannot be maintained in pure homoplasmic lines, except in the case of a rare NCS2 *nd4* deletion mutant plant of maize (YAMATO and NEWTON 1999).

The unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* can be used as a model system to investigate mitochondrial gene function in plant cells. Its small linear 15.8-kb

Corresponding author: René F. Matagne, Laboratory of Genetics of Microorganisms, Department of Plant Biology, B22, University of Liège, B-4000 Liège Sart-Tilman, Belgium.  
E-mail: rf.matagne@ulg.ac.be

mitochondrial genome has been totally sequenced and all the genes identified (VAHRENHOLZ *et al.* 1993). Moreover, several nonlethal mutations (*dum*) altering mitochondrial genes encoding apocytochrome b (*cob* gene) or subunit I of cytochrome oxidase (*cox1* gene) have been characterized (MATAGNE *et al.* 1989; DORTHU *et al.* 1992; RANDOLPH-ANDERSON *et al.* 1993; COLIN *et al.* 1995; REMACLE and MATAGNE 1998). Mutant cells are homoplasmic for the mutation and do not retain any wild-type mitochondrial DNA copies. The mutants lack the cytochrome pathway of respiration but their respiratory activity is partially retained via the nonphosphorylating alternative pathway that drives the electrons from reduced ubiquinone to oxygen. Phenotypically, the mutants have lost the capacity to grow under heterotrophic conditions (Dark<sup>-</sup> or Dk<sup>-</sup> phenotype) whereas the photoautotrophic growth is barely affected. An extreme phenotype is obtained when mutant cells possess mitochondrial DNA copies deleted for *cob*, *nd4*, and the 3' end of *nd5* (DUBY and MATAGNE 1999). This *dum24* mutant lacks the cyanide-sensitive cytochrome pathway of respiration and the activity associated with complex I. A low respiratory rate of mutant cells is maintained via the activities of rotenone-resistant NADH dehydrogenase, complex II, and alternative oxidase.

Until now, mutants of *Chlamydomonas* altered only in complex I have never been characterized at the molecular level. We describe here three mutants from *Chlamydomonas* that lack complex I activity. In contrast to the other respiratory mutants characterized so far, they grow slowly under heterotrophic conditions (Dk<sup>+/-</sup> phenotype), probably because the two phosphorylation sites associated with complex III and complex IV are preserved. One mutation is of nuclear origin whereas the two others affect the *nd1* mitochondrial gene. A recombinational analysis has allowed us to draw a more complete genetic map of the mitochondrial genome and to confirm that the recombination frequency is ~3%/kb.

## MATERIALS AND METHODS

**Strains and growth conditions:** Strains used in this work are derived from the 137c strain of *Chlamydomonas reinhardtii*. The following mitochondrial mutants have been used (Table 1): *dum15*, double base pair substitution in the *cob* gene, lacking complex III activity; *dum19*, one T deletion in *cox1*, lacking complex IV activity (COLIN *et al.* 1995); *dum20*, mitochondrial mutation (not characterized at molecular level), lacking complex I activity (REMACLE and MATAGNE 1998); *dum24*, deletion encompassing *cob*, *nd4*, and the 3' end of *nd5*, lacking activities of complex I and complex III (DUBY and MATAGNE 1999). *Arg7*, *arg7-3*, *arg7-7*, and *arg7-8* are nuclear mutations at the *ARG7* nuclear locus. Some of these *arg* mutations complement (MATAGNE 1978), allowing diploids to be selected on Tris-minimal phosphate (TMP) minimal medium.

Cells were routinely grown under light (75 PAR) on TAP (Tris-acetate phosphate) or TMP agar medium supplemented with 100 mg/liter arginine when required (HARRIS 1989).

Rotenone, antimycin A, and myxothiazol were dissolved in ethanol and added to TAP agar medium after autoclaving at 35, 1, and 7.5  $\mu\text{M}$  final concentrations, respectively.

**Mutagenesis and genetical analysis:** Mutagenesis with acriflavin was performed on the wild-type *mt<sup>-</sup>* (2) or *dum19 mt<sup>-</sup>* (239) strains as described in DUBY and MATAGNE (1999). The transmission pattern of the mutations in crosses was determined by random analysis of the meiotic products.

**Recombinational analysis:** To determine the recombination frequencies between mitochondrial markers, strains carrying different *dum* mutations and complementary *arg7* nuclear markers were crossed and the diploid colonies were selected on minimal TMP medium. After 10 days, when the mitotic segregation had produced near homoplasmic diploid progeny, the recombination frequencies were determined, assuming that the percentages of Dk<sup>+</sup> recombinant cells corresponded to the recombination rates (REMACLE *et al.* 1995).

**Whole-cell respiration:** Measurements of whole-cell respiration were made using a Clark Electrode (Hansatech Instruments, King's Lynn, England) as described in DUBY and MATAGNE (1999). Rotenone dissolved in ethanol (15 mM) was used at a final concentration of 100  $\mu\text{M}$ . To determine the reduction of whole-cell respiration by rotenone, the inhibitory effect of 0.7% ethanol alone (~10%) was deduced.

**Enzyme activity analyses:** NADH:ubiquinone oxidoreductase activity (complex I) was assayed on membrane fractions by using duroquinone as an electron acceptor. Membranes were prepared as follows. Cells from 300-ml TAP cultures ( $2\text{--}3 \cdot 10^6$  cells/ml) were collected by centrifugation ( $700 \times g$  for 10 min). They were resuspended in 2 to 3 ml of MET buffer (280 mM mannitol, 100  $\mu\text{M}$  EDTA, 10 mM Tris-HCl pH 7, and 0.1% BSA) and then disrupted by sonication (two times for 30 sec; Vibra Cell Sonicator, Danbury, CT). The suspension was centrifugated at low speed (10 min at  $480 \times g$  followed by 4 min at  $3000 \times g$ ). The supernatant was then centrifugated at high speed ( $27,000 \times g$  for 15 min) and the final pellet containing membranes was suspended in 600  $\mu\text{l}$  of MET. A short pulse of ultrasounds (5 sec) was used to homogenize the suspension. A total of 100 to 200  $\mu\text{g}$  proteins of the membrane fraction were added to the assay buffer (20 mM Tris HCl pH 8.0, 100  $\mu\text{M}$  NADH, and 100  $\mu\text{M}$  duroquinone) in a final volume of 1 ml. Enzyme activity was monitored by recording NADH oxidation at 340 nm, using the extinction coefficient of  $6.22 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . Rotenone-sensitive NADH:ubiquinone oxidoreductase activity (complex I) was determined by adding rotenone (15 mM in ethanol) at a final concentration of 10  $\mu\text{M}$  in the mixture. In each case, the inhibitory effect of ethanol alone (~10%) was deduced. The specific activities were expressed in nanomoles NADH oxidized per minute per milligram per protein.

Succinate:cytochrome c oxidoreductase (complexes II + III) was assayed on membrane fractions prepared as above, except that MOPS buffer (280 mM mannitol, 10 mM MOPS-KOH pH 7.4, 0.1% BSA) was used instead of MET. The assay conditions were the following: 10 mM MOPS-KOH pH 7.4, 53  $\mu\text{M}$  ferricytochrome c, 20 mM succinate, 1 mM KCN, and 50–200  $\mu\text{g}$  proteins in a final volume of 1 ml. Enzyme activity was monitored by recording reduction of cytochrome c at 550 nm, using an extinction coefficient of  $19.6 \text{ mm}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ . The specific activity was expressed in nanomoles cytochrome c reduced per minute per milligram protein.

Cytochrome c oxidoreductase (complex IV) was assayed on membrane fractions prepared as for measurements of complexes II + III activity. The assay conditions (adapted from WISEMAN *et al.* 1977) were the following: 10 mM MOPS-KOH pH 7.4, 53  $\mu\text{M}$  ferrocytochrome c, 1% Triton, 20–50  $\mu\text{g}$  proteins in a final volume of 1 ml. Ferrocytochrome c was prepared according to FRITZ and BEEVERS (1955). Enzyme activity



TABLE 1  
Mutations affecting the mitochondrial genome

| Mitochondrial mutation <sup>a</sup> | Defective complex | Growth <sup>b</sup> |             |                 |                      |
|-------------------------------------|-------------------|---------------------|-------------|-----------------|----------------------|
|                                     |                   | TAP (darkness)      | TAP (light) | TAP + R (light) | TAP + AA + M (light) |
| Wild type (2)                       | —                 | +                   | +++++       | ++++            | +++                  |
| <i>dum15</i>                        | III               | —                   | ND          | ND              | ND                   |
| <i>dum19</i> (239)                  | IV                | —                   | +++         | ++              | +++                  |
| <i>dum20</i> (234)                  | I                 | +/-                 | ++          | ++              | +                    |
| <i>dum24</i> (283)                  | I, III            | —                   | +           | +               | +                    |
| 169                                 | ?                 | +/-                 | ++          | ++              | ++                   |
| 300                                 | ?                 | —                   | +           | +               | +                    |

<sup>a</sup> Strain designations are shown in parentheses.

<sup>b</sup> Growth was estimated from size of colonies produced on TAP agar medium after cultivation for 10 days in the dark or 5 days in the light. Some media were supplemented with 35  $\mu\text{M}$  rotenone (R) or with 1  $\mu\text{M}$  antimycin A (AA) and 7.5  $\mu\text{M}$  myxothiazol (M). ND, not determined.

was monitored by recording oxidation of cytochrome *c* at 550 nm, using an extinction coefficient of 19.6  $\text{mm}^{-1}\text{cm}^{-1}$ . Reaction was totally inhibited by 1 mM KCN. The specific activity was expressed in nanomoles cytochrome *c* oxidized per minute per milligram per protein.

Protein content was determined according to the method of BRADFORD (1976).

**Sequencing analyses:** *C. reinhardtii* total DNA was prepared according to the procedure of NEWMAN *et al.* (1990). Four segments of the *C. reinhardtii* mitochondrial genome (GenBank CRU03843: 1629–3301, 3236–5233, 6636–8593, and 10282–11283) containing *nd4*, *nd5*, *nd2-nd6*, and *nd1*, respectively, were amplified by PCR and fully sequenced on both strands. PCRs were performed according to standard protocol using a Taq DNA polymerase from QIAGEN (Hilden, Germany) in a thermocycler GeneAmp PCR System 9700 (PE Applied Biosystems, Foster City, CA). Amplified products were sent to GenomeExpress (Paris) for automated sequencing. Overlapping segments were assembled with the aid of the GCG software package (Genetics Computer Group, Madison, WI) and final consensus sequences were aligned with the MAP alignment tool freely available through the Internet (Human Genome Center, Baylor College of Medicine, Houston, TX).

## RESULTS

**Isolation and phenotypical analysis of mutants 169 and 300:** Mutants 169 and 300 were isolated after acriflavine treatment of wild-type (strain 2) and *dum19* (strain 239) cells, respectively. Their growth on TAP agar medium in darkness and in light was compared to the growth of wild-type and of previously characterized mutants (Table 1): *dum19*, which lacks cytochrome *c* oxidase (complex IV) activity; *dum20*, which lacks rotenone-sensitive NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) activity; and *dum24* deprived of complex I and complex III activities (see MATERIALS AND METHODS). Mutants 169 and *dum20* display the same phenotypes: both strains grow very slowly under heterotrophic conditions (darkness + acetate) and produce smaller colonies than wild-type and *dum19* cells in the light. Mutant 300

does not grow in the dark and grows slowly in the light, as does the *dum24* mutant.

The growth of the different mutants in the presence of rotenone, an inhibitor of complex I, and of myxothiazol + antimycin A, inhibitors of complex III, was also tested (Table 1). Both mutants 169 and *dum20* were insensitive to rotenone and sensitive to myxothiazol + antimycin A, whereas the reverse situation was found for *dum19*. This suggests that, like *dum20*, mutant 169 has a defect in complex I whereas its cytochrome pathway of respiration is still functional. Mutants 300 and *dum24* are both insensitive to the inhibitors. This is an indication that mutant 300, which lacks complex IV activity (due to the *dum19* mutation), is also deprived of complex I, as is *dum24*. The phenotypes of mutants 169 and 300 in the absence of inhibitors are similar to those of *dum20* and *dum24*, respectively, which reinforces these hypotheses.

**Whole-cell respiration and enzyme activity analyses:** Dark respiration of mutant cells from strains 169 and 300 grown under mixotrophic conditions (on TAP medium in the light) was measured with a Clark electrode. Cells from wild type, *dum19*, *dum20*, and *dum24* were used as controls (Table 2). The total respiratory rate of *dum20* and mutant 169 was about the same as the respiratory rate of *dum19* and represents about half the rate of the wild type. The total respiratory rate of mutant 300 was very low, similar to that of *dum24*. The sensitivity of respiration to rotenone was also checked. The addition of rotenone induced a reduction of 56 and 50% of the cell respiration of wild-type and *dum19* cells, respectively, whereas only a low effect was observed for *dum20*, *dum24*, and the two new mutant strains. This suggests again that mutants 169 and 300, like *dum20* and *dum24*, have lost the activity of complex I.

The NADH:ubiquinone oxidoreductase activity was measured using membrane fractions from wild-type and various mutant strains. The enzyme activity sensitive to

**TABLE 2**  
**Respiratory rates of wild-type and mutant strains**

| Strains <sup>a</sup> | Respiratory rates <sup>b</sup> |                            |
|----------------------|--------------------------------|----------------------------|
|                      | Total                          | After addition of rotenone |
| Wild type (2)        | 13.8 ± 4.0                     | 6.1 ± 1.4                  |
| <i>dum19</i> (239)   | 6.3 ± 1.5                      | 3.1 ± 0.5                  |
| <i>dum20</i> (234)   | 8.0 ± 2.0                      | 7.2 ± 1.8                  |
| <i>dum24</i> (283)   | 3.0 ± 0.5                      | 2.7 ± 0.3                  |
| 169                  | 6.6 ± 0.3                      | 6.1 ± 0.3                  |
| 300                  | 2.0 ± 0.3                      | 1.8 ± 0.2                  |

<sup>a</sup> Strain designations are shown in parentheses.

<sup>b</sup> The respiratory rates (nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> × 10<sup>-7</sup> cells) were determined from cells grown in the light on TAP agar medium. The values ±SD represent the mean values from two to four independent experiments.

rotenone represents the activity of complex I (Table 3). In wild-type and *dum19* extracts, the complex I activity was 15–17 nmol NADH oxidized min<sup>-1</sup> mg protein<sup>-1</sup> whereas it was null in *dum20*, *dum24*, 169, and 300 mutant strains.

The activities of complexes II + III and complex IV were also determined (Table 3). Except in *dum24*, the activity of complex II + III was not altered in the mutant strains and was even higher in 169 and 300 than in the other strains. As expected, cytochrome c oxidase (complex IV) activity was null in strains *dum19* and 300 and was not modified in the other mutant strains.

Taken together, these data indicate that mutants *dum20*, 169, and 300 all lack complex I activity and have a reduced respiratory rate, insensitive to rotenone. Strain 300 also lacks complex IV activity, as does mutant *dum19*, from which it derives.

**Genetical analysis:** All the respiratory-deficient mutants previously isolated in our laboratory have been induced by treatment with acriflavine or ethidium bromide. Most of the mutations induced by these mutagens

were shown to affect the mitochondrial genome (REMACLE and MATAGNE 1998). The distinction between nuclear mutations and mitochondrial mutations can be easily made by genetical analysis: the former are transmitted in a Mendelian fashion whereas the latter are transmitted uniparentally, the meiotic progeny inheriting almost exclusively the mitochondrial genome from the mating-type minus (*mt*<sup>-</sup>) parent.

In crosses between *dum20* and wild-type cells, the meiotic progeny inherited the phenotype of the *mt*<sup>-</sup> parent (Table 4), confirming that the mutation responsible for the Dk<sup>+/-</sup> phenotype (slow growth in the dark) affects the mitochondrial genome (REMACLE and MATAGNE 1998). In contrast, in the cross 169 *mt*<sup>-</sup> × WT *mt*<sup>+</sup>, the meiotic segregation was Mendelian. A Mendelian transmission was also observed when a Dk<sup>+/-</sup> *mt*<sup>+</sup> progeny clone (strain 163 isolated from previous cross 169 × WT) was crossed with WT *mt*<sup>-</sup> cells (Table 4). Thus, the mutation responsible for the Dk<sup>+/-</sup> phenotype of strains 169 and 163 affects a nuclear gene. It was called *dn26* (Dk<sup>+/-</sup> phenotype, nuclear origin).

Strain 300 *mt*<sup>-</sup>, Dk<sup>-</sup> (no growth in the dark) and insensitive to rotenone due to the inactivation of both complex IV and complex I (see here above), was crossed to wild-type *mt*<sup>+</sup> and gave rise to meiotic products, 97% of which were Dk<sup>-</sup> Rot<sup>f</sup>. In the reciprocal cross (301 × WT), all the meiotic progeny were Dk<sup>+</sup> Rot<sup>s</sup> (Table 4). These results indicate that strains 300 and 301 possess, in addition to *dum19*, another mitochondrial mutation (hereafter called *dum25*) that is responsible for the inactivation of complex I.

**Isolation of the mitochondrial *dum25* mutation:** It has been previously shown that the few “vegetative” zygotes that divide mitotically to produce a stable diploid progeny transmit the mitochondrial genomes from both *mt*<sup>+</sup> and *mt*<sup>-</sup> parents. In these zygotes and their diploid progeny, the mitochondrial genomes recombine at high rate to generate various types of mitochondrial DNA copies. The different mitochondrial DNA copies segregate during the successive mitotic divisions and, after 15–20 divi-

**TABLE 3**  
**Activities of respiratory complexes**

| Strains            | NADH:ubiquinone oxidoreductase activity |                |                   |                    |            |
|--------------------|---|----------------|-------------------|--------------------|------------|
|                    | Total (1)                               | + Rotenone (2) | Complex I (1)-(2) | Complexes II + III | Complex IV |
| Wild type (2)      | 30 ± 9                                  | 15 ± 2         | 15 ± 4            | 24 ± 6             | 256 ± 40   |
| <i>dum19</i> (239) | 32 ± 5                                  | 15 ± 3         | 17 ± 5            | 32 ± 4             | 0          |
| <i>dum20</i> (234) | 12 ± 3                                  | 12 ± 3         | 0                 | 34 ± 10            | 201 ± 22   |
| <i>dum24</i> (283) | 11 ± 3                                  | 11 ± 3         | 0                 | 0                  | 233 ± 26   |
| 169                | 17 ± 1                                  | 17 ± 1         | 0                 | 49 ± 3             | 220 ± 74   |
| 300                | 18 ± 6                                  | 18 ± 6         | 0                 | 64 ± 1             | 0          |

Rotenone-sensitive NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I), succinate:cytochrome c oxidoreductase (complexes II + III), and cytochrome c oxidase (complex IV) activities were measured in membrane-enriched fractions from wild-type, *dum19*, *dum20*, *dum24*, 169, and 300 mutant strains. Values represent specific activities ±SD from two to five independent experiments.

TABLE 4  
Meiotic segregations obtained in crosses between mutant and wild-type strains

| Crosses <sup>a</sup>   | Phenotype of the parental strains <sup>b</sup>                      | Segregation (%) <sup>b</sup>   |
|--|---|--|
| <i>dum20 mt</i> <sup>-</sup> (235) × WT <i>mt</i> <sup>+</sup> (1) | Dk <sup>+/-</sup> × Dk <sup>+</sup>                                 | 98.5 Dk <sup>+/-</sup> :1.5 Dk <sup>+</sup>                              |
| <i>dum20 mt</i> <sup>+</sup> (234) × WT <i>mt</i> <sup>-</sup> (2) | Dk <sup>+/-</sup> × Dk <sup>+</sup>                                 | 0 Dk <sup>+/-</sup> :100 Dk <sup>+</sup>                                 |
| 169 <i>mt</i> <sup>-</sup> × WT <i>mt</i> <sup>+</sup> (1)         | Dk <sup>+/-</sup> × Dk <sup>+</sup>                                 | 46 Dk <sup>+/-</sup> :54 Dk <sup>+</sup>                                 |
| 163 <i>mt</i> <sup>+</sup> × WT <i>mt</i> <sup>-</sup> (2)         | Dk <sup>+/-</sup> × Dk <sup>+</sup>                                 | 45 Dk <sup>+/-</sup> :55 Dk <sup>+</sup>                                 |
| 300 <i>mt</i> <sup>-</sup> × WT <i>mt</i> <sup>+</sup> (1)         | Dk <sup>-</sup> Rot <sup>t</sup> × Dk <sup>+</sup> Rot <sup>t</sup> | 97 Dk <sup>-</sup> Rot <sup>t</sup> :3 Dk <sup>+</sup> Rot <sup>t</sup>  |
| 301 <i>mt</i> <sup>+</sup> × WT <i>mt</i> <sup>-</sup> (2)         | Dk <sup>-</sup> Rot <sup>t</sup> × Dk <sup>+</sup> Rot <sup>t</sup> | 0 Dk <sup>-</sup> Rot <sup>t</sup> :100 Dk <sup>+</sup> Rot <sup>t</sup> |

One to two hundred meiotic products were analyzed in each cross to determine the meiotic segregation.

<sup>a</sup> Strain designations are shown in parentheses.

<sup>b</sup> Symbols used: Dk<sup>+</sup>, good growth in the dark; Dk<sup>+/-</sup>, slow growth in the dark; Dk<sup>-</sup>, no growth in the dark; Rot<sup>t</sup>, resistance to rotenone in the light; Rot<sup>s</sup>, sensitivity to rotenone in the light.

sions, most cells are homoplasmic for all the markers (BOYNTON *et al.* 1987; REMACLE *et al.* 1990; REMACLE and MATAGNE 1993).

To isolate a recombinant diploid strain carrying only the *dum25* mutation, an *arg7-8 dum19 dum25 mt*<sup>+</sup> haploid mutant (strain 303) was first constructed. Strain 303 was then crossed to *arg7-3 dum15 mt*<sup>-</sup> (246). The *dum15* mutation present in strain 246 affects the mitochondrial *cob* gene and determines the absence of complex III activity (COLIN *et al.* 1995; Table 1). The *arg7-8/arg7-3* diploid clones (phenotypically Arg<sup>+</sup>) resulting from the cross were selected on minimal (TMP) medium and after 10 days (when most of the cells are homoplasmic), the progeny cells were grown under heterotrophic (TAP, darkness) conditions. Individual colonies growing slowly in the dark and suspected to carry only the *dum25* mutation were tested for their sensitivity in the light to rotenone and to antimycin A + myxothiazol. Diploid clones insensitive to rotenone and sensitive to antimycin A + myxothiazol were selected. Measurements of complex I, complexes II + III, and complex IV activities confirmed that these clones were recombinant, bearing only a defect in complex I (data not shown). Two *arg7-8* haploid clones (212 *mt*<sup>+</sup> and 213 *mt*<sup>-</sup>), growing slowly in the dark, were then selected from a cross between one diploid clone (phenotypically *mt*<sup>-</sup>) and the wild-type *mt*<sup>+</sup> haploid strain. They showed no complex I activity and a whole-cell respiration of 5.5 nmol O<sub>2</sub> min<sup>-1</sup> × 10<sup>-7</sup> cells (close to the values found for strains 169 and *dum20*; Table 2), nearly insensitive to rotenone. The haploid character of these two clones (data not shown) was confirmed by determining the number of nucleoids in the chloroplast by 4'6-diamidino-2-phenylindole staining (MATAGNE *et al.* 1991).

**Genetic mapping of the *dum25* mutation site on the mitochondrial genome:** Vegetative zygotes produced from crosses between different Dk<sup>-</sup> mitochondrial mutants segregate Dk<sup>+</sup> wild-type recombinant cells whose proportion depends on the distance separating the mitochondrial markers. For example, the *dum18* and *dum19* mutations, which are separated by ≈20 bp, re-

combine at a rate of 0.04% whereas the percentage of recombination between *dum15* and *dum18* or *dum19*, which are 4.2 kb apart, is 13.7% (Figure 1). The *dum20* mitochondrial mutation, which determines the inactivation of complex I and must thus affect one of the *nd* genes encoding subunits of complex I, had been located at the right side of *cox1* on the genetic map of the mitochondrial genome (REMACLE *et al.* 1995; REMACLE and MATAGNE 1998).

To determine the position of the *dum25* mutation site on the genetic map, the *arg7-8 dum25 mt*<sup>+</sup> mutant (strain 212) isolated above was crossed to three different mitochondrial mutants carrying a complementary arginine-auxotrophic marker (Table 5). A cross between *dum19* and *dum20* was also performed as a control. The percentages of Dk<sup>+</sup> recombinants were determined when most diploid cells had become homoplasmic. The low percentage of recombination between *dum20* and *dum25* indicates that the two mutations are closely linked and thus probably affect the same gene. Moreover, despite a certain variability found in the recombination experiments, it can be deduced that *dum20* and *dum25* are more distant from *dum15* (mutation in *cob*) than from *dum19* (mutation in *cox1*) and are thus located at the right side of *cox1* on the genetic map. It should, however, be noted that for an unknown reason, the recombination rate obtained in cross 247 × 206 (Table 5) is higher (14–17.5%) than that previously found for the same mutations (2–7%; REMACLE *et al.* 1995).

From the data of Table 5 and those obtained previously (REMACLE *et al.* 1995), the genetic map presented in Figure 1 can be drawn. Considering the high recombination rates found in crosses between *dum19*, on one hand, and *dum20* or *dum25*, on the other hand (212 × 248 and 247 × 206), it can be postulated that both *dum20* and *dum25* mutations affect the *nd1* gene.

**Molecular characterization of *dum20* and *dum25* mutations and relationship between the physical map and the genetic map:** To identify the *dum20* and *dum25* mutations at the molecular level, the *nd1*, *nd2*, and *nd6* genes

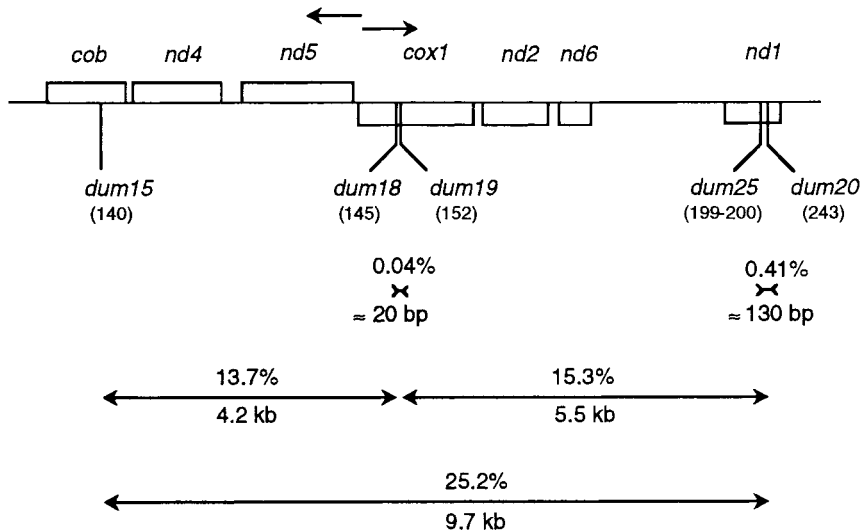


FIGURE 1.—Physical map of the 15.8-kb linear mitochondrial genome of *C. reinhardtii*. The positions of the genes encoding subunits of respiratory complexes are indicated: *cob*, cytochrome b (component of complex III); *cox1*, subunit 1 of cytochrome c oxidase or complex IV; *nd1*, *nd2*, *nd4*, *nd5*, and *nd6*, subunits 1, 2, 4, 5, and 6 of complex I. Arrows indicate the directions of transcription. The positions (mutated codons in parentheses) of *dum15*, *dum18*, *dum19*, *dum20*, and *dum25* mutations in *cob*, *cox1*, and *nd1* genes, as well as the physical distances (base pairs or kilobase) between the different mutation sites and the recombination frequencies (percentages), are indicated (from REMACLE *et al.* 1995; and data from Table 5 and Figure 2).

from wild type (strain 2), *dum20* (strain 234), and *dum19* *dum25* (strain 300) were amplified by PCR and sequenced. The *nd4* and *nd5* sequences from strains 2 and 300 and the *nd4* sequence from strain 234 were also determined.

A single frameshift mutation, corresponding to the deletion of one T at codon 243 of *nd1*, was found in strain 234 (Figure 2). The same deletion was present in two other *dum20* isolates derived from crosses (data not shown). No other difference was found between the *nd1*, *nd2*, and *nd6* sequences from strains 2 and 234.

In the case of strain 300, the mutation was a deletion of six contiguous base pairs of the *nd1* sequence. The deletion occurred in a segment with short repeated motifs, GAG GCT GAG GCT GAG, corresponding to codons 199–203 (Figure 2). The same deletion was found in the diploid clone and in the two haploid strains 212 and 213 carrying only the *dum25* mutation (see above). No deletion was found in the *nd1* sequence from *dum19* (strain 239), which was used to generate the mutated strain 300 (Figure 2). The consequence of the *dum25* mutation is the loss of two amino acid residues (Glu-Ala or Ala-Glu) in a highly conserved polar segment separating helices E and F (Figure 3).

In the course of sequencing the five *nd* genes from wild-type and mutant strains, a few differences were found compared to the “standard” *C. reinhardtii* mitochondrial genome (GenBank accession no. U03843). Surprisingly, the 6-bp deletion corresponding to the *dum25* mutation is also present in the *nd1* sequence published by BOER and GRAY (1988). Since the *nd1* sequence from wild type (strain 2), *dum19* (strain 239), and *dum20* (strain 234; Figure 2) but also from two other strains (strains 25 and *cc-277*, *cw15* and *cw15-2*, respectively; data not shown) did not have the deletion, it is possible that the *nd1* sequence published by Boer and Gray corresponds to a mutant sequence or that it contains errors. U. KÜCK (personal communication) also found in a wild-type strain the *nd1* sequence identical to our wild-type sequence. An additional argument in favor of our conclusion is the conservation of the motif E(A/G)E(A/S)ELV in all ND1 protein sequences examined (Figure 3). The same EAEAEELV conserved amino acid sequence, interrupted by an intron, can also be found in the ND1 sequence from *Chlamydomonas eugametos* (GenBank accession no. AF008237).

Another difference with the sequence from BOER and GRAY (1988) is observed at codon 193, changing GAC

TABLE 5  
Frequencies of Dk<sup>+</sup> recombinant diploid cells obtained in four different crosses

| Crosses <sup>a</sup>  | % Dk <sup>+</sup> recombinant cells <sup>b</sup> |              |
|---|--|--------------|
|   | Experiment 1                                     | Experiment 2 |
| <i>arg7-8 dum25 mt</i> <sup>+</sup> (212) × <i>arg7-3 dum15 mt</i> <sup>-</sup> (246) | 28.8   | 21.6         |
| <i>arg7-8 dum25 mt</i> <sup>+</sup> (212) × <i>arg7-7 dum19 mt</i> <sup>-</sup> (248) | 11.9   | 17.7         |
| <i>arg7-8 dum25 mt</i> <sup>+</sup> (212) × <i>arg7 dum20 mt</i> <sup>-</sup> (206)   | 0.25   | 0.57         |
| <i>arg7-7 dum19 mt</i> <sup>+</sup> (247) × <i>arg7 dum20 mt</i> <sup>-</sup> (206)   | 14.0   | 17.5         |

<sup>a</sup> Strain designations are shown in parentheses.

<sup>b</sup> The percentages of Dk<sup>+</sup> recombinant cells were determined when the homoplasmic state had been reached in most of the diploid clones. The values obtained in two independent experiments are presented.



|                          |   |      |                      |
|--------------------------|---|------|----------------------|
| WT (2)                   | CTACCAGAGGCTGAGGCTGAGTTGGTTGCTGGTTATAAC | —//— | TACTTCTGGGTGGCTTCAGC |
| <i>dum19</i> (239)       | <u>L P E A E A E L V A G Y N</u>        |      | Y F L G G F S        |
| <i>dum20</i> (234)       | CTACCAGAGGCTGAGGCTGAGTTGGTTGCTGGTTATAAC | —//— | TACTTCTGGGTGGCTCAGC  |
|                          | <u>L P E A E A E L V A G Y N</u>        |      | Y F L G G S A        |
| <i>dum19 dum25</i> (300) | CTACCA-----GAGGCTGAGTTGGTTGCTGGTTATAAC  | —//— | TACTTCTGGGTGGCTTCAGC |
|                          | <u>L P E A E A E L V A G Y N</u>        |      | Y F L G G F S        |
| <i>dum25</i> (212)       | CTACCA-----GAGGCTGAGTTGGTTGCTGGTTATAAC  | —//— | TACTTCTGGGTGGCTTCAGC |
|                          | <u>L P E A E A E L V A G Y N</u>        |      | Y F L G G F S        |
|                          | 197                                     |      | 244                  |

FIGURE 2.—Mutations detected in the *nd1* sequence from *dum20*, *dum19 dum25*, and *dum25* mutant strains (controls: WT and *dum19*). Numbers below the sequence refer to codons. The deletions are underlined. In the case of *dum25*, the position of the 6-bp deletion is arbitrary since the deletion can affect codons 199 to 203.

(D) into GTA (V) (Figure 3). As a valine is present in all strains we sequenced and also in *Chlorogonium elongatum*, we assume that our sequence is probably the correct one.

The molecular characterization of *dum20* and *dum25* allows us to position the two mutations on the physical map and thus to re-examine the relationship between the frequencies of recombination relative to the distances separating the mutation sites on the mitochondrial genome (Figure 1). From the data presented in Figure 1, one can conclude that there is a good correlation between the physical distances, ranging from a few base pairs to ~10 kb, and the genetic distances corresponding to the recombination rates. Our data show that the recombination rate is ~3%/kb in the present case.

## DISCUSSION

Two mutations, *dn26* and *dum25*, both leading to the inactivation of complex I, have been isolated after mutagenic treatment with acriflavine. The two mutant strains have the same phenotype as *dum20*, a mitochondrial mutant previously shown to lack complex I activity but not further characterized (REMACLE and MATAGNE 1998). The inactivation of complex I determines a strong reduction of cell growth in darkness but also affects the growth rate under mixotrophic conditions

(light + acetate). The three complex I-deficient mutants are clearly distinguished from mutants inactivated in complex III or complex IV by their capacity to grow slowly in the dark. The use of inhibitors of complex I (rotenone) or complex III (antimycin A and myxothiazol) in growth tests and in measurements of whole-cell respiration also allowed the discrimination between complex I- and complex III- or complex IV-deficient mutants (Tables 1 and 2).

The absence of complex I activity determines a substantial reduction in the respiratory rate of the mutant cells. The oxidation of NADH produced in the tricarboxylic cycle probably must occur through the activity of a nonproton pumping NAD(P)H-dehydrogenase. Such an enzyme bound to the inner membrane has been identified in mitochondria from higher plants (SIEDOW 1995; SOOLE and MENZ 1995) and is also present in mitochondria from *Chlamydomonas* (ATTEIA 1994; REMACLE and MATAGNE 1998). The drastic reduction of heterotrophic growth displayed by complex I mutant cells points out the importance of the phosphorylating enzyme in the respiratory metabolism.

A sequencing analysis allowed the characterization of the two mitochondrial mutations, *dum20* and *dum25*, at the molecular level. The *dum20* mutation corresponds to a deletion of one T in a context where several base pairs are repeated whereas *dum25* corresponds to the deletion of six contiguous base pairs in a short segment

|                       | E  | F |     |
|-----------------------|--|---|-----|
| <i>R. capsulatus</i>  | WYWLPHLQMVALLFFISALAEINRPPFDLPEAESELVAGFMVVEYSSSTPYLLFMAGEYIAVWLMCALTSVLPFGGWL |   | 267 |
| <i>N. crassa</i>      | LFVLPLLRIFIIFFIGSIAETINRAPFDLAEAESELVSGFMTEHAAVVPVFFFLAEYGSIVLMCILTSILPLGGYL   |   | 256 |
| <i>H. sapiens</i>     | WLLPSWFLAMWPISTLAETINRTPFDLAEAESELVSGFNIEYAAAGPPALFPMAEYINIIMNTLTTTFLGTTY      |   | 247 |
| <i>T. aestivum</i>    | WFGIPLFQVLMVFFISCLAETINRAPFDLPEAESELVAGYNVEYSSMGFALFPLGEYANMILMSSLCTLLPLGGWL   |   | 252 |
| <i>M. polymorpha</i>  | WFVPLFQVFLMFFISCLAETINRAPFDLPEAESELVAGYNVEYSSMGFALFPLGEYANMILMSSLCTLLPLGGWL    |   | 255 |
| <i>C. elongatum</i>   | NISFALLRLFFIFLVCILAETIKRVPPFDLPEAESELVAGYNVEYSSSLGFALFFIGEYASMAVMSILASVYPLGGFS |   | 244 |
| <i>C. reinhardtii</i> | TPQYALMRLCLIFLVCILAETIKRVPPFDLPEAESELVAGYNVEYSSSLGFALFFIAEYANMAVMSAIASIYPLGGFS |   | 244 |

FIGURE 3.—Partial alignment of ND1 amino acid sequences from *R. capsulatus* (AAC24997), *N. crassa* (P08774), *Homo sapiens* (P03886), *Triticum aestivum* (Q01148), *Marchantia polymorpha* (P26845), *C. elongatum* (CAA73993), and *C. reinhardtii*. Solid lines above the sequences mark the positions of hydrophobic segments E and F (FEARNLEY and WALKER 1992). Conserved amino acid residues are shown by a shaded background. The positions of the mutations in the *C. reinhardtii* ND1 sequence are underlined. The asterisk shows the valine residue found at position 193 of the *C. reinhardtii* ND1 protein.

containing two different repeated motifs (Figure 2). It is interesting to note that two other mutations previously characterized (*dum18* and *dum19*) correspond to the deletion or the addition of one T in a run of three or four T (COLIN *et al.* 1995). Because all these mutations were induced by treatment with acriflavine, it is likely that they result from replication errors favored by distortion of the double helix structure when the intercalating dye is bound to DNA.

Both the *dum20* and *dum25* mutations affect the *nd1* gene, which points out the essential role of the ND1 subunit in the activity of complex I. As mentioned in the Introduction, ND1 binds rotenone and has been proposed to carry the ubiquinone-binding domain(s). To our knowledge, very few mutations affecting only *nd1* have been described. In humans, the ND1/3460 mutation changes an alanine to threonine in a highly conserved region of the subunit and causes Leber's hereditary optic neuropathy (HUOPONEN *et al.* 1991). The mutation provokes a marked decrease in the specific activity of complex I (MAJANDER *et al.* 1991; CARELLI *et al.* 1997). In *Rhodobacter capsulatus*, disruption of the gene equivalent to *nd1* totally suppresses the activity of complex I (DUPUIS *et al.* 1998b). In the complex CMSII mitochondrial mutant of *N. sylvestris*, the absence of ND1 and ND7 and the important reduction of other complex I subunits lead to the quasi-loss of complex I activity (GUTIERRES *et al.* 1997, 1999).

The *nd1* gene of *C. reinhardtii* encodes a polypeptide of 294 amino acids (taking into account the two additional codons in comparison to the sequence published by BOER and GRAY 1988) and is homologous to other ND1 subunits, as judged by similarities in primary sequence and hydrophathy (BOER and GRAY 1988). The ND1 proteins contain eight defined hydrophobic stretches corresponding to transmembrane helices (FEARNLEY and WALKER 1992; KURKI *et al.* 2000). The deletion of one T corresponding to *dum20* mutation occurs at codon 243, just after helix F of the protein (Figure 3). It changes the reading frame downstream of the mutation site and induces a stop signal at codon 273 of the *nd1* sequence. This region of the protein must thus be essential for enzyme activity since its modification inactivates complex I.

The deletion of 6 bp corresponding to the *dum25* mutation occurs in a very conserved segment located between helices E and F, at the matrix side of the inner membrane (Figure 3). As pointed out by FEARNLEY and WALKER (1992), the two best conserved regions of ND1 are in polar segments linking hydrophobic spans A and B, and E and F, respectively. The *dum25* deletion occurs in a short segment that contains repeated motifs and transforms the amino acid EAEALV into EAELV, without changing the reading frame (Figure 3). The sequence E(A/G)E(A/S)ELV is invariant in all sequences examined so far. Interestingly, the three-glutamate cluster bears some resemblance to the dicyclohexylcarbodi-

imide (DCCD)-binding sequence of the c subunit of ATPase F<sub>0</sub> (HASSINEN and VUOKILA 1993). DCCD, an inhibitor of the mitochondrial proton pumping complexes, binds notably to the ND1 subunit (YAGI and HATEFI 1988) and competes for the same site as piericidin A (HASSINEN and VUOKILA 1993). This complex I inhibitor was shown to bind to a domain that overlaps the rotenone-binding site (OKUN *et al.* 1999). Moreover, it has been recently proposed that many of the inhibitors of complex I share a common wide binding domain located between the two ubiquinone reaction centers (TORMO and ESTORNELL 2000). On the other hand, site-specific mutagenesis in a bacterial homologue of ND1 suggests that residues located close to helices E and F on the cytoplasmic side of the membrane (the matrix side in mitochondria) are intimately involved in ubiquinone binding and reduction (KURKI *et al.* 2000). It is thus tempting to propose that the amino acid residues modified by the *dum25* mutation play a major role in the binding and reduction of ubiquinone.

The recombination analysis involving the *dum20* and *dum25* mutations has allowed the completion of the genetic map of the mitochondrial genome from *C. reinhardtii*. Until now, only mutations affecting the mitochondrial genes *cob* and *cox1* had been characterized at the molecular level and used in parallel for a recombinational analysis (REMACLE *et al.* 1995). The results obtained in that work led to the conclusion that the frequency of recombination was 3.2% ( $\pm 0.7\%$ )/kb. The present data extend the genetic map to a third gene (*nd1*) and confirm that the recombination rate per kilobase is close to 3%. Moreover, it shows that the recombination frequency found for a distance of  $\sim 10$  kb (*i.e.*, the distance separating *dum15* from *dum20* or *dum25*) is higher than the frequencies found for distances of  $\sim 5$  kb (Figure 1). This means that the recombinational analysis can be extended to mutation sites separated by distances as high as 10 kb (which corresponds to two-thirds of the genome) and thus constitutes a powerful tool to position any mutation on the algal mitochondrial genome. In this respect, *Chlamydomonas* constitutes a unique model system since, in *Saccharomyces cerevisiae*, the maximum recombinational rate (20–25%) is reached for a distance of only 1.5 kb (DUJON 1981), which represents a very small part of the yeast mitochondrial genome.

We thank J. Vaassen for technical assistance and M. Dejean for manuscript preparation. This research was supported by grants from the Belgian Fonds National de la Recherche Scientifique (1.5.211.99 and 2.4552.01). D.B. and P.C. are Research Fellows and C.R. is a Research Associate from FNRS.

#### LITERATURE CITED

- ALVES, P. C., and A. VIDEIRA, 1998 The membrane domain of complex I is not assembled in the stopper mutant E 35 of *Neurospora*. *Biochem. Cell Biol.* **76**: 139–143.
- ATTEIA, A., 1994 Identification of mitochondrial respiratory pro-

- teins from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. C.R. Acad. Sci. Paris **317**: 11–19.
- BAI, Y., and G. ATTARDI, 1998 The mtDNA-encoded ND6 subunit of mitochondrial NADH dehydrogenase is essential for the assembly of the membrane arm and the respiratory function of the enzyme. EMBO J. **17**: 4848–4858.
- BOER, P. H., and M. W. GRAY, 1988 Genes encoding a subunit of respiratory NADH dehydrogenase (ND1) and a reverse transcriptase-like protein (RTL) are linked to ribosomal RNA gene pieces in *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondrial DNA. EMBO J. **7**: 3501–3508.
- BOYNTON, J. E., E. H. HARRIS, B. D. BURKHART, P. M. LAMERSON and N. W. GILLHAM, 1987 Transmission of mitochondrial and chloroplast genomes in crosses of *Chlamydomonas*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **84**: 2392–2395.
- BRADFORD, M. M., 1976 A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. **72**: 248–254.
- CARELLI, V., A. GHELLI, M. RATTA, E. BACCHILEGA, S. SANGIORGI *et al.*, 1997 Leber's hereditary optic neuropathy: biochemical effect of 11778/ND4 and 3460/ND1 mutations and correlation with mitochondrial genotype. Neurology **48**: 1623–1632.
- COLIN, M., M.-P. DORTHU, F. DUBY, C. REMACLE, M. DINANT *et al.*, 1995 Mutations affecting the mitochondrial genes encoding the cytochrome oxidase subunit I and the apocytochrome *b* of *Chlamydomonas reinhardtii*. Mol. Gen. Genet. **249**: 179–184.
- DORTHU, M.-P., S. REMY, M.-R. MICHEL-WOLWERTZ, L. COLLEAUX, D. BREYER *et al.*, 1992 Biochemical, genetic and molecular characterization of new respiratory-deficient mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. Plant Mol. Biol. **18**: 759–772.
- DUBY, F., and R. F. MATAGNE, 1999 Alteration of dark respiration and reduction of phototrophic growth in a mitochondrial DNA deletion mutant of *Chlamydomonas* lacking *cob*, *nd4*, and the 3' end of *nd5*. Plant Cell **11**: 115–125.
- DUJON, B., 1981 Mitochondrial genetics and functions, pp. 504–635 in *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance*, edited by J. N. STRATHERN, E. W. JONES and J. R. BROACH. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY.
- DUPUIS, A., M. CHEVALLET, E. DARROUZET, H. DUBORJAL, J. LUNARDI *et al.*, 1998a The complex I from *Rhodobacter capsulatus*. Biochim. Biophys. Acta **1364**: 147–165.
- DUPUIS, A., E. DARROUZET, H. DUBORJAL, B. PIERRARD, M. CHEVALLET *et al.*, 1998b Distal genes of the *nuo* operon of *Rhodobacter capsulatus* equivalent to the mitochondrial ND subunits are essential for the biogenesis of the respiratory NADH-ubiquinone reductase. Mol. Microbiol. **28**: 531–541.
- EARLEY, F. G. P., S. D. PATEL, C. I. RAGAN and G. ATTARDI, 1987 Photolabeling of a mitochondrially encoded subunit of NADH dehydrogenase with [<sup>3</sup>H]dihydroxyacetone. FEBS Lett. **219**: 108–113.
- FEARNLEY, I. A., and J. E. WALKER, 1992 Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins. Biochim. Biophys. Acta **1140**: 105–134.
- FRIEDRICH, T., 1998 The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. Biochim. Biophys. Acta **1364**: 134–146.
- FRITZ, G., and H. BEEVERS, 1955 Cytochrome oxidase content and respiratory rates of etiolated wheat and barley seedlings. Plant Physiol. **30**: 309–317.
- GUÉNEBAUT, V., R. VINCENTELLI, D. MILLS, H. WEISS and K. R. LEONARD, 1997 Three-dimensional structure of NADH-dehydrogenase from *Neurospora crassa* by electron microscopy and conical tilt reconstruction. J. Mol. Biol. **265**: 409–418.
- GUTIERRES, S., M. SABAR, C. LELANDAIS, P. CHÉTRIT, P. DIOLEZ *et al.*, 1997 Lack of mitochondrial and nuclear-encoded subunits of complex I and alteration of the respiratory chain in *Nicotiana sylvestris* mitochondrial deletion mutants. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **94**: 3436–3441.
- GUTIERRES, S., B. COMBETTES, R. DE PAEPE, M. MIRANDE, C. LELANDAIS *et al.*, 1999 In the *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant, a recombination-mediated change 5' to the first exon of the mitochondrial *nad1* gene is associated with lack of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) NAD1 subunit. Eur. J. Biochem. **261**: 361–370.
- HARRIS, E. H., 1989 *The Chlamydomonas Sourcebook*. Academic Press, San Diego, Eo.
- HASSINEN, I. E., and P. T. VUOKILA, 1993 Reaction of dicyclohexylcarbodiimide with mitochondrial proteins. Biochim. Biophys. Acta **1144**: 107–124.
- HOFHAUS, G., and G. ATTARDI, 1993 Lack of assembly of mitochondrial DNA-encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase and loss of enzyme activity in a human cell mutant lacking the mitochondrial *ND4* gene. EMBO J. **12**: 3043–3048.
- HOFHAUS, G., and G. ATTARDI, 1995 Efficient selection and characterization of mutants of a human cell line which are defective in mitochondrial DNA-encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase. Mol. Cell. Biol. **15**: 964–974.
- HOFHAUS, G., H. WEISS and K. LEONARD, 1991 Electron microscopic analysis of the peripheral parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I). J. Mol. Biol. **221**: 1027–1043.
- HUOPONEN, K., J. VILKKI, P. AULA, E. K. NIKOSKELAINEN and M.-L. SAVONTAUS, 1991 A new mtDNA mutation associated with Leber hereditary optic neuroretinopathy. Am. J. Hum. Genet. **48**: 1147–1153.
- KURKI, S., V. ZICKERMANN, M. KERVINEN, I. HASSINEN and M. FINEL, 2000 Mutagenesis of three conserved Glu residues in a bacterial homologue of the ND1 subunit of complex I affects ubiquinone reduction kinetics but not inhibition by dicyclohexylcarbodiimide. Biochemistry **39**: 13496–13502.
- MAJANDER, A., K. HUOPONEN, M.-L. SAVONTAUS, E. NIKOSKELAINEN and M. WIKSTRÖM, 1991 Electron transfer properties of NADH:ubiquinone reductase in the ND1/3460 and ND4/11778 mutations of the Leber hereditary optic neuroretinopathy. FEBS Lett. **292**: 289–292.
- MARIENFELD, J. R., and K. J. NEWTON, 1994 The maize NCS2 abnormal growth mutant has a chimeric *nad4-nad7* mitochondrial gene and is associated with reduced complex I function. Genetics **138**: 855–863.
- MATAGNE, R. F., 1978 Fine structure of the *arg-7* cistron in *Chlamydomonas reinhardtii*. Complementation between *arg-7* mutants defective in argininosuccinate lyase. Mol. Gen. Genet. **160**: 95–99.
- MATAGNE, R. F., M.-R. MICHEL-WOLWERTZ, C. MUNAUT, C. DUYCKAERTS and F. SLUSE, 1989 Induction and characterization of mitochondrial DNA mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. J. Cell Biol. **108**: 1221–1226.
- MATAGNE, R. F., C. REMACLE and M. DINANT, 1991 Cytoduction in *Chlamydomonas reinhardtii*. Proc. Natl. Acad. Sci. USA **88**: 7447–7450.
- NEWMAN, S. M., J. E. BOYNTON, N. W. GILLHAM, B. L. RANDOLPH-ANDERSON, A. M. JOHNSON *et al.*, 1990 Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: molecular and genetic characterization of integration events. Genetics **126**: 875–888.
- OKUN, J. G., P. LÜMMEN and U. BRANDT, 1999 Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase). J. Biol. Chem. **274**: 2625–2630.
- PLA, M., C. MATHIEU, R. D. PAEPE, P. CHÉTRIT and F. VEDEL, 1995 Deletion of the last two exons of the mitochondrial *nad7* gene results in lack of the NAD7 polypeptide in *Nicotiana sylvestris* CMS mutant. Mol. Gen. Genet. **248**: 79–88.
- RANDOLPH-ANDERSON, B. L., J. E. BOYNTON, N. W. GILLHAM, E. H. HARRIS, A. M. JOHNSON *et al.*, 1993 Further characterization of the respiratory deficient *dum-1* mutation of *Chlamydomonas reinhardtii* and its use as a recipient for mitochondrial transformation. Mol. Gen. Genet. **236**: 235–244.
- RASMUSSEN, A. G., V. HEISER, E. ZABAETA, A. BRENNICKE and L. GROHMANN, 1998 Physiological, biochemical and molecular aspects of mitochondrial complex I in plants. Biochim. Biophys. Acta **1364**: 101–111.
- REMACLE, C., and R. F. MATAGNE, 1993 Transmission, recombination and conversion of mitochondrial markers in relation to the mobility of a group I intron in *Chlamydomonas*. Curr. Genet. **23**: 518–525.
- REMACLE, C., and R. F. MATAGNE, 1998 Mitochondrial genetics, pp. 661–674 in *Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas*, edited by J. D. ROCHAIX, M. GOLDSCHMIDT-CLERMONT and S. MERCHANT. Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- REMACLE, C., C. BOVIE, M.-R. MICHEL-WOLWERTZ, R. LOPPE and

- R. F. MATAGNE, 1990 Mitochondrial genome transmission in *Chlamydomonas* diploids obtained by sexual crosses or artificial fusions: role of the mating-type and of a one kb intron. *Mol. Gen. Genet.* **223**: 180–184.
- REMACLE, C., M. COLIN and R. F. MATAGNE, 1995 Genetic mapping of mitochondrial markers by recombinational analysis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.* **249**: 185–190.
- SHAPIRA, A. H. V., 1998 Human complex I defects in neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**: 261–270.
- SIEDOW, J. N., 1995 Bioenergetics: the mitochondrial electron transport chain, pp. 281–312 in *The Molecular Biology of Plant Mitochondria*, edited by C. S. LEVINGS and I. K. VASIL. Kluwer Academic Press, Dordrecht, The Netherlands.
- SOOLE, K. L., and R. I. MENZ, 1995 Functional molecular aspects of the NADH dehydrogenase of plant mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**: 397–406.
- TORMO, J. R., and E. ESTORNELL, 2000 New evidence for the multiplicity of ubiquinone- and inhibitor-binding sites in the mitochondrial complex I. *Arch. Biochem. Biophys.* **381**: 241–246.
- VAHRENHOLZ, C., G. RIEMEN, E. PRATJE, B. DUJON and G. MICHAELIS, 1993 Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication. *Curr. Genet.* **24**: 241–247.
- WALKER, J. E., 1992 The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Q. Rev. Biophys.* **25**: 253–324.
- WEISS, H., T. FRIEDRICH, G. HOFHAUS and D. PREIS, 1991 The respiratory chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **197**: 563–567.
- WISEMAN, A., N. W. GILLHAM and J. E. BOYNTON, 1977 Nuclear mutations affecting mitochondrial structure and function in *Chlamydomonas*. *J. Cell Biol.* **73**: 56–77.
- YAGI, T., and Y. HATEFI, 1988 Identification of the dicyclohexylcarbodiimide-binding subunit of NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *J. Biol. Chem.* **263**: 16150–16155.
- YAGI, T., T. YANO, S. DI BERNARDO and A. MATSUNO-YAGI, 1998 Prokaryotic complex I (NDH-1), an overview. *Biochim. Biophys. Acta* **1364**: 125–133.
- YAMATO, K. T., and K. J. NEWTON, 1999 Heteroplasmy and homoplasmy for maize mitochondrial mutants: a rare homoplasmic *nd4* deletion mutant plant. *J. Heredity* **90**: 369–373.

Communicating editor: K. J. NEWTON



**Publication 3. Cardol P., Matagne RF., Remacle C. (2002) Impact of mutations affecting ND mitochondria-encoded subunits on the activity and assembly of complex I in Chlamydomonas. Implication for the structural organization of the enzyme. *J. Mol. Biol.* 319(5):1211-21.**

# Impact of Mutations Affecting ND Mitochondria-encoded Subunits on the Activity and Assembly of Complex I in *Chlamydomonas*. Implication for the Structural Organization of the Enzyme

Pierre Cardol, René F. Matagne and Claire Remacle\*

Genetics of Microorganisms  
Department of Life Sciences  
B22, University of Liège  
B-4000 Liège, Belgium

The mitochondrial rotenone-sensitive NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) comprises more than 35 subunits, the majority of which are encoded by the nucleus. In *Chlamydomonas reinhardtii*, only five components (ND1, ND2, ND4, ND5 and ND6) are coded for by the mitochondrial genome. Here, we characterize two mitochondrial mutants (*dum5* and *dum17*) showing strong reduction or inactivation of complex I activity: *dum5* is a 1T deletion in the 3' UTR of *nd5* whereas *dum17* is a 1T deletion in the coding sequence of *nd6*. The impact of these mutations and of mutations affecting *nd1*, *nd4* and *nd4/nd5* genes on the assembly of complex I is investigated. After separation of the respiratory complexes by blue native (BN)-PAGE or sucrose gradient centrifugation, we demonstrate that the absence of intact ND1 or ND6 subunit prevents the assembly of the 850 kDa whole complex, whereas the loss of ND4 or ND4/ND5 leads to the formation of a subcomplex of 650 kDa present in reduced amount. The implications of our findings for the possible role of these ND subunits on the activity of complex I and for the structural organization of the membrane arm of the enzyme are discussed. In mitochondria from all the strains analyzed, we moreover detected a 160–210 kDa fragment comprising the hydrophilic 49 kDa and 76 kDa subunits of the complex I peripheral arm and showing NADH dehydrogenase activity.

© 2002 Elsevier Science Ltd. All rights reserved

\*Corresponding author

**Keywords:** complex I assembly; *Chlamydomonas* mitochondrial mutants; ND subunits; NADH dehydrogenase; NADH:ubiquinone oxidoreductase

## Introduction

The rotenone-sensitive NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I, EC 1.6.5.3) is the largest and least understood complex of the mitochondrial respiratory chain. This amphipathic enzyme located in the inner membrane of the organelle is composed of at least 35 subunits of dual genetic origin: seven subunits (the ND subunits) are usually encoded by the mitochondrial DNA, whereas the remainder are nuclear gene products. Only a few subunits of complex I have been shown to be involved in catalytic function.<sup>1,2</sup>

Low-resolution structures based on electron microscopic analysis of the *Neurospora crassa* and

the bovine enzymes have shown that complex I holoenzyme has an L-shaped assembly: a membrane-embedded arm that contains all the hydrophobic ND subunits and a peripheral arm extending into the mitochondrial matrix.<sup>3</sup> The matrix arm containing the NADH-binding site and the prosthetic groups contributes to the NADH dehydrogenase segment of the electron pathway.<sup>4</sup> The membrane arm contains the ubiquinone reductase and proton translocation machinery with a ubiquinone-binding center sensitive to rotenone. The disruption of the purified bovine complex I (~900 kDa) by a mild detergent has allowed the isolation of three subcomplexes: I $\alpha$ , made of ~21 mostly hydrophilic subunits and corresponding to the peripheral arm (55% of the whole complex); I $\beta$  and I $\gamma$ , both belonging to the membrane arm. The I $\beta$  fragment, which represents ~33% of the entire complex, contains the ND4 and

Abbreviation used: NBT, nitro blue tetrazolium.  
E-mail address of the corresponding author:  
[c.remacle@ulg.ac.be](mailto:c.remacle@ulg.ac.be)

**Table 1.** Growth phenotypes and respiratory rates of wild-type and mutant strains

| Mitochondrial mutations | Relative growth |       |           |                | Respiratory rate |           |
|-------------------------|-----------------|-------|-----------|----------------|------------------|-----------|
|                         | Darkness        | Light | Light + R | Light + AA + M | Total            | +R        |
| Wild-type (2)           | +               | +++++ | ++++      | +++            | 10.5 ± 1.4       | 3.3 ± 1.0 |
| <i>dum5</i> (641)       | ±               | +++++ | ++++      | ++             | 7.0 ± 1.5        | 5.2 ± 0.7 |
| <i>dum17</i> (233)      | ±               | +++   | +++       | +              | 5.3 ± 1.2        | 4.7 ± 0.8 |
| <i>dum20</i> (234)      | ±               | +++   | +++       | +              | 5.1 ± 0.4        | 4.4 ± 0.8 |

Strain numbers are given in parentheses. Growth was estimated from the size of colonies produced after cultivation for ten days in the dark or five days in the light on TAP medium. Some media were supplemented with 35  $\mu\text{M}$  rotenone (R) or 1  $\mu\text{M}$  antimycin A and 7.5  $\mu\text{M}$  myxothiazol (AA + M). Whole-cell respiratory rates ( $\text{nmol of O}_2 \text{ min}^{-1} 10^{-7} \text{ cells} \pm \text{SD}$ ) were measured in the absence or in the presence of 100  $\mu\text{M}$  rotenone (R) (means of three experiments).

ND5 subunits together with 11 subunits. The I $\gamma$  fragment (~12% of the whole complex) is made of ND1, ND2, ND3 and ND4L proteins associated to KFYI and other subunits.<sup>5</sup>

The specific role of the ND mitochondria-encoded subunits and their exact location in the membrane domain are still poorly understood. ND1, ND4 and ND5 have been proposed to be involved in a ubiquinone-binding site.<sup>6,7</sup> This is true also for the homologous proteins NuoH (ND1) and NuoM (ND4) of the bacterial form of the enzyme.<sup>4,8,9</sup> There are some reports for the participation of ND2, ND4 and ND5 in H<sup>+</sup> translocation.<sup>10,11</sup>

The role of the ND subunits on the activity and/or the assembly of complex I can be deduced from the analysis of complex I-deficient mutants in different organisms. For example, in *Neurospora*, the E35 “stopper” mutant is deficient for the *nd2* and *nd3* genes and assembles a subcomplex probably lacking the membrane arm of the enzyme.<sup>12</sup> In mammal cell lines that carry frame-shift mutations in *nd4*, *nd5* or *nd6*, activity of complex I is reduced dramatically or abolished totally and assembly defect of the membrane arm is found.<sup>13–15</sup> In humans, point mutations leading to amino acid substitutions in *nd1*, *nd4* or *nd6* cause optic nerve degeneracy and modify complex I activity.<sup>16</sup> Loss of ND4 in *Zea mays* and of ND7 in *Nicotiana glauca* induce reduced complex I activity and formation of an altered complex missing several subunits.<sup>17–20</sup>

The analysis of mitochondrial mutations in fungi, mammals and higher plants is often made complicated because the mutations have to be at the heteroplasmic state for the survival of the organism.<sup>21,22</sup> In that respect, the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii* can be considered as a model organism, since homoplasmic mitochondrial mutants are easy to isolate. Mutants lacking complex I, complex III or complex IV activity are dark-diers or grow slowly in the dark but survive perfectly when cultivated in the light.<sup>23,24</sup> In the particular case of complex I mutants, a strain deprived of ND4 and ND5 subunits lacks complex I activity and assembles a subcomplex of 650 kDa, missing 200 kDa compared to the size of the wild-type enzyme.<sup>25,26</sup> In

another mutant, the inactivation of *nd1* leads to the loss of complex I activity<sup>24</sup> but nothing is known upon the role of ND1 subunit on the assembly of the enzyme.

Here, we describe the genetic, biochemical and molecular characterization of two complex I mutants altered in *nd5* or *nd6* mitochondrial genes. The impact of these mutations and of mutations affecting *nd1* and *nd4* genes on the assembly of complex I is also analyzed, giving an insight into the possible location of the corresponding subunits in the membrane arm. We report the presence of a small fragment related to the peripheral arm of complex I that is involved in NADH dehydrogenase activity.

## Results

### Phenotypical, genetical and biochemical characterization of *dum5* and *dum17* complex I mutants

Two new mutants (strains 233 and 641) were isolated after acriflavine treatment of the wild-type mating-type minus (*mt*<sup>-</sup>) strain. Both strains grew very slowly in the dark on acetate-supplemented agar medium (dark<sup>±</sup> phenotype), like the two complex I mutants (*dum20* and *dum25*) characterized previously (Table 1).<sup>24</sup> In crosses between mutant strains *mt*<sup>-</sup> and wild-type *mt*<sup>+</sup>, almost all the meiotic progeny inherited the dark<sup>±</sup> phenotype of the mating-type minus (*mt*<sup>-</sup>) parent. In the reciprocal crosses (mutants *mt*<sup>+</sup> × wild-type *mt*<sup>-</sup>), all the progeny were phenotypically wild-type (data not shown). This uniparental *mt*<sup>-</sup> (paternal) transmission is typical of mitochondrial heredity.<sup>27</sup> The two new mutations thus affect a mitochondrial gene and were called *dum5* (641) and *dum17* (233) (for dark uniparental minus inheritance).

Both mutants were tested for their growth in the light, in the absence or in the presence of rotenone (inhibitor of complex I), and antimycin A and myxothiazol (inhibitors of complex III). Wild-type and *dum20* mutant strains were used as controls (Table 1). Without inhibitors, *dum17* and *dum20* grew slower than wild-type (Table 1). Both mutants were insensitive to rotenone and highly

**Table 2.** Activities of respiratory chain complexes in wild-type and mutant strains

| Mitochondrial mutations | NADH:DQ oxidoreductase activity |           | NADH:K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> oxidoreductase activity | Complex II + III activity | Complex IV activity |
|-------------------------|---------------------------------|-----------|---|---------------------------|---------------------|
|                         | Total                           | Complex I |   |                           |                     |
| Wild-type (2)           | 32 ± 5                          | 17 ± 6    | 2172 ± 305  | 22 ± 4                    | 266 ± 45            |
| <i>dum5</i> (641)       | 19 ± 3                          | 2 ± 1     | 398 ± 82  | 34 ± 10                   | 212 ± 77            |
| <i>dum17</i> (233)      | 18 ± 4                          | 0         | 366 ± 81  | 45 ± 17                   | 205 ± 58            |
| <i>dum20</i> (234)      | 14 ± 2                          | 0         | 272 ± 23  | 39 ± 8                    | 222 ± 19            |
| <i>dum25</i> (228)      | 18 ± 2                          | 0         | 1810 ± 317  | 35 ± 11                   | 284 ± 75            |
| <i>dum24</i> (283)      | 8 ± 1                           | 0         | 423 ± 112   | 0                         | 254 ± 44            |
| <i>dum22</i> (662)      | 16 ± 2                          | 0         | 243 ± 88  | 0                         | 205 ± 94            |

Values represent specific activities ( $\pm$ SD from three to five experiments) of total and rotenone-sensitive NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) (nmol of NADH oxidized  $\text{min}^{-1}$  mg protein<sup>-1</sup>), NADH:ferricyanide oxidoreductase (nmol of K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub> reduced  $\text{min}^{-1}$  mg protein<sup>-1</sup>), succinate:cytochrome *c* oxidoreductase (complex II + III) (nmol of cytochrome *c* reduced  $\text{min}^{-1}$  mg protein<sup>-1</sup>) and cytochrome *c* oxidase (complex IV) (nmol of cytochrome *c* oxidized  $\text{min}^{-1}$  mg protein<sup>-1</sup>).

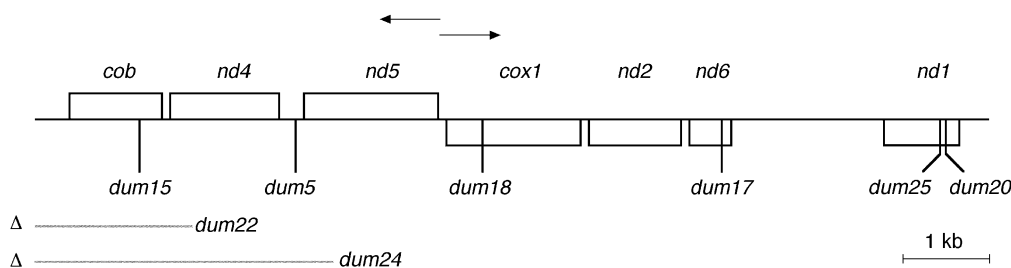
sensitive to antimycin A and myxothiazol. *dum5* grew like wild-type without and with rotenone in the culture medium but was more sensitive to antimycin A and myxothiazol than the wild-type reference strain. These results suggest that *dum17* and maybe also *dum5*, could be affected in complex I activity (Table 1).

To investigate whether *dum5* and *dum17* are altered in complex I activity, whole-cell respiration was measured with a Clark electrode. Cells from wild-type and from the *dum20* mutant were used as controls (Table 1). The total respiratory rate of *dum17* cells was very close to that of *dum20* cells and represented about half the rate of wild-type, whereas for *dum5*, the value of oxygen consumption was intermediate. Addition of rotenone induced a reduction of 69% of the cell respiration of wild-type, whereas reductions of 25, 11 and 10% were observed for *dum5*, *dum17* and *dum20* mutants, respectively. From these data, it can be concluded that *dum17* behaves as a mutant deprived of complex I activity, with a respiration almost insensitive to rotenone,<sup>24</sup> whereas *dum5* possibly retains some activity of the complex.

The NADH:duroquinone oxidoreductase activity was then measured using membrane fraction from wild-type, *dum5* and *dum17* mutant strains. The enzyme activity sensitive to rotenone was con-

sidered to represent the activity of complex I (Table 2). The activity of other complex I mutants previously characterized is reported: *dum20* (frameshift mutation in *nd1*), *dum25* (deletion of two amino acid residues in a very conserved region of *nd1*), *dum22* (deletion of *cob* and 3' end of *nd4*) and *dum24* (deletion of *cob*, *nd4* and the 3' end of *nd5*). As suspected from the data of whole-cell respiration measurements, complex I activity was null in *dum17* as in the other complex I mutants, whereas *dum5* still possessed some enzyme activity (about 10% of wild-type activity).

The NADH:ferricyanide oxidoreductase activity present in the membrane fraction from wild-type and the six complex I mutants was measured (Table 2). In other organisms, this reaction is catalyzed by the NADH dehydrogenase of the peripheral arm of the complex I enzyme and by other NADH dehydrogenases located in chloroplast membranes.<sup>28,29</sup> The value found in *dum25* was close to that found in wild-type. In contrast, the enzyme activity was much lower in membrane preparations from *dum5*, *dum17*, *dum20*, *dum22* and *dum24*. Hence, the drastic reduction of the NADH:ferricyanide oxidoreductase activity in the five mutants is correlated to the absence of complex I activity in the membrane preparations. This result suggests strongly that, contrary to



**Figure 1.** Partial physical map of the 15.8 kb linear mitochondrial genome of *C. reinhardtii*. Arrows indicate the directions of transcription. The positions of genes encoding subunits of the respiratory chain complexes are indicated: *cob* (apocytochrome *b*, component of complex III); *cox1* (subunit 1 of cytochrome *c* oxidase or complex IV); *nd1*, *nd2*, *nd4*, *nd5*, *nd6* (subunits of the NADH:ubiquinone oxidoreductase or complex I). The positions of the *dum5*, *dum15*, *dum17*, *dum18*, *dum20* and *dum25* point mutations as well as the positions of the *dum22* and *dum24* deletions are indicated.

**Table 3.** Percentages of  $dk^+$  recombinant cells obtained in crosses involving *dum5* and *dum17* mutants (data from one or two experiments)

| Crosses                                 | $dk^+$ recombinants (%) |
|---|-------------------------|
| <i>dum5</i> (643) × <i>dum15</i> (250)  | 8.6, 9.6                |
| <i>dum5</i> (643) × <i>dum18</i> (252)  | 7.0, 8.2                |
| <i>dum5</i> (643) × <i>dum20</i> (205)  | 17.5, 18.3              |
| <i>dum17</i> (670) × <i>dum15</i> (250) | 22.9, 29.6              |
| <i>dum17</i> (670) × <i>dum18</i> (252) | 3.7, 8.8                |
| <i>dum17</i> (670) × <i>dum20</i> (205) | 6.3                     |

The positions of the *dum* mutations are indicated in Figure 1. The *arg* complementary markers used to isolate the vegetative zygotic clones are not indicated. Strain designations are shown in parentheses.

*dum25*, the activity of the peripheral arm of complex I is affected importantly in the *dum5*, *dum17*, *dum20*, *dum22* and *dum24* mutants.

The activities of complex II + III and complex IV were determined in the mutant strains comparative to wild-type (Table 2). The activity of complex IV was not modified, whereas complex II + III activity was increased notably, as noted for *dum20* and *dum25* mutants.<sup>24</sup>

### Position on the genetic map and molecular characterization of *dum5* and *dum17* mutations

In *C. reinhardtii*, the mitochondrial genome is made of small (15.8 kb) linear DNA molecules.<sup>30</sup> Only seven genes encode components of the respiratory chain complexes, including five ND subunits of the complex I enzyme. Figure 1 gives a simplified physical map of the mitochondrial genome of *C. reinhardtii*, as well as the positions of several *dum* mutations affecting *cob*, *cox1* or *nd* genes. Mutants inactivated in *cob* or *cox1* gene sequence cannot grow in darkness ( $dk^-$  phenotype),<sup>23</sup> whereas *nd* mutants deprived of complex I activity display a slow growth in the dark ( $dk^\pm$  phenotype) (see above). In order to determine which of the five *nd* genes were altered in the *dum5* and *dum17* mutants, a recombinational

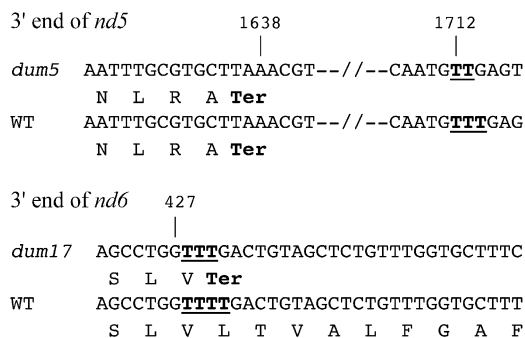
study was performed by analyzing the phenotypes of the mitotic progeny issued from vegetative diploid zygotes. In these particular zygotes, the mitochondrial genomes from both parents are transmitted to the daughter cells and recombination can occur. Parental and recombinant DNA molecules segregate during the successive mitotic divisions in such a way that after 15–20 divisions, most of the cells are homoplasmic for a parental or recombinant mitochondrial genome. In crosses between different  $dk^-$  or  $dk^\pm$  mutants,  $dk^+$  wild-type recombinant cells are produced, whose proportion depends on the distance separating the mitochondrial markers (the recombination frequency being about 3% per kilobase).<sup>24,31</sup>

The two mutants carrying the *dum5* and *dum17* mutations were thus crossed with reference strains mutated in *cob* (*dum15*), *cox1* (*dum18*) and *nd1* (*dum20*) (see Figure 1) and the frequencies of wild-type ( $dk^+$ ) recombinant cells were determined when most diploid cells had become homoplasmic. From the data of Table 3, it can be deduced that *dum5* mutation is far apart from *dum20* and located at a more or less equal distance from *dum15* and *dum18*. The *dum5* mutation may therefore concern *nd4* or *nd5* (see Figure 1). *dum17* is more distant from *dum15* than from *dum18* and *dum20*, and may affect *nd2* or *nd6* (see Figure 1).

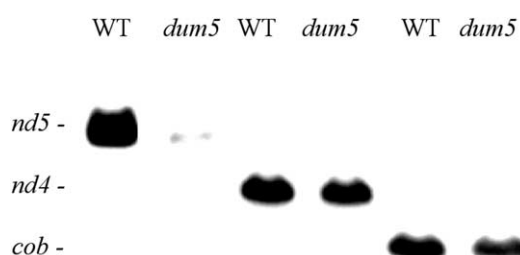
To identify the *dum5* and *dum17* mutations at the molecular level, the *nd4* and *nd5* genes from *dum5* (strain 641) and the *nd2* and *nd6* genes from *dum17* (strain 233) were amplified by PCR and sequenced. In each case, a single frameshift mutation was identified. *dum5* is a deletion of one T in a stretch of three T bases at positions 74–76 downstream of the termination codon of the *nd5* coding sequence (Figure 2). *dum17* is a deletion of one T in a stretch of four T bases at codon 143 or 144 of *nd6*, generating a termination codon at that position (Figure 2). The same deletions were detected in two other *dum5* and *dum17* isolates (data not shown).

In the course of sequencing the *nd6* gene from wild-type and mutant strains, a difference was found compared to the “standard” *C. reinhardtii* mitochondrial genome sequence (Genbank accession no. U03843): codon 151 of *nd6* was GCT (A) instead of CGT (R). As the alanine residue is conserved in all strains of *C. reinhardtii* that we sequenced as well as in many bacteria, protists, fungi and plants (data not shown), we assume that our sequence is probably the correct one.

To investigate the impact of the *dum5* mutation located downstream of the stop codon of *nd5*, a transcript analysis was performed. In *Chlamydomonas*, the origin of transcription of the mitochondrial genome is bidirectional and located between *nd5* and *cox1*<sup>25,32</sup> (Figure 1). Long cotranscripts are produced and mature transcripts are generated by precise endonucleolytic cleavage, implying secondary structures made by direct and inverted repeats.<sup>33,34</sup> P17 (*cob*), P11 (*nd4*) and P13 (*nd5*) were used as probes on Northern blots to

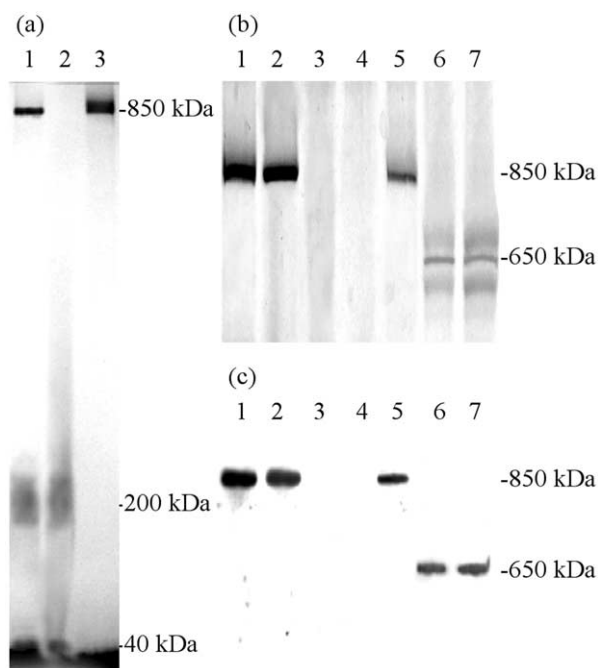
**Figure 2.** Mutations detected in the *nd5* and *nd6* sequences from *dum5* and *dum17* mutant strains, respectively. Numbers refer to nucleotides from the ATG start codon. The positions of the –1T deletions are indicated.



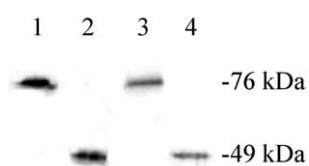


**Figure 3.** Hybridization patterns obtained with P13 (*nd5*), P11 (*nd4*) and P17 (*cob*) on Northern blots from wild-type and *dum5* mutant.

determine whether in *dum5*, the  $-1T$  deletion in the 3' non-translated region of *nd5* might affect the maturation of the left cotranscript or the stability of the *nd5* transcript. No difference was found for the *cob* or *nd4* transcripts compared to wild-type. In contrast, the amount of the *nd5* transcript was reduced drastically (Figure 3). The deletion of one T in the 3' UTR region of the *nd5* transcript thus probably decreases the stability of the mature mRNA.



**Figure 4.** Analysis of mitochondrial NADH dehydrogenases from wild-type and mutant strains after Blue native PAGE. (a) Partially purified mitochondria from wild-type was loaded in lane 1 (120  $\mu$ g protein) or mitochondria were sonicated and submitted to centrifugation to yield soluble (70  $\mu$ g of protein, lane 2) and membrane (120  $\mu$ g of protein, lane 3) fractions. The gel was stained for NADH-NBT oxidoreductase activity. (b) Gel of partially purified mitochondria from wild-type (lane 1), *dum25* (lane 2), *dum17* (lane 3), *dum20* (lane 4), *dum5* (lane 5), *dum22* (lane 6) and *dum24* (lane 7) was stained for NADH-NBT oxidoreductase activity. (c) The gel was blotted and probed with an antiserum against the *N. crassa* whole complex I.



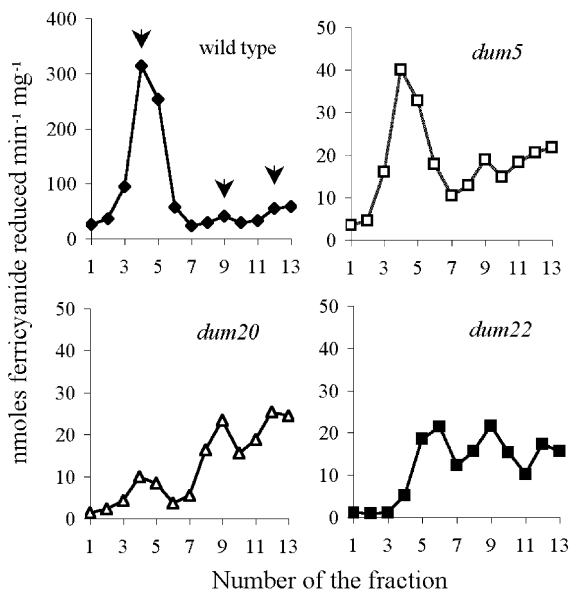
**Figure 5.** Immunological analysis of mitochondrial proteins (120  $\mu$ g) from wild-type. Blue native gel slices corresponding to the 850 kDa complex I (lanes 1 and 2) and the 160–210 kDa NADH dehydrogenase (lanes 3 and 4) were subjected to SDS-PAGE, blotted and probed with antisera against 78 kDa and 49 kDa subunits of *N. crassa*.

### Complex I assembly in the *dum5*, *dum17*, *dum20*, *dum22*, *dum24* and *dum25* mutants

Blue native polyacrylamide gel electrophoresis (BN-PAGE) allows separation of mitochondrial complexes in their native form.<sup>19,35,36</sup> This technique has been applied successfully to crude membrane fractions of *Chlamydomonas*, allowing determination of the molecular mass of complex I of the alga as  $\sim 850$  kDa. In the *dum24* mutant deprived of *cob*, *nd4* and *nd5* functional genes, a small amount of a subcomplex of  $\sim 650$  kDa was present.<sup>25</sup>

In this study, the analysis of complex I assembly has been extended to all *Chlamydomonas* mutants deprived of complex I activity. Instead of using membrane fractions as starting material, we used partially purified mitochondria extracted from cell wall-less mutant strains. Compared to the previous study, this allowed us to analyze both soluble and insoluble NADH dehydrogenases present in mitochondria. To check the integrity of the mitochondria recovered by the method we used, activities of enzymes located in the inner membrane (complex IV) and in the matrix (NADH-dependent D-lactate dehydrogenase, NADH-dependent alcohol dehydrogenase) were checked. The values obtained (data not shown) were in good agreement with those reported in the literature.<sup>37</sup>

Complex I from wild-type mitochondria was detected by an NADH/NBT (nitro blue tetrazolium) staining reaction involving the NADH dehydrogenase activity associated with the peripheral arm (Figure 4(a), lane 1) and by immunological reaction using an antiserum against whole *N. crassa* complex I (Figure 4(c), lane 1). A signal at 850 kDa was detected with both techniques. Additional bands were detected by the NADH/NBT staining reaction: a signal of 40 kDa, and a diffuse signal, in the range of 160–210 kDa, sometimes replaced by two more or less diffused bands. After sonication and separation of mitochondria into membrane and soluble fractions, complex I was clearly associated with the mitochondrial membrane fraction, whereas the other NADH dehydrogenase activities belonged to the soluble fraction (Figure 4(a)). In order to identify



**Figure 6.** NADH:ferricyanide oxidoreductase activity (nmol of ferricyanide reduced  $\text{min}^{-1} \text{mg protein}^{-1}$ ) after sucrose gradient centrifugation of extracts from wild-type and complex I mutant cells. For wild-type extract, arrows correspond to fractions giving NADH/NBT-stained bands at 850, 160–210 and 40 kDa, respectively (see the text).

the nature of the 160–210 kDa NADH dehydrogenase, whose large size suggests that it could be related to complex I, gel slices corresponding to complex I (850 kDa) and to the 160–210 kDa NADH dehydrogenase were isolated from BN polyacrylamide gels and subjected to denaturing SDS-PAGE. After blotting, the proteins were tested with antisera against the 78 kDa and the 49 kDa subunits of the *N. crassa* complex I. These two hydrophilic subunits encoded by nuclear genes are part of the peripheral arm of complex I.<sup>38</sup> Two polypeptides with molecular mass of 76 kDa and 49 kDa reacted with these antibodies (Figure 5), which shows that these two subunits are present in the 160–210 subcomplex, as in native complex I.

The assembly of complex I was then investigated in mutant strains. Using the NADH/NBT staining reaction, we detected the 40 kDa and the 160–210 kDa signals in all mutants (data not shown). *dum25* (deletion of two amino acid residues of ND1) exhibited a NADH/NBT-stained band at the same position (850 kDa) as in wild-type, and with the same intensity (Figure 4(b), lanes 1 and 2). The situation encountered in *dum5* (reduction of the amount of *nd5* transcript) was identical, except that the signal intensity was reduced to ~17% of that of wild-type (mean of five independent densitometric measurements) (Figure 4(b), lane 5). In contrast, no signal (or sometimes a very faint one at 850 kDa, representing less than 2%) corresponding to complex I was detected in *dum17* (frameshift in *nd6*) or *dum20* (frameshift in *nd1*) mitochondria (Figure 4(b), lanes 3 and 4). In *dum22* (deletion of the 3' end of *nd4*) and *dum24* (deletion of *nd4* and the 3' end of *nd5*) mutants, a signal corresponding to ~15% of that of wild-type was detected at 650 kDa, which confirms the results obtained with membrane extracts for *dum24*.<sup>25</sup> Notice that purification of mitochondria was always difficult with these two mutants and additional bands corresponding to green contaminants were found on the BN polyacrylamide gels (Figure 4(b), lanes 6 and 7). All these results obtained with the 850 kDa complex or the 650 kDa subcomplex were confirmed by Western blotting using antiserum against *N. crassa* whole complex I (Figure 4(c)).

The assembly of complex I in the six mutants was investigated by another approach. Wall-less cells of each strain were lysed by Triton X-100 and the supernatants were submitted to sucrose gradient centrifugation. The gradient fractions were assayed for NADH:ferricyanide oxidoreductase activity. For wild-type, each fraction was submitted to BN-PAGE and the gel was further stained using the NADH/NBT reaction (data not shown). With wild-type extracts, the major peak of NADH:ferricyanide activity found in fractions 4 and 5 of the gradient (Figure 6) corresponded to the 850 kDa NADH/NBT stained band in BN-PAGE.

**Table 4.** Summary of the data obtained for the six complex I mutants

| Strains      | Gene mutations  | Complex I activity (%) | NADH:K <sub>3</sub> Fe(CN) <sub>6</sub> oxidoreductase activity | Size (kDa) and relative amount (%) of complex I or subcomplex | Presence of the 160–210 kDa fragment |
|--------------|---|------------------------|---|---|--------------------------------------|
| Wild-type    | –   | 100                    | High  | 850 (100)   | +                                    |
| <i>dum5</i>  | –1T in 3' end non-coding sequence of <i>nd5</i> ; low amount of <i>nd5</i> transcript | ~12                    | Low   | 850 (~15)   | +                                    |
| <i>dum17</i> | –1T in <i>nd6</i>   | 0                      | Low   | 850 (0–2)   | +                                    |
| <i>dum20</i> | –1T in <i>nd1</i>   | 0                      | Low   | 850 (0–3)   | +                                    |
| <i>dum22</i> | Deletion of <i>cob</i> and 3' end of <i>nd4</i>                                       | 0                      | Low   | 650 (~10)   | +                                    |
| <i>dum24</i> | Deletion of <i>cob</i> , <i>nd4</i> and 3' end of <i>nd5</i>                          | 0                      | Low   | 650 (~10)   | +                                    |
| <i>dum25</i> | Deletion of two successive codons in <i>nd1</i>                                       | 0                      | High  | 850 (~100)  | +                                    |

The two other minor peaks at fractions 9 and 12 and 13 (Figure 6) corresponded to the NADH dehydrogenase activities at 160–210 kDa and 40 kDa, respectively. For *dum25*, the peaks of NADH:ferricyanide activity were almost identical with those obtained with wild-type extract (data not shown). For *dum5*, *dum20* (Figure 6) and *dum17* (data not shown), the peaks corresponding to complex I (fractions 4 and 5) represented 13%, 3% and 2% of that of wild-type, respectively. For *dum22* (Figure 6) and *dum24* (data not shown), fractions 5 and 6 displayed NADH:ferricyanide activity, most probably corresponding to the 650 kDa subcomplex identified by BN-PAGE. These peaks represented 8% and 9% of the activity of wild-type, respectively. In all mutant strains, the activities found in fractions 9 on one hand, 12 and 13 on the other hand, were all similar to the corresponding wild-type activities (Figure 6 and data not shown). Table 4 summarizes the data obtained for all strains analyzed.

## Discussion

We describe here the characterization of two new mitochondrial complex I mutants (*dum5* and *dum17*) in *Chlamydomonas*. Like the *dum20* and *dum25* mutants characterized previously, both mutants grow very slowly in the dark compared to wild-type, which points out the essential role of complex I in the respiratory chain.<sup>24</sup> These four complex I-deficient mutants show an increase in complex II + III activity, which could represent a compensatory effect, as has been suggested for some human and *Rhodobacter capsulatus* complex I mutants.<sup>39,40</sup> A recombinational analysis allowed us to determine the position of the *dum5* and *dum17* mutations on the genetic map. The regions found in this way were in accordance with the physical positions of the mutations determined by sequencing.

The *dum17* frameshift mutation at codon 143–144 of *nd6* is located in the last putative hydrophobic transmembrane segment of ND6 (data not shown), causing a premature termination of the protein at codon 144 and a loss of complex I activity. Substitutions leading to amino acid changes in this subunit are responsible for Leber hereditary optic neuropathy and dystonia in humans. As these mutations provoke a decrease of complex I activity and/or a change in the sensitivity to quinol analogs, ND6 subunit has been proposed to be part of the quinone redox site in the membrane-buried portion of the complex.<sup>41</sup> The analysis of a frameshift mutation in a mouse cell line has shown that ND6 is essential for the assembly of the membrane arm of the complex.<sup>13</sup> By BN-PAGE and sucrose gradient analyses, we demonstrate that in *Chlamydomonas*, the ND6 subunit is involved in the assembly of the whole enzyme, since no assembled complex I (or extremely low amount) is found when the subunit

is truncated (mutation *dum17*, see Table 4). Similarly, the absence of the 850 kDa complex found in *dum20* mutant (frameshift in *nd1*, Table 4) allows us to conclude that ND1 is essential for the assembly of complex I. In contrast, the elimination of two amino acid residues in a very conserved polar region of ND1 (*dum25* mutation) does not modify complex I assembly. As duroquinone reductase is null and NADH dehydrogenase is fully active in this mutant, we can conclude, as has been suggested,<sup>24</sup> that the segment of ND1 modified by the *dum25* mutation plays an essential role in complex I activity, probably by contributing to the ubiquinone-binding domain of the membrane arm.<sup>9</sup>

The *dum5* mutation is a deletion of one T from the 3' non-translated region of *nd5*, which induces a drastic reduction of the corresponding transcript. This region has been pointed out for its role in stabilizing the *nd5* transcript.<sup>25</sup> Moreover, *in silico* studies showed that this single deletion mutation is able to modify the potential secondary structure of the 3' non-translated region (data not shown). The small amount of *nd5* transcript should reduce the amount of the corresponding subunit and explain the 85–90% reduction of complex I activity and assembly detected in *dum5* (Table 4). This observation can be related to a situation encountered in a human cell line in which the ND5 subunit was not detectable and the complex I was assembled with a decreased efficiency or a reduced stability.<sup>15</sup> In *dum5*, the basal level of complex I activity explains why growth and respiration (Table 1) of *dum5* are better than those found for the two null complex I mutants *dum17* and *dum20*.

The presence of a 650 kDa subcomplex with NADH dehydrogenase activity and null duroquinone activity in *dum22* and *dum24* allow us to propose that ND4 is essential for the assembly of a 200 kDa subcomplex of the membrane domain. Since it is present in a reduced amount, the 650 kDa subcomplex would be less stable or assembled less efficiently than the whole complex I enzyme. As the loss of ND4 or ND4/ND5 is less damaging than the absence of intact ND1 and ND6 subunits concerning the assembly, we can suggest that ND4 and ND5 on one hand, and ND1 and ND6 on the other hand, are located in two different parts of the membrane domain. Interestingly, the model proposed recently by Sazanov<sup>5</sup> (see Introduction) associates ND4 and ND5 together with other proteins at the distal end of the membrane I $\beta$  subcomplex, whereas ND1 and ND2 are associated with the I $\gamma$  membrane domain, interconnecting I $\beta$  to the I $\alpha$  peripheral arm. In this model, the ND6 subunit has not been assigned to any of these three domains. Our observations allow us to suggest that this subunit might be included in or associated with the I $\gamma$  subcomplex. In *dum22* and *dum24*, the missing 200 kDa subcomplex could comprise ND4 (49 kDa), ND5 (59 kDa) and two subunits homologous to B17 and PDSW, which are all closely associated in the bovine



complex.<sup>5</sup> Moreover, the absence of complex I activity in *dum22* and *dum24* indicates that at least one of these subunits could contribute to the large ubiquinone-binding pocket(s)<sup>42</sup> together with ND1 in the membrane arm.

Two additional NADH dehydrogenases, a 160–210 kDa subform of complex I and a 40 kDa enzyme, have been detected in mitochondria from all the strains analyzed. Both enzymes are found in the soluble fraction after sonication of the mitochondrial preparation. The 160–210 kDa enzyme comprises the 49 kDa (NUOD) and 76 kDa (NUOG) subunits of the peripheral arm of the mammalian, fungal and prokaryotic complex I,<sup>38</sup> two polypeptides that are thought to be involved in the electron flow from NADH to ubiquinone: the former provides ligands for Fe–S clusters N-1b and N-4 and the latter could participate in the structure of a quinone subsite of complex I.<sup>43–45</sup> Since the fractions of the sucrose gradient corresponding to the 160–210 kDa fragment display an NADH:ubiquinone activity (data not shown), we can propose that this subcomplex I participates in the non-phosphorylating reduction of the ubiquinone pool, as described for a 350 kDa fragment of *N. crassa* complex I devoid of all the ND subunits.<sup>46</sup> The putative existence of a smaller, less complex form of complex I that does not pump protons, has been suggested for plant mitochondria.<sup>47</sup> Interestingly a 200–300 kDa NADH dehydrogenase comprising the 76 kDa subunit has been found recently in potato and pea mitochondria.<sup>48</sup>

In *Chlamydomonas*, another contribution to the non-phosphorylating oxidation of the NADH pool could be done by the soluble NADH dehydrogenase corresponding to the NADH/NBT staining detected at 40 kDa. The size of this NADH dehydrogenase fits well with that of a rotenone-insensitive NADH dehydrogenase associated with the mitochondrial inner membrane in several plants.<sup>49</sup>

## Materials and Methods

### Strains and growth conditions

Strains used in this work are derived from the 137c strain of *C. reinhardtii* except *dum22* which is a hybrid from *C. reinhardtii* × *C. smithii* (cc-1373 of the Duke University). The following mitochondrial mutants have been used: *dum15*, double substitution in the *cob* gene, lacking complex III activity; *dum18*, one T deletion in the *cox1* gene, lacking complex IV activity; *dum20*, one T deletion in the *nd1* gene, lacking complex I activity; *dum25*, six bases in-frame deletion in the *nd1* gene, lacking complex I activity; *dum22*, deletion encompassing *cob* and the 3' end of *nd4*, lacking complex I and III activities; *dum24*, deletion encompassing *cob*, *nd4* and the 3' end of *nd5*, lacking complex I and III activities (Figure 1).<sup>24–26,50,51</sup>

Cells were routinely grown under light (75  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  PAR) on TAP (Tris–acetate–phosphate) or TMP agar medium supplemented with 100 mg l<sup>-1</sup>

of arginine when required.<sup>52</sup> Rotenone, antimycin A and myxothiazol were prepared as described.<sup>24</sup>

### Mutagenesis and genetical analyses

Mutagenesis with acriflavin was performed on the wild-type *mt*<sup>-</sup> strain as described.<sup>26</sup> The transmission pattern of the mutations in crosses was determined by random analysis of the meiotic products. To determine the recombination frequencies between mitochondrial markers, strains carrying different *dum* mutations and complementary *arg7* nuclear markers were crossed and the diploid colonies were selected on minimal TMP medium.<sup>53</sup> After ten days, when the mitotic segregation had produced near-homoplasmic diploid progeny, the recombination frequencies were determined, assuming that the percentages of *dk*<sup>+</sup> recombinant cells corresponded to the recombination rates.<sup>31</sup>

### Whole-cell respiration

Dark respiration rates of cells that were grown mixotrophically (TAP medium in the light) were measured using a Clark electrode (Hansatech Instruments, King's Lynn, England) as described.<sup>26</sup> Rotenone dissolved in ethanol (15 mM) was used at a final concentration of 100  $\mu\text{M}$ .

### Enzyme activity analyses

Activities of complex I, II + III and IV were measured in membrane fractions from cells disrupted by sonication.<sup>24</sup> NADH:ferricyanide oxidoreductase activity was measured in 20 mM Tris–HCl (pH 8.0) containing 100  $\mu\text{M}$  NADH and 800  $\mu\text{M}$  K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>. The reduction of ferricyanide was monitored at 420 nm  $\epsilon_{420 \text{ nm}} = 1.05 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  (adapted from Majander<sup>40</sup>). NADH-dependent D-lactate dehydrogenase, NADH-dependent alcohol dehydrogenase were measured according to Grondal,<sup>54</sup> and Kreuzberg,<sup>37</sup> respectively.

### Sucrose gradient centrifugation

Cell wall-less strains were lysed in 20 mM Tris–HCl (pH 8.0) containing 10% (v/v) Triton X-100. The supernatant was clarified by centrifugation at 20,000 g for ten minutes. About 5 mg (500  $\mu\text{l}$ ) of the supernatant was then applied to the top of an 11 ml sucrose gradient (7.5%–30% (w/v) in 50 mM Tris–acetate (pH 7.5), 0.05% (v/v) Triton X-100).<sup>55</sup> Following centrifugation at 180,000 g for 16 hours at 4 °C, the gradients were fractionated in 900  $\mu\text{l}$  portions, and stored at –20 °C.

### Isolation and subfractionation of mitochondria

Mitochondria were isolated from cell wall-less strains.<sup>56</sup> 10<sup>10</sup> cells were harvested by centrifugation (480 g), resuspended in 10 ml of ice-cold 25 mM phosphate buffer (pH 6.5 containing 6% PEG 6000, 0.4% (w/v) bovine serum albumin and 0.016% (w/v) digitonin. The suspension was warmed rapidly to 30 °C, kept at this temperature for 30 seconds and cooled to 4 °C. Then the broken cells were spun down at 2500 g and the pellet was washed with 40 ml of ice-cold 20 mM Hepes–NaOH buffer at pH 7.2 containing 0.15 M mannitol, 2 mM EDTA, 0.1% bovine serum albumin and 1 mM MgCl<sub>2</sub>, resuspended in 2 ml of the same solution, stirred

vigorously and 6 ml of 20 mM Hepes–NaOH buffer (pH 7.2) containing 0.15 M mannitol, 0.8 mM EDTA and 4 mM MgCl<sub>2</sub> was added. After removing chloroplasts by centrifugation at 2000 g, the mitochondria were collected at 10,000 g and stored at –80 °C. Mitochondria were disrupted by sonication (2 × 15 seconds, Vibra cell Sonicator, Danbury, CT) in 20 mM Tris–HCl (pH 8). After removal of unbroken mitochondria (9500 g five minutes), soluble (supernatant) and membrane (pellet) fractions were separated by centrifugation at 20,000 g for 20 minutes.<sup>19</sup>

### Analysis of protein complexes

The starting material was purified mitochondria or organelle subfractions. Protein complexes were solubilized by 0.9% (w/v), dodecylmatoside separated by BN-PAGE<sup>36</sup> and stained for NADH dehydrogenase activity using nitro blue tetrazolium as an electron acceptor.<sup>57</sup>

The two-dimensional PAGE procedure was conducted according to Karpova:<sup>19</sup> treated BN-gel slices were laid on a second dimensional SDS/polyacrylamide gel, consisting of a 12% running gel and a 4% stacking gel. The molecular size of the proteins was calculated by comparison with known markers (Prestained SDS-PAGE Bio-Rad Standards, Low Range).

BN-gels were electroblotted<sup>25</sup> and SDS-containing gels were electroblotted according to standard protocols. The following antisera were used: polyclonal antisera raised in rabbits against whole purified complex I or against individual subunits of 78 kDa and 49 kDa from *N. crassa* (provided by H. Weiss and U. Schulte). Detection was performed using the ECL kit (Roche Molecular Biology) with anti-rabbit POD-conjugated antibodies.

### Sequencing analyses

*C. reinhardtii* total nucleic acids were prepared according to Newman.<sup>58</sup> Three segments of the *C. reinhardtii* mitochondrial genome (Genbank U03843: 1629–3301, 3236–5233 and 6636–8593) containing *nd4*, *nd5*, and *nd2–nd6*, respectively, were amplified by PCR according to standard protocols. Amplified products were sent to GenomeExpress (Paris, France) for automated sequencing on both strands. Overlapping segments were assembled with the aid of the GCG software package (Genetics Computer Group, Madison, WI) and final consensus sequences were aligned with the same program.

### RNA analyses

Northern blots were performed according to Duby,<sup>25</sup> except that the starting material was 10 µg aliquots of total nucleic acids extracted as described.<sup>58</sup> Probes 11, 13 and 17 were used to detect the *nd4*, *nd5* and *cob* transcripts.<sup>25</sup> Transcript sizes were calculated by comparison with markers of known sizes (0.24–9.5 kb, Life Technologies, USA). Sets of RNA secondary structures were generated with the program MFOLD 3.1 of Zuker†.

### Acknowledgments

We thank J. Vaassen and E. Schmetz for technical assistance, Dr H. Weiss and Dr U. Schulte (Institut für Biochimie, Düsseldorf) for the generous gift of the antisera. This research was supported by grants from the Belgian Fonds National de la Recherche Scientifique (1.5.211.99 and 2.4552.01) and Fonds spéciaux pour la recherche dans les Universités. P.C. and C.R. are Research Fellow and Research Associate of the FNRS, respectively.

### References

- Weiss, H., Friedrich, T., Hofhaus, G. & Preis, D. (1991). The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur. J. Biochem.* **197**, 563–576.
- Walker, J. E. (1992). The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Quart. Rev. Biophys.* **25**, 253–324.
- Grigorieff, N. (1999). Structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Curr. Opin. Struct. Biol.* **9**, 476–483.
- Dupuis, A., Prieur, I. & Lunardi, J. (2001). Toward a characterization of the connecting module of complex I. *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 159–168.
- Sazanov, L. A., Peak-Chew, S. Y., Fearnley, I. M. & Walker, J. E. (2000). Resolution of the membrane domain of bovine complex I into subcomplexes: implications for the structural organization of the enzyme. *Biochemistry*, **39**, 7229–7235.
- Earley, F. G., Patel, S. D., Ragan, I. & Attardi, G. (1987). Photolabelling of a mitochondrially encoded subunit of NADH dehydrogenase with [<sup>3</sup>H]dihydrorotenone. *FEBS Letters*, **219**, 108–112.
- Fisher, N. & Rich, P. R. (2000). A motif for quinone binding sites in respiratory and photosynthetic systems. *J. Mol. Biol.* **296**, 1153–1162.
- Friedrich, T. (2001). Complex I: a chimera of a redox and conformation-driven proton pump? *J. Bioenerg. Biomembr.* **33**, 169–177.
- Roth, R. & Hagerhall, C. (2001). Transmembrane orientation and topology of the NADH:quinone oxidoreductase putative quinone binding subunit NuoH. *Biochim. Biophys. Acta*, **1504**, 352–362.
- Friedrich, T., Abelmann, A., Brors, B., Guenebaut, V., Kintscher, L., Leonard, K. *et al.* (1998). Redox components and structure of the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim. Biophys. Acta*, **1365**, 215–219.
- Plesofsky, N., Gardner, N., Videira, A. & Brambl, R. (2000). NADH dehydrogenase in *Neurospora crassa* contains myristic acid covalently linked to the ND5 subunit peptide. *Biochim. Biophys. Acta*, **1495**, 223–230.
- Alves, P. C. & Videira, A. (1998). The membrane domain of complex I is not assembled in the stopper mutant E35 of *Neurospora*. *Biochem. Cell. Biol.* **76**, 139–143.
- Bai, Y. & Attardi, G. (1998). The mtDNA-encoded ND6 subunit of mitochondrial NADH dehydrogenase is essential for the assembly of the membrane arm and the respiratory function of the enzyme. *EMBO J.* **17**, 4848–4858.
- Hofhaus, G. & Attardi, G. (1993). Lack of assembly of mitochondrial DNA-encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase and loss of enzyme activity

† <http://bioinfo.math.rpi.edu>

- in a human cell mutant lacking the mitochondrial ND4 gene product. *EMBO J.* **12**, 3043–3048.
15. Hofhaus, G. & Attardi, G. (1995). Efficient selection and characterization of mutants of a human cell line which are defective in mitochondrial DNA-encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase. *Mol. Cell. Biol.* **15**, 964–974.
  16. Schapira, A. H. (1998). Human complex I defects in neurodegenerative diseases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 261–270.
  17. Gutierrez, S., Combettes, B., De Paepe, R., Mirande, M., Lelandais, C., Vedel, F. & Chetrit, P. (1999). In the *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant, a recombination-mediated change 5' to the first exon of the mitochondrial *nad1* gene is associated with lack of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) *nad1* subunit. *Eur. J. Biochem.* **261**, 361–370.
  18. Gutierrez, S., Sabar, M., Lelandais, C., Chetrit, P., Diolez, P., Degand, H. *et al.* (1997). Lack of mitochondrial and nuclear-encoded subunits of complex I and alteration of the respiratory chain in *Nicotiana sylvestris* mitochondrial deletion mutants. *Proc. Natl Acad. Sci. USA*, **94**, 3436–3441.
  19. Karpova, O. V. & Newton, K. J. (1999). A partially assembled complex I in ND4-deficient mitochondria of maize. *Plant J.* **17**, 511–521.
  20. Pla, M., Mathieu, C., De Paepe, R., Chetrit, P. & Vedel, F. (1995). Deletion of the last two exons of the mitochondrial *nad7* gene results in lack of the NAD7 polypeptide in a *Nicotiana sylvestris* CMS mutant. *Mol. Gen. Genet.* **248**, 79–88.
  21. Gillham, N. W. (1994). *Organelle Genes and Genomes*, Oxford University Press, Oxford.
  22. Yamato, K. T. & Newton, K. J. (1999). Heteroplasmy and homoplasmy for maize mitochondrial mutants: a rare homoplasmic *nd4* deletion mutant plant. *J. Heredity*, **90**, 369–373.
  23. Remacle, C. & Matagne, R. F. (1998). Mitochondrial genetics. In *Molecular Biology of Chloroplasts and Mitochondria in Chlamydomonas* (Rochaix, J. D., Goldschmidt-Clermont, M. & Merchant, S., eds), pp. 661–674, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
  24. Remacle, C., Baurain, D., Cardol, P. & Matagne, R. F. (2001). Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in mitochondrial complex I. Characterization of two mutations affecting the *nd1* coding sequence. *Genetics*, **158**, 1051–1060.
  25. Duby, F., Cardol, P., Matagne, R. F. & Remacle, C. (2001). Structure of the telomeric ends of mt DNA, transcriptional analysis and complex I assembly in the *dum24* mitochondrial mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Genet. Genomics*, **266**, 109–114.
  26. Duby, F. & Matagne, R. F. (1999). Alteration of dark respiration and reduction of phototrophic growth in a mitochondrial DNA deletion mutant of *Chlamydomonas* lacking *cob*, *nd4*, and the 3' end of *nd5*. *Plant Cell*, **11**, 115–125.
  27. Matagne, R. F., Michel-Wolwertz, M. R., Munaut, C., Duyckaerts, C. & Sluse, F. (1989). Induction and characterization of mitochondrial DNA mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell Biol.* **108**, 1221–1226.
  28. Galante, Y. M. & Hatefi, Y. (1979). Purification and molecular and enzymatic properties of mitochondrial NADH dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.* **192**, 559–568.
  29. Quiles, M. J., Albacete, M. E., Sabater, B. & Cuello, J. (1996). Isolation and partial characterization of the NADH dehydrogenase complex from barley chloroplast thylakoids. *Plant Cell Physiol.* **37**, 1134–1142.
  30. Vahrenholz, C., Riemen, G., Pratje, E., Dujon, B. & Michaelis, G. (1993). Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication. *Curr. Genet.* **24**, 241–247.
  31. Remacle, C., Colin, M. & Matagne, R. F. (1995). Genetic mapping of mitochondrial markers by recombinational analysis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.* **249**, 185–190.
  32. Gray, M. W. & Boer, P. H. (1988). Organization and expression of algal (*Chlamydomonas reinhardtii*) mitochondrial DNA. *Philos. Trans. Roy. Soc. ser. B*, **319**, 135–147.
  33. Boer, P. H. & Gray, M. W. (1986). The *URF5* gene of *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondria: DNA sequence and mode of transcription. *EMBO J.* **5**, 21–28.
  34. Vahrenholz, C., Pratje, E., Michaelis, G. & Dujon, B. (1985). Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii*: sequence and arrangement of *URF5* and the gene for cytochrome oxidase subunit I. *Mol. Gen. Genet.* **201**, 213–224.
  35. Jansch, L., Kruft, V., Schmitz, U. K. & Braun, H. P. (1996). New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant J.* **9**, 357–368.
  36. Schagger, H. & Von Jagow, G. (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.* **199**, 223–231.
  37. Kreuzberg, K., Klöck, G. & Grobheiser, D. (1987). Subcellular distribution of pyruvate-degrading enzymes in *Chlamydomonas reinhardtii* studied by an improved protoplast fractionation procedure. *Physiol. Plant.* **69**, 481–488.
  38. Videira, A. (1998). Complex I from the fungus *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 89–100.
  39. Dupuis, A., Darrouzet, E., Duborjal, H., Pierrard, B., Chevallet, M., van Belzen, R. *et al.* (1998). Distal genes of the *nuo* operon of *Rhodobacter capsulatus* equivalent to the mitochondrial ND subunits are all essential for the biogenesis of the respiratory NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Mol. Microbiol.* **28**, 531–541.
  40. Majander, A., Huoponen, K., Savontaus, M. L., Nikoskelainen, E. & Wikstrom, M. (1991). Electron transfer properties of NADH:ubiquinone reductase in the ND1/3460 and the ND4/11778 mutations of the Leber hereditary optic neuroretinopathy (LHON). *FEBS Letters*, **292**, 289–292.
  41. Chinnery, P. F., Brown, D. T., Andrews, R. M., Singh-Kler, R., Riordan-Eva, P., Lindley, J. *et al.* (2001). The mitochondrial *ND6* gene is a hot spot for mutations that cause Leber's hereditary optic neuropathy. *Brain*, **124**, 209–218.
  42. Okun, J. G., Lümmlen, P. & Brandt, U. (1999). Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase). *J. Biol. Chem.* **274**, 2625–2630.
  43. Darrouzet, E., Issartel, J. P., Lunardi, J. & Dupuis, A. (1998). The 49-kDa subunit of NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I) is involved in the binding of piericidin and rotenone, two quinone-related inhibitors. *FEBS Letters*, **431**, 34–38.
  44. Prieur, I., Lunardi, J. & Dupuis, A. (2001). Evidence for a quinone binding site close to the interface

- between NUOD and NUOB subunits of complex I. *Biochim. Biophys. Acta*, **1504**, 173–178.
45. Kashani-Poor, N., Zwicker, K., Kerscher, S. & Brandt, U. (2001). A central functional role for the 49-kDa subunit within the catalytic core of mitochondrial complex I. *J. Biol. Chem.* **276**, 24082–24087.
46. Friedrich, T., Hofhaus, G., Ise, W., Nehls, U., Schmitz, B. & Weiss, H. (1989). A small isoform of NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) without mitochondrially encoded subunits is made in chloramphenicol-treated *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.* **180**, 173–180.
47. Soole, K. L. & Menz, R. I. (1995). Functional molecular aspects of the NADH dehydrogenases of plant mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.* **27**, 397–406.
48. Bykova, N. V., Rasmusson, A. G., Igamberdiev, A. U., Gardestrom, P. & Moller, I. M. (1999). Two separate transhydrogenase activities are present in plant mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **265**, 106–111.
49. Menz, R. I. & Day, D. A. (1996). Purification and characterization of a 43-kDa rotenone-insensitive NADH dehydrogenase from plant mitochondria. *J. Biol. Chem.* **271**, 23117–23120.
50. Colin, M., Dorthu, M. P., Duby, F., Remacle, C., Dinant, M., Wolwertz, M. R. *et al.* (1995). Mutations affecting the mitochondrial genes encoding the cytochrome oxidase subunit I and apocytochrome *b* of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.* **249**, 179–184.
51. Remacle, C., Duby, F., Cardol, P. & Matagne, R. F. (2001). Mutations inactivating mitochondrial genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem. Soc. Trans.* **29**, 442–446.
52. Harris, E. H. (1989). *The Chlamydomonas Sourcebook*, Academic Press, San Diego.
53. Matagne, R. F. (1978). Fine structure of the arg-7 cistron in *Chlamydomonas reinhardtii*. Complementation between arg-7 mutants defective in argininosuccinate lyase. *Mol. Gen. Genet.* **160**, 95–99.
54. Grondal, E. J. M., Betz, A. & Kreuzberg, K. (1983). Partial purification and properties of alcohol dehydrogenase from the unicellular green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *Phytochemistry*, **22**, 1695–1699.
55. Tuschen, G., Sackmann, U., Nehls, U., Haiker, H., Buse, G. & Weiss, H. (1990). Assembly of NADH: ubiquinone reductase (complex I) in *Neurospora* mitochondria. Independent pathways of nuclear-encoded and mitochondrially encoded subunits. *J. Mol. Biol.* **213**, 845–857.
56. Klein, U., Chen, C., Gibbs, M. & Platt-Aloia, K. (1983). Cellular fractionation of *Chlamydomonas reinhardtii* with emphasis on the isolation of the chloroplast. *Plant Physiol.* **72**, 481–487.
57. Rasmusson, A. G. & Moller, I. M. (1991). NAD(P)H dehydrogenases on the inner surface of the inner mitochondrial membrane studied using inside-out submitochondrial particles. *Physiol. Plant.* **83**, 357–365.
58. Newman, S. M., Boynton, J. E., Gillham, N. W., Randolph-Anderson, B. L., Johnson, A. M. & Harris, E. H. (1990). Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: molecular and genetic characterization of integration events. *Genetics*, **126**, 875–888.

Edited by N.-H. Chua

(Received 6 December 2001; received in revised form 22 March 2002; accepted 9 April 2002)

## 2.2. Recherche de nouveaux mutants. Caractérisation d'une mutation affectant la séquence codante du gène *nd5*

### 2.2.1. Isolement de deux nouveaux mutants insensibles à la roténone

A ce stade du travail, nous avons caractérisé des mutations qui affectent la séquence codante des gènes *nd1* (*dum20,25*), *nd4* (*dum22*), *nd4-nd5* (*dum24*) et *nd6* (*dum17*), ainsi qu'une mutation localisée dans la région 3' non traduite du gène *nd5* (*dum5*). Afin de rechercher des mutants affectés dans la séquence codante des gènes *nd2* ou *nd5*, nous avons effectué une nouvelle expérience de mutagenèse à l'acriflavine de la souche sauvage *mt*. Après mutagenèse, les colonies ont été dénombrées et le taux de survie a été estimé à 22%. Deux types de colonies ont été observés : des colonies minuscules (*minutes*) dépigmentées (82%), dont les cellules ont subi quelques divisions avant de mourir, et des colonies vertes visibles à l'œil nu (18%).

Quatre cents colonies vertes de taille relativement réduite ont été criblées en vue d'identifier un phénotype identique à celui des mutants du complexe I (*dum17,20* ou *25*) (cf. publication 1 et 2). Dix souches (PC1-10) qui en conditions mixotrophes sont insensibles à la roténone (35  $\mu\text{M}$ ) mais présentent une sensibilité aux inhibiteurs du complexe III (antimycine A 1  $\mu\text{M}$  et myxothiazol 7,5  $\mu\text{M}$ ) ont été sélectionnées. Ces souches présentent en outre une croissance lente en conditions hétérotrophes. Six mois après leur isolement, les dix souches ont été sous-clonées et testées à nouveau. Seuls les sous-clones des souches PC7 et PC10 étaient homogènes et avaient conservé leur phénotype mutant (Tableau 9). Pour les huit autres souches, nous n'avons pas été en mesure d'isoler des sous-clones présentant le phénotype originel. Ceci suggère que des mutations de suppression ou de réversion pourraient avoir eu lieu ou que, plus probablement, l'état homoplasmique n'était pas encore atteint lorsque les souches avaient été isolées. Dans les deux cas, les quelques cellules sauvages

présentes dans les colonies auraient progressivement pris le pas sur les cellules mutantes en raison de leur croissance plus rapide.

En vue de confirmer le phénotype de sensibilité à la roténone des souches PC7 et PC10, la consommation d'oxygène des cellules a été mesurée à l'électrode de Clark en absence et en présence d'inhibiteur. Les souches sauvage (2) et mutante *dum20* (235) ont été utilisées comme témoins (Tableau 9). L'activité respiratoire des souches 235, PC7 et PC10 est comparable et représente environ 50% de celle de la souche sauvage. L'addition de roténone (100  $\mu\text{M}$ ) fait par ailleurs chuter la respiration de la souche sauvage d'environ 55% alors que les souches mutantes sont beaucoup moins sensibles à l'inhibiteur. Ces résultats confirment que les souches PC7 et PC10 se comportent comme des mutants du complexe I (Cardol *et al.*, 2002; Remacle *et al.*, 2001a).

### 2.2.2. Analyse génétique et moléculaire des mutants PC7 (*dum23*) et PC10 (*dum27*)

Le mode de transmission d'un phénotype mutant permet aisément de déterminer le génome (nucléaire, mitochondriale ou chloroplastique) porteur de la mutation (Matagne *et al.*, 1989). Les souches PC7 et PC10 (*mt*) ont été croisées avec la souche sauvage *mt*<sup>+</sup> (1) et le phénotype de la descendance méiotique a été analysé. Lors de chaque croisement, un descendant *mt*<sup>+</sup> de phénotype similaire à celui de la souche mutante parentale a été isolé puis utilisé dans un croisement réciproque avec la souche sauvage *mt* (2) (Tableau 10).

| Souches            | consommation d'oxygène | % + R   | croissance |      |       |              |
|--------------------|------------------------|---------|------------|------|-------|--------------|
|                    |                        |         | mixotrophe |      |       | hétérotrophe |
|                    |                        |         | -          | + R  | +AA+M | -            |
| wt (2)             | 9,1 ± 0,3              | 45 ± 11 | +++++      | ++++ | ++    | +            |
| <i>dum20</i> (235) | 5,2 ± 1,2              | 87 ± 6  | ++         | ++   | +     | ±            |
| PC7                | 4,1 ± 0,9              | 90 ± 5  | ++         | ++   | +     | ±            |
| PC10               | 4,7 ± 0,5              | 87 ± 8  | ++         | ++   | +     | ±            |

**Tableau 9.** Tests *in vivo* portant sur les souches PC7 et PC10. L'activité respiratoire des cellules cultivées en milieu TAP est exprimée en nmoles d'O<sub>2</sub>.min<sup>-1</sup>.10<sup>-7</sup> cellules ; %+R : pourcentage de respiration résiduelle après ajout de 100  $\mu\text{M}$  roténone (moyenne de 3 mesures indépendantes  $\pm$  écart-type). La croissance des souches à la lumière est exprimée sur une échelle relative. Les phénotypes de croissance des colonies à l'obscurité sont traduits par + (normale) et  $\pm$  (faible). AA : antimycine A 1  $\mu\text{M}$ , M : myxothiazol 7,5  $\mu\text{M}$  ; R : roténone 35  $\mu\text{M}$ .

| Croisement (phénotype)   | Ségrégation méiotique                  |
|--|--|
| PC7 <i>mt<sup>-</sup></i> (dk <sup>±</sup> ) x <i>w t mt<sup>+</sup></i> (dk <sup>+</sup> )  | 19 dk <sup>±</sup> : 1 dk <sup>+</sup> |
| PC7 <i>mt<sup>+</sup></i> (dk <sup>±</sup> ) x <i>w t mt<sup>-</sup></i> (dk <sup>+</sup> )  | 20 dk <sup>+</sup>                     |
| PC10 <i>mt<sup>-</sup></i> (dk <sup>±</sup> ) x <i>w t mt<sup>+</sup></i> (dk <sup>+</sup> ) | 24 dk <sup>±</sup> : 6 dk <sup>+</sup> |
| PC10 <i>mt<sup>+</sup></i> (dk <sup>±</sup> ) x <i>w t mt<sup>-</sup></i> (dk <sup>+</sup> ) | 30 dk <sup>+</sup>                     |

**Tableau 10.** Analyse génétique des mutants PC7 et PC10. Ségrégation du phénotype de croissance en conditions hétérotrophes.

Dans les quatre croisements, la descendance méiotique hérite majoritairement du caractère du parent *mt<sup>-</sup>*, ce qui démontre que chez les souches PC7 et PC10, les mutations responsables de la croissance faible en conditions hétérotrophes sont bien d'origine mitochondriale. Nous pouvons donc conclure que les mutations des souches PC7 et PC10 affectent probablement un des cinq gènes *nd* mitochondriaux. Ces mutations ont été appelées *dum23* et *dum27*.

Dans le but d'identifier les gènes concernés par les mutations *dum23* et *dum27*, nous avons entrepris de cartographier génétiquement les sites de mutation par analyse de recombinaison. On sait que lors d'un croisement, les rares zygotes végétatifs qui se divisent mitotiquement pour donner une descendance diploïde stable transmettent les génomes mitochondriaux des deux parents (Remacle et Matagne, 1993). Dans ces cellules hétéroplasmiques, les génomes mitochondriaux recombinent à haute fréquence (environ 3% par kb) pour générer différents types de molécules (Remacle *et al.*, 1995), parentales ou recombinantes, qui ségréguent progressivement au cours des divisions successives. Dans le cas de croisements entre mutants mitochondriaux de type *dk<sup>-</sup>* ou *dk<sup>±</sup>*, la fréquence des recombinants sauvages *dk<sup>+</sup>* dépendra de la distance physique séparant les deux mutations.

La sélection des colonies diploïdes peut s'effectuer en appliquant la complémentation intragénique entre allèles mutants du gène nucléaire *ARG7* codant pour l'argininosuccinate lyase (Matagne, 1978). Les mutations *dum23* et *dum27* ont été associées à la mutation *arg7-2* par croisement entre les souches *dum23 mt<sup>-</sup>* et *dum27 mt<sup>-</sup>* avec une souche *arg7-2 mt<sup>+</sup>* (souche 158). Des clones *arg7-2 dum23-27 mt<sup>-</sup>* ont été sélectionnés sur base de leur dépendance vis-à-vis de

l'arginine, de leur phénotype *dk<sup>±</sup>* à l'obscurité et de leur capacité à se croiser avec la souche sauvage *mt<sup>+</sup>*.

Ces nouvelles souches ont été croisées avec des souches porteuses d'une mutation nucléaire complémentaire (*arg7-8*) et de la mutation *dum15* (souche 250), *dum18* (souche 252) ou *dum20* (souche 205) dont la position est connue sur le génome mitochondrial (*cob*, *cox1*, *nd1*) (Figure 15). Les taux de cellules diploïdes recombinantes *dk<sup>+</sup>* ont été déterminés pour chacun des croisements (Tableau 11).

| Croisement (phénotype)  | % de colonies diploïdes recombinantes <i>dk<sup>+</sup></i> |
|---|---|
| <i>dum23 mt<sup>-</sup> arg 7-2</i> (dk <sup>±</sup> ) x <i>dum15 mt<sup>+</sup> arg 7-8</i> (dk <sup>-</sup> ) | 12,2%   |
| <i>dum23 mt<sup>-</sup> arg 7-2</i> (dk <sup>±</sup> ) x <i>dum18 mt<sup>+</sup> arg 7-8</i> (dk <sup>-</sup> ) | 5%  |
| <i>dum23 mt<sup>-</sup> arg 7-2</i> (dk <sup>±</sup> ) x <i>dum20 mt<sup>+</sup> arg 7-8</i> (dk <sup>-</sup> ) | 22,7%   |
| <i>dum27 mt<sup>-</sup> arg 7-2</i> (dk <sup>±</sup> ) x <i>dum15 mt<sup>+</sup> arg 7-8</i> (dk <sup>-</sup> ) | 25%   |
| <i>dum27 mt<sup>-</sup> arg 7-2</i> (dk <sup>±</sup> ) x <i>dum18 mt<sup>+</sup> arg 7-8</i> (dk <sup>-</sup> ) | 5,3%  |
| <i>dum27 mt<sup>-</sup> arg 7-2</i> (dk <sup>±</sup> ) x <i>dum20 mt<sup>+</sup> arg 7-8</i> (dk <sup>-</sup> ) | 4,8%  |

**Tableau 11.** Analyse génétique des mutations *dum23* et *dum27*. Fréquence des colonies diploïdes recombinantes *dk<sup>+</sup>* établies après croisement entre souches mutantes *dk<sup>±</sup>* ou *dk<sup>-</sup>* (moyenne de deux expériences indépendantes).

Sachant que le taux de recombinaison entre marqueurs mitochondriaux est d'environ 3% par kb (avec un taux maximum de 20-25%) (Remacle *et al.*, 1995), les résultats suggèrent que la mutation *dum23* est éloignée de *dum20* (*nd1*), proche de *dum18* (*cox1*) et se situe entre *dum15* (*cob*) et *dum18* (*cox1*). Comme le montre la Figure 15, elle pourrait affecter le gène *nd5*. Par contre, la mutation *dum27* est fort éloignée de *dum15* (*cob*) et se situe à une distance équivalente de *dum18* (*cox1*) et *dum20* (*nd1*). Elle pourrait donc affecter les gènes *nd2* ou *nd6* (Figure 15).

En vue de définir les mutations *dum23* et *dum27* au niveau moléculaire, nous avons amplifié par PCR les régions identifiées par l'analyse de recombinaison, puis avons déterminé leur séquence. Le séquençage des deux brins a été réalisé à partir de produits de PCR indépendantes, en plusieurs étapes et en utilisant des amorces internes en plus de celles utilisés pour l'amplification (*cf.* Matériel et Méthode).



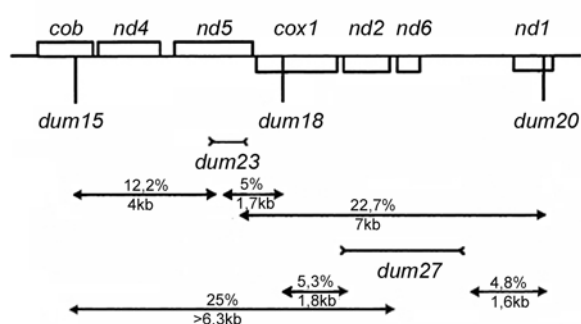


Figure 15. Carte génétique d'un segment du génome mitochondrial de 15,8 kb de *C. reinhardtii*. La position des gènes encodant les sous-unités des complexes de la chaîne respiratoire et la position des mutations *dum15,18,20* sont indiquées. Les positions des mutations *dum23* et *dum27* sont estimées sur base des fréquences de recombinaison du Tableau 11.

Les séquences nucléotidiques 1629-3301 et 3236-5233 (numérotation du génome mitochondrial de *C. reinhardtii*, numéro d'accès dans GenBank U03843) comprenant respectivement les gènes *nd4* (1713-3044) et *nd5* (3320-4960) ont été déterminées pour le mutant *dum23*. La séquence du gène *nd4* ne présente aucune mutation. Par contre, une délétion d'une thymine a été identifiée au niveau d'une série de quatre thymines (nucléotides 435-438, codons 145-146) de la séquence codante du gène *nd5* (546 codons). Cette mutation introduit un déphasage qui transforme le codon 146 (TTT, phénylalanine) en codon L (TTA, leucine) et introduit un stop STOP (TAG) au codon 151 (Figure 16). Nous avons par ailleurs vérifié qu'aucun autre gène *nd* de cette souche n'était porteur d'une mutation. La souche *dum23* présente donc un réel intérêt pour la suite du travail puisqu'il s'agit du premier mutant affecté uniquement dans la séquence codante du gène *nd5*.

| Séquence partielle du gène <i>nd5</i> (546 codons) |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|--|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
|  | 144 | 145 | 146 | 147 | 148 | 149 | 150 | 151 | 152 | 153 |  |  |
| WT   | ACT | GGI | TTT | ATG | TGC | GTA | CTT | GTA | GCC | GCT |  |  |
|  | T   | G   | F   | M   | C   | V   | L   | V   | A   | A   |  |  |
| <i>dum23</i>                                       | ACT | GGI | TTA | TGT | GCG | TAC | TTG | TAG | CCG | CTG |  |  |
|  | T   | G   | L   | C   | A   | Y   | L   | *   | P   | L   |  |  |

Figure 16. Nature et position de la mutation détectée chez la souche mutante *dum23*.

L'analyse de la région 6636-8011 du mutant *dum27*, comprenant la séquence des gènes *nd2* (6707-7855) et *nd6* (7953-8441) a également permis de déceler

la délétion d'une thymine au niveau d'une série de quatre thymines dans la séquence codante du gène *nd6* (nucléotides 428-431, codons 143-144) (données non présentées). A notre grande surprise, cette mutation frameshift, qui transforme le codon 144 (TTG, L) en codon STOP (TGA), est identique à la mutation *dum17* déjà isolée et caractérisée précédemment (Publication 3) (Cardol *et al.*, 2002).

### 2.2.3. Activités enzymatiques du mutant *dum23*

Les activités spécifiques des complexes de la chaîne respiratoire mitochondriale ont été mesurées chez le mutant *dum23* à partir d'extraits membranaires. Les souches sauvage et mutante *dum17* (perte de l'activité complexe I) ont été utilisées comme témoins (Tableau 12).

| Souches      | NADH:DQ oxydoréductase |            | NADH:Fe(CN) <sub>6</sub> <sup>3-</sup> oxydoréductase |
|--------------|------------------------|------------|---|
|              | totale                 | complexe I |   |
| wt           | 108 ± 10               | 42 ± 15    | 2054 ± 121  |
| <i>dum23</i> | 47 ± 13                | 0.5 ± 0.5  | 694 ± 156   |
| <i>dum17</i> | 54 ± 12                | 1 ± 1      | 550 ± 86  |

| Souches      | II     | III      | II+III  | IV       |
|--------------|--------|----------|---------|----------|
| wt           | 11 ± 2 | 281 ± 76 | 32 ± 6  | 313 ± 86 |
| <i>dum23</i> | 10 ± 1 | 282 ± 47 | 61 ± 9  | 354 ± 44 |
| <i>dum17</i> | 12 ± 2 | 271 ± 60 | 79 ± 21 | 265 ± 65 |

Tableau 12. Activités spécifiques mesurées chez les souches sauvage et mutantes *dum17* et *dum23*: NADH :duroquinone oxydoréductase (nmoles NADH oxydés.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup>) totale et sensible à la roténone (complexe I), NADH :ferricyanure oxydoréductase (nmoles de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>3-</sup> réduit.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup>), succinate :DCIP oxydoréductase (complexe II; nmoles de DCIP réduit.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup>), succinate :cytochrome c oxydoréductase (complexe II+III; nmoles de cyt c réduit.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup>), décybenzoquinone :cytochrome c oxydoréductase (complexe III; nmoles de cyt c réduit.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup>), cytochrome c oxydase (complexe IV; nmoles de cyt c oxydé.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup>) (moyenne de 4 à 6 séries de mesures indépendantes).

L'activité NADH:duroquinone oxydoréductase totale des mutants *dum23* et *dum27*, comparée à celle de la souche sauvage, est réduite d'environ 50%. De plus, elle est insensible à la roténone. La production d'une sous-unité ND5 tronquée chez le mutant *dum23* abolit donc l'activité roténone-sensible du complexe I.

L'activité NADH:ferricyanure oxydoréductase a été également mesurée. Cette réaction est catalysée par

un groupe de sous-unités du bras périphérique du complexe I, encodées par le génome nucléaire (Galante et Hatefi, 1979), mais aussi par d'autres NADH déshydrogénases localisées dans les membranes mitochondriales ou chloroplastiques (Quiles *et al.*, 1996; Rasmusson et Moller, 1991). La valeur obtenue pour *dum23* (690 nmoles ferricyanure réduit.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> protéines) est nettement plus faible que celle obtenue pour la souche sauvage (2054 nmoles ferricyanure réduit.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> protéines). Par contre, cette valeur est très proche de celle trouvée chez le mutant *dum17*. Ce résultat indique que l'activité du bras périphérique du complexe I intervient pour une part importante dans l'activité totale mesurée chez la souche sauvage et que cette activité est perturbée chez le mutant *dum23*, tout comme chez le mutant *dum17*.

Enfin, les activités des complexes II, III et IV ne sont pas altérées chez les mutants *dum23* et *dum17*, alors que l'activité succinate :cytochrome *c* oxydoréductase (II+III) est sensiblement plus importante (environ 2 fois) (Tableau 12). Egalement observée chez les mutants du complexe I de *Chlamydomonas* (*cf.* publications 2 et 3), une telle augmentation suggère un mécanisme compensatoire. On pourrait penser à une organisation spatiale préférentielle entre les complexes II et III en l'absence d'activité du complexe I. Néanmoins, il est difficile de conclure sur base de ces seules mesures d'activité. Notons que chez *R. capsulatus* la respiration mitochondriale des mutants des gènes *Nuo* homologues aux gènes *ndl*, *2*, *4L*, *5* et *6* est doublée en présence de succinate (Dupuis *et al.*, 1998b) alors que l'activité mitochondriale succinate déshydrogénase de lignées cellulaires humaines mutantes est identique à celle du témoin de type sauvage (Majander *et al.*, 1996).

#### 2.2.4. Analyse de l'assemblage du complexe I chez les mutants *dum23* et *dn26*

En vue d'étudier l'impact de la mutation *dum23* sur l'assemblage du complexe I, nous avons séparé les complexes protéiques mitochondriaux par électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions bleu-natives (BN-PAGE). Le mutant nucléaire *dn26* qui a perdu l'activité du complexe I (*cf.* publication 2) (Remacle *et al.*, 2001a) et pour lequel il n'existe aucune donnée sur l'assemblage de l'enzyme, a également été étudié.

La construction de souches *dum23* et *dn26* sans paroi (mutation nucléaire *cw15*), nécessaires pour l'isolement des mitochondries, a été réalisée en croisant les souches *dum23 mt* et *dn26 mt* (souche 169) avec la souche *cw15 mt*<sup>+</sup> (souche 25). La présence de la mutation *dum23* chez trois descendants sans paroi repris au hasard a été confirmée par dosage de l'activité du complexe I et séquençage du gène *nd5*. Les descendants sans paroi porteurs de la mutation *dn26* ont été identifiés par mesure de l'activité du complexe I. Sur treize clones testés, sept possédaient une activité complexe I nulle. Cette ségrégation mendélienne confirme l'origine nucléaire de la mutation *dn26* (*cf.* publication 2) (Remacle *et al.*, 2001a).

Les mitochondries des souches mutantes ont été ensuite isolées par la méthode de lyse cellulaire à la digitonine. Les souches sans paroi sauvage (souche 25, complexe I de 950 kDa<sup>1</sup>), *dum17* (souche 645, pas d'assemblage du complexe I) et *dum22* (souches 667, sous-complexe de 700 kDa<sup>1</sup>) ont été utilisées comme témoins. Après la séparation des complexes protéiques par BN-PAGE, les activités NADH déshydrogénases ont été détectées dans le gel par la réaction de coloration au NADH/NBT (Figure 17a).

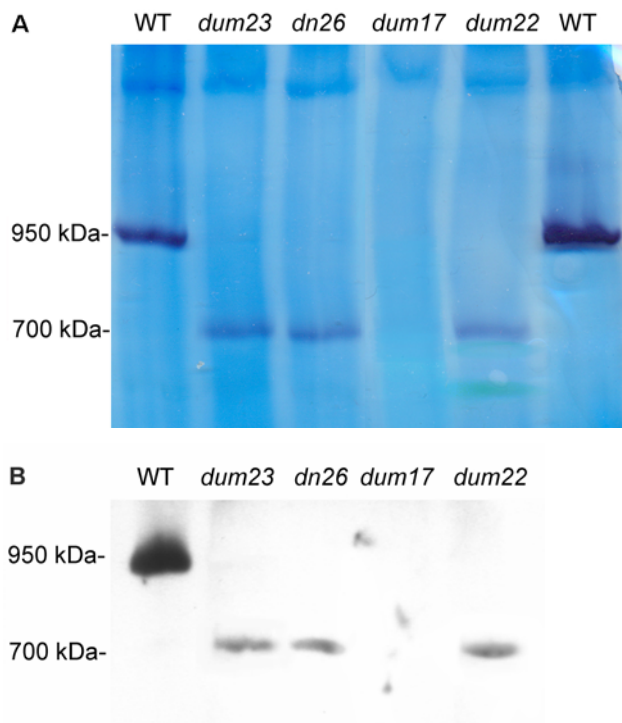
La bande intense à 950 kDa, qui correspond au complexe I, n'est observée que chez la souche sauvage. Par contre, une bande de plus faible intensité est observée pour les mutants *dum23* et *dn26*. Sa position dans le gel est identique à celle du sous-complexe de 700 kDa du mutant *dum22* (Figure 17). Ces résultats ont été confirmés par détection immunologique sur Western blot avec un antiserum dirigé contre le complexe I de *Neurospora* (Figure 17b) et par coloration du gel au Bleu de Coomassie (données non montrées). Il convient de signaler que des trois méthodes de détection, la première est la plus sensible. Toutes révèlent cependant que le sous-complexe de 700 kDa est présent en faible quantité (15-25%) dans les mitochondries mutantes, témoignage de son instabilité ou de son assemblage en quantité réduite.

Nous pouvons donc conclure que la perte des sous-unités ND4 (*dum22*), ND5 (*dum23*), ND4+ND5 (*dum24*) ou encore la présence de la mutation nucléaire non identifiée *dn26* aboutit à la perte du complexe I de 950 kDa et à la formation en faible quantité d'un sous-complexe de 700 kDa. Notons enfin que la bande à activité NADH déshydrogénase d'environ 200 kDa est

<sup>1</sup> Valeurs des masses moléculaires actualisées, *cf.* page 26.



présente chez toutes les souches (données non montrées). Cette bande pourrait correspondre à un assemblage intermédiaire du complexe I (cf. publication 3) (Cardol *et al.*, 2002).



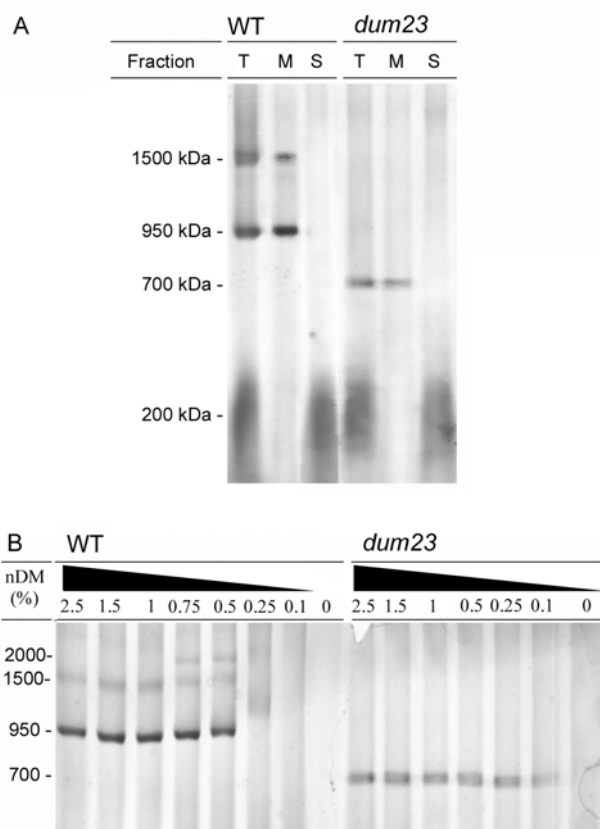
**Figure 17.** BN-PAGE des complexes protéiques mitochondriaux (150 µg de protéines par puits) des souche sauvage, *dum17*, *dum22*, *dum23* et *dn26*, après solubilisation des complexes avec du n-dodécyl-β-D-maltoside (concentration finale de 1,5%). A, mise en évidence de l'activité NADH déshydrogénase par coloration NADH/NBT; B, détection immunologique sur Western blot avec l'anticorps dirigé contre le complexe I de *N.crassa*.

### 2.2.5. Topologie du sous-complexe de 700 kDa

Dans le but de déterminer la localisation du sous-complexe de 700 kDa au sein de l'organite, les mitochondries de la souche mutante *dum23* ont été traitées aux ultra-sons et les fractions solubles et membranaires ont été séparées par centrifugation. La souche sauvage a été utilisée comme témoin. Cette analyse n'est pas envisageable chez les mutants *dum22* et *dum24*, tous deux porteurs d'une grande délétion du génome mitochondrial. En effet, il n'est pas possible d'obtenir chez ces souches des préparations de mitochondries exemptes de contaminants du chloroplaste (cf. Figure 17 et Publication 3), peut-être en raison de l'altération de la structure des mitochondries. On sait en effet que chez un autre mutant de délétion

(*dum11*), l'ultrastructure des mitochondries est affectée : des lacunes sont visibles à l'intérieur de la matrice mitochondriale et on ne détecte que peu de replis de la membrane interne, elle-même parfois interrompue (Dorthu, 1989). Ces observations rappellent celles réalisées sur la structure des mitochondries d'une lignée cellulaire humaine dépourvue d'ADN mitochondrial ( $\rho^0$ ) (Bourges *et al.*).

Après séparation des protéines par BN-PAGE et coloration par la réaction NADH/NBT, nous observons que le sous-complexe de 700 kDa, tout comme le complexe de 950 kDa, est clairement associé à la fraction membranaire, alors que la bande diffuse à activité NADH déshydrogénase d'environ 200 kDa est soluble (Figure 18a).



**Figure 18.** Analyse du complexe I sauvage et du sous-complexe du mutant *dum23* par mise en évidence des activités NADH déshydrogénases après séparation par BN-PAGE des protéines solubilisées au n-dodécyl-β-D-maltoside (nDM). A, fractionnement des mitochondries : T, fraction totale ; M, fraction membranaire ; S, fraction soluble. La concentration finale de nDM est de 1,5% (w/v). B, Essais de solubilisation du complexe I et du sous-complexe de 700 kDa avec des concentrations croissantes de détergent appliquées à des fractions membranaires mitochondriales.

Dans le but de déterminer si l'ancrage du sous-complexe de 700 kDa dans la membrane mitochondriale diffère de celui du complexe de 950 kDa, la fraction membranaire des mitochondries sauvages et mutantes a été traitée par diverses concentrations de détergent, puis le surnageant obtenu après centrifugation a été déposé sur le gel d'électrophorèse (Figure 18b). Alors qu'une concentration de 0,1% en n-dodécyl- $\beta$ -D-maltoside (0,4 mg par mg de protéine) est suffisante pour libérer le sous-complexe des membranes du mutant *dum23*, une concentration plus élevée (0,5%) est requise pour une solubilisation du complexe I natif. Ce résultat suggère que le sous-complexe de 700 kDa, n'est que faiblement associé à la membrane interne de la mitochondrie.

La figure Figure 18a montre également la présence chez la souche sauvage d'une bande de haut poids moléculaire (>1500 kDa), enzymatiquement active. Une bande de masse moléculaire plus importante encore (>2 MDa) est observée lorsque la concentration de détergent est faible (0,5%-0,75%) (Figure 18b). Ces bandes peu colorées pourraient correspondre à des supercomplexes associant différents complexes de la chaîne respiratoire, dont le complexe I. De telles associations ont été mises en évidence chez les bactéries, l'homme, la levure et les plantes supérieures (Eubel *et al.*, 2003; Schagger et Pfeiffer, 2000). Il pourrait aussi d'agir d'un dimère de complexe I comme l'ont suggéré Van Lis *et al* (2003) (van Lis *et al.*, 2003).

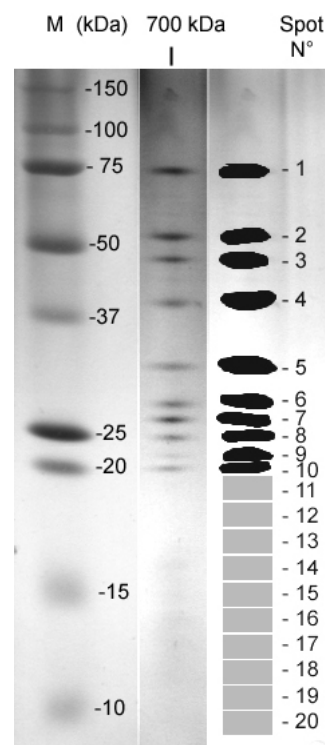
Notons enfin que ces activités déshydrogénases de haut poids moléculaire n'ont jamais été observées chez le mutant *dum23*, pas plus d'ailleurs que chez d'autres mutants du complexe I. Ceci suggère qu'il s'agit bien d'une association impliquant le complexe I de 950 kDa.

### 2.2.6. Analyse protéomique préliminaire du sous-complexe de 700 kDa

Dans le but d'étudier la composition du sous-complexe de 700 kDa, il a été isolé des autres complexes mitochondriaux de la souche mutante *dum23* par BN-PAGE. Ses polypeptides constitutifs ont ensuite été séparés par électrophorèse en gel Tris-Tricine-SDS. Après coloration au bleu de Coomassie, dix bandes distinctes ont été visualisées. Leur masse moléculaire est comprise entre 75 et 19 kDa (Figure 19). Dans la partie inférieure du gel, aucune bande n'a pu être mise en évidence, ce qui suggère que la quantité de sous-

complexe dans l'échantillon était trop faible pour obtenir une coloration des protéines de faible masse moléculaire. Les résultats antérieurs suggèrent déjà que le sous-complexe de 700 kDa s'assemble en faible quantité (15-25% du sauvage, *cf.* 2.2.4). Nos tentatives pour séparer par BN-PAGE des quantités de protéines supérieures à 1 mg ont conduit à des migrations aberrantes.

Les dix bandes colorées ont été découpées du gel et soumises à un traitement à la trypsine. Les peptides ont ensuite été extraits et analysés par spectrométrie de masse (*cf.* publication 1). Parallèlement, le gel dans la région inférieure à 19 kDa a été découpé en dix bandes (Figure 19) qui ont été traitées de la même façon que ci-dessus afin de détecter d'éventuels peptides non mis en évidence par la coloration au bleu de Coomassie.



**Figure 19.** Coloration au bleu de Coomassie des constituants du sous-complexe de 700 kDa du mutant *dum23* séparés par SDS-PAGE (15 % acrylamide ; tampon Tris-Tricine). Le sous-complexe I a été préalablement isolé par BN-PAGE (750  $\mu$ g de protéines mitochondriales). M, marqueurs de masses moléculaires DualColor (Biorad). A la droite du gel se trouve une représentation schématique des bandes analysées par spectrométrie de masse (Tableau 13) après digestion des peptides à la trypsine.

Onze protéines, identifiées précédemment dans le complexe I natif de 950 kDa (*cf.* publication 1) ont été détectées lors de cette analyse (Tableau 13) : sept d'entre elles sont des homologues de constituants du complexe I bovin (75, 51, 49, 39, 30, 24 kDa et AQDQ) ; la protéine de 13 kDa est l'homologue de la sous-unité 20.9 kDa de *N. crassa* ; les trois protéines FBP typiques des végétaux ont été identifiées. Cinq autres protéines, vraisemblablement des contaminants, ont été détectées par cette analyse. Toutes avaient été occasionnellement identifiées dans certaines préparations du complexe I sauvage (données non montrées). Il s'agit de l'homologue de la sous-unité E de l'ATP synthétase vacuolaire identifiée chez *A. thaliana* (numéro d'accension T01918, spot 5,6), de la protéine mitochondriale CR057 (numéro d'accension AAO32620, spot 5), apparentée aux transporteurs de phosphate, d'une protéine membranaire impliquée dans le transport ADP/ATP (numéro d'accension X65194, spot 5), du précurseur de l'anhydrase carbonique (numéro d'accension U41190, spots 8,10,11) et d'une protéine similaire à la protéine S15 de la sous-unité 40S

ribosomale du riz (numéro d'accension AAO37527, spot 14).

Les onze protéines du complexe I de *Chlamydomonas* identifiées dans le sous-complexe I de 700 kDa du mutant *dum23* totalisent une masse moléculaire inférieure à 400 kDa. Un nombre non négligeable de constituants a donc certainement échappé à l'analyse. Dans le cas du complexe I natif, plusieurs protéines de faible masse moléculaire (<14 kDa) et des protéines hydrophobes (en particulier les protéines ND1,2,4,5,6 et 4L) n'avaient pas pu être identifiées par cette approche. Dans le cas du sous-complexe, la détection des protéines est rendue davantage difficile en raison de la faible quantité de matériel mise en oeuvre. Les onze sous-unités ont été identifiées sur base d'un faible nombre de peptides détectés (Tableau 13), par rapport à l'étude réalisées sur le complexe sauvage (*cf.* publication 1).

| spot  | Masse moléculaire (nom de la sous-unité) | N° d'accension | Nombre de peptides identifiés, pourcentage de couverture, et début-fin des peptides |
|-------|--|----------------|---|
| 1     | 76 kDa ( <b>75 kDa</b> )                 | AAQ73136       | 4 (11%) 399-424, 535-549, 594-606, 693-727  |
| 2     | 52 kDa ( <b>51 kDa</b> )                 | AAQ63696       | 3 (8%) 51-61, 365-380,381-390   |
| 3     | 44 kDa ( <b>49 kDa-ND7</b> )             | AAQ63700       | 5 (13%) 209-217, 233-246, 259-270, 409-417, 430-444                                 |
| 4     | 39 kDa ( <b>39 kDa</b> )                 | AAQ55458       | 4 (14%) 166-179, 264-276, 338-355, 356-366  |
| 5     | 34 kDa ( <b>FBP</b> )                    | AAS48197       | 4 (24%) 38-59, 60-73, 124-137, 286-310  |
| 6     | 30 kDa ( <b>FBP</b> )                    | AAS48196       | 3 (12%) 42-52, 137-146, 186-198   |
| 7     | 28 kDa ( <b>24kDa</b> )                  | AAQ63695       | 2 (10%) 53-71, 221-230  |
|       | 28 kDa ( <b>FBP</b> )                    | AAS48195       | 1 (4%) 61-70  |
| 8     | 26 kDa ( <b>30 kDa-ND9</b> )             | AAQ55457       | 1 (5%) 257-269  |
| 9     | <i>N.I.</i>                              |                |   |
| 10    | 19 kDa ( <b>AQDQ</b> )                   | AAQ64640       | 3 (21%) 49-53, 82-93, 171-183   |
| 11-16 | <i>N.I.</i>                              |                |   |
| 17    | 13 kDa ( <b>20.9 kDa</b> )               | AAQ64641       | 1 (11%) 2-14  |
| 18-20 | <i>N.I.</i>                              |                |   |

**Tableau 13.** Sous-unités du complexe I mitochondrial de *Chlamydomonas* identifiées par spectrométrie de masse dans le sous-complexe de 700 kDa du mutant *dum23*.

## 2.3. Inactivation de l'expression des gènes nucléaires *ND4L* et *ND9* par interférence ARN

Les données présentées dans le premier chapitre de la partie Résultats, suggèrent que le complexe I mitochondrial de *Chlamydomonas* est composé de 37 protéines encodées par des gènes nucléaires et de 5 protéines ND encodées par le génome mitochondrial. L'analyse par spectrométrie de masse a permis l'identification de 30 des 37 protéines d'origine nucléaire. Cette approche ne donne cependant aucun renseignement sur la fonction des protéines.

Chez *Chlamydomonas*, comme chez de nombreux organismes, la transformation du génome nucléaire s'effectue généralement par recombinaison illégitime et la recombinaison homologue est beaucoup plus rare (Pazour et Witman, 2000). Ainsi, le rapport obtenu entre les événements d'intégration ciblée et ceux d'intégration aléatoire est trop faible pour permettre des approches de mutagenèse dirigée (*gene-targeting*). En 1998, il a été montré chez *C. elegans* que l'introduction d'un ARN double-brin (ARNds) induisait l'inactivation de l'expression du gène correspondant (Fire *et al.*, 1998). Bien que le mécanisme d'interférence entre l'ARNds et l'expression d'un gène spécifique ne soit pas complètement élucidé, cette technique constitue une alternative de choix pour étudier la fonction d'un gène tant chez les plantes supérieures que chez *Chlamydomonas* (Fagard et Vaucheret, 2000; Fuhrmann *et al.*, 2001).

Dans le cadre de notre étude du rôle des sous-unités ND au sein du complexe I, nous avons envisagé d'appliquer cette technique dans le but d'inactiver l'expression des gènes *ND9* et *ND4L* chez *Chlamydomonas*<sup>2</sup>. Les protéines Nd4L et Nd9 sont, avec Nd3 et Nd7, encodées dans le noyau alors que les gènes correspondants sont présents dans le génome mitochondrial chez les plantes supérieures. Notons que de ces quatre protéines, seule Nd4L n'a pas été identifiée par spectrométrie de masse.

### 2.3.1. Construction des vecteurs d'inactivation pour l'interférence ARN

#### 2.3.1.1. Stratégie

L'inactivation de l'expression d'un gène nucléaire par RNAi chez *Chlamydomonas reinhardtii* repose sur la transformation du génome nucléaire avec une construction comprenant un promoteur, une partie de la séquence génique cible (comprenant éventuellement des introns) et la partie correspondante de l'ADNc en orientation anti-sens (Fuhrmann *et al.*, 2001; Sineshchekov *et al.*, 2002).

Le promoteur utilisé est dérivé du promoteur du gène *NIA1*. Chez *Chlamydomonas reinhardtii*, l'expression du gène *NIA1* encodant la nitrate réductase est contrôlée au niveau transcriptionnel par la lumière et par la source d'azote. Les transcrits *NIA1* sont très abondants dans des cellules cultivées en milieu additionné de nitrate de potassium ou en milieu carencé en azote. Par contre, les mRNA sont peu abondants lorsque les cellules sont mises en présence d'ions ammonium (Quesada et Fernandez, 1994). Récemment, Loppes et Radoux (2002) ont démontré qu'une séquence de 84 pb du promoteur *NIA1*, fusionnée au promoteur minimal du gène codant pour la  $\beta$ -tubuline, est suffisante pour assurer la régulation d'un gène rapporteur par la source d'azote (Loppes et Radoux, 2002). Nous avons choisi d'utiliser ce promoteur chimérique et inductible (plasmide pNB1) et d'y cloner en aval les séquences sens-antisens des gènes cibles.

<sup>2</sup> Les résultats présentés dans les sections 2.3.1.5, 2.3.2.1, 2.3.2.2 et 2.3.4 ont été obtenus en collaboration avec Pierre Minet et Dorothee Pirote dans le cadre de leur mémoire de licence (Minet P., 2003; Pirote D, 2003).

**2.3.1.2. Séquence et structure du gène ND9**

L'ADNc du gène *ND9* a une taille de 1540 pb (Numéro d'accèsion Genbank AY351261). Des cinq codons ATG (positions 101, 125, 215, 296 et 353) (Figure 20), aucun ne possède un environnement qui s'accorde parfaitement au consensus (A/C)A(A/C)(A/C)ATG(G/C)C(C/G) défini par Silflow pour les codons initiateurs de *Chlamydomonas* (Silflow, 1998). Le premier codon ATG a donc été considéré par défaut comme le codon initiateur. Jusqu'au codon Stop, dont l'environnement correspond au consensus prédéfini (GTAAA) (Silflow, 1998), la séquence obtenue encode un polypeptide de 282 acides aminés avec une masse moléculaire estimée à 32,1 kDa.

```

1   CGTTGCATTGCTTGAAGTCTAGCATACCATTGATAACTTAGGTGTGGCCCTCC
52  GGGGTGCGAAGCTGAGTTTACAGGCACCGGGTTCGCTTCTGTGCGCACGAT
103 GAAGTCCGCTCAGTCGCTTCTCATGAGCTGCAGGCGCCCATTAAGGGCTG
154 CCTGCAGCAGGGAACCTCCGAGGGTCTGCGCTCGTTCGCTGCTCCGCTCT
205 GGGCTCGGCGATGGAGACTTCCCTGATACCTGAGGCCAACAGCGCCAGCAC
256 CAGCGCTAGCTCAGGCTCGCAGCTGCAGCAGACTCGTAGCATGGGCTATGC
307 TTACGCCCGAAGACCAGGACAGGACTACATCGCAGCGAGCACATGCA
358 GCGGTCGGCAACACCGCAGCTGACGGATTATATTATTAAGACGGTGGCGAA
409 ATTTGTGAAGATGGCGCTCACCGGCCAGCCGAGAGCGGTGCTTACCA
      ND9-RNAi-3F →
460 GGAGCCCACGATATACACCAGCCTGAGAGCCTGGTGGCCGCTATGGTTTT
511 CCTGCGCAGCACACCAACTCAGTTCAAGTGCCTGCTGGACGTGACGCG
562 GGTGGACTTCCCGAGCGTCCCGCGGTTTCGAGGTGGTGTACCACTCCT
613 CAGCCCCGCTGGAACACCCGATCCCGGTGAAGGTGTGCGTGGACGAGGT
      ← ND9-2R
664 CACGGCCGTGCCACCCTTCGCAAGGTGTTCAACACCGCCCAACTGGTTTGA
715 GCGGAGACGTTGGACATGTTGCGGCTGTTCTTCAGCGGCCATCCCGACCT
766 GCGCGCATCCTCACCAGCTACGGCTTCCAGGCCACCCGCTCGCAAGGA
817 CTTCCGATGACCGGCTACCAAGGAGTGCCTGACGACTACGGCAAGAAGCG
868 CGTGGTGTGCGAGCCGCTGGAGCTGACGAGGAGTTGAG
      GTGCGCTGGGTC
AGAGGCGCGAAAGGAGCATGGGCGGGAGCAGGGCTGCATGTGGATGGTGT
GGCGCTCGGGATGCCAGTGCAGGCTGGCAGCTGCAAGGCTAGGGAGGTGCA
TGAGGAAGGAAGTACGCGCGGTCACCTTGTGCGGAGCAAAAGGGGCGAG
CATCGCAGGGCGTTGGGCGTGGGACTGGGCGGGTGGATGCTTCCGGCAGC
GCCATCCGTACTGAGCGCTTCCAGCCTCAAGAAGCTTTCACGCAACCTT
TTTTGTGCGGAGCTGTAACCACTTACCTTTTTGTAATCCGACCACCAAG
AG
      ← ND9-RNAi-4R
917 GTACTTTGACTTCAACAGCCCTTGGGAGACGCTGAACCGGTAAAGCAAT
968 GGAGCCCGGAGCGATGGCGCTTGGCGCCTTGCAGAGTTGGCAGAGGGAGC
1019 TGGCAGCGGGGGCAATGCAATTGCTGGCGCCGCTTGTCACTGGCTCGCT
1070 GCTGTAAGACACGCGGGGCAATGCTGGCGCGGCTGGTTTTGTGGTGAG
1121 GGTGGTATTAAGGTGTCGGTAAGGAGGAGGCGGTTGAGGGCACTGGTTCA
1172 ATGCAGTCGTTGTTGTTGTCGAAGGTGTCCTGTTGTAATGCATGGCT
1223 GTCGGCACTCCGCACACTTGTGCGCAAGTCTAGGATGTAGCGAGTCTCAA
1274 CGCTCCGAGTCACTCGAGAGTGGGTTTTGCAAGTGTATTTCGCGCGG
1325 ACCATGCTTCAGTTGAGGGGTTAGCAAGGCAACGATTGGCCAGACAGG
1376 ACTGACAGTAGTGTGTTGCGGCTTCAAAGCTTAACAACCTTGACAGCAGGAA
1427 GGGATTGTAGCATATGGATTAGGTGTGATGCGTGTGTCGCGCTCAGGCA
1478 CCGCGTGGGACGCGCTGATGTAGTTTCGGCAGCTGTAAGGTCCACGTTGGAT
1529 ATCA
    
```

**Figure 20.** Séquence du gène et de l'ADNc *ND9*. Les codons initiateurs potentiels (ATG) et le codon Stop sont en caractères gras. Les frontières entre l'intron (bases non numérotées) et les exons sont surlignées en gris. Les séquences des amorces utilisées pour la construction ARN interférence (2.3.1.3) sont soulignées.

L'alignement de la séquence de l'ADNc avec la séquence génomique<sup>3</sup> permet d'identifier dans la partie 3' de la séquence codante, un intron unique de 320 pb dont les frontières intron/exon (CAG/GTGGCG) et exon/intron (ACAG/G) correspondent parfaitement aux consensus définis chez *Chlamydomonas* (Silflow, 1998).

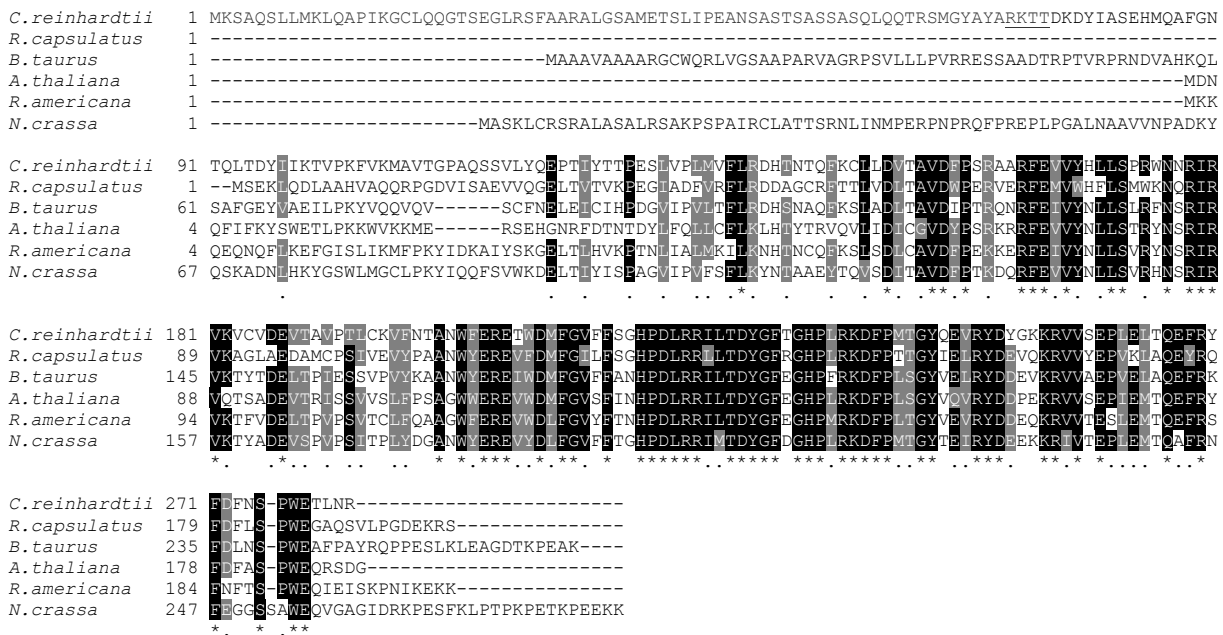
La séquence de la protéine Nd9 a été alignée avec celle de cinq homologues représentatifs des divers règnes du vivant (Figure 21). Les 150 acides aminés de l'extrémité C-terminale de la protéine sont hautement conservés (40 % d'identité, 85% de similarité). Les séquences N-terminales des protéines ne présentent par contre aucune similarité. En particulier, les protéines de *Chlamydomonas*, du bœuf et de *Neurospora*, toutes trois encodées par un gène nucléaire, possèdent une extension N-terminale (60-90 acides aminés) absente de la protéine NUOC procaryotique (*Rhodobacter*) et des protéines encodées dans le génome mitochondrial (*Arabidopsis* et *Reclinomonas*). Chez les plantes, les peptides de transit N-terminaux ont une longueur comprise entre 20 et 80 acides aminés, sont riches en leucine, sérine, alanine et arginine mais généralement pauvres en tryptophane, histidine, cystéine et en acides aminés chargés négativement (aspartate et glutamate). En amont du site de clivage, des résidus arginine sont souvent rencontrés en positions -2 et -10 (R-X<sub>7</sub>-R-X↓A/S-T/S) ou plus rarement en positions -3 et -11 (R-X<sub>7</sub>-R-X-X↓A/S-T/S) (Glaser *et al.*, 1998).

Un site potentiel de clivage R-X<sub>7</sub>-R-K↓T-T est localisé à la position 73 de la séquence de Nd9 de *Chlamydomonas*. Parmi les 73 premiers acides aminés, huit leucines, treize sérines, douze alanines et quatre arginines sont dénombrées tandis qu'on ne trouve que trois résidus glutamate, une cystéine et aucun aspartate, tryptophane ou histidine.

Notons que la masse moléculaire de la protéine Nd9 a été estimée sur gel à 25 kDa (*cf.* publication 1), taille qui pourrait correspondre au clivage des 73 premiers acides aminés. Un séquençage N-terminal de la protéine mature permettrait de confirmer ou d'infirmer cette hypothèse.

Signalons enfin qu'aucune hélice amphiphile ou transmembranaire n'est prédite par les logiciels de prédiction TMHMM et TMPRED ou en réalisant un profil d'hydropathie (données non montrées).

<sup>3</sup> Accessible sur le site internet du « Us Department of Energy Joint Genome Institute » (<http://genome.jgi-psf.org/chlre2>)



**Figure 21.** Alignement multiple de la séquence polypeptidique Nd9 de *C. reinhardtii* (AAQ55457) avec la séquence de la protéine NUOC du procaryote *Rhodobacter capsulatus* (O84971) et des protéines ND9 d'*Arabidopsis thaliana* (Q95748), de *Reclinomonas americana* (O21271), de *Bos taurus* (P23709) et de *Neurospora crassa* (P23710). Le site potentiel de clivage de la protéine Nd9 de *Chlamydomonas* (RK↓TT) est souligné.

### 2.3.1.3. Construction du vecteur pND9-RNAi

Pour réaliser la construction d'inactivation, le couple d'amorces ND9-RNAi-3F/ND9-RNAi-4R (Figure 20) a été utilisé pour amplifier un fragment de 801 pb d'ADN génomique (y compris l'intron de 320 pb) et le fragment d'ADNc correspondant (481 pb). Pour faciliter les étapes ultérieures de clonage, les amorces contiennent respectivement en 5' les séquences des sites de restriction *ClaI* et *HindIII* pour la première, *HindIII* et *PstI* pour la seconde. Les différentes étapes de la construction sont schématisées à la Figure 22. Brièvement, les produits de PCR (825 pb et 505 pb) ont été clonés dans le plasmide pGEM-T *Easy* (pND9-1 et pND9-2). Le fragment d'ADNc, libéré du pND9-2 par restriction avec l'enzyme *HindIII* a ensuite été cloné

dans le pNB1 (2895 pb), préalablement linéarisé en son site unique *HindIII*. L'orientation de l'insert a été déterminée par deux PCR à l'aide d'une amorce située dans la séquence de l'ADNc (ND9-2R) couplée aux amorces universelles (PU et PR) situées de part et d'autre du site d'insertion (données non montrées). Le plasmide pND9-AS (3388 pb), qui contient le fragment d'ADNc en orientation anti-sens par rapport au promoteur, a ensuite été digéré par les enzymes *ClaI* et *PstI*, dont les sites de restriction sont distants de 6 pb. Le fragment génomique *ClaI/PstI* de 819 pb du pND9-1 y a été cloné. Les plasmides de dix clones amp<sup>r</sup> ont été analysés par restriction avec l'enzyme *HindIII* afin d'identifier ceux qui possèdent la construction complète (pND9-RNAi, 4189 pb) (données non montrées).

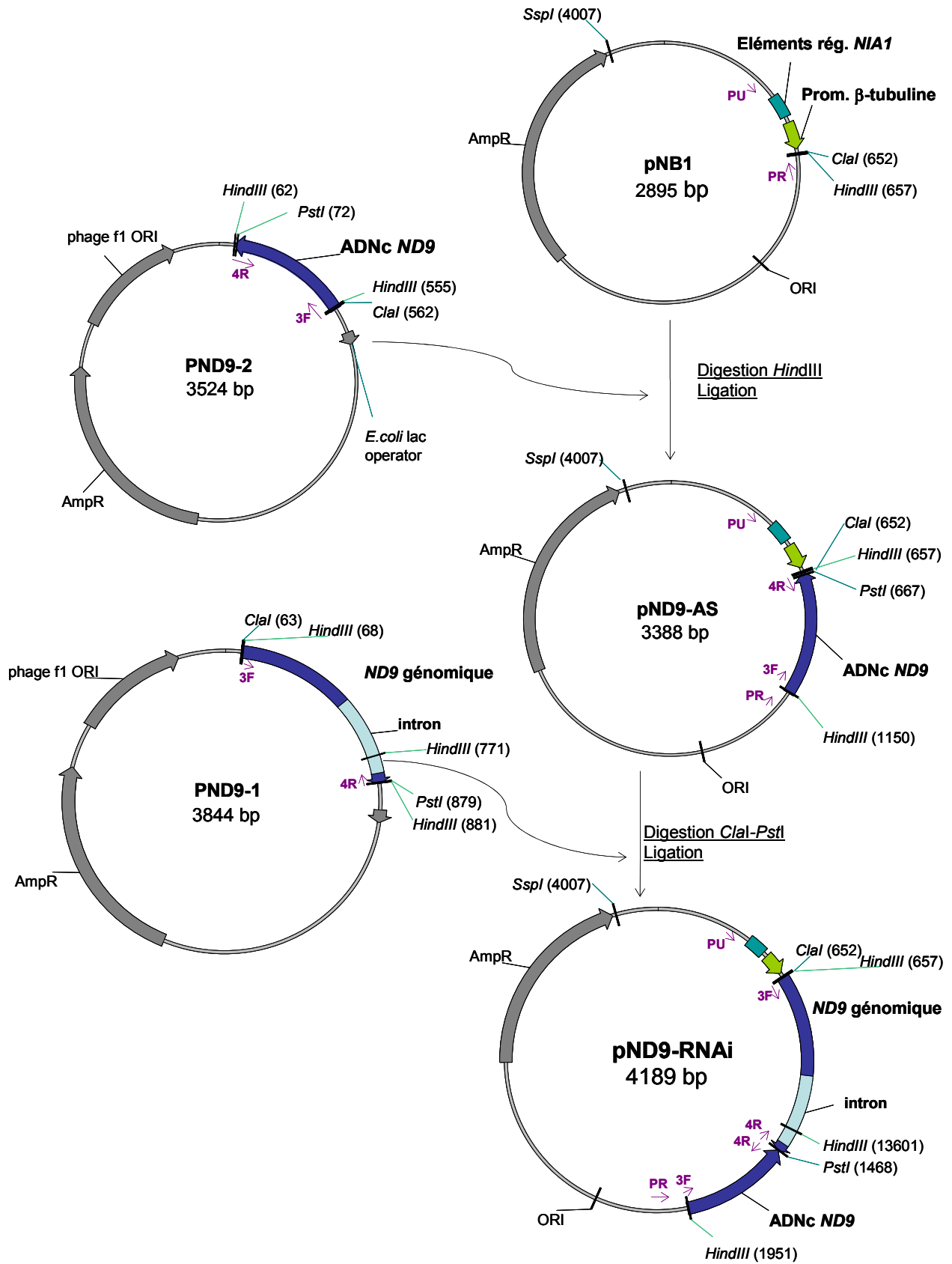
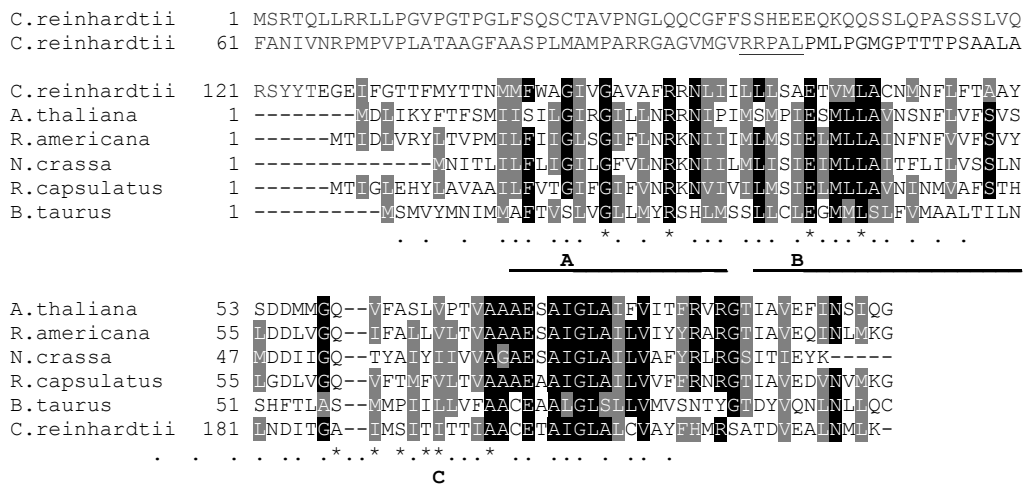


Figure 22. Résumé des étapes de construction du vecteur d'inactivation de l'expression du gène ND9.



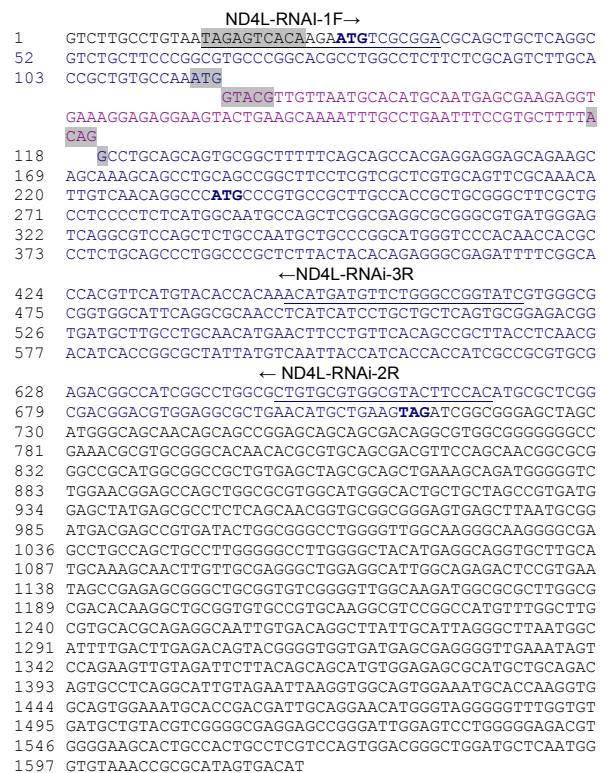


**Figure 23.** Alignement de la séquence polypeptidique Nd4L de *C. reinhardtii* (AAO61142) avec la séquence de la protéine NUOK du procaryote *Rhodobacter capsulatus* (P50940) et des protéines ND4L d'*Arabidopsis thaliana* (NP\_051111), *Neurospora crassa* (P05509), *Reclinomonas americana* (NP\_044799) et *Bos taurus* (P03902). Les trois segments transmembranaires (A,B,C) (Walker, 1992) et les deux sites potentiel de clivage de la protéine Nd4L de Chlamydomonas (RRP↓AL, RSS↓YT) sont soulignés.

### 2.3.1.4. Séquence et structure du gène ND4L

L'ADNc du gène *ND4L* a une taille de 1616 pb (Numéro d'accèsion Genbank AY216717) (Figure 24). Les deux premiers codons ATG (positions 27 et 234 sur l'ADNc) possèdent un environnement qui correspond relativement bien (5 bases sur 7) au consensus des codons initiateurs chez Chlamydomonas (Silflow, 1998). Du premier ATG au codon Stop (TAG), le polypeptide déduit compte 227 acides aminés pour une masse moléculaire prédite de 24,2 kDa. La comparaison entre l'ADNc et la séquence génomique<sup>4</sup> permet d'identifier entre les deux premiers codons ATG un intron unique de 90 pb dont les frontières correspondent aux consensus définis chez Chlamydomonas (Silflow, 1998).

La séquence de la protéine Nd4L a été alignée avec ses homologues eucaryotes et bactérien (Figure 23). Rappelons que chez tous les autres eucaryotes, cette sous-unité est encodée dans le génome mitochondrial. La séquence de Chlamydomonas se distingue des autres polypeptides par une extension N-terminale de 125 acides aminés. Deux sites potentiels de clivage R-X<sub>7</sub>-R-R-P↓A-L et R-S-Y↓Y-T sont localisés aux positions 101 et 123. Parmi les 101 premiers acides aminés, huit leucines, dix sérines, douze alanines et six arginines sont dénombrées tandis qu'on trouve seulement trois glutamates, deux cystéines, une histidine et aucun aspartate ou tryptophane.



**Figure 24.** Séquence du gène et de l'ADNc *ND4L*. Les deux codons initiateurs potentiels (ATG) et le codon Stop sont en caractère gras. Les frontières entre l'intron et les exons sont surlignées en gris. Les séquences des amorces utilisées pour la construction ARN interférence (2.3.1.5) sont soulignées.

<sup>4</sup> Accessible sur le site internet du « *Us Department of Energy Joint Genome Insitute* » (<http://genome.jgi-psf.org/chlre2>)



A l'exclusion de cette extension N-terminale qui présente donc les caractéristiques d'une séquence d'adressage mitochondriale (Glaser *et al.*, 1998), les protéines partagent 10% d'identité et 64% de similarité. Les trois segments transmembranaires prédits pour la protéine ND4L bovine (Walker, 1992) sont également signalés par les logiciels de prédiction pour toutes les protéines et correspondent aux régions les mieux conservées entre les organismes (Figure 23).

### 2.3.1.5. Construction du vecteur pND4L-RNAi

Pour réaliser la construction d'inactivation de l'expression du gène *ND4L*, des fragments de 742 et 541 pb du gène (y compris l'intron) ont été amplifiés à l'aide de l'amorce ND4L-RNAi-1F combinée respectivement aux amorces ND4L-RNAi-2R et ND4L-RNAi-3R (Figure 24). Pour faciliter les étapes ultérieures de clonage, les amorces contiennent en 5' les séquences des sites de restriction *ClaI* et *HindIII* (1F) ou *HindIII* et *NcoI* (2R et 3R). Les différentes étapes de la construction sont schématisées à la Figure 25. Brièvement, les deux fragments (766 et 565 pb) ont été clonés dans le plasmide pGEM-T Easy (pND4L-1 et pND4L-2). Le fragment de 553 pb libéré du pND4L-2 par restriction avec l'enzyme *HindIII* a ensuite été cloné dans le pNB1 (2895 pb) ouvert en son site unique *HindIII*. La présence de l'insert dans le pNB1 et son orientation ont été évaluées par digestion des plasmides de 20 transformants résistants à l'ampicilline. Des fragments de restriction *BamHI/StuI* de 446 pb et 546 pb sont observés selon que l'insert est en orientation sens ou anti-sens par rapport à la séquence promotrice (données non montrées). Le plasmide pND4L-AS (3448 pb), qui contient le fragment en orientation anti-sens a ensuite été digéré par les enzymes *ClaI* et *NcoI* dont les sites de restriction sont distants de 6 pb. Le fragment de restriction *ClaI/NcoI* de 754 pb du pND4L-1 y a été cloné. Après transformation avec le mélange de ligation, les plasmides de dix clones amp<sup>r</sup> ont été analysés par restriction afin d'identifier ceux qui possèdent la construction complète (pND4L-RNAi, 4190 pb). La présence de l'insert de 754 pb a été démontrée par digestion avec les enzymes *ClaI* et *NcoI*. Par ailleurs, la restriction du plasmide par l'enzyme *HindIII* génère une bande à 2,9 kb (pNB1) et un fragment de 1,3 kb correspondant aux deux fragments tête-bêche du gène *ND4L* (données non montrées).

## 2.3.2. Intégration des cassettes d'expression RNAi et criblage des transformants

### 2.3.2.1. Co-transformation avec les plasmides pND9-RNAi et pND4L-RNAi.

Nous avons digéré les plasmides pND9-RNAi et pND4L-RNAi avec l'endonucléase *SspI* dont le site de clivage est en dehors de la construction chimérique (Figure 22 et Figure 25). Plusieurs études ont en effet montré que l'intégration de petits plasmides linéarisés dans le génome nucléaire de *Chlamydomonas* s'effectuait préférentiellement par les extrémités de l'ADN linéarisé (Adam et Loppes, 1998; Cerutti *et al.*, 1997). Afin de s'assurer que la région des plasmides correspondant au promoteur chimérique était bien conforme à celle décrite par Loppes et Radoux (Loppes et Radoux, 2002), leur séquence a été établie par séquençage à l'aide du primer universel (PU).

Nous avons ensuite réalisé une co-transformation avec les plasmides pRNAi digérés (4 µg) et le pASL (1 µg linéarisé en son site *BamHI*) qui porte le gène sauvage de l'argininosuccinate lyase (*Arg7*). La souche sans paroi auxotrophe pour l'arginine (325.2) a été transformée par la méthode des billes de verre. Après 8 jours de croissance en lumière vive, 120 colonies capables de croître sur milieu gélosé dépourvu d'arginine ont été isolées pour chacune des deux co-transformations.

### 2.3.2.2. Sélection et criblage des co-transformants

Afin de vérifier l'intégration des plasmides pND9-RNAi et pND4L-RNAi au sein du génome des transformants arg<sup>+</sup>, des PCR ont été réalisées sur l'ADN des 2x120 colonies avec des couples d'amorces qui permettent d'amplifier les parties gauche (promoteur + fragment en orientation sens : amorces PU/ND4L-RNAi-3R, PU/ND9-2R) et droite (fragment en orientation anti-sens : amorces PR/ND4L-RNAi-3R et PR/ND9-2R) des deux constructions (données non montrées).

Cette analyse a permis de conclure que respectivement 60 et 28 transformants avaient intégré dans leur génome les deux parties des plasmides pND9-RNAi (souches coND9) ou pND4L-RNAi (souches coND4L), ce qui correspond à des taux de co-transformation respectifs de 50% et 23%.

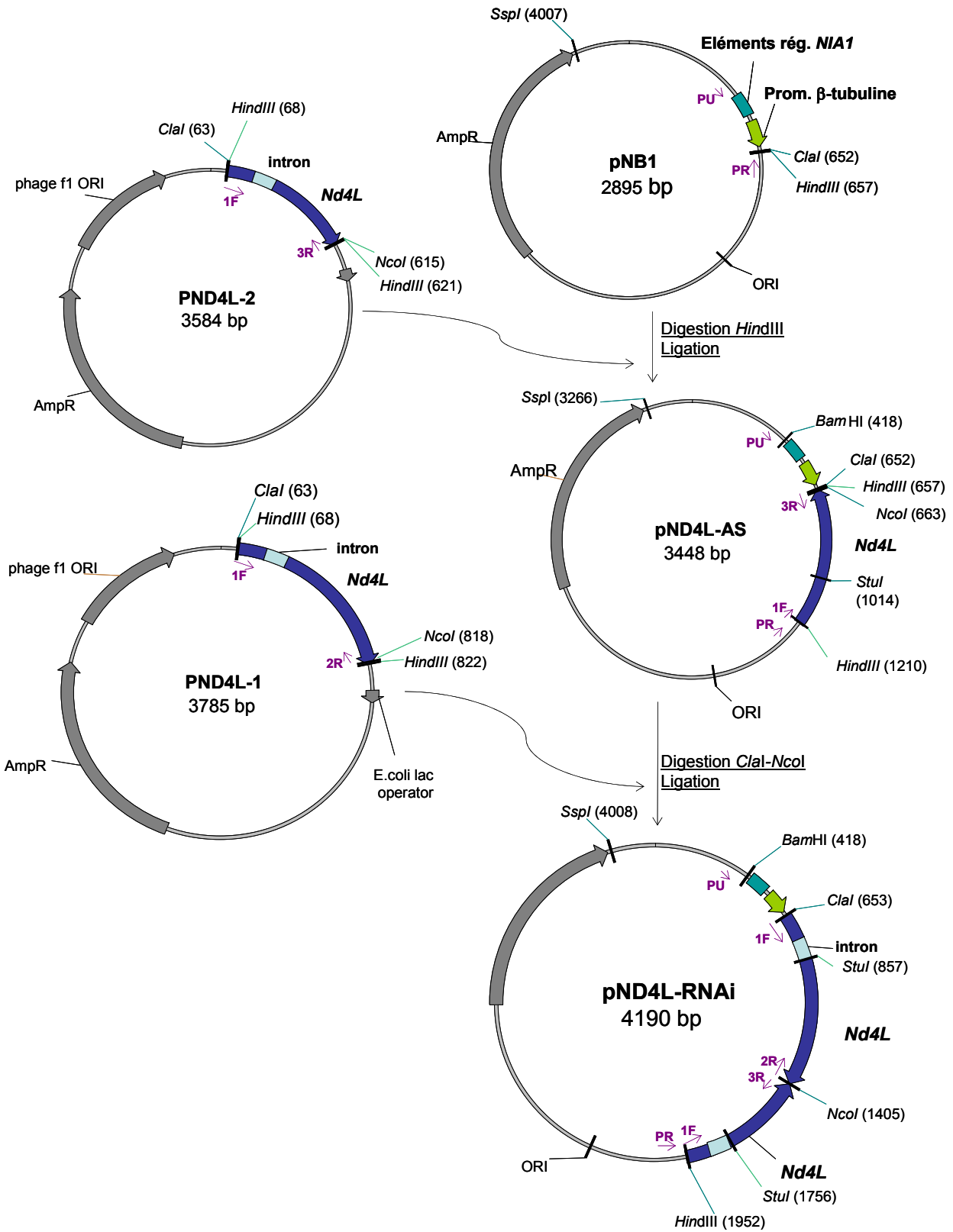


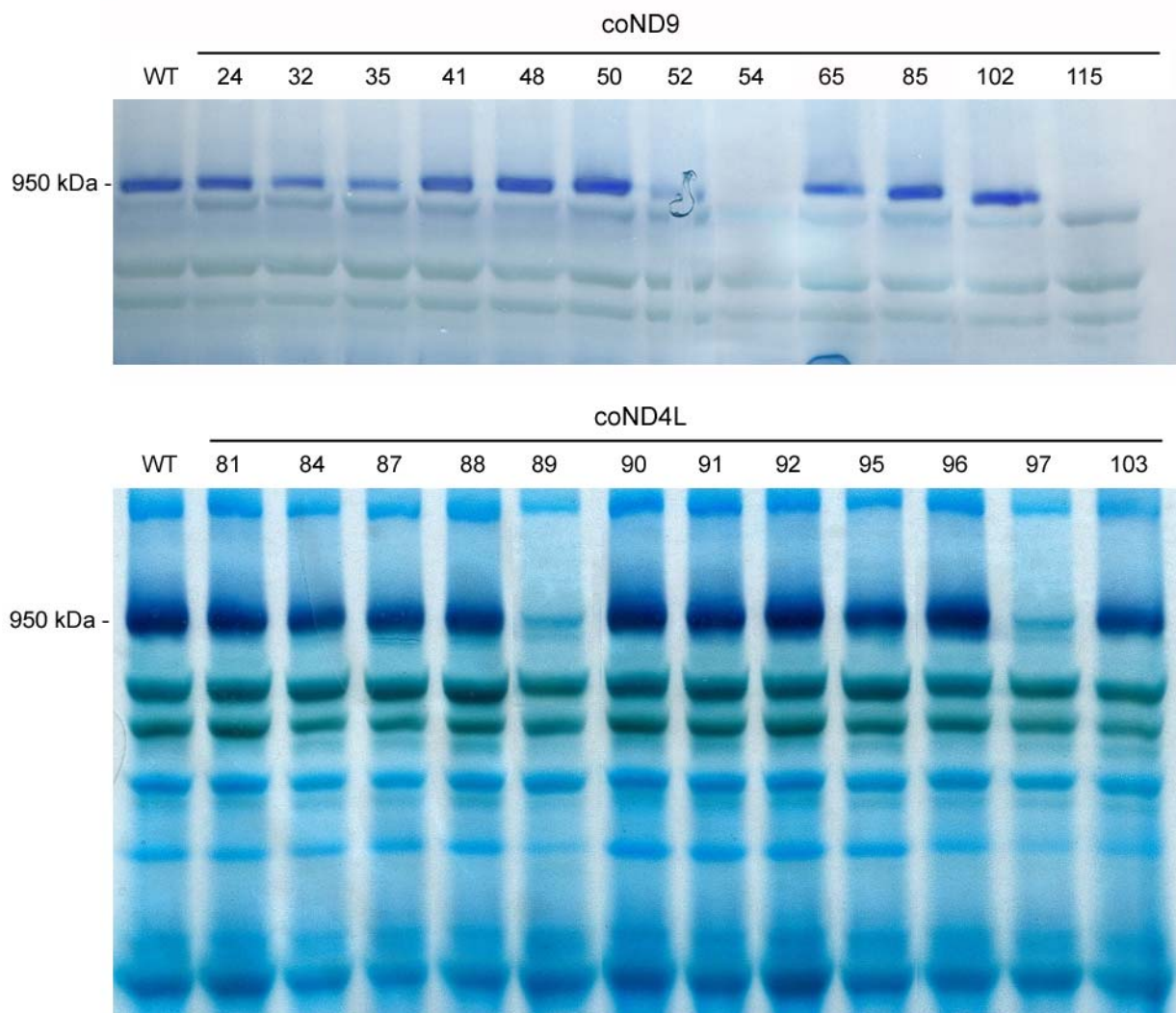
Figure 25. Schéma des étapes de la construction du vecteur pND4L-RNAi.

Dans l'optique de réaliser un crible rapide des co-transformants, l'activité du complexe I a été analysée par BN-PAGE d'extraits protéiques totaux. Brièvement, les co-transformants préalablement cultivés sur milieu classique TAP+NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ont été transférés sur milieu TAP+NO<sub>3</sub><sup>-</sup> afin d'induire l'expression de la construction chimérique. Après 2 jours de croissance, les cellules ont été détruites aux ultrasons et les protéines totales solubilisées au n-dodécyl-β-D-maltoside. Après électrophorèse des protéines en gel bleu natif, l'activité NADH déshydrogénase du complexe I a été mise en évidence dans le gel par coloration NADH/NBT. Une bande de coloration intense (~950 kDa) correspondant au complexe I est détectée chez la souche sauvage et chez la majorité des co-transformants (Figure 26) Sur les 60 co-transformants co-ND9, trois (coND9-54, -78 et -115) présentent une bande de très faible activité enzymatique (<5%) tandis que deux autres (coND9-52 et -81) présentent une réduction d'environ 50%. Sur les

28 co-transformants co-ND4L, deux (coND4L-89 et-97) montrent également un signal très faible (<5%).

Ces données suggèrent que dans les deux cas, environ 8% des co-transformants présentent une extinction de l'expression des gènes correspondants. Plus de 90% n'exprimeraient pas l'ARNds suite peut-être à l'intégration de la cassette dans une région transcriptionnellement inactive (effet de position). Notons que la probabilité que l'intégration de la construction ait entraîné la dislocation d'un gène impliqué l'assemblage du complexe I est négligeable et peut être estimée à 0,1-0,2%.

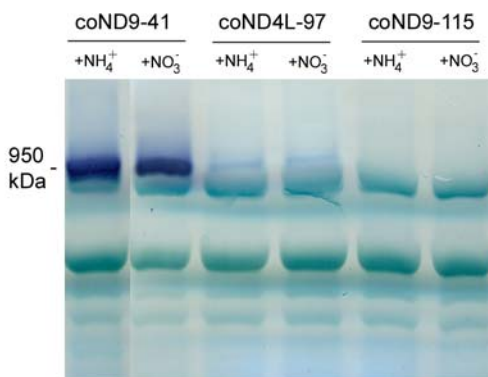
**Figure 26.** Crible des co-transformants coND9 et coND4L par BN-PAGE. Les protéines d'un extrait total (100 µg par puits) des souches cultivées sur milieu TAP+NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ont été solubilisées avec du n-dodécyl-β-D-maltoside à la concentration finale de 1,5% (w/v). Après électrophorèse, le gel a été incubé dans une solution de coloration au NADH/NBT.



### 2.3.2.3. Régulation de l'inactivation par le promoteur inducible PNIT/TUB

Le promoteur chimérique NIT/TUB est fort peu exprimé en présence d'ammonium (Loppes et Radoux, 2002). Afin de tester si la répression de l'expression des constructions chimériques conduit à une diminution de l'activité NADH déshydrogénase du complexe I, les souches ont été cultivées sur milieux TAP+NH<sub>4</sub><sup>+</sup> et TAP+NO<sub>3</sub><sup>-</sup>. Après séparation des protéines par BN-PAGE, nous n'avons observé aucune différence d'activité du complexe I (NADH/NBT) entre les deux conditions de culture (Figure 27).

En raison des effets de position, l'importance du niveau de transcription du locus RNAi dans l'inactivation post-transcriptionnelle du gène cible n'est pas connue (Fagard et Vaucheret, 2000). Nos observations laissent penser que le niveau d'expression basal assuré par le promoteur minimal de la β-tubuline est suffisant pour induire le phénomène d'interférence ARN. Néanmoins, on peut aussi supposer que plusieurs événements d'intégration de la construction ont eu lieu dans les différentes souches, et qu'au moins une des constructions est exprimée de manière constitutive (délétion des éléments régulateurs, environnement transcriptionnel élevé).

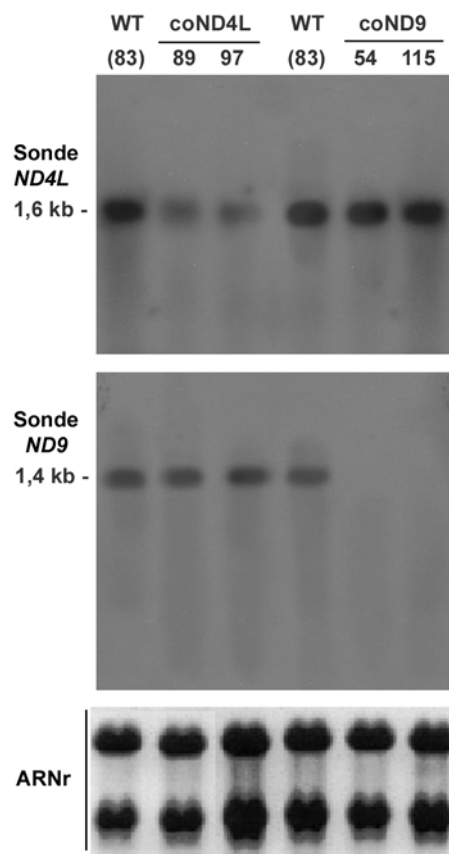


**Figure 27.** Effet de la source d'azote sur l'activité NADH:NBT oxydoréductase du complexe I des souches coND9-41, coND4L-97 et coND9-115. Les protéines d'un extrait total (120 µg par puits) des souches cultivées sur milieu TAP+NH<sub>4</sub><sup>+</sup> ou TAP+NO<sub>3</sub><sup>-</sup> ont été solubilisées avec du n-dodécyl-β-D-maltoside à la concentration finale de 1,5% (w/v). Après électrophorèse, le gel a été incubé dans une solution de coloration au NADH/NBT.

### 2.3.3. Analyse des transcrits

Dans le but de mettre en évidence une possible dégradation spécifique des transcrits des gènes *ND4L* et *ND9* dans les souches coND4L-89, -97 et coND9-54, -

115, les ARN ont été analysés par hybridation sur Northern blot à l'aide de sondes spécifiques aux gènes *ND4* et *ND9*. Les sondes ADN ont été amplifiées à partir des plasmides pND4L-2 et pND9-2 puis marquée au <sup>32</sup>P (cf. Matériel et Méthodes). Dans chaque cas, la sonde reconnaît chez la souche sauvage un transcrite unique (Figure 28). Les tailles des transcrits correspondent aux tailles des ADNc déterminés par le « *Chlamydomonas Genome Project* » (1,54 kb pour l'ADNc du gène *ND9* et 1,62 kb pour l'ADNc du gène *ND4L*). Chez les deux souches coND4L, le signal correspondant aux transcrits du gène *ND4L* diminue considérablement (60-70 %) alors que des signaux d'intensité identique à celui du témoin sont observés avec la sonde *ND9*. Chez les deux mutants coND9, les niveaux des transcrits *ND4L* sont équivalents à ceux de la souche sauvage. Par contre, aucun signal n'est mis en évidence avec la sonde *ND9*.



**Figure 28.** Northern blot des transcrits des gènes *ND4L* et *ND9* chez les souches sauvage (83) et mutantes coND4L, coND9. Les sondes *ND4L* (~600 pb) et *ND9* (~500 pb) marquées au P<sup>32</sup> ont été utilisées. Après électrophorèse des ARN totaux (15 µg), le gel a été coloré au bromure d'éthidium. Les ARNr sont montrés comme contrôle de chargement.

La diminution drastique (ou l'extinction) de l'activité NADH:NBT oxydoréductase du complexe I des souches coND4L-89, -97 et des souches coND9-54, -115, est donc liée à une réduction significative et spécifique des transcrits *ND4L* et *ND9*. Notons que dans une expérience sur l'inactivation post-transcriptionnelle de l'expression du gène encodant l'opsine chez *Chlamydomonas*, Furmann *et al.* ont observé une réduction du niveau des transcrits non corrélée à la diminution de la protéine correspondante (Furmann *et al.*, 2001), dans un rapport similaire à celui observé pour les souches coND4L-89 et -97.

### 2.3.4. Impact de l'inactivation de l'expression des gènes sur l'activité et l'assemblage du complexe I

L'activité spécifique NADH:ferricyanure oxydoréductase d'extraits membranaires des souches mutantes coND4L-89, -97 et coND9-54, -115 a été comparée à celle de la souche sauvage (wt *cw15*) et des co-transformants coND4L-85 et coND9-41 dont l'activité NADH déshydrogénase n'est pas affectée (Figure 26). Chez les quatre mutants, elle oscille entre 12% (coND9-115) et 30% (co-ND4L-89) de l'activité de la souche sauvage (Tableau 14) Ces données confirment que l'activité du bras périphérique est perturbée chez les mutants.

L'activité spécifique du complexe I a été également mesurée. Chez les trois souches témoins, elle représente environ 50% de l'activité NADH:duroquinone oxydoréductase totale (~50 nmoles de NADH oxydés. min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> protéines). Par contre, elle est très faible (1,8-4,2% du sauvage) dans le cas des mutants coND4L-97, coND9-54 et coND9-115, et inférieure à dix pourcents de l'activité sauvage chez le mutant coND4L-89 (Tableau 14). Ces données

indiquent que la perte de l'activité du complexe I est corrélée à l'extinction de l'expression du gène *ND4L* ou du gène *ND9*.

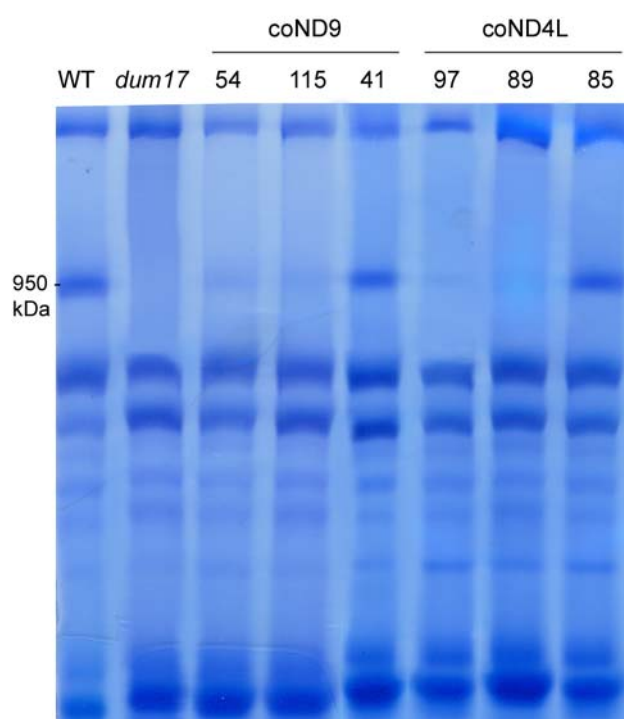
Enfin, l'activité cytochrome *c* oxydase a été mesurée. Aucune différence significative n'est observée entre les souches sauvages et mutantes.

L'assemblage du complexe I des co-transformants coND9-54 et-115, coND4L-89 et -97 a été analysé par BN-PAGE à partir d'extraits protéiques membranaires. Les souches sauvage (souche 2) et *dum17* (souche 233) ainsi que les co-transformants coND9-41 et coND4L-85 (qui ne sont pas affectés) ont été utilisés comme témoins. Que ce soit après mise en évidence par réaction de coloration enzymatique (NADH/NBT) (données non montrées), par coloration des protéines au Bleu de Coomassie (Figure 29) ou par détection immunologique sur Western blot avec un anticorps polyclonal dirigé contre le complexe I de *Neurospora* (données non montrées), nous observons pour les quatre souches mutantes une diminution de plus 95-98 % du signal à 950 kDa. Aucune autre différence entre les profils des protéines colorées au Bleu de Coomassie des souches sauvages ou mutantes n'a été détectée. Ces résultats ont été confirmés par des analyses sur des extraits mitochondriaux (données non montrées). Dans ce cas, le sous-complexe de 200 kDa à activité NADH déshydrogénase a été observé chez toutes les souches.

De l'ensemble de ces observations, il apparaît donc que l'inactivation de l'expression des gènes *ND9* et *ND4L* empêche l'assemblage du complexe I.

|                                     | wt         | 85<br>(témoin) | coND4L           |                  | coND9          |                  |                  |
|-------------------------------------|------------|----------------|------------------|------------------|----------------|------------------|------------------|
|                                     |            |                | 89               | 97               | 41<br>(témoin) | 54               | 115              |
| NADH:ferricyanure                   | 2489 ± 614 | 2235 ± 198     | <b>739 ± 208</b> | <b>401 ± 219</b> | 2023 ± 256     | <b>401 ± 113</b> | <b>289 ± 57</b>  |
| NADH:DQ totale                      | 108 ± 21   | 98 ± 15        | 49 ± 11          | 37 ± 8           | 112 ± 26       | 50 ± 12          | 45 ± 8           |
| NADH:DQ sensible à la roténone (CI) | 50 ± 22    | 46 ± 15        | <b>4,2 ± 1,8</b> | <b>0,9 ± 0,7</b> | 56 ± 13        | <b>2,1 ± 1,5</b> | <b>1,2 ± 1,1</b> |
| cytochrome <i>c</i> oxydase (CIV)   | 245 ± 29   | 212 ± 23       | 245 ± 12         | 229 ± 41         | 245 ± 26       | 263 ± 23         | 202 ± 24         |

**Tableau 14.** Activités spécifiques NADH:ferricyanure oxydoréductase (nmoles de Fe(CN)<sub>6</sub><sup>-3</sup> réduit.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup>), NADH:duroquinone oxydoréductase (nmoles NADH oxydés.min<sup>-1</sup>.mg<sup>-1</sup> prot<sup>-1</sup>) totale et sensible à la roténone (complexe I), et cytochrome *c* oxydase (complexe IV ; nmoles de cyt *c* oxydé.min<sup>-1</sup>.mg prot<sup>-1</sup>) (moyenne de 3 à 4 séries de mesures indépendantes).



**Figure 29. Coloration** des protéines au Bleu de Coomassie après BN-PAGE d'extraits protéiques membranaires totaux (120 µg) solubilisés au n-dodécyl-β-D-maltoside (2% final [w/w]).

### 3. Impact de déficiences de la chaîne respiratoire mitochondriale sur l'activité photosynthétique et les transitions d'état

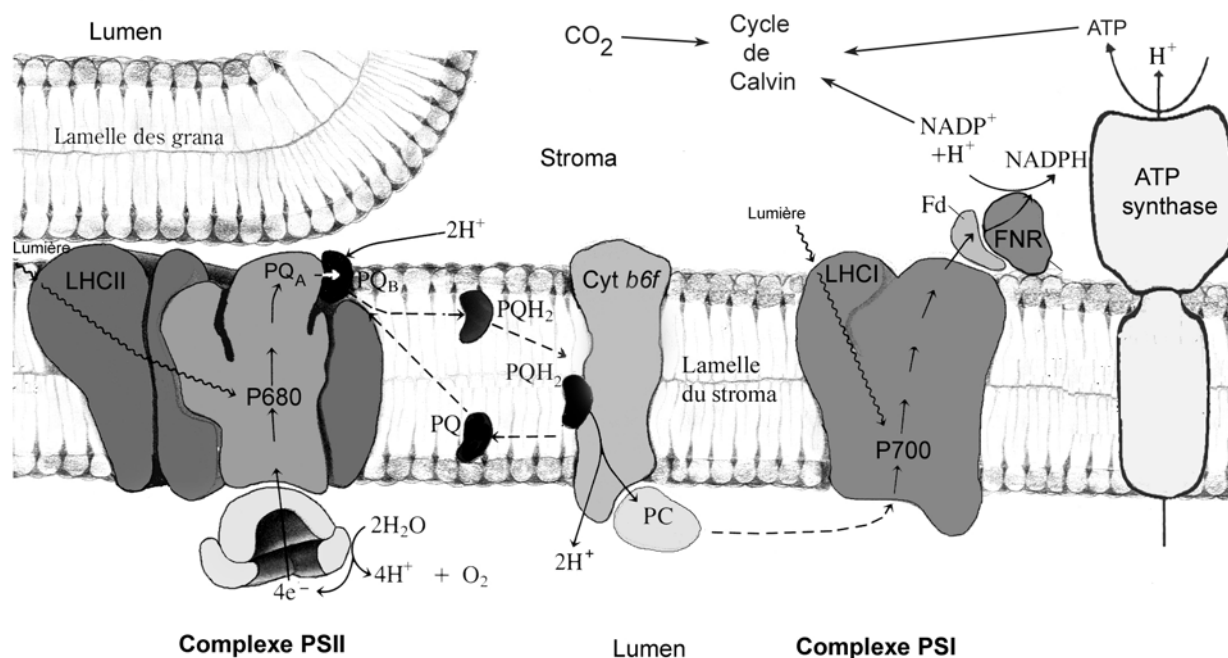
#### 3.1. Introduction

##### 3.1.1. La Photosynthèse

La photosynthèse est le processus par lequel les végétaux et beaucoup de genres bactériens convertissent l'énergie lumineuse en énergie chimique contenue dans des molécules organiques. Dans les cellules eucaryotes, la photosynthèse a lieu dans les chloroplastes. Comme les mitochondries, il s'agit d'organites semi-autonomes comprenant une double enveloppe membranaire, une matrice aqueuse (le stroma) et des membranes internes (les thylakoïdes). Toutes les fonctions de captage de la lumière et de transduction d'énergie sont localisées dans les thylakoïdes qui forment un système membranaire dans la matrice et qui déterminent un autre

compartiment aqueux : le lumen. Dans la grande majorité des cas, les membranes thylakoïdiennes sont différenciées en deux types de structures interconnectées : des thylakoïdes empilés les uns sur les autres (grana chez les plantes supérieures) et des thylakoïdes libres dans le stroma.

La photosynthèse est divisée en deux phases séparées tant spatialement que temporellement : la phase claire durant laquelle ont lieu les réactions photochimiques et la phase sombre (ou cycle de Calvin), phase de fixation du carbone et de synthèse de molécules organiques (Figure 30) **Figure 30**(Rawn, 1990).



**Figure 30.** Schéma général de la photosynthèse (Rawn, 1990). Le transfert linéaire des électrons du photosystème II (PSII) au photosystème I (PSI) (phase claire) génère un potentiel réducteur (NADPH) et un gradient de protons. L'énergie du gradient de protons est utilisée par l'ATP synthase pour la synthèse d'ATP. ATP et NADPH sont utilisés dans le Cycle de Calvin pour la biosynthèse des hydrates de carbone (phase sombre). Cyt, cytochrome ; Pc, plastocyanine, PQ, plastoquinone ; PS, photosystème, Fd, ferrédoxine, FNR, ferrédoxine NADP<sup>+</sup> réductase, NAD(P)H-PQ, NAD(P)H :plastoquinone oxydoréductase.



### 3.1.1.1. La phase claire

Cette phase a lieu dans les thylakoïdes et inclut les étapes de la photosynthèse qui convertissent l'énergie lumineuse en énergie chimique. La lumière absorbée par les chlorophylles déclenche un transfert d'électrons de l'eau vers le NADP<sup>+</sup>, couplé à transfert de protons du stroma vers le lumen (Figure 30). L'énergie de ce gradient de protons est utilisée par une ATP synthase (CF<sub>0</sub>/CF<sub>1</sub>) pour la synthèse d'ATP.

Cinq complexes protéiques membranaires (associés à des cofacteurs et à des protéines périphériques) interviennent dans ce transport d'électrons photosynthétiques. Trois de ces complexes, le photosystème I (PSI), le photosystème II (PSII) et l'antenne périphérique collectrice de lumière associée au PSII (light harvesting complex II ou LHCII) contiennent de la chlorophylle. Les deux autres complexes, le cytochrome *b<sub>6</sub>f* et l'ATP synthase en sont dépourvus. Les zones accolées des thylakoïdes sont enrichies en PSII alors que les thylakoïdes libres sont quant à eux plus riches en PSI (Figure 30).

Le premier événement du transport d'électrons photosynthétiques est l'absorption d'un photon par une molécule de chlorophylle associé à LHCII. L'énergie associée à ce photon est transférée de pigment en pigment par résonance jusqu'à P<sub>680</sub>, une paire spéciale de chlorophylles qui constitue le centre réactionnel du PSII (Figure 31A). Un électron de haute énergie est éjecté du centre réactionnel et entre ensuite dans la chaîne de transport d'électrons. Les principaux transporteurs d'électrons dans le PSII sont la phéophytine, une plastoquinone liée (Q<sub>A</sub>) et une plastoquinone qui peut se dissocier du PSII pour rejoindre un pool de plastoquinones liposolubles (PQ). Les plastoquinones servent de transporteurs d'électrons mobiles entre le PSII et le cytochrome *b<sub>6</sub>f*. Deux électrons sont nécessaires pour réduire PQ en PQH<sub>2</sub>, réduction concomitante au prélèvement de deux protons du stroma. Le transfert subséquent de deux électrons au cytochrome *b<sub>6</sub>f* est associé à la libération de deux protons dans le lumen et participe ainsi à la production du potentiel électrochimique nécessaire à la synthèse d'ATP (Figure 31). Le centre réactionnel du PSII est réduit grâce à l'oxydation d'une molécule d'eau dans le lumen. Cette réaction libère de l'oxygène et des protons qui contribuent également à l'établissement du potentiel transmembranaire. Le cytochrome *b<sub>6</sub>f*, complexe intermédiaire entre le PSI et le PSII, comporte un site d'oxydation (Q<sub>0</sub>) et un site de réduction (Q<sub>i</sub>) des

plastoquinones orientés de part et d'autre de la membrane. Les électrons issus de l'oxydation de PQH<sub>2</sub> peuvent soit transiter vers le site Q<sub>i</sub> via deux cytochromes, soit réduire la plastocyanine, transporteur mobile entre le cytochrome *b<sub>6</sub>f* et le PSI. L'oxydation et la réduction des PQ par le cytochrome *b<sub>6</sub>f* contribuent à la formation du potentiel électrochimique. L'énergie d'un second photon est nécessaire pour provoquer l'éjection d'un électron du centre réactionnel du PSI (P<sub>700</sub>). Cet électron va migrer via différents groupes prosthétiques jusqu'à la ferrédoxine. Le PSI ainsi oxydé sera réduit par un électron venant de la plastocyanine, transporteur mobile entre le cytochrome *b<sub>6</sub>f* et le PSI. La ferrédoxine joue un rôle clé : elle dirige le flux d'électrons soit de retour vers les plastoquinones au site Q<sub>i</sub> du cytochrome *b<sub>6</sub>f* pour favoriser la translocation de H<sup>+</sup> (et donc la synthèse d'ATP) (Figure 31b), soit vers une NADP réductase pour la synthèse de NADPH + H<sup>+</sup> (Figure 31a).

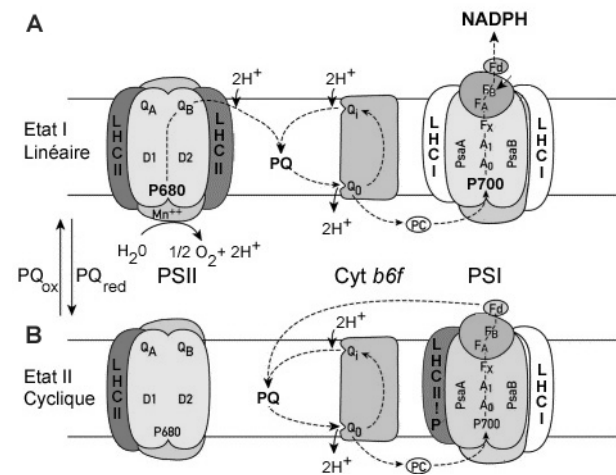


Figure 31. Schéma des complexes protéiques impliqués dans la phase claire de la photosynthèse dans les membranes des thylakoïdes. Seuls les centres réactionnels sont indiqués : D1 et D2 pour le PSII; PsaA et PsaC pour le PSI ; P680, dimère de chlorophylle qui est le donneur primaire du PSII ; Q<sub>A</sub> et Q<sub>B</sub>, premier et second accepteurs d'électrons du PSII ; Q<sub>0</sub>, Q<sub>i</sub> sites de liaison du cytochrome *b<sub>6</sub>f* respectivement pour une plastoquinol et une plastoquinone ; LHC : complexe collecteur de lumière; LHCII-P, forme phosphorylée de LHCII; PC, plastocyanine ; P700, dimère de chlorophylle qui agit comme donneur primaire du PSI; A<sub>0</sub>, A<sub>1</sub> accepteurs primaires du PSI; F<sub>X</sub>, F<sub>A</sub> et F<sub>B</sub>, centres 4Fe-4S du PSI ; Fd, ferrédoxine. A l'état I, la fraction mobile des LHCII (en gris) est associée au PSII; la chaîne d'électrons photosynthétique opère linéairement et génère du NADPH et de l'ATP. A l'état II, la fraction mobile des LHCII est associée au PSI; la chaîne d'électrons photosynthétique opère cycliquement et génère seulement de l'ATP (Rochaix, 2002).



L'énergie associée au gradient de protons est utilisée pour la synthèse d'ATP par l'ATP synthase. L'on distingue ainsi un transport cyclique, générant uniquement de l'ATP et n'impliquant que le PSI (Figure 31b) et un transport d'électrons linéaire, générant du NADPH,  $H^+$  et de l'ATP et impliquant les deux photosystèmes (Figure 31a) (Rawn, 1990; Rochaix, 2002).

### 3.1.1.2. La phase sombre

Le NADPH +  $H^+$  et l'ATP formé pendant la phase claire sont utilisés dans le cycle de Calvin dont les enzymes sont localisés dans le stroma pour la synthèse des glucides, des acides gras et des acides aminés via la fixation du  $CO_2$  par la ribulose-1,6 biphosphate carboxylase/oxygénase (RUBISCO).

## 3.1.2. Les transitions d'état

### 3.1.2.1. Description du phénomène

Les transitions d'état ont été découvertes fin des années 70 chez des organismes photosynthétiques unicellulaires (Bonaventura et Meyers, 1969; Murata, 1969). Elles sont décrites à l'époque comme un mécanisme de contrôle de l'excitation des deux photosystèmes. Cette interprétation se base sur le fait que les deux photosystèmes n'ont pas le même spectre d'absorption : le spectre du PSI est décalé vers les grandes longueurs d'onde par rapport à celui du PSII. Cela est dû à la localisation préférentielle de la chlorophylle *b* dans le PSII et de chlorophylle *a*, absorbant dans le rouge lointain (700-720 nm), dans le PSI. Cette différence peut poser des problèmes d'équilibre dans la chaîne de transport d'électrons photosynthétiques lorsque le spectre de la lumière ambiante est tel qu'un des deux photosystèmes est davantage excité. Le rôle régulateur des transitions d'état à ce niveau a été mis en évidence grâce à l'expérience type suivante (Murata, 1970) : une lumière qui excite préférentiellement le PSII (par exemple 650 nm) induit une augmentation de la sensibilité du PSI et cela en quelques minutes. A l'inverse, une lumière rouge lointain (700-720nm) qui est absorbée préférentiellement par le PSI provoque quant à elle une augmentation de la sensibilité du PSII. Ainsi, le flux d'électrons dans la chaîne de transport d'électrons photosynthétique est régulé et la photosynthèse atteint son rendement maximum. Il aura fallu une dizaine

d'années avant que les bases moléculaires des transitions d'état soient comprises.

### 3.1.2.2. Bases moléculaires

Le changement de la sensibilité des photosystèmes est en fait dû à la migration des antennes collectrices de lumière (LHCII) entre les deux photosystèmes. Quand le pool de plastoquinones est réduit, situation qui prévaut lorsque le PSII est davantage excité que le PSI, une kinase est activée (Allen *et al.*, 1981). Celle-ci phosphoryle les protéines de LHCII qui migrent alors jusqu'au PSI, ce qui augmente la surface d'absorption lumineuse de ce dernier : on parle d'état II (Figure 31b). A l'inverse, l'oxydation du pool de PQ, situation qui prévaut lorsque le PSI est davantage excité que le PSII, provoque la désactivation de la kinase. Les protéines des LHCII sont déphosphorylées par une phosphatase qui agit constitutivement et se réassocient au PSII, on parle alors d'état I (Figure 31a). C'est ce phénomène qui est appelé transition d'état (Wollman, 2001). Cette explication est encore valable aujourd'hui : c'est le pool de PQ qui agit comme véritable senseur de l'activité photosynthétique et qui, via l'action d'une kinase, redirige les LHCII vers l'un ou l'autre des photosystèmes. Ces dernières années, divers progrès ont été réalisés en ce qui concerne l'identification de la kinase et le mécanisme de transduction du signal d'activation de cette kinase via le statut rédox du pool de PQ. Le rôle physiologique attribué aux transitions d'état a également été mieux défini.

### 3.1.2.3. La kinase

Depuis la fin des années septante, on sait que les transitions d'état sont liées à l'activité d'une kinase intrathylakoïdienne (Bennett, 1977; Bennett, 1979). Cependant, ce n'est que récemment que les kinases ont pu être identifiées grâce à des approches génétiques menées chez *Arabidopsis* et *Chlamydomonas*. En 1999, Snyders et Kohorn ont montré que chez *Arabidopsis*, trois kinases (TAK 1-3, pour thylakoid associated) sont capables de phosphoryler l'extrémité N-terminale de protéines LHCII *in vivo* (Snyders et Kohorn, 1999). Des plants d'*Arabidopsis* anti-sens Pour TAK1 montrent des spectres de fluorescence modifiés et des changement de phosphorylation des protéines LHCII, suggérant que TAK 1 joue un rôle dans les transitions d'état (Snyders et Kohorn, 2001). De plus, la perte de la sous-unité psaH du PSI chez *Arabidopsis* empêche le transfert

d'énergie des LHCII au PSI en conditions d'état II (Lunde *et al.*, 2000). Des mutants de *Chlamydomonas* déficients dans les transitions d'état ont également été isolés (Fleischmann, 1999; Kruse *et al.*, 1999). En particulier, le mutant *sst7* est incapable de réaliser la transition à l'état I et le niveau de phosphorylation des protéines LHCII est constant quelle que soit les conditions environnementales (Fleischmann, 1999). Le gène déficient chez le mutant *sst7* a été cloné : il encode une Sérine-thréonine kinase de 80 kDa (Depege *et al.*, 2003). Cette kinase Sst7 possède un homologue chez *Arabidopsis* mais qu'il ne s'agit pas d'une des protéines TAK (Depege *et al.*, 2003; Snyders et Kohorn, 1999).

#### 3.1.2.4. Le mécanisme d'activation de la kinase.

Le fait que ce soit l'état rédox du pool de plastoquinones qui contrôle l'activation de la kinase suggère fortement que celle-ci est liée ou étroitement associée aux plastoquinols. Dans la chaîne transporteuse d'électrons photosynthétique, deux complexes protéiques sont capables de fixer PQ : le PSII et le cytochrome *b<sub>6</sub>f*. L'étude de mutants de *Chlamydomonas* déficients pour l'un ou l'autre de ces complexes indique que le cytochrome *b<sub>6</sub>f* est strictement indispensable pour que les algues passent à l'état II lorsque le pool de PQ est réduit (Wollman et Lemaire, 1988). En absence de cytochrome *b<sub>6</sub>f*, la kinase n'est pas activée. Des études *in vivo* ont ensuite montré que le site Q<sub>o</sub> du cytochrome *b<sub>6</sub>f* (qui fixe PQH<sub>2</sub> du côté du lumen, cf. Figure 31) est impliqué dans l'activation de la kinase (Zito *et al.*, 1999). Des mutants de *Chlamydomonas* présentant une poche Q<sub>o</sub> mal repliée sont en effet bloqués à l'état I, quelles que soient les conditions d'induction. Un mécanisme de transduction du signal entre la fixation de PQH<sub>2</sub> au site Q<sub>o</sub> du côté du lumen et l'activation de la kinase qui est localisée du côté du stroma, a été proposé (Finazzi, 2001) sur base de diverses analyses (Hamel *et al.*, 2000; Zhang *et al.*, 1998; Zito *et al.*, 1999). La clé de la compréhension de ce mécanisme se situe dans la protéine de Rieske associée au complexe cytochrome *b<sub>6</sub>f*. Il s'agit d'une protéine Fe-S hydrophile qui est attachée à la membrane thylakoïdienne par son extrémité N-terminale et qui pointerait dans le lumen. La fixation d'une molécule de plastoquinone réduite au site Q<sub>o</sub> du cytochrome *b<sub>6</sub>f* provoque le passage de la protéine de Rieske d'une position distale à une position proximale. Ce changement entraînerait une modification de la conformation du cytochrome *b<sub>6</sub>f* qui permettrait l'activation d'une (ou plusieurs) kinase(s). Cette

dernière phosphorylerait la sous-unité V du cytochrome *b<sub>6</sub>f* (Hamel *et al.*, 2000) puis serait libérée dans la membrane à cause du retour de la protéine de Rieske dans sa position distale, retour causé par un turnover de PQH<sub>2</sub> au site Q<sub>o</sub>. La kinase libérée dans la membrane pourrait catalyser la phosphorylation de LHCII qui provoque son déplacement.

Le mouvement des LHCII phosphorylés des régions granaires (riches en PSII) aux régions intergranaires (riches en PSI) a pu être observé par des études de fractionnement des thylakoïdes et par immunocytochimie (pour revue (Wollman, 2001)). Ce mouvement a été expliqué en terme de répulsion électrostatique liée à l'augmentation des charges négatives apportées par les groupements phosphates et à des changements de conformation de la partie N-terminale des LHCII. L'association des phospho-LHCII au PSI résulterait de l'affinité élevée de la protéine *psaH* (sous-unités du PSI) pour les antennes phosphorylées (Lunde *et al.*, 2000).

#### 3.1.2.5. Le rôle physiologique des transitions d'état

Comme nous l'avons mentionné, le rôle premier attribué aux transitions d'état est de permettre aux végétaux d'adapter l'organisation de l'appareil photosynthétique en vue de garantir une excitation équitable des deux photosystèmes. Chez *Chlamydomonas* cependant, l'état II peut être atteint à l'obscurité en diminuant le contenu en ATP intracellulaire à l'aide d'inhibiteurs. Quand la teneur normale en ATP est restaurée, les algues passent à l'état I (Bulté *et al.*, 1990). Ces observations ont amené à considérer que les transitions d'état peuvent également être contrôlées par la demande en ATP intracellulaire (Bulté *et al.*, 1990; Wollman, 2001). Par ailleurs, lors du passage à l'état II, la proportion de cytochrome *b<sub>6</sub>f* augmente dans les zones intergranaires, riches en PSI (Vallon, 1991). Comme nous l'avons vu ci-dessus, la sous-unité V du cytochrome *b<sub>6</sub>f* est également phosphorylée à l'état II et la migration du cytochrome *b<sub>6</sub>f* pourrait se faire selon un mécanisme identique à la migration des complexes LHCII phosphorylés. (Hamel *et al.*, 2000). La co-localisation des LHCII, du cytochrome *b<sub>6</sub>f* et du PSI permettrait la formation d'une structure supramoléculaire adéquate pour le transport cyclique d'électrons entre le PSI et le cytochrome *b<sub>6</sub>f*. Pour rappel, le transport cyclique d'électrons est favorable à la synthèse d'ATP dans la mesure où il

accentue le gradient de  $H^+$  sans créer de potentiel réducteur ( $NADPH+H^+$ ). La transition à l'état II serait donc propice à la synthèse d'ATP. Cette hypothèse a été vérifiée expérimentalement en montrant que chez *Chlamydomonas*, la réduction du cytochrome *b<sub>6</sub>f* est insensible au DCMU (inhibiteur du PSII) quand les algues sont à l'état II, suggérant que le transport linéaire n'a pas lieu (Finazzi, 1999). De plus, un mutant de *Chlamydomonas* bloqué à l'état I effectue quant à lui un transport linéaire dans les conditions qui amènent le sauvage à l'état II (Fleischmann, 1999).

Toutes ces données convergent vers la même conclusion : les transitions d'état chez *Chlamydomonas* permettent également de réorganiser l'appareil photosynthétique en vue d'une synthèse accrue d'ATP lorsque les conditions l'exigent (Wollman, 2001).

### 3.1.3. La chlororespiration et son influence sur les transitions d'état

Les plastoquinones ne sont pas seulement impliquées dans la chaîne de transport d'électrons photosynthétique. Elles sont également au carrefour d'une chaîne respiratoire chloroplastique non photosynthétique (ou chaîne chlororespiratoire) (Figure 32). Même si les preuves de son existence ont été apportées grâce à des études menées sur *Chlamydomonas* (Bennoun, 1982), c'est d'abord chez les plantes que des complexes enzymatiques analogues aux enzymes mitochondriaux ont été mis en évidence. On sait en effet qu'une NAD(P)H déshydrogénase composée de onze protéines homologues à onze des quatorze constituants du complexe I bactérien, catalyse le transfert d'électrons provenant d'équivalents réducteurs du stroma vers les plastoquinones (Burrows *et al.*, 1998; Peltier et Cournac, 2002). Une plastoquinone oxydase transférerait ensuite les électrons de  $PQH_2$  à l'oxygène moléculaire. Chez *Chlamydomonas*, aucun gène homologue aux gènes encodant les constituants de la NAD(P)H déshydrogénase chloroplastique des plantes supérieures n'a été identifié dans le génome du chloroplaste ou du noyau (Peltier et Cournac, 2002) alors qu'une activité de type oxydase a été mise en évidence (Cournac *et al.*, 2000).

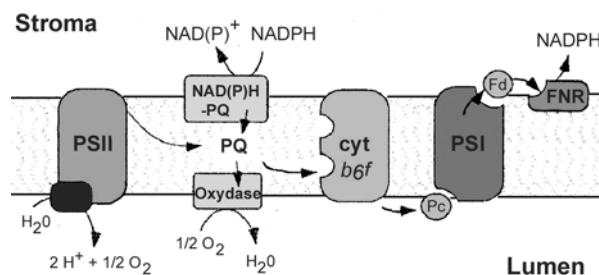


Figure 32. Modèle de la connexion entre la chaîne de transport d'électrons photosynthétique et la chaîne chlororespiratoire (Bennoun, 1982; Peltier et Cournac, 2002). Cyt, cytochrome; Pc, plastocyanine, PQ, plastoquinone; PS, photosystème, Fd, ferrédoxine, FNR, ferrédoxine NADP+ réductase, NAD(P)H-PQ, NAD(P)H :plastoquinone oxydoréductase.

Le rôle physiologique de la chlororespiration est aussi peu connu que les mécanismes qui la gouvernent. Même si un potentiel membranaire thylakoïdien est observé chez *Chlamydomonas* à l'obscurité, il ne semble pas lié à la présence de la chaîne chlororespiratoire. Cette dernière ne serait donc pas impliquée dans la synthèse d'ATP (Cournac *et al.*, 2000). Différents rôles lui ont été par ailleurs attribués, comme l'oxydation d'équivalents réducteurs en excès (Cournac *et al.*, 2000) ou l'élimination d'espèces réactives de l'oxygène du chloroplaste (Casano *et al.*, 2000). Des données obtenues chez le tabac concilient deux hypothèses, suggérant la participation de la NADH déshydrogénase dans le flux cyclique d'électrons autour du photosystème I, à la lumière, et son implication dans la chlororespiration à l'obscurité (Burrows *et al.*, 1998; Joet *et al.*, 2002).

Comme les PQ constituent un point de jonction entre les chaînes de transport d'électrons photosynthétique (linéaire et cyclique) et chlororespiratoire, et qu'elles jouent un rôle de senseur permettant de réorganiser l'appareil photosynthétique, il est probable que la chlororespiration influence les transitions d'état. Les techniques pour induire artificiellement l'état II en laboratoire se basent d'ailleurs largement sur la chlororespiration puisqu'il s'agit de rendre le milieu de culture anoxique (Fleischmann, 1999; Wollman et Delepelaire, 1984). Dans ces conditions, la respiration mitochondriale est inhibée, la concentration en ATP chute, la glycolyse est stimulée (effet Pasteur) et la concentration en NAD(P)H dans le stroma augmenterait. Le NADPH pourrait être oxydé par la NAD(P)H déshydrogénase qui réduit le pool de PQ et provoque le passage à l'état II.

### 3.2. Résultats

Le métabolisme d'une cellule eucaryote est tributaire de la génération d'ATP par la photosynthèse et la respiration. Bien que ces deux processus soient bien compris individuellement, il existe peu de données relatives à leurs régulations mutuelles. Dans les cellules des plantes, des interactions complexes ont lieu entre photosynthèse et respiration parce que les deux processus sont dépendants des mêmes métabolites fondamentaux tel que ADP/ATP, NAD(P)H, triose-phosphate et hexose-phosphate (Hoefnagel *et al.*, 1998). L'influence de la respiration sur la photosynthèse pourrait impliquer des modifications de l'organisation de l'appareil photosynthétique, en particulier via les transitions d'état. *Chlamydomonas reinhardtii* s'est avéré être un organisme de choix pour analyser ce phénomène, principalement parce que la transition de l'état I à l'état II est accompagnée d'une diminution importante de la fluorescence (Wollman et Delepelaire, 1984) due à l'association de près de 80% des LHClI au PSI (Delosme *et al.*, 1996). Une transition rapide à l'état II est observée lorsque l'activité respiratoire mitochondriale est perturbée (anaérobiose, agents découplants, inhibiteurs) (Bulté *et al.*, 1990). Des études récentes ont montré que l'anaérobiose provoque également une inhibition transitoire du dégagement d'oxygène et une stimulation du transport cyclique d'électrons autour du PSI à l'état II (Finazzi, 1999; Finazzi *et al.*, 2002). Chez *Chlamydomonas*, il a aussi été montré que l'addition à l'obscurité d'agents découplants ou d'inhibiteurs induit une chute rapide la concentration en ATP et une stimulation de la glycolyse. Ceci entraîne une augmentation de la concentration en NAD(P)H et cause une réduction non-photochimique du pool de PQ (Rebeille et Gans, 1988). Comme nous l'avons signalé plus haut, la réduction du pool de PQ déclenche la transition vers l'état II.

A ce jour, les modèles explicatifs de la réponse du chloroplaste aux variations de la respiration mitochondriale ont tous été construits sur base d'expériences menées en anaérobiose, ou en présence de molécules inhibitrices ou découplantes. L'analyse du transport d'électrons photosynthétique chez des mutants mitochondriaux affectés à des degrés divers constitue une approche nouvelle et originale pour évaluer les répercussions de l'activité mitochondriale sur l'organisation de l'appareil photosynthétique.

Dans cette partie du travail, nous avons analysé le transport d'électrons photosynthétique et l'organisation de l'appareil photosynthétique chez divers mutants mitochondriaux de *Chlamydomonas*<sup>5</sup>. Tous ces mutants présentent une croissance lente (phénotype  $dk^{+/}$ ; mutants *dum5*, 17, 20 et 25) ou nulle (phénotype  $dk^-$ ; *dum1*, 18, 19, 21 et 22) lorsqu'ils sont cultivés en conditions hétérotrophes. Les mutants *dum5*, 17, 20 et 25 sont affectés dans l'activité du complexe I (*cf.* partie 2 des Résultats). Les autres mutants présentent une activité nulle du complexe III [mutations *dum1* et *dum21* dans le gène *cob* (Matagne *et al.*, 1989; Matagne et Remacle, 2002)], du complexe IV [mutations *dum18* et *dum19* dans le gène *cox1* (Colin *et al.*, 1995)], des complexes I et III (mutant *dum22*, *cf.* partie 2 des Résultats) ou encore des complexes I et IV (mutant *dum19/dum25*). Ces mutants peuvent être répartis en trois classes en fonction du nombre de sites de pompage de protons potentiellement perdus : perte d'un site chez les mutants du complexe I, de deux sites chez les mutants du complexe III ou du complexe IV, ou de trois sites chez les doubles mutants I+III ou I+IV.

Ces analyses ont permis d'établir une relation directe entre l'activité respiratoire mitochondriale et le rendement du transport linéaire d'électrons photosynthétique. Dans le cas des doubles mutants, ce rendement est réduit à 15-20% de la valeur du sauvage, suggérant que l'énergie lumineuse est principalement employée dans un transport cyclique d'électrons. Une stimulation du transport cyclique d'électrons a été en effet observée en déterminant l'énergie de stockage du PSI sous lumière modulée (expérience de photoacoustique menée en collaboration avec le laboratoire d'écophysiologie du Dr. M. Havaux, Cadarache, France).

Bien qu'aucune différence significative dans la stoechiométrie des complexes majeurs impliqués dans la phase claire de la photosynthèse n'ait été observé entre les différentes souches, l'analyse des spectres de fluorescence à basse température (77°K) montre une excitation préférentielle du PSI chez les mutants, ce qui indique une transition à l'état II. Cet effet est corrélé à la phosphorylation de polypeptides des antennes

<sup>5</sup> Cette étude a bénéficié de la collaboration de G. Gloire dans le cadre d'un mémoire de Licence (Gloire G., 2001).

collectrices de lumière (LHCII), témoignage de leur association préférentielle au PSI. Des expériences de transition à l'état I indiquent par ailleurs des taux plus élevés de réduction non-photochimique du pool de plastoquinone sans doute via la chlororespiration chez les mutants les plus affectés. Ceci a été confirmé par des mesures de la réduction du pool de PQ de cellules adaptées à l'obscurité.

Ces résultats démontrent que des déficiences respiratoires permanentes stabilisent l'état II, situation

qui favorise le transport cyclique d'électrons au détriment du transport linéaire dans le chloroplaste. D'une manière générale, nos résultats suggèrent que le rôle premier des transitions d'état chez *Chlamydomonas* n'est pas de garantir une excitation équitable des deux photosystèmes mais bien de permettre à la cellule de s'adapter aux changements de la demande en ATP intracellulaire.

**Publication 4. Cardol P., Gloire G., Havaux M., Remacle C., Matagne RF., Franck F. (2003) Photosynthesis and State Transitions in Mitochondrial Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* Affected in Respiration. *Plant Physiol.* 133(4):2010-20.**

# Photosynthesis and State Transitions in Mitochondrial Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* Affected in Respiration<sup>1</sup>

Pierre Cardol, Geoffrey Gloire<sup>2</sup>, Michel Havaux, Claire Remacle, René Matagne, and Fabrice Franck\*

Genetics of Microorganisms (P.C., G.C., C.R., R.M.) and Biochemistry and Photobiology (F.F.), Institute of Plant Biology B22, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium; and Commissariat à l'Énergie Atomique (CEA)/Cadarache, Direction des Sciences du Vivant, Département d'Écophysiologie Végétale et de Microbiologie, Laboratoire d'Écophysiologie de la Photosynthèse, Unité Mixte de Recherche 163 CEA Centre National de la Recherche Scientifique, Univ-Méditerranée CEA 1000, F-13108 Saint-Paul-lez-Durance, France (M.H.)

Photosynthetic activities were analyzed in *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondrial mutants affected in different complexes (I, III, IV, I + III, and I + IV) of the respiratory chain. Oxygen evolution curves showed a positive relationship between the apparent yield of photosynthetic linear electron transport and the number of active proton-pumping sites in mitochondria. Although no significant alterations of the quantitative relationships between major photosynthetic complexes were found in the mutants, 77 K fluorescence spectra showed a preferential excitation of photosystem I (PSI) compared with wild type, which was indicative of a shift toward state 2. This effect was correlated with high levels of phosphorylation of light-harvesting complex II polypeptides, indicating the preferential association of light-harvesting complex II with PSI. The transition to state 1 occurred in untreated wild-type cells exposed to PSI light or in 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea-treated cells exposed to white light. In mutants of the cytochrome pathway and in double mutants, this transition was only observed in white light in the presence of 3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea. This suggests higher rates of non-photochemical plastoquinone reduction through the chlororespiratory pathway, which was confirmed by measurements of the complementary area above the fluorescence induction curve in dark-adapted cells. Photo-acoustic measurements of energy storage by PSI showed a stimulation of PSI-driven cyclic electron flow in the most affected mutants. The present results demonstrate that in *C. reinhardtii* mutants, permanent defects in the mitochondrial electron transport chain stabilize state 2, which favors cyclic over linear electron transport in the chloroplast.

Metabolic processes of photosynthetic organisms depend on the regeneration of ATP through photosynthesis and respiration. Although these two processes are now well understood at the molecular and physiological levels, less is known about their mutual regulation. In eukaryotic cells, complex interactions between photosynthesis and respiration occur because both processes are linked by common key metabolites such as ADP/ATP, NAD(P)H, triose-P, and hexose-P (for review, see Hoefnagel et al., 1998).

When the dependence of respiration on photosynthesis seems to rely essentially on the availability of substrates, the influence of respiration on photosynthesis is suggested to involve complex organizational changes in the PSs, known as state transitions. The

transition from states 1 to 2 corresponds to the reversible transfer of a mobile pool of PSII light-harvesting complexes II (LHCII) from PSII to PSI along the thylakoid membrane (state 2 transition) and is triggered by persistent reduction of the plastoquinone (PQ) pool. This reduction causes the activation of an LHCII-kinase interacting with the quinone oxidizing site of cytochrome (Cyt) *b6/f* (for review, see Allen, 1992; Wollman, 2001). Due to its high affinity for the PSI-h subunit, phospho-LHCII then is bound preferentially to PSI and increases the antenna size of this PS. Return to state 1 can be achieved by reoxidation of the PQ pool and is mediated by a permanently active phosphatase.

In the unicellular alga *Chlamydomonas reinhardtii*, a rapid transition toward state 2 can be observed when oxidative phosphorylations are interrupted by anaerobiosis or by addition of uncouplers or inhibitors of mitochondrial electron transport (Bulté et al., 1990). Recent studies in the same organism have shown further that anaerobiosis causes a transient inhibition of oxygen evolution and stimulation of PSI-mediated cyclic electron transport upon state 2 transition (Finazzi et al., 1999, 2002). From these results, Wollman (2001) has inferred that one function of state transitions in *C. reinhardtii* is to modulate the relative rates

<sup>1</sup> This research was supported by Fonds de la Recherche Fondamentale Collective (grant no. 2.4552.01) and by Fonds de la Recherche Fondamentale Collective (grant no. 1.5.145.03 and research fellowship to P.C.). C.R. and F.F. are research associates of the Fonds National de la Recherche Scientifique.

<sup>2</sup> Present address: Virology and Immunology, Institute of Pathology B23, University of Liège, B-4000 Liège, Belgium.

\* Corresponding author; e-mail F.Franck@ulg.ac.be; fax 324-3662926.

Article, publication date, and citation information can be found at <http://www.plantphysiol.org/cgi/doi/10.1104/pp.103.028076>.

of photosynthetic linear and cyclic electron flows. The state transitions would provide a mean of regulating net ATP and NAD(P)H synthesis by the chloroplast because ATP and NAD(P)H are consumed in the Calvin cycle in conditions that favor linear electron transport, whereas ATP resulting from cyclic photophosphorylation can be used in other metabolic processes.

It also has been shown that addition in darkness of uncouplers or inhibitors of mitochondrial electron transport induces a rapid drop in ATP and a stimulation of glycolysis in *C. reinhardtii*. This increases the NAD(P)H level and causes non-photochemical reduction of the PQ pool (Rebeille and Gans, 1988). PQ reduction in the dark was attributed to the process of chlororespiration. Although chlororespiration was discovered more than 20 years ago (Bennoun, 1982), the chloroplastic complexes involved in electron transfer from NAD(P)H to oxygen are not unambiguously identified today. Recent data (for review, see Peltier and Cournac, 2002) suggest that in *C. reinhardtii*, chlororespiratory PQ reduction is catalyzed by a still-unidentified NAD(P)H-PQ oxidoreductase, but a putative ferredoxin-PQ oxidoreductase and a succinate dehydrogenase homologous to mitochondrial complex II may also be involved. A nuclear-encoded plastoquinol oxidase showing restricted homology to the mitochondrial alternative oxidase was detected in *C. reinhardtii* thylakoids and is the most likely candidate to support electron transfer from PQ to oxygen.

The present explanatory frame of the chloroplast response to mitochondrial respiration relies essentially on the analysis of transient changes in photosynthetic parameters upon reduction of mitochondrial electron transport and ATP synthesis by inhibitors or anaerobiosis. Combined with the current model of chlororespiration and with recent understanding of the effects of state transitions, this

approach led to a concept of flexibility of photosynthetic electron transport in which the chloroplast appears as a sensor of the ATP status of the cell (Wollman, 2001).

Analyzing photosynthetic electron transport in mutants affected in respiration at various extents constitutes another approach to evaluate chloroplast responses to respiration. In *C. reinhardtii*, a large number of homoplasmic mitochondrial mutants affected in respiration have been isolated (for review, see Matagne and Remacle, 2002; Table I). They are characterized by their null or slow growth when cultivated under heterotrophic conditions (darkness + acetate as an exogenous carbon source). Four mutants (*dum5*, 17, 20, and 25) with point mutation in one of the five *nd* genes (*nd1*, 2, 4, 5, and 6) of the mitochondrial genome, grow in the dark much slower than the wild-type strain (dark<sup>±</sup> phenotype) and are only affected in the activity of the mitochondrial respiratory chain complex I. The other mutants are unable to grow in the dark (dark<sup>-</sup> phenotype) because of mutations in the *cob* gene (encoding the apocytochrome b subunit of complex III; mutants *dum1* and 21) or in the *cox1* gene (coding for the subunit 1 of complex IV; mutants *dum18* and 19) or because of a large deletion that encompasses *cob* and *nd4* genes (*dum22*). In all these mutants, electron transfer from ubiquinone to molecular oxygen through the alternative oxidase is still functional. The mutants listed in Table I can be classified in three classes based on the putative number of active proton-pumping sites lost in the mitochondrial membrane: loss of one ATP synthesis site (complex I mutants), of two sites (complex III or IV mutants), or of three sites (complexes I + III or I + IV mutants).

In this work, we have analyzed photosynthetic oxygen evolution, state transitions, and cyclic electron transport in the above set of mutants grown under mixotrophic conditions (light + acetate). The data

**Table I.** Mitochondrial mutations in *C. reinhardtii* (*dum* [dark uniparental minus inheritance])

| Mutations       | Strain | Growth in the Dark | Biochemical Defect <sup>a</sup> | Gene Mutations   | References                |
|-----------------|--------|--------------------|---------------------------------|--|---------------------------|
| Wild-type       | 2      | +                  | -                               | -  | -                         |
| <i>dum 5</i>    | 641    | ±                  | Complex I                       | -1T, 74 bp downstream from <i>nd5</i> stop codon, low amount of <i>nd5</i> transcripts | Cardol et al., 2002       |
| <i>dum 17</i>   | 233    | ±                  | Complex I                       | -1T at codon 143 of <i>nd6</i>   | Cardol et al., 2002       |
| <i>dum 20</i>   | 235    | ±                  | Complex I                       | -1T at codon 243 of <i>nd1</i>   | Remacle et al., 2001      |
| <i>dum 25</i>   | 228    | ±                  | Complex I                       | Deletion of two of the five codons 199–203 of <i>nd1</i>                               | Remacle et al., 2001      |
| <i>dum 1</i>    | 165    | -                  | Complex III                     | <i>cob</i> Totally deleted   | Matagne et al., 1989      |
| <i>dum 21</i>   | 271    | -                  | Complex III                     | 1-bp Substitution at codon 166 of <i>cob</i>   | Remacle and Matagne, 2002 |
| <i>dum 18</i>   | 236    | -                  | Complex IV                      | +1T at codon 145 of <i>cox1</i>  | Colin et al., 1995        |
| <i>dum 19</i>   | 238    | -                  | Complex IV                      | -1T at codon 152 of <i>cox1</i>  | Colin et al., 1995        |
| <i>dum19/25</i> | 300    | -                  | Complexes I and IV              | <i>cf dum19</i> and <i>dum25</i> mutations   | Remacle et al., 2001      |
| <i>dum 22</i>   | 662    | -                  | Complexes I and III             | <i>cob</i> and 3' End of <i>nd4</i> deleted  | Remacle and Matagne, 2002 |

<sup>a</sup> All the mutants lack the activity of the mentioned complex, except *dum5*, which shows very low complex I activity.

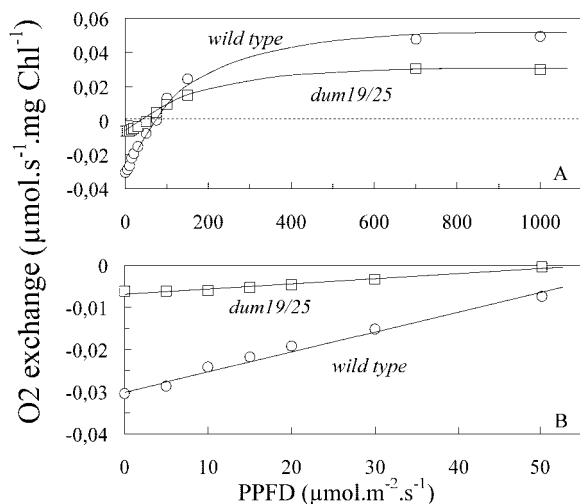


obtained allow us to evaluate current ideas on the impact of respiration on photosynthetic electron transport and provide quantitative relationships between these processes.

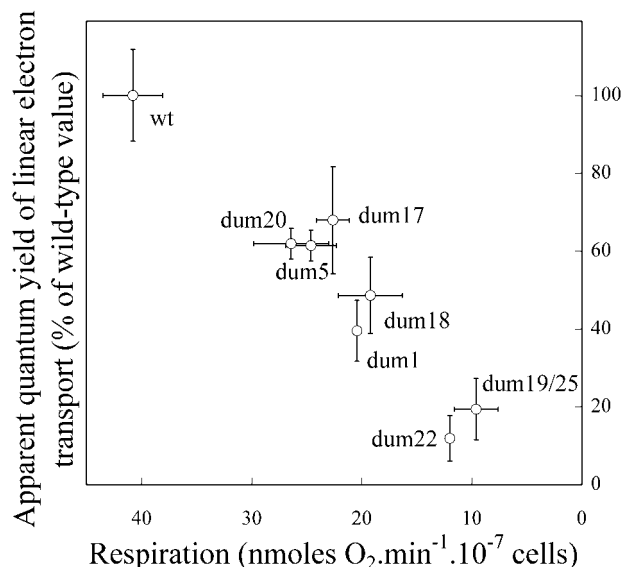
## RESULTS

### Respiration Rates Strongly Correlate with Relative Quantum Yields of Linear, Photosynthetic Electron Transport

Polarographic measurements of oxygen exchange rates in darkness and in light of increasing photosynthetic photon flux densities were performed with wild-type cells and mutant cells affected in various complexes of the mitochondrial electron transport respiratory chain (Table I). Light saturation curves of photosynthetic oxygen evolution were established and compared on a chlorophyll (Chl) basis. When comparing the light curve obtained with the wild type with that of a double mutant (*dum19/25*) deprived of complexes I and IV activities, clear differences appeared both in the maximum rate of oxygen evolution in saturating light ( $V_{\max}$ ) and in the initial slope of the light curve ( $\alpha'$ ) up to  $50 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  (Fig. 1). In the double mutant,  $V_{\max}$  and  $\alpha'$  were reduced by about 40% and 80%, respectively. Because  $\alpha'$  is proportional to the quantum yield of linear, photosynthetic electron transport from molecular oxygen to  $\text{NADP}^+$ , it represents an important parameter of photosynthetic efficiency. It was measured in all the mutants and plotted as a function of the rate of dark respiration (Fig. 2). In this plot, the three categories of mutants (complex I mutants; mutants of the Cyt pathway, i.e. complex III or complex IV mutants; and double mutants) distribute into three groups of points along a single relationship



**Figure 1.** Light saturation curves of oxygen evolution in cells of wild-type and *dum19/25* double mutant (lacking complexes I and IV). A and B, Two scales of photosynthetic photon flux densities.



**Figure 2.** Relationship between the rate of dark respiration and the apparent quantum yield of oxygen evolution (estimated from the initial slope of the light saturation curves and expressed in percentage of the wild-type control).

between photosynthetic quantum yield and dark respiration rate.

The respiration rate values reflect the effects of the loss of different mitochondrial electron transporters. Mutants of complex I still show substantial respiration due to the presence of multiple NADH-dehydrogenases (Cardol et al., 2002). Mutants of the Cyt pathway, which rely solely on alternative oxidase to reduce oxygen, are somewhat more affected, whereas double mutants show very weak oxygen uptake rates. Mitochondrial oxidative phosphorylation capacity must decrease in the same order because the number of operating phosphorylating sites decreases from one group to another (three in wild type, two in complex I mutants, one in mutants of the Cyt pathway, and none in double mutants).

### Mitochondrial Mutants Show Similar Composition of Their Photosynthetic Apparatus and Have Moderately Reduced ATP Levels Compared with Wild Type

The large effects of mitochondrial mutations on photosynthetic electron transport outlined above can be due to quantitative modifications of photosynthetic pigment-protein complexes and/or to changes in their organization or activities. Therefore, it was important to evaluate the concentrations of photosynthetic constituents on a cell basis. Simple spectrophotometric measurements of total Chl concentration in ethanolic extracts gave a wild-type value of  $23 \mu\text{g Chl per } 10^7 \text{ cells}$  with no difference higher than 12% in the different groups of mutants. This was further confirmed by HPLC analysis, which showed no significant differences in Chl or carotenoid contents (data not shown). The Chl *a/b* ratio was fairly con-



stant with a mean value of 2.5, which indicated no obvious changes in PSI/PSII stoichiometry. In crude membranes from wild-type cells, the concentrations of P700 (PSI), Cyt b559 (PSII), and Cyt f (Cyt b6/f complex) estimated by redox difference spectroscopy were around 2 nmol  $\mu\text{mol}^{-1}$  Chl in each case. No significant differences were found for double mutant cells (data not shown). We also found that cellular concentrations of total proteins did not vary by more than 20% in different groups of mutants compared with wild type (around 130  $\mu\text{g}$  protein per  $10^{-7}$  cells). This allowed us to express any activity or concentration indifferently on a cell, Chl or protein basis.

Because the mutants are impaired in at least one mitochondrial phosphorylating site, we expected significant reduction of the cell ATP concentrations compared with wild type. However, ATP measurements by the luciferase assay on extracts of illuminated cells showed relatively modest decreases (Fig. 3). The wild-type cell ATP concentration was  $103 \pm 23$  nmol mg Chl $^{-1}$ , a value comparable with previously published data (Finazzi et al., 1999). Complex I mutants showed no significant difference compared with wild type. ATP concentration was reduced in mutants of the Cyt pathway and in double mutants, but even in the latter, it was more than 60% compared with wild type.

### The Excitation Energy Distribution Is Shifted to "State 2" in White Light, and PSI Light Fails to Promote Transition to "State 1" in Mitochondrial Mutants

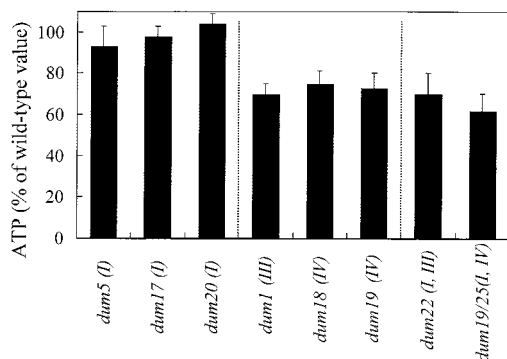
State transitions were monitored by measurements of steady-state Chl fluorescence spectra at 77 K. Excitation in the Chl Soret band produces PSII and PSI fluorescence bands at 685 and 715 nm, respectively. In wild-type cells frozen to 77 K under the white light used for growth ( $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ), the two bands had similar amplitudes (Fig. 4A). Incubation under flushing nitrogen during 20 min in darkness before freezing caused an increase of the relative amplitude of the PSI band, reflecting transition to state 2 caused

by PQ reduction. Full transition to state 1, detected as a decrease of the relative amplitude of the PSI band, was obtained by pre-illuminating the cells with PSI light ( $\lambda > 705$  nm) of  $60 \text{ W m}^{-2}$  for 5 min, which causes oxidation of the PQ pool. The same effect was observed when the cells were pre-illuminated by white light of  $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in the presence of DCMU, a treatment that also results in PQ oxidation due to PSII inhibition by DCMU (Fig. 4A).

In double mutant cells (*dum* 19/25), a high relative amplitude of the PSI band, indicative of state 2, was found already in cells frozen in white light (Fig. 4A). It was only slightly increased after dark incubation under nitrogen. Pre-illumination by PSI light of  $\lambda > 705$  nm, instead of promoting transition to state 1 as in wild-type cells, caused a slight increase of the 715-nm band. This indicates a slight shift toward state 2, which can probably be explained by residual PSII excitation. Transition to state 1 was only observed after pre-illumination by white light in the presence of DCMU. Thus, compared with wild type, the double mutant appears closer to state 2 in continuous white light and shows transition to state 1 only in conditions that allow strong excitation of PSI.

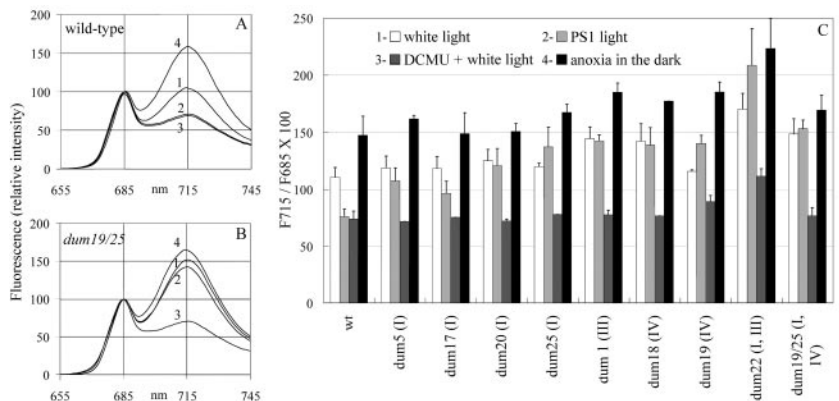
To compare the whole set of mutants with regard to their ability to perform state transitions, the F715 to F685 ratio was used as an indicator of the state of excitation energy distribution and was measured in untreated cells and in state 1 or 2 conditions as above (Fig. 4B). Compared with wild type, complex I mutants (*dum*5, *dum*17, *dum*20, and *dum*25) showed already significant shifts toward state 2 when frozen under white light (untreated) or in state 1 conditions. In these mutants, the transition to state 1 was barely detected. Similarly, mutants of the Cyt pathway (*dum*1 for complex III and *dum*18 and *dum*19 for complex IV) did not show transition to state 1. In state 2 conditions, these mutants further showed a higher F715 to F685 ratio than the wild type in the same conditions. Double mutants (*dum*19/25 and *dum*22), when frozen in white light, showed a F715 to F685 ratio that was as high as for the wild type in state 2 conditions. This ratio further increased in state 2 conditions and could reach a value well beyond the one found for the wild type (2.25 instead of 1.5 for *dum*22). Thus, one concludes that excitation of PSI by  $60 \text{ W m}^{-2}$  during 15 min (state 1 conditions) does not promote state 1 in most of the mutants. However, transition to state 1 was promoted by pre-illumination by white light in the presence of DCMU. On the other hand, the most affected mutants can show a significantly higher F715 to F685 ratio in state 2 compared with wild type.

State transitions are caused by phosphorylation (state 2) or dephosphorylation (state 1) of a set of mobile LHCs of the *lhcb* family. In *C. reinhardtii*, state 2 transition involves phosphorylation of LHCII polypeptides and the minor Chl *a/b*-binding CP26 and CP29 polypeptides at a Thr residue (Wollman



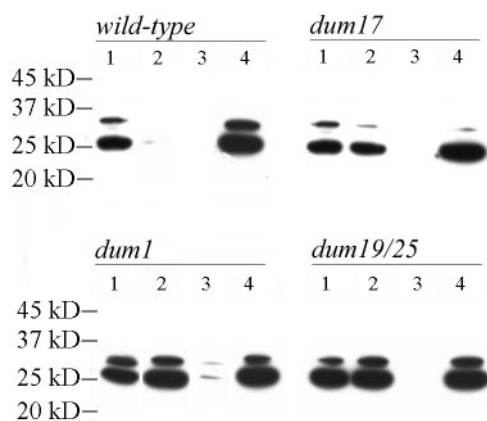
**Figure 3.** Cellular ATP concentrations of mitochondrial mutants, expressed in percentage of the wild-type control. Cells were fixed under illumination with white light of  $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , as used during growth.

**Figure 4.** Analysis of state transitions by 77 K fluorescence spectroscopy. A, Fluorescence emission spectra (77 K) of the wild-type control and of the *dum19/25* double mutant (lacking complexes I and IV). Different pretreatments were applied to cell suspensions before freezing: 1, control under white light of  $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; 2, illumination by PSI light ( $\lambda > 705 \text{ nm}$ ) of  $60 \text{ W m}^{-2}$  during 15 min; 3, illumination by white light of  $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in the presence of  $10 \mu\text{M}$  3-(3,4-dichlorophenyl)-1,1-dimethylurea (DCMU); and 4, dark incubation under nitrogen atmosphere during 20 min. B, F715 to F685 ratios measured in the same conditions for the wild type and for the indicated mutants.



and Delepelaire, 1984), which can be detected on immunoblots using an anti-phospho-Thr antibody (Fleischman et al., 1999). In membranes of wild-type cells (Fig. 5), we detected two main bands of 26- and 34-kD apparent molecular mass. Because the number and position of phospho-Thr-containing polypeptides are highly dependent on the gel system used, we will refer to them collectively as antenna phosphoproteins. These two polypeptides were heavily phosphorylated in state 2 conditions (anoxia in darkness). The phosphorylation level was significantly lower when cells were frozen under the white light ( $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) used for growth, and no antenna phosphoprotein could be detected in either of the two conditions that promote transition to state 1 (PSI light pre-illumination or white light pre-illumination in the presence of DCMU).

Complex I mutants such as *dum17* already showed a clearly different behavior because pre-illumination



**Figure 5.** Immunoblot detection of phosphorylated LHCs of the wild-type control and of the *dum17*, *dum1*, and *dum19/25* mutants lacking complex I, complex III, and complexes I and IV, respectively. Immunoblotting was performed on  $10 \mu\text{g}$  of membrane proteins using an antibody against phospho-Thr. Different pretreatments were applied to cell suspensions before membrane isolation: 1, control under white light of  $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ; 2, illumination by PSI light ( $\lambda > 705 \text{ nm}$ ) of  $60 \text{ W m}^{-2}$  during 15 min; 3, illumination by white light of  $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in the presence of  $10 \mu\text{M}$  DCMU; and 4, dark incubation under nitrogen atmosphere during 20 min.

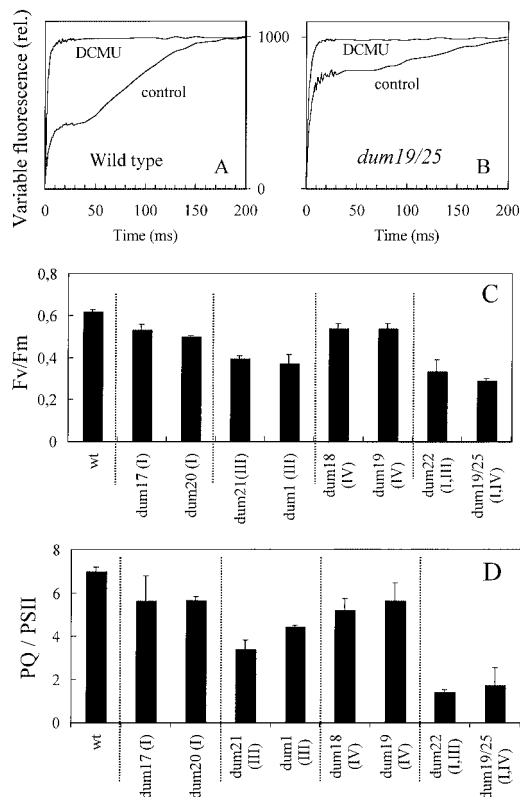
by PSI light did not cause significant labeling attenuation, in contrast to wild type. The *dum1* mutant (lacking complex III) and the *dum19/25* double mutant (lacking complexes I and IV) exhibited strong phosphorylation under white light, PSI light, or anoxia in the dark but still showed a marked decrease of phosphorylation level when pre-illuminated with white light in the presence of DCMU.

The persistence of phosphorylated antenna proteins in PSI light seen in the mutants was consistent with their inability to perform transition to state 1 in these conditions, as concluded from 77 K fluorescence measurements.

#### The Low Rate of "State 1" Transition in the Mutants Is Correlated with a Higher Reduction Level of the PQ Pool

In *C. reinhardtii*, as in higher plants, state transitions are controlled primarily by the redox status of the PQ pool. Previous studies have indicated that inhibitors of the mitochondrial electron transport or ATP synthesis cause a rapid non-photochemical reduction of the PQ pool that results in transition toward state 2 (Bulté et al., 1990). To evaluate the redox status of the PQ pool in the set of mitochondrial mutants studied here, we have performed fluorescence induction measurements at room temperature. During a saturating red light pulse ( $1,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) given after a short dark adaptation (5 min), wild-type cells showed a ratio of variable to maximal fluorescence ( $F_v/F_m$ ) around 0.6 in our experimental conditions (Fig. 6C). Single mutants showed significantly reduced  $F_v/F_m$  ratios, which is another indication of a transition to state 2 (Finazzi et al., 1999). In double mutants, this ratio was reduced to 0.3, a value close to the one obtained with wild-type cells placed in state 2 by a 5-min dark incubation in the absence of oxygen (data not shown).

The redox state of the PQ pool can be evaluated semiquantitatively on the basis of fluorescence induction measurements performed in the absence and in the presence of DCMU, an inhibitor of PSII-driven electron transport between the bound plastoquinone



**Figure 6.** Analysis of the redox state of PQs from fast fluorescence induction curves recorded in the absence or in the presence of DCMU (10  $\mu\text{M}$ ) after 5 min of dark adaptation. A and B, Variable fluorescence traces (averages of four recordings) of cell suspensions of the wild-type control and of the *dum19/25* double mutant lacking complexes I and IV (only the variable part of the signal, from  $F_o$  to  $F_m$ ) is shown here after normalization to  $F_m$ ). C,  $F_v/F_m$  ratios in the absence of DCMU. D, Apparent numbers of oxidized PQ per PSII reaction center, calculated from the complementary areas over the fluorescence induction curves.

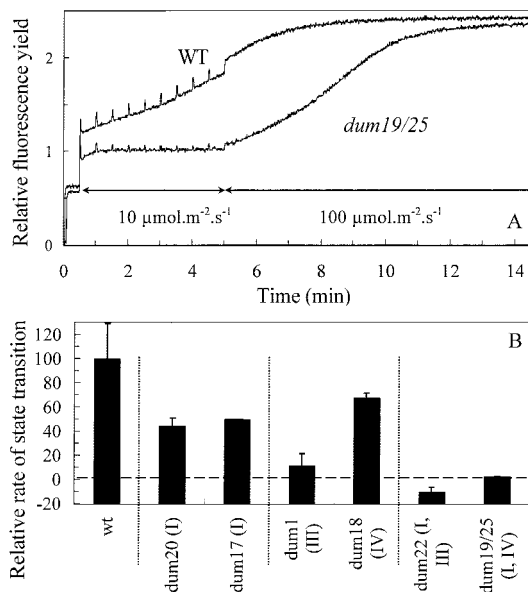
in PSII ( $Q_A$ ) and external PQ acceptors. Early studies have shown that the area between the fluorescence rise curve and its  $F_m$  asymptot (complementary area) is proportional to the number of electrons transported through the PSII reaction center during the induction phenomenon (Malkin and Kok, 1966). As a consequence, the number of oxidized PQ molecules per active PSII reaction center can be derived from the ratio of the complementary area measured in the absence and in the presence of DCMU, as shown in Figure 6, A and B, for wild-type and *dum19/25* cells, respectively. This ratio is best measured when PQ reoxidation by PSI is abolished, for instance by using a *C. reinhardtii* mutants lacking Cyt *b6/f*. In this case, oxidized PQ values around 5 have been found (Ben-noun, 2001). By using an excitation light of 1,000  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , which allowed us to approach full PQ reduction at  $F_m$  (judging from the maximal  $F_m/F_o$  ratio) and, thus, minimize the effect of PQ reoxidation, we obtained an average value around 7 in wild-type cells (Fig. 6D). Complex I mutants showed

slightly lower average values. A significant reduction was observed in complex III mutants (average values around 4), whereas complex IV mutants behaved like complex I mutants. Double mutants showed the lowest values (around 1.5 in average; Fig. 6D).

Because the measurements were performed after a 5-min dark adaptation, these results indicate that significant non-photochemical reduction of the PQ pool occurs in mutants and that its rate is dependent on the extent of inhibition of respiration caused by the mitochondrial mutations. The differences between the behavior of complex III and complex IV mutants in this respect and in the  $F_v/F_m$  ratio, however, are unexpected and may point to specific effects of deficiencies in one or the other complex (see "Discussion").

An increased rate of non-photochemical PQ reduction may explain why PSI light fails to promote state 1 transition in the mutants, as evidenced by 77 K fluorescence spectra measurements and detection of phosphorylated LHClI proteins. For state 1 transition to occur, the rate of PQ oxidation in PSI light must overbalance the rate of non-photochemical PQ reduction in such a way that net PQ oxidation is achieved. When the rate of non-photochemical PQ reduction is high, the rate of PSI excitation by the poorly absorbed light at wavelength beyond 705 nm may be too low, and PQ may remain largely reduced. On the other hand, white light of moderate intensity will be better absorbed by PSI and cause higher rates of PQ oxidation in the presence of DCMU, leading to state 1. The persistence of state 2 in PSI light would simply reflect a lower yield of state 1 transition in the mutants. We verified this point by comparing the rate of state 1 transition under white light of low intensity (10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) in wild-type or mutant cells in the presence of DCMU. For this purpose, the kinetics of state 1 transition were monitored by continuous fluorescence measurements at room temperature using modulated excitation. State 1 transition causes an increase of the maximal fluorescence yield ( $F_m$ ), which can be followed by applying saturating pulses during continuous measurements of fluorescence yield (Delepelaire and Wollman, 1985; Finazzi et al., 1999). The time course of typical experiment is shown in Figure 7A for wild type and the *dum19/25* mutant. After a 5-min dark adaptation, cells were illuminated by actinic white light of 10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  during 5 min; then, light intensity was increased to 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  to complete state 1 transition. The  $F_m$  changes during low-light excitation were monitored by exposure to repeated 1-s saturating pulses of 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Wild-type cells, but not double mutant cells, showed a steady  $F_m$  increase during excitation by white light of 10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . Both cell types reached maximal  $F_m$  under 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . In wild-type cells, the initial state of energy distribution was intermediate between states 1 and 2, whereas double mutant cells were close to state 2 (77





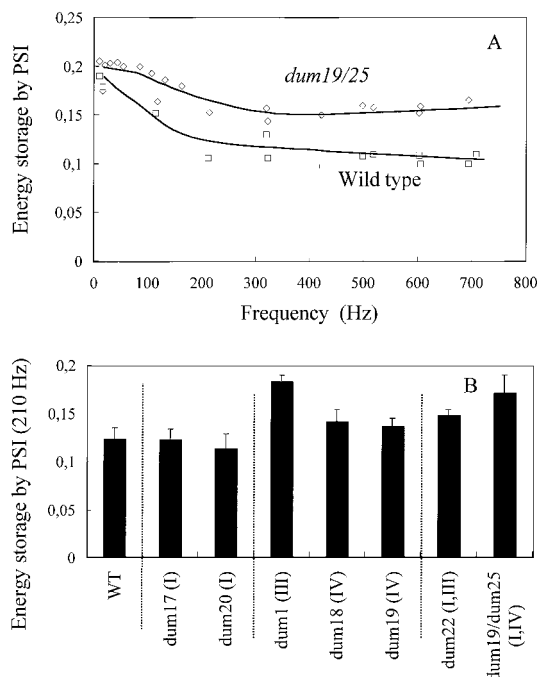
**Figure 7.** Slow changes in room temperature fluorescence quantum yield associated with state 1 transition during illumination by white light in the presence of 10  $\mu\text{M}$  DCMU. A, Recordings of the modulated fluorescence signal in wild-type and *dum19/25* cells. Cells are illuminated by 10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ , and 1-s saturating pulses of 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  are given every 1 min to record  $F_m$ . After approximately 5 min, the photosynthetic photon flux density (PPFD) is kept continuously at 100  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ . B, Initial rate of  $F_m$  increase under 10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  in wild-type and mutant cells, expressed in percentage of the wild-type control.

K fluorescence; data not shown). Thus, the measured kinetics followed a larger part of the state 1 transition process in the mutant. The stability of  $F_m$  under low actinic light and its increase under stronger light indicate the high light requirement for initiating state 1 transition in the mutant. We quantified the relative rate of state 1 transition in different mutants by the ratio of the initial rate of  $F_m$  increase under low actinic light (10  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$ ) over the maximal  $F_m$  value reached at state 1. The variations of this ratio from one mutant to another, shown in Figure 7B, are in good agreement with variations of the PQ redox state evaluated by measurements of complementary areas over the fluorescence induction curve (Fig. 6D). This confirms the close link between state transitions and non-photochemical PQ reduction.

#### Photo-Acoustic Measurements of Energy Storage (ES) under PSI Light Indicate an Increased Rate of Cyclic Electron Flow in the Most Affected Mutants

The physiological role of state transitions has been reevaluated recently and suggested to provide a regulation mechanism to control the relative rates of linear and cyclic electron transport pathways in chloroplasts in response to the ATP status of the cell (Wollman, 2001). As we show here, respiratory mutants of *C. reinhardtii* are shifted to state 2 and show

decreased quantum yields of linear electron transport compared with wild type. To determine whether these modifications are accompanied by increased rates of cyclic electron transport, we performed photo-acoustic measurements of thermal dissipation by PSI. It was shown previously that ES under weak modulated PSI light, measured as the relative amplitude of the photothermal signal rise caused by saturating light, reflects the yield of PSI-driven cyclic electron transport (Malkin and Canaani, 1994). We measured ES as a function of the modulation frequency in wild-type and in double mutant (*dum19/25*) cells deposited on a nitrocellulose filter and treated as solid samples. In both cases, a biphasic relationship between ES and modulation frequency was observed (Fig. 8A), as already described for *C. reinhardtii* cells (Canaani et al., 1989). ES was significantly higher at all frequencies in double mutant cells, but the increase was more pronounced at high frequencies (beyond 150 Hz). When comparing ES measured at 200 Hz in different mutants (Fig. 8B), a significant increase was found for complex III, complex IV, and double mutants but not for complex I mutants, which were close to wild type. The highest stimulation of ES, around 40% compared with wild type, was found for *dum1* (complex III) and *dum19/25* (complexes I and IV) mutants. It is noteworthy that complex IV mutants (*dum19* and *dum18*) were, again, less stimulated than the complex III mutant (*dum1*).



**Figure 8.** PSI ES measured from the photo-acoustic photothermal signal measured under modulated PSI light ( $\lambda > 715 \text{ nm}$ ). A, ES as a function of the modulation frequency of excitation light in cells of the wild-type control and of the *dum19/25* mutant lacking complexes I and IV. B, ES values of cells of the wild type and of the indicated mutants.

## DISCUSSION

Previous works have shown that the respiratory mutants used in this study are unable to grow in darkness or grow poorly when supplied with acetate (Matagne and Remacle, 2002; see Table I). This light requirement indicates that photosynthetic phosphorylations are necessary to compensate the reduction in rate of oxidative phosphorylation in the mutants. In the chloroplast, ADP phosphorylation can be energetically coupled to either linear or cyclic (PSI-mediated) electron flow. However, it is generally admitted that most of the ATP produced through linear electron flow is consumed by the reductive pentose pathway, the operation of which necessitates a ratio of three ATPs to two NADPHs for every fixed CO<sub>2</sub>. In linear electron transport from water to NADP<sup>+</sup>, the ATP/NADPH ratio is somewhat lower (1.28; Joliot and Joliot, 2002). Therefore, it is likely that ATP synthesis driven by cyclic electron flow is required to support growth of the mutants, especially those in which oxidative phosphorylations are completely impaired.

The very strong dependence of oxygen evolution on respiration found here shows that in the double mutants, which have lost the ability for oxidative phosphorylations, the quantum efficiency of linear electron transport is reduced to 15% to 20% of that of the wild type. This suggests that in this case, light energy is used mainly in cyclic electron transport. The response of the other mutants is roughly proportional to the expected decrease in oxidative phosphorylation due to the loss of complex I or either complex III or IV. State transition experiments and PQ reduction estimations indicate that the inhibition of oxygen evolution in the mutants is due to a shift to state 2 caused by non-photochemical reduction of the PQ pool. Altogether, the results are in general agreement with the model recently proposed by Wollman (2001) in which state transitions allow modulation of the relative rates of linear and cyclic electron flows in response to the ATP status of the cell. They further show the ability of this regulatory mechanism to ensure survival and growth in conditions of restricted mitochondrial activity. Previous characterization has shown, however, that under mixotrophic conditions (light + acetate), mitochondrial mutants display somewhat limited growth compared with wild type in the light (Remacle et al., 2001), with mutants of complex I being less affected than mutants of the Cyt pathway or double mutants. The extent to which cyclic photophosphorylation compensates for the reduction of mitochondrial ATP synthesis must be one of the factors that determine growth rate. From the present results, it appears that compensation is only partial because the cellular ATP levels of the mutants are lower than that of wild type (except for complex I mutants). On the other hand, the reduction in the quantum yield of photosynthetic linear electron transport will limit photosynthetic

carbon fixation in moderate light and contribute to the reduction in growth rate. Obviously, each mutant reaches an optimum steady-state equilibrium by adjusting photosynthetic carbon fixation and cyclic photophosphorylation in response to mitochondrial activity.

In this work, ES under PSI light was measured as indicator of cyclic electron flow. Significant ES was detected in the wild type, which indicates significant cyclic electron transport upon exclusive PSI excitation in state 1. Its biphasic dependence on the modulation frequency of the exciting light values most probably indicates the occurrence of two different cyclic electron pathways with different kinetics, as suggested by a recent study on tobacco (*Nicotiana tabacum*) chloroplasts (Joët et al., 2002). Following the interpretation from this study, ES at high frequency (200 Hz or more) is mainly due to NAD(P)H-dependent cyclic electron flow, whereas at low frequency, an additional contribution from cyclic electron flow involving ferredoxin and a putative ferredoxin-PQ oxidoreductase is involved. The higher stimulation found in the high frequency region compared with the low-frequency region in the mutants suggests that essentially the rate of the NAD(P)H-dependent pathway is increased. In this region, the enhancement is not detected in complex I mutants and it varies from 20% to 50% in the others. Because the measuring light (>715 nm) excites preferentially Chl located in the core of PSI, this enhancement cannot be caused by an increased antenna size in state 2 but rather is due to faster intrinsic rates of electron transport steps. This effect is most probably due to the redistribution of Cyt *b6/f* from appressed to nonappressed thylakoid regions upon state 2 transition, shown before by Vallon et al. (1991). This redistribution will favor electron transport between Cyt *b6/f* and PSI by plastocyanin because PSI is exclusively located in appressed thylakoid regions (Vallon et al., 1986; Wollman, 2001). In this context, a recent kinetic study on higher plant thylakoids strongly suggested that cyclic electron flow necessitates physical connection between PSI and Cyt *b6/f* (Joliot and Joliot, 2002).

To evaluate the effective stimulation of cyclic electron transport, the increased PSI antenna size due to state 2 transition must be taken into account together with the stimulation of ES. Previous studies have shown that in *C. reinhardtii*, a shift to state 2 corresponds to the displacement of 80% of the LHClI from PSII to PSI, leading to an increase of PSI antenna size of 50% in red light compared with state 1 (Delosme et al., 1996). This increase, together with the 50% stimulation of ES in the most affected mutants, would lead to more than doubling the rate of cyclic electron flow under constant excitation conditions.

The large effect of state transitions on energy distribution between PSs explains the strong impact of respiration on linear electron flow measured here as

oxygen evolution. However, significant apparent quantum yields of oxygen evolution (10%–20% of wild type) were measured in double mutants, which are deficient in mitochondrial ATP synthesis and remain in state 2 in the light. Thus, in contrast to earlier findings on wild-type cells subjected to anaerobiosis in similar culture conditions (Finazzi et al., 1999), we find that a basal level of oxygen evolution persists in state 2. This apparent discrepancy has to be found in the different experimental approaches used to reach state 2. In the present work, a basal level of respiration (essentially due to alternative pathways) is maintained in the double mutants, whereas anaerobiosis leads to a complete inhibition and may have additional effects. The persistence of low quantum yields of oxygen evolution in double mutants results in maximal oxygen values close to those of wild type in saturating light. It may allow the avoidance of PSII photo-inhibition during long-term exposure to moderate light. No indication of PSII photo-inhibition was apparent from the values of maximal variable fluorescence, which were similar in double mutants or in wild type in state 2.

In this study, we found that mutants of complex IV were less affected than mutants of complex III when the PQ redox status, the ability to undergo state 1 transition in weak light, and the ES by PSI were investigated. This is unexpected because complex III or IV mutants are in principle equivalent on the basis of mitochondrial respiration defect. The Cyt pathway is inactive in both cases, and we checked that the ATP level in dark-adapted (90 min) cells did not differ significantly (values of 65% to 70% of wild type), thus indicating no visible difference in oxidative phosphorylation ability (data not shown). Interestingly, it was found recently that complex IV is specifically involved in ascorbate synthesis in higher plant mitochondria (Bartoli et al., 2000). In plants, the last step of ascorbate biosynthesis consists of the oxidation of L-galactono-lactone by a membrane dehydrogenase that couples L-galactono-lactone oxidation to the reduction of Cyt *c* (Wheeler et al., 1998). Reduced Cyt *c* is then oxidized by complex IV. In potato mitochondria, inhibition of complex IV by cyanide strongly reduces ascorbate synthesis (Bartoli et al., 2000). One can hypothesize that the same pathway occurs in *C. reinhardtii* and that mitochondrial ascorbate synthesis is specifically inhibited in complex IV mutants. Therefore, it is tempting to propose that in wild type and in mutants not affected in complex IV, interactions of ascorbate with the photosynthetic electron transport chain participate in non-photochemical PQ reduction and initiate partial state 2 transition. Complex III mutants might even show higher responses because a stimulation of ascorbate synthesis by antimycin A (an inhibitor of Cyt *c* reduction by complex III) was reported in potato mitochondria (Bartoli et al., 2000). However, to our knowledge, reduction of PQ by ascorbate in thylakoids has not been reported,

although chemical reduction of extracted PQ by ascorbate is common routine. Other interactions with photosynthetic electron transport may be involved, such as with the PSI-reducing side and the PSII-oxidizing side (Smirnov, 2000). Further investigation is required to explore these possibilities in the context of the interactions between mitochondria and chloroplast.

Non-photochemical reduction of the PQ pool appears to play a key role in the transition to state 2 observed in the mutants. This was also observed in a previous work using inhibitors of respiration or of oxidative phosphorylation in wild-type cells or in one of the complex III mutants used here (*dum1*; Bulté et al., 1990). The high rate of “dark” PQ reduction in mitochondrial mutants is documented here by high levels of reduced PQ estimated from complementary fluorescence areas in dark-adapted cells. It explains in part the low quantum efficiency of state 1 transition in the mutants. On the other hand, increased rates of cyclic electron transport due to relocalization of Cyt *b6/f* in nonappressed thylakoid regions will also slow PQ oxidation. Non-photochemical PQ reduction has been ascribed to a chlororespiratory electron flow from NAD(P)H to oxygen (for review, see Peltier and Cournac, 2002). High PQ reduction level in mitochondrial mutants can be sustained by stimulated NADH production through glycolysis due to lower ATP levels (Rebeille and Gans, 1988). However, ATP deficiency is partly compensated by increased cyclic photophosphorylation in steady-state conditions, and clear differences in cellular ATP levels were only found in mutants of the Cyt pathway. Therefore, increased NAD(P)H levels resulting directly from lower rates of mitochondrial NADH oxidation must also be considered as a cause of increased PQ reduction rate in the mutants.

In conclusion, the use of mutants with permanent defects in the mitochondrial electron transport chain allows to demonstrate that photosynthetic electron transport is tightly controlled by respiration in *C. reinhardtii*. This work further emphasizes state transitions as a regulatory process important for modulating cyclic and linear chloroplasmic electron transport and maintaining viability when mitochondrial ATP synthesis is impaired. In the future, the double mutants exhibiting high non-photochemical PQ reduction rate should become useful tools for further investigating the still poorly characterized electron transport pathways involved in chlororespiration in this alga.

## MATERIALS AND METHODS

### Strains and Growth Conditions

Strains used in this work are derived from the 137c strain of *Chlamydomonas reinhardtii* except *dum22*, which is a hybrid from *C. reinhardtii* × *C. smithii* (Matagne and Remacle, 2002; see Table I for details). Cells were routinely grown at 25°C in Tris-acetate-phosphate medium (Gorman and Levine, 1965) under 70  $\mu\text{mol m}^{-2} \text{s}^{-1}$  continuous white light and harvested



at a density of  $4 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ . Cell density was monitored using a coulter counter (Coulter Electronics, Harpenden Herts, UK).

### Pigment Analysis

Pigments were extracted from whole cells in ethanol and debris were removed by centrifugation at 10,000g for 15 min. The Chl (*a* and *b*) concentration was determined according to Lichtenthaler (1987) with a lambda 20 UV/Vis spectrophotometer (Perkin Elmer, Norwalk, CT). Twenty-five microliters of pigment extract was subjected to reverse-phase HPLC analysis using a set-up comprising a 616 pump, a 717 plus autosampler, and a 996 online photodiode array detector (Waters, Milford, MA). A Nova Pak C18, 60A column (150-mm length, 4- $\mu\text{m}$  pore size) was used for separation. Acquisition and data treatment were performed using the Millennium software (Waters). Pigments were eluted during 2 min with a gradient from 100% (v/v) solvent A (80% [v/v] methanol and 20% [v/v] 0.5 M ammonium acetate [pH 7]) to 100% (v/v) solvent B (90% [v/v] acetonitrile in water), then during 20 min with a gradient from 100% (v/v) solvent B to 31% (v/v) solvent B and 69% (v/v) solvent C (ethyl acetate) and during 3 min with a gradient from the latter solvent mixture to 100% (v/v) solvent A. The solvent flow rate was 1  $\text{mL min}^{-1}$ . Concentrations of individual pigments were determined using authentic references prepared by chromatography on silica gel thin-layer plates (Chl *a* and *b*) or pigments purchased from DHI-Water and Environment (Horstholm, Denmark).

### Protein Content

Protein content was determined according to the method of Bradford (1976).

### ATP Determination

ATP was extracted according to Gans and Rebeille (1990). ATP cellular level was determined using the Enliten luciferase/luciferin kit (Promega, Madison, WI).

### Redox Absorbance Difference Spectra

The isolation of total membrane fractions was conducted according to Remacle et al. (2001), and 60% (v/v) glycerol was added to the preparation. The amounts of Cyt *b-559* (high potential + low potential forms) and Cyt *f* were determined by redox difference spectra as by Mizusawa et al. (1995) using extinction coefficients  $\epsilon_{559\text{nm}} = 15 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  for Cyt *b-559* and  $\epsilon_{554\text{nm}} = 26 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$  for Cyt *f* (Metzger et al., 1997). P700 was determined according to Melis and Brown (1980), using  $\epsilon_{700\text{nm}} = 64 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ .

### State Transition Treatments

Cells were placed in state 1 conditions by incubation for 15 min either under white light ( $70 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) in the presence of  $10 \mu\text{M}$  DCMU or under far-red light ( $>705 \text{ nm}$ , fluence rate of  $60 \text{ W m}^{-2}$ ). The transition to state 2 was achieved by anaerobic incubation in darkness under nitrogen atmosphere for 20 min (Bulté et al., 1990).

### Oxygen Evolution and Fluorescence Emission Measurements

Respiration and photosynthesis were measured as  $\text{O}_2$  exchange rates using a Clark-type oxygen electrode at  $25^\circ\text{C}$  (Chlorolab 2, Hansatech Instruments, King's Lynn, UK). The actinic light was provided by light-emitting diodes with an emission maximum around 650 nm. Light saturation curves were obtained by measuring  $\text{O}_2$  exchange rates during successive 2-min illumination periods with PPFs increasing stepwise from 0 to  $1,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Chl concentration was 2 to  $3 \mu\text{g mL}^{-1}$ .

Changes of fluorescence yield associated with the transition to state 1 were measured in the chamber used for the  $\text{O}_2$  recordings using a modulated fluorometer (type MFMS, Hansatech Instruments). The analytical light was provided by light-emitting diodes with an emission maximum of 580 nm and PPF of  $0.5 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ . Actinic white light was provided by a

tungsten-halogen lamp (Intralux 500-H, Volpi AG, Urdorf-Zürich). The final PPF was adjusted using neutral filters.

Fast fluorescence rise kinetics associated with PQ photoreduction were recorded at room temperature under continuous excitation using a portable fluorometer (Handy-PEA, Hansatech Instruments) equipped with an accessory for liquid suspension measurements. Actinic light at 650 nm was set at a PPF of  $1,000 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ , and Chl concentration of the algal samples was adjusted to a constant value of  $20 \mu\text{g mL}^{-1}$ . Data acquisition rates of 10  $\mu\text{s}$  during the first 2 ms and fast stabilization (50  $\mu\text{s}$ ) of the light-emitting photodiodes allowed accurate determination of  $F_0$  and, hence, of  $F_v/F_m$  ratios (Srivastava et al., 1995). However,  $F_v/F_m$  ratios of wild-type cells were lower than previously reported (around 0.6 instead of 0.7–0.75 in Srivastava et al., 1995). This was related to the relatively short adaptation time of the algae in liquid medium (around 4 h) used in this study because we observed a slow increase of  $F_v/F_m$  values during growth in liquid medium over days (data not shown). Apparent values of the number of oxidized PQ molecules per PSII were calculated according to Malkin and Kok (1966; see also Bennoun, 2001) as  $1/2(A_C - A_{\text{DCMU}})/A_{\text{DCMU}}$ , where  $A_C$  and  $A_{\text{DCMU}}$  are the complementary areas above the fluorescence induction curves of control and DCMU-treated samples, respectively (DCMU was prepared in ethanol and the final concentration was  $5 \mu\text{M}$  in 0.5% [v/v] ethanol).

Fluorescence emission spectra at 77 K were recorded using a LS 50B spectrofluorometer (Perkin Elmer). The excitation wavelength was 440 nm and excitation, and emission slits were 10 and 5 nm, respectively. A broad blue filter (CS-4-96, Corning, Corning, NY) was placed between the excitation window and the sample to minimize stray light. Cells were treated to induce state transitions before freezing in liquid nitrogen. Chl concentration was lower than  $2 \mu\text{g mL}^{-1}$ , and it was verified that no changes in the intensity ratio of the 685- and 715-nm emission bands arose from reabsorption artifacts. Spectra were corrected for the wavelength-dependent photomultiplier response.

### Analysis of LHCII Protein Complexes

State 1 or state 2 conditions were applied as described above, and the phosphorylation states of LHCII were stabilized by incubating the cells ( $5 \times 10^6$  cells  $\text{mL}^{-1}$ ) during 5 min in darkness at  $4^\circ\text{C}$  in the presence of  $600 \mu\text{M}$  *p*-benzoquinone (adapted from Bulté and Wollman, 1990). Cells were then harvested and suspended in the extraction buffer (25 mM HEPES-KOH [pH 7.0], 5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 300 mM Suc, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride) and total membranes were prepared as described (Remacle et al., 2001). Ten micrograms of proteins of membrane fractions was separated by SDS-PAGE using 15% (w/v) acrylamide gels containing 6 M urea and electroblotted to polyvinylidene difluoride membrane according to standard protocols. Phosphorylated proteins were detected using rabbit polyclonal antibodies to phospho-Thr (Zymed Laboratories Inc., Am Uden, The Netherlands) and the ECL kit using anti-rabbit horseradish peroxidase-conjugated antibodies (Roche Applied Science, Vilvoorde, Belgium). The molecular size of the proteins was calculated by comparison with known markers (Dual Color protein standards, Bio-Rad Laboratories, Hercules, CA).

### Photo-Acoustic Spectroscopy

Photo-acoustic measurements of ES by PSI were performed as described in detail by Ravenel et al. (1994). In brief, cells deposited on a cellulose nitrate/acetate filter were illuminated by a modulated light that exclusively excites PSI ( $\lambda > 715 \text{ nm}$ , modulation frequency value selected between 10 and 800 Hz with a constant integrated fluence rate of  $21 \text{ W m}^{-2}$ ). Heat dissipation was measured as the amplitude *A* of the generated acoustic wave (photothermal signal) in synchronicity with the exciting modulated light. After about 30 s, a saturating continuous white light ( $1,400 \mu\text{mol m}^{-2} \text{ s}^{-1}$ ) was superimposed on the modulated light, which caused an increase of the photothermal signal to an amplitude  $A^{\text{max}}$  as the absorbed modulated light energy was then dissipated as heat. ES was calculated as  $\text{ES} = (A^{\text{max}} - A)/A^{\text{max}}$ . It was verified that the intensity of the modulated light was weak enough to allow maximal ES to be measured (i.e. the modulated light could be considered as analytic in our conditions).

### ACKNOWLEDGMENT

The authors thank Prof. Francis-André Wollman for helpful suggestions during experiments on state transitions.

Received June 10, 2003; returned for revision June 30, 2003; accepted July 21, 2003.

## LITERATURE CITED

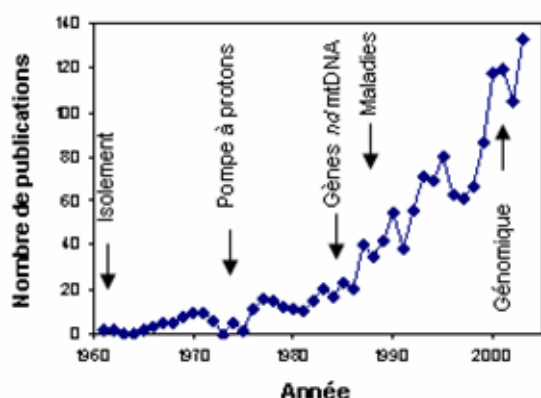
- Allen JF** (1992) Protein phosphorylation in regulation of photosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1098**: 275–335
- Bartoli CG, Pastori GM, Foyer CH** (2000) Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiol* **123**: 335–343
- Bennoun P** (1982) Evidence for a respiratory chain in the chloroplast. *Proc Natl Acad Sci USA* **79**: 4352–4356
- Bennoun P** (2001) Chlororespiration and the process of carotenoid biosynthesis. *Biochim Biophys Acta* **1506**: 133–142
- Bradford MM** (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem* **72**: 248–254
- Bulté L, Gans P, Rebeillé F, Wollman FA** (1990) ATP control on state transitions *in vivo* in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* **1020**: 72–80
- Bulté L, Wollman FA** (1990) Stabilization of states I and II by *p*-benzoquinone treatment of intact cells of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* **1016**: 253–258
- Canaani O, Schuster G, Ohad I** (1989) Photoinhibition in *Chlamydomonas reinhardtii*: effect on state transition, intersystem energy distribution and photosystem I cyclic electron flow. *Photosynth Res* **20**: 129–146
- Cardol P, Matagne RF, Remacle C** (2002) Impact of mutations affecting ND mitochondria-encoded subunits on the activity and assembly of complex I in *Chlamydomonas*: implication for the structural organization of the enzyme. *J Mol Biol* **319**: 1211–1221
- Colin M, Dorthu MP, Duby F, Remacle C, Dinant M, Wolwertz MR, Duyckaerts C, Sluse F, Matagne RF** (1995) Mutations affecting the mitochondrial genes encoding the cytochrome oxidase subunit I and apocytochrome b of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol Gen Genet* **249**: 179–184
- Delepelaire P, Wollman FA** (1985) Correlations between fluorescence and phosphorylation changes in thylakoid membranes of *Chlamydomonas reinhardtii* *in vivo*: a kinetic analysis. *Biochim Biophys Acta* **809**: 277–283
- Delosme R, Olive J, Wollman FA** (1996) Changes in light energy distribution upon state transitions: an *in vivo* photoacoustic study of the wild type and photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* **1273**: 150–158
- Finazzi G, Furia A, Barbagallo RP, Forti G** (1999) State transitions, cyclic and linear electron transport and photophosphorylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* **1413**: 117–129
- Finazzi G, Rappaport F, Furia A, Fleischmann M, Rochaix JD, Zito F, Forti G** (2002) Involvement of state transitions in the switch between linear and cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO Rep* **3**: 280–285
- Fleischman MM, Ravanel S, Delosme R, Olive J, Zito F, Wollman FA, Rochaix JD** (1999) Isolation and characterization of photoautotrophic mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in state transition. *J Biol Chem* **274**: 30987–30994
- Gans P, Rebeillé F** (1990) Control in the dark of the plastoquinone redox state by mitochondrial activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim Biophys Acta* **1015**: 150–155
- Gorman DS, Levine RP** (1965) Cytochrome *f* and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc Natl Acad Sci USA* **94**: 3436–3441
- Hoefnagel MHN, Atkin OK, Wiskich JT** (1998) Interdependence between chloroplasts and mitochondria in the light and the dark. *Biochim Biophys Acta* **1366**: 235–255
- Joët T, Cournac L, Peltier G, Havaux M** (2002) Cyclic electron flow around photosystem I in C3 plants: *in vivo* control by the redox state of chloroplasts and involvement of the NADH-dehydrogenase complex. *Plant Physiol* **128**: 760–769
- Joliot P, Joliot A** (2002) Cyclic electron transfer in plant leaf. *Proc Natl Acad Sci USA* **99**: 10209–10214
- Lichtenthaler HK** (1987) Chlorophylls and carotenoids: pigments of photosynthetic biomembranes. *Methods Enzymol* **148**: 350–382
- Malkin S, Canaani O** (1994) The use and characteristics of the photoacoustic method in the study of photosynthesis. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **45**: 493–526
- Malkin S, Kok B** (1966) Fluorescence induction studies in isolated chloroplasts: I. Number of components involved in the reaction and quantum yields. *Biochim Biophys Acta* **126**: 413–432
- Matagne RF, Michel-Wolwertz MR, Munaut C, Duyckaerts C, Sluse F** (1989) Induction and characterization of mitochondrial DNA mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Cell Biol* **108**: 1221–1226
- Matagne RF, Remacle C** (2002) The genetics and molecular biology of mitochondria in *Chlamydomonas*. *Recent Res Dev Plant Biol* **2**: 15–32
- Melis A, Brown JS** (1980) Stoichiometry of system I and system II reaction centers and of plastoquinones in different photosynthetic membranes. *Proc Natl Acad Sci USA* **77**: 4712–4716
- Metzger SU, Cramer WA, Whitmarsh J** (1997) Critical analysis of the extinction coefficient of chloroplast cytochrome *f*. *Biochim Biophys Acta* **1319**: 233–241
- Mizusawa N, Ebina M, Yamashita T** (1995) Restoration of the high potential form of cytochrome b-559 through the photoreactivation of Tris-inactivated oxygen-evolving center. *Photosynth Res* **45**: 71–77
- Peltier G, Cournac L** (2002) Chlororespiration. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* **53**: 523–550
- Ravenel J, Peltier G, Havaux M** (1994) The cyclic electron pathways around photosystem I in *Chlamydomonas reinhardtii* as determined *in vivo* by photoacoustic measurements of energy storage. *Planta* **193**: 251–259
- Rebeillé F, Gans P** (1988) Interaction between chloroplasts and mitochondria in microalgae. *Plant Physiol* **88**: 973–975
- Remacle C, Duby F, Cardol P, Matagne RF** (2001) Mutations inactivating mitochondrial genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem Soc Trans* **29**: 442–445
- Remacle C, Matagne R** (2002) The genetics and molecular biology of mitochondria in *Chlamydomonas*. In SG Pamalai, ed, *Recent Research Development in Plant Biology*. Research Signpost, Kerala, India, pp 15–32
- Smirnov N** (2000) Ascorbate biosynthesis and function in photoprotection. *Philos Trans R Soc Lond B* **355**: 1455–1464
- Srivastava A, Strasser RJ, Govindjee** (1995) Polyphasic rise of chlorophyll *a* fluorescence in herbicide-resistant D1 mutants of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Photosynth Res* **43**: 131–141
- Vallon O, Bulté L, Dainese P, Olive J, Bassi R, Wollman FA** (1991) Lateral redistribution of cytochrome b6/*f* complexes along the thylakoid membranes upon state transitions. *Proc Natl Acad Sci USA* **88**: 8262–8266
- Vallon O, Wollman FA, Olive J** (1986) Lateral distribution of the main protein complexes of the photosynthetic apparatus in *Chlamydomonas reinhardtii* and in spinach: an immunocytochemical study using intact thylakoid membranes and a PSII enriched membrane preparation. *Photobiochem Photobiophys* **12**: 203–220
- Wheeler GL, Jones MA, Smirnov N** (1998) The biosynthetic pathway of vitamin C in higher plants. *Nature* **393**: 365–369
- Wollman FA** (2001) State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *EMBO J* **20**: 3623–3630
- Wollman FA, Delepelaire P** (1984) Correlation between changes in light energy distribution and changes in thylakoid membrane polypeptide phosphorylation in *C. reinhardtii*. *J Cell Biol* **98**: 1–7



## 4. Discussion Générale

### 4.1. Le complexe I mitochondrial de *C. reinhardtii*

Le complexe I, enzyme le plus volumineux de la chaîne respiratoire mitochondriale, n'a fait l'objet que d'un nombre limité de travaux au cours de la décennie qui a suivi son isolement à partir des mitochondries de cœur de bœuf en 1961 (Hatefi *et al.*, 1961) (Figure 33). Un regain d'intérêt pour cet enzyme a suivi son identification en tant que pompe à protons (Ragan et Racker, 1973), mais l'augmentation du nombre de publications date surtout de l'identification des gènes *nd* dans le génome mitochondrial humain (Chomyn *et al.*, 1985) et plus encore de la découverte de pathologies humaines associées à des mutations dans ces gènes (Wallace *et al.*, 1988) (Figure 33). A l'heure actuelle, il apparaît que la majorité des désordres liés à une réduction de la phosphorylation oxydative mitochondriale résulte de déficiences du complexe I (Smeitink *et al.*, 2001).



**Figure 33.** Nombre de publications annuelles sur le complexe I depuis 1961 (adapté de (Matsuno-Yagi et Yagi, 2001) et des données publiées sur le site <http://www.scripps.edu/mem/biochem/CI/publications.html>). Quelques avancées significatives relatives à l'étude du complexe I sont notées à titre indicatif (détails dans le texte).

A ce jour, et malgré les efforts importants de recherche, la structure et le fonctionnement du complexe I restent encore à bien des égards largement méconnus. De ce fait, cet enzyme est considéré par plusieurs auteurs comme une boîte noire au sein de la chaîne respiratoire mitochondriale (Matsuno-Yagi et Yagi, 2001).

Une compilation des données de la littérature suggère que des 45 sous-unités identifiées chez le bœuf (Hirst *et al.*, 2003), 27 sont largement conservées chez les eucaryotes *C.elegans* (nématode), *A. thaliana*, *O. sativa* (plantes supérieures) et *N. crassa* (champignon) (*cf.* Introduction). Parmi ces 27 sous-unités, 14 sont les homologues des constituants de la NADH :ubiquinone oxydoréductase bactérienne.

Chez *Chlamydomonas*, en combinant une analyse protéomique du complexe I à une approche génomique, nous avons identifié 42 polypeptides, constituants potentiels de l'enzyme. La somme des masses moléculaires individuelles de ces protéines (970 kDa) est compatible avec la masse moléculaire du complexe I natif estimée par BN-PAGE (950 kDa, nos analyses ; 1000 kDa (van Lis *et al.*, 2003)). Les douze sous-unités qui n'ont pas été identifiées par l'analyse protéomique ont des masses moléculaires inférieures à 14 kDa ou sont extrêmement hydrophobes. Des observations similaires ont été effectuées pour le complexe I humain en utilisant la même approche méthodologique (Devreese *et al.*, 2002). Ces deux types de polypeptides contiennent peu de sites de clivage pour la trypsine et génère donc un nombre restreint de peptides susceptibles de donner un signal au spectromètre de masse. Par ailleurs, certaines sous-unités sont susceptibles d'être perdues durant la seconde étape d'électrophorèse (SDS-PAGE) ou d'échapper à la détection lors de la coloration au Bleu de Coomassie. En particulier, aucune des cinq sous-unités ND1,2,4,5,6 encodées par le génome mitochondrial de *Chlamydomonas* n'a été détectée. Rappelons à cet égard que les *Chlamydomonaceae* sont caractérisées par un nombre restreint de polypeptides encodés dans le génome mitochondrial (Nedelcu et Lee, 1998). En plus des cinq gènes identifiés chez *Chlamydomonas*, le génome mitochondrial des animaux et des champignons encode les gènes *nd3* et *nd4L*, et deux gènes additionnels (*nd7* et *nd9*) sont présents dans le génome mitochondrial des plantes supérieures. Plusieurs autres gènes, classiquement encodés dans le génome mitochondrial ont été identifiés dans le noyau chez *Chlamydomonas* ; c'est le cas des gènes *cox2*, *cox3*, *atp6* (Funes *et al.*, 2002; Perez-Martinez *et al.*, 2001; Perez-Martinez *et al.*, 2000). Il a été suggéré que les protéines ND3 et ND4L, qui possèdent trois segments transmembranaires potentiels (Walker, 1992) sont trop

hydrophobes pour être importées au travers de la double membrane mitochondriale (Race *et al.*, 1999). Nous avons cependant identifié les gènes *ND3*, *ND7*, *ND9* et *ND4L* dans le génome nucléaire de *Chlamydomonas* et, à l'exception de la protéine Nd4L, les sous-unités correspondantes ont été détectées au niveau protéique. Comparés à leurs homologues respectifs encodés dans la mitochondrie, les quatre polypeptides de *Chlamydomonas* possèdent une longue extension N-terminale (jusqu'à 120 résidus), qui peut correspondre à un signal d'adressage.

La comparaison des constituants du complexe I identifiés chez *Chlamydomonas* avec ceux des autres organismes montre que les 27 sous-unités conservées chez les mammifères, champignons et plantes supérieures, sont également conservées chez *Chlamydomonas*. Par ailleurs, nous avons défini quatre nouvelles familles de protéines appartenant au complexe I, portant à 31 le nombre de constituants largement conservés chez les eucaryotes. Une trente-deuxième sous-unité (B14.7) est aussi présente chez le boeuf, chez *Neurospora* et chez *Chlamydomonas*, mais n'a pas été identifiée dans les autres groupes. En plus des 14 constituants homologues aux sous-unités bactériennes, le complexe I des eucaryotes contiendrait donc 17 ou 18 composants largement conservés (*cf.* Tableau 2 de la Publication 1). Généralement considérées comme accessoires parce qu'elles n'ont pas de fonction connue, ces sous-unités pourraient stabiliser l'enzyme ou jouer un rôle dans sa protection contre le stress oxydant (Friedrich et Weiss, 1996). Récemment, des recherches ont été menées pour déterminer le rôle de certaines de ces protéines. Par exemple, chez *Neurospora*, la dislocation des gènes encodant les homologues des sous-unités bovines 39 kDa, AQDQ, PDSW, B13, B14.7, PGIV, MWFE ou encore SDAP permet de définir leur implication dans l'assemblage de l'enzyme (*cf.* Introduction).

A côtés des 31-32 sous-unités conservées chez les eucaryotes, il subsiste un nombre important de sous-unités qui semblent être spécifiques à chaque lignée. Cependant, dans la mesure où ces protéines sont fortement divergentes au sein de leur groupe, on ne peut pas exclure que des homologies aient échappé à nos analyses en raison de similarités ténues. Sans études plus détaillées sur le complexe I d'organismes variés, il nous paraît difficile de déterminer si ces protéines sont des orthologues faiblement conservés, des homologues structurels ou s'il s'agit réellement de composants

spécifiques à certaines lignées qui auraient été acquis ou perdus durant l'évolution des espèces. Néanmoins, 11 protéines semblent être spécifiques aux mammifères et trois d'entre elles n'ont de surcroît pas d'équivalent chez les autres animaux. Trois sous-unités sont spécifiques des champignons et au moins neuf sont typiques des eucaryotes photosynthétiques, y compris *C. reinhardtii*. On note aussi deux composants communs aux animaux et aux champignons (B15 et ASHI), et une sous-unité (20.9) présente chez les champignons et les plantes qui n'a pas d'équivalent chez les animaux. Sur base des connaissances actuelles, il paraît probable que ces protéines ne sont pas requises pour le transport d'électrons dans le complexe I. Dans ce contexte, l'absence de la sous-unité 21.3a identifiée chez *Neurospora* et qui n'a pas d'équivalent connu chez les autres organismes, entraîne une réduction de la quantité de complexe I (25% du sauvage) et l'accumulation du bras périphérique (Alves et Videira, 1994). Par ailleurs, l'interruption du gène encodant la sous-unités 20.9 chez *N. crassa* n'empêche pas l'assemblage du bras périphérique mais conduit tout de même à l'accumulation d'un petit sous-complexe membranaire (Schulte et Weiss, 1995). Ces observations témoignent du rôle que certaines sous-unités non conservées pourraient jouer dans l'assemblage de l'enzyme.

Avec 38 constituants en commun, les complexes I de *Chlamydomonas* et des plantes supérieures sont très similaires. Un trait caractéristique des eucaryotes photosynthétiques semble être la présence de protéines apparentées à des protéines bactériennes liant des ferripyochélines (sidérophores à Fer) (*cf.* Tableau 2 de la Publication 1). Trois protéines de cette famille ont été identifiées dans la préparation de complexe I de *Chlamydomonas* et plusieurs ont également été détectées en association avec le complexe I chez *A. thaliana*, *O. sativa*, *S. tuberosum* et *V. faba* (Heazlewood *et al.*, 2003). En consultant les annotations des banques de séquences, il apparaît que ces protéines présentent également de fortes similarités avec des protéines de type anhydrase carbonique ou acétyl transférase bactériennes (Tableau 15). C'est ainsi que la protéine de *Chlamydomonas* AAS48197 est annotée comme protéine hypothétique de type anhydrase carbonique gamma (AAR82950), mais à notre connaissance, aucune publication n'a suivi cette description. Par ailleurs, la protéine d'*Arabidopsis* AAK28403/At1g47260 est également proposée comme facteur de transcription impliqué dans l'expression spécifique de gènes encodant des sous-unités du

complexe I dans les anthères. Cette annotation date de 2001 et n'a pas fait l'objet de publication ultérieure. Comme on le voit, sans données plus spécifiques, il est difficile d'attribuer un rôle à ces protéines associées au complexe I des eucaryotes photosynthétiques. Il a néanmoins été suggéré qu'elles pourraient lier des ions Fe, agissant comme des senseurs mitochondriaux ou intervenant dans le stockage des ions pour leur assemblage ultérieur au sein des centres Fe-S (Heazlewood *et al.*, 2003).

#### 4.2. Isolement, caractérisation et impact de mutations affectant les sous-unités ND du complexe I chez *Chlamydomonas*

Comme il a été signalé dans l'introduction, très peu de données sont disponibles sur la fonction des sous-unités ND du complexe I encodées par le génome mitochondrial, et ce, en dépit de la connaissance de leur structure primaire. Dans la mesure où les méthodes de

mutagenèse dirigée ne sont pas au point pour ce génome, l'obtention de mutants générés par mutagenèse aléatoire est donc d'un intérêt fondamental pour l'étude du rôle des protéines ND dans l'activité et l'assemblage du complexe I. Des données fragmentaires sont disponibles grâce à la caractérisation de quelques mutants mitochondriaux du complexe I chez divers organismes. Cependant, la plupart de ces mutations sont létales à l'état homoplasmique et leur implication sur l'activité et l'assemblage de l'holoenzyme reste difficile à préciser (*cf.* Introduction).

L'algue verte unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* constitue à cet égard un organisme de choix : des mutations homoplasmiques et viables ont été obtenues dès 1989 et au début des années 90 par Matagne et ses collaborateurs (Colin *et al.*, 1995; Dorthu *et al.*, 1992; Matagne *et al.*, 1989).

| N° d'accession                       | AA  | Espèces                                       | Annotations dans les banques  | Sim |
|--------------------------------------|-----|---|---|-----|
| <b>Procaryotes</b>                   |     |   |   |     |
| NP_247277                            | 159 | <i>Methanococcus jannaschii</i>               | protéine liant des ferripyochélines   |     |
| CAC42862                             | 178 | <i>Streptomyces coelicolor</i>                | protéine putative liant des sidérophores  | 88% |
| NP_247277                            | 159 | <i>Methanococcus maripaludis</i>              | anhydrase carbonique (famille gamma Zn-dépendante)  | 84% |
| NP_276700                            | 151 | <i>Methanothermobacter thermautotrophicus</i> | protéine liant des ferripyochélines   | 79% |
| NP_616075                            | 181 | <i>Methanosarcina acetivorans</i>             | anhydrase carbonique/acétyl transférase isoleucine  | 77% |
| NP_354523                            | 207 | <i>Agrobacterium tumefaciens</i>              | protéine liant des ferripyochélines   | 70% |
| NP_281424                            | 182 | <i>Campylobacter jejuni</i>                   | acétyl transférase probable   | 69% |
| <b>Plantes</b>                       |     |   |   |     |
| BAB08816/<br>At5g63510               | 253 | <i>Arabidopsis thaliana</i>                   | sous-unité du complexe I ; similaire aux acétyl transférases et aux membres d'une famille de transférases bactériennes contenant des hexapeptides répétés;  | 67% |
| NP_175159/<br>AAK28403/<br>At1g47260 | 278 | <i>Arabidopsis thaliana</i>                   | sous-unité du complexe I ; similaire aux membres d'une famille de transférases bactériennes contenant des hexapeptides répétés; facteur de transcription impliqué dans l'expression de gènes nucléaires du complexe I dans les anthères | 66% |
| AAM64929/<br>At3g48680               | 258 | <i>Arabidopsis thaliana</i>                   | sous-unité du complexe I ; similaire aux protéines liant des ferripyochélines et aux membres d'une famille de transférases bactériennes contenant des hexapeptides répétés  | 61% |
| NP_569036/<br>At5g66510              | 259 | <i>Arabidopsis thaliana</i>                   | sous-unité du complexe I ; similaire aux acétyl transférases et aux membres d'une famille de transférases bactériennes contenant des hexapeptides répétés   | 57% |
| BAB10927                             | 213 | <i>Arabidopsis thaliana</i>                   | similaire aux protéines liant des ferripyochélines  | 61% |
| AAS48197/<br>AAR82950                | 312 | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>              | sous-unité du complexe I ; anhydrase carbonique gamma potentielle   | 61% |
| AAS48195                             | 216 | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>              | sous-unité du complexe I  | 61% |
| AAS48196                             | 280 | <i>Chlamydomonas reinhardtii</i>              | sous-unité du complexe I  | 58% |

**Tableau 15.** Exemples de séquences présentant des similarités avec à la protéine de *Methanococcus jannaschii* liant des ferripyochélines (FPB). AA : nombre d'acides aminés ; Sim : pourcentage de similarité avec la protéine de *M. jannaschii*.

Il s'agit de mutations affectant les gènes *cob* et *cox1*, codant respectivement pour l'apocytochrome b du complexe III et la sous-unité 1 du complexe IV. Par la suite, le même groupe a obtenu le premier double mutant viable affecté au niveau des complexes I et III. Il s'agit de la mutation *dum24*, correspondant à la délétion des gènes *cob*, *nd4* et de l'extrémité 3' du gène *nd5* (Duby et Matagne, 1999). D'autres doubles mutants ont ensuite isolés, en particulier la souche *dum22* dont la délétion couvre le gène *cob*, et l'extrémité 3' du gène *nd5* (Duby, 2002; Remacle *et al.*, 2001b). En 1998-1999, des recherches ont été entreprises par le Dr C. Remacle pour obtenir spécifiquement des mutants mitochondriaux du complexe I chez *Chlamydomonas*. C'est dans ce contexte qu'a débuté ce travail. Brièvement, après mutagenèse de la souche sauvage à l'aide d'acriflavine, intercalant de l'ADN agissant préférentiellement sur le génome mitochondrial, des mutants qui, cultivés en conditions mixotrophes (lumière + acétate), présentent une insensibilité à la roténone (inhibiteur du complexe I) et une forte sensibilité à l'antimycine A et au myxothiazol (inhibiteurs du complexe III) ont été isolés. Ils présentent une croissance lente lorsqu'ils sont cultivés en conditions hétérotrophes (obscurité + acétate). La perte de l'activité du complexe I a été démontrée par des dosages biochimiques et par des mesures de respiration. Les mutations responsables des déficiences du complexe I ont ensuite été identifiées en associant des analyses génétiques et moléculaires. La transmission uniparentale "paternelle" du phénotype mutant a tout d'abord permis de localiser les mutations dans le génome mitochondrial. Des tests de recombinaison ont ensuite permis d'estimer la distance physique séparant les mutations de marqueurs connus localisés en diverses régions du génome mitochondrial. Les mutations ont enfin été identifiées par séquençage du (des) gène(s) désignés par l'analyse de recombinaison. Cinq mutations homoplasmiques, stables et viables, affectant exclusivement des gènes *nd* mitochondriaux, ont été identifiées par cette approche : la mutation *dum25* correspond à la délétion de deux codons de la séquence du gène *nd1* ; les mutations *dum5*, *dum17* (isolée une seconde fois : *dum27*), *dum20* et *dum23* correspondent toutes les quatre à la délétion d'une thymine (T). Notons qu'une mutation nucléaire non identifiée (*dn26*) a été également isolée par cette méthode.

Il est intéressant de noter que les quatre délétions d'une thymine ont lieu dans une séquence comportant 2

à 4 T successives. Il en est de même pour deux autres mutations affectant le gène *cox1* (*dum18*, *19*), qui correspondent à la délétion ou à l'addition d'un T dans un groupe de 3 à 4 T (Colin *et al.*, 1995). Les répétitions de thymines semblent donc constituer des "hot spots" de mutations lors d'un traitement à l'acriflavine. Ces mutations de délétion ou d'addition résultent certainement d'une erreur de réplication survenue suite à une distorsion de la double hélice d'ADN lorsque le colorant est intercalé.

Les mutations *dum17*, *dum20* et *dum23* induisent un changement de la phase de lecture respectivement dans les séquences codantes des gènes *nd6*, *nd1* et *nd5*. Par contre, la mutation *dum5* affecte la région 3' non traduite du gène *nd5*. Chez *Chlamydomonas*, la transcription du génome mitochondrial s'effectue très certainement à partir d'une origine de transcription unique, bidirectionnelle, située entre les extrémités 5' des gènes *nd5* et *cox1* (Figure 14) et les ARNs messagers matures sont générés par clivage des deux longs précurseurs (Boer et Gray, 1991; Duby *et al.*, 2001; Vahrenholz *et al.*, 1985). L'analyse des ARNs mitochondriaux a montré que la mutation *dum5* affecte la stabilité de l'ARN mature du gène *nd5*, sans affecter la maturation des transcrits *nd4* et *cob*. Chez *Chlamydomonas*, les ARNs messagers chloroplastiques possèdent souvent une séquence répétée inversée dans la région 3' non traduite, séquence qui peut potentiellement donner lieu à la formation de structures secondaires en épingle à cheveux. La suppression de cette région répétée du gène *psaB* entraîne une instabilité de l'ARN messager correspondant (Lee *et al.*, 1996). L'analyse *in silico* des structures secondaires possibles de l'extrémité 3' non traduite du transcrit *nd5* suggère également que la délétion d'une seule paire de bases est suffisante pour entraîner la formation de structures secondaires différentes (données non montrées). Différentes approches ont permis de conclure que le mutant *dum5* assemble un complexe I actif, sensible à la roténone mais dont l'activité ne dépasse pas 12% de l'activité de la souche sauvage. Cette observation est à mettre en relation avec la faible quantité de transcrits *nd5* chez le mutant *dum5*. Notons que chez une lignée de cellules humaines mutantes, l'absence de la sous-unité ND5 réduit la quantité des sous-unités encodées par le génome mitochondrial (Hofhaus et Attardi, 1995), peut-être en raison d'un défaut d'assemblage.

Tous les autres mutants, y compris les deux mutants de délétion *dum22* et *dum24* préalablement caractérisés et le mutant nucléaire *dn26*, conduisent à l'inactivation du complexe I. Les mutants *dum22* et *dum24* perdent de surcroît l'activité ubiquinone:cytochrome *c* oxydoréductase. On peut donc conclure que la perte des sous-unités ND1, ND4, ND5 ou ND6 conduit à l'inactivation du complexe I.

Comme signalé ci-dessus, les gènes codant pour les sous-unités Nd3, Nd4L, Nd7 et Nd9 sont localisés dans le génome nucléaire. Au cours de ce travail, l'expression des gènes *ND4L* et *ND9* a été inactivée par la technique d'interférence ARN (RNAi). Il est désormais établi qu'un ARN double-brin (ARNds) peut induire la dégradation spécifique des ARNs homologues chez les eucaryotes. Il s'agit d'un mécanisme d'inactivation post-transcriptionnel de l'expression d'un gène (Cerutti, 2003). Brièvement, l'ARNds est dégradé en segments de 21-23 nucléotides qui sont incorporés dans un complexe multiprotéique (RISC pour RNA-induced silencing complex). Les petits ARN simple-brin servent de guides au complexe RISC pour identifier l'ARN endogène complémentaire qui serait ensuite clivé par une endoribonucléase. Bien que les données

qui permettent de proposer ce mécanisme aient été essentiellement obtenues chez l'homme et la drosophile, des études génétiques laissent penser que les bases du mécanisme RNAi sont identiques chez tous les eucaryotes (Cerutti, 2003).

Suite à la transformation du génome nucléaire de la souche sauvage de *Chlamydomonas* avec des constructions exprimant une fusion entre deux séquences complémentaires (des gènes *ND4L* ou *ND9*), l'une en orientation sens, l'autre en orientation anti-sens par rapport aux séquences promotrices, nous avons obtenu pour chacune des transformations deux clones dont l'activité du complexe I est presque nulle (coND9-54, -115 ; coND4L-89, -97). Les transcrits du gène *ND9* sont indétectables par Northern blot réalisés à partir des ARNs totaux des souches coND9-54 et -115 alors que le niveau des transcrits *ND4L* est fortement réduit dans les souches coND4L-89 et -97.

Les données principales concernant les mutants du complexe I étudiés au cours de ce travail sont reprises dans le Tableau 16.

| Souche                        | Nature de la mutation  | activité du complexe I (% sauvage) | assemblage du complexe I et du sous-complexe (%) |
|-------------------------------|--|------------------------------------|--|
| <b>sauvage</b>                |  | 100                                | 950 kDa (100)                                    |
| <b>Mutants mitochondriaux</b> |  |                                    |  |
| <i>dum5</i>                   | -1T (au sein d'un groupe de 3T) dans la région 3' non traduite du gène <i>nd5</i> (réduction importante de la quantité des transcrits <i>nd5</i> ) | ~12                                | 950 kDa (15)                                     |
| <i>dum17/27</i>               | -1T (au sein d'un groupe de 4T) aux codons 143-144 du gène <i>nd6</i>  | 0                                  | 950 kDa (1-2)                                    |
| <i>dum20</i>                  | -1T (au sein d'un groupe de 2T) au codon 243 du gène <i>nd1</i>  | 0                                  | 950 kDa (1-2)                                    |
| <i>dum22</i>                  | délétion du gène <i>cob</i> et de l'extrémité 3' du gène <i>nd4</i>  | 0                                  | 700 kDa (15)                                     |
| <i>dum23</i>                  | -1T (au sein d'un groupe de 4T) aux codons 145-146 du gène <i>nd5</i>  | 0                                  | 700 kDa (15)                                     |
| <i>dum24</i>                  | délétion des gènes <i>cob</i> , <i>nd4</i> et de l'extrémité 3' du gène <i>nd5</i>   | 0                                  | 700 kDa (15)                                     |
| <i>dum25</i>                  | délétion des codons 199-200 du gène <i>nd1</i>   | 0                                  | 950 kDa (100)                                    |
| <b>Mutants nucléaires</b>     |  |                                    |  |
| <i>dn26</i>                   | mutation inconnue  | 0                                  | 700 kDa (15)                                     |
| <i>coNd4L-97</i>              | Inactivation de l'expression du gène <i>Nd4L</i> (réduction importante de la quantité des transcrits <i>Nd4L</i> )                                 | 0-2                                | 950 kDa (0-2)                                    |
| <i>coNd4L-89</i>              |  | 5                                  | 950 kDa (0-2)                                    |
| <i>coNd9-54</i>               | Inactivation de l'expression du gène <i>Nd9</i> (absence de transcrits <i>Nd9</i> )  | 0-2                                | 950 kDa (0-2)                                    |
| <i>coNd9-115</i>              |  | 0-2                                | 950 kDa (0-2)                                    |

**Tableau 16.** Caractéristiques des mutants du complexe I de *Chlamydomonas reinhardtii*.

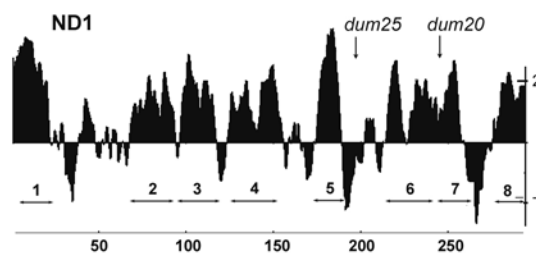
### 4.3. Rôle des sous-unités ND dans l'assemblage du complexe I

L'assemblage du complexe I chez les différents mutants mitochondriaux et nucléaires de *Chlamydomonas* a été essentiellement étudié par séparation des complexes protéiques mitochondriaux par BN-PAGE suivie d'une coloration NADH/NBT ou d'une détection immunologique sur Western Blot (Tableau 16). Des données complémentaires ont été obtenues pour certains mutants en séparant les complexes protéiques par ultracentrifugation en gradients de saccharose et en analysant l'activité NADH déshydrogénase des fractions récoltées. Chez *Chlamydomonas*, en l'absence des protéines ND1 (*dum20*), ND6 (*dum17*), Nd4L ou Nd9 (mutants coND9 et coND4L), nous n'observons pas de signal correspondant au complexe I sauvage. On note parfois un très faible signal (1-3%) mais jamais de trace d'un sous-complexe par détection immunologique sur Western blot. Il apparaît donc clairement que l'absence de ces protéines est plus dommageable pour l'assemblage du complexe I que l'absence des protéines ND4 et/ou ND5 (mutants *dum22,23,24*), qui conduit à la formation d'un sous-complexe de 700 kDa en quantité réduite (Tableau 16). Chez tous les mutants, une sous-forme de 200 kDa du bras périphérique a été néanmoins détectée (*cf point 4.4*).

#### 4.3.1. ND1

Le gène *nd1* de *Chlamydomonas reinhardtii* encode un polypeptide de 294 acides aminés. La protéine ND1 contient classiquement huit segments hydrophobes qui correspondent à des hélices transmembranaires (Fearnley et Walker, 1992; Roth et Hagerhall, 2001) (Figure 3). Huit segments hydrophobes sont également présents dans la protéine de *Chlamydomonas*. La délétion d'un T correspondant à la mutation *dum20* a lieu au codon 243, juste après la sixième hélice (Figure 34). Cette mutation change la phase de lecture et induit un codon stop au codon 273 de la séquence de *nd1*. La production d'une protéine ND1 tronquée chez le mutant *dum20* empêche l'assemblage du complexe I.

La mutation *dum25* transforme quant à elle le segment peptidique EAEAE en EAE au sein de la protéine ND1. Cette mutation n'affecte par contre en rien l'assemblage du complexe I, ni l'activité de son bras périphérique. Le segment muté est localisé dans la région polaire située entre les hélices 5 et 6 (Figure 34).

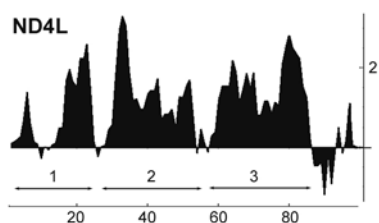


**Figure 34.** Profil d'hydropathie de la protéine ND1 de *Chlamydomonas reinhardtii*. Les segments hydrophobes sont indiqués ainsi que la position des mutations *dum20* et *dum25*.

Il s'agit d'une des deux régions les mieux conservées de la protéine ND1 (Fearnley et Walker, 1992). Elle comprend trois résidus glutamate totalement conservés et est similaire à la séquence de liaison du dicyclohexylcarbodiimide (DCCD) de la sous-unité c de L'ATPase (Hassinen et Vuokila, 1993). Le DCCD, un inhibiteur des pompes à protons, se lie notamment à la sous-unité ND1 (Yagi et Hatefi, 1988) et entre en compétition pour le même site de liaison que la piéricidine (Hassinen et Vuokila, 1993). Cet inhibiteur pourrait se lier dans une région qui recouvre aussi le site de liaison de la roténone (Okun *et al.*, 1999). Par ailleurs, la modification de résidus proches des hélices 5 et 6 de l'homologue bactérien de ND1 suggère que cette région est impliquée dans la liaison et la réduction de l'ubiquinone (Kurki *et al.*, 2000). Ces données permettent de suggérer que les acides aminés modifiés par la mutation *dum25* jouent un rôle majeur dans la liaison et la réduction de l'ubiquinone.

#### 4.3.2. ND4L

Le gène nucléaire *ND4L* chez *Chlamydomonas reinhardtii* encode un polypeptide de 227 résidus. L'inactivation de son expression empêche l'assemblage du complexe I. Le polypeptide Nd4L de *Chlamydomonas* se distingue des protéines ND4L des autres organismes (10 à 11 kDa), toutes encodées dans la mitochondrie, par une extension N-terminale de 125 acides aminés. Deux sites de clivage potentiels d'un peptide de transit ont été identifiés aux positions 101 et 123. Le polypeptide mature contiendrait ainsi au minimum 104 résidus. Au sein de cette séquence, les trois segments hydrophobes classiquement identifiés chez les autres organismes (Fearnley et Walker, 1992) sont présents (Figure 35).

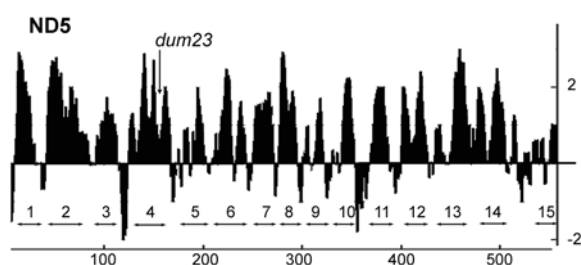


**Figure 35.** Profil d'hydrophatie de la protéine ND4L de *Chlamydomonas reinhardtii*. Les segments hydrophobes sont indiqués.

La comparaison des protéines ND4L pro- et eucaryotes indique par ailleurs qu'une dizaine de résidus seulement sont conservés (Figure 23). Parmi ceux-ci, on note trois résidus chargés (une arginine et deux glutamates). Chez *E. coli*, la modification de chacun des deux résidus glutamate, localisés respectivement au milieu des segments transmembranaires potentiels 2 et 3, a pour conséquence de modifier la vitesse de réduction de l'ubiquinone (Kervinen *et al.*, 2004).

#### 4.3.3. ND4 et ND5

Les protéines ND4 et ND5 sont deux protéines très hydrophobes, comprenant respectivement 12 et 15-16 segments transmembranaires (Fearnley et Walker, 1992; Mathiesen et Hagerhall, 2002). Chez *Chlamydomonas*, le gène mitochondrial *nd4* encode un polypeptide de 443 résidus comprenant 12 segments transmembranaires potentiels (données non montrées) tandis que le gène *nd5* encode un polypeptide de 546 résidus présentant 15 segments hydrophobes (Figure 36). La mutation frameshift *dum23* a lieu au codon 146 et affecte toute la séquence en aval du quatrième segment transmembranaire.



**Figure 36.** Profil d'hydrophatie de la protéine ND5 de *Chlamydomonas reinhardtii*. Les segments hydrophobes ainsi que la position de la mutation *dum23* sont indiqués.

La délétion du gène *nd4* et de l'extrémité 3' du gène *nd5* (*dum24*), la délétion partielle du gène *nd4* (*dum22*) et la mutation frameshift dans le gène *nd5* (*dum23*) ont les mêmes répercussions sur l'assemblage du complexe I. Un sous-complexe de 700 kDa, qui possède toujours l'activité du bras périphérique, est présent en quantité réduite (environ 15%) suite à un assemblage moins efficace ou moins stable que celui du complexe natif de 950 kDa. L'absence des sous-unités ND4 et/ou ND5, de masses moléculaires théoriques respectives de 48,7 et 59 kDa, ne suffit pas à expliquer la différence de masse entre le complexe sauvage et le sous-complexe. Les protéines ND4 et ND5 sont donc certainement impliquées dans la fixation ou dans l'assemblage d'un module d'environ 250 kDa, fragment appartenant très certainement au bras membranaire de l'enzyme. En effet, le sous-complexe de 700 kDa est associé de manière plus lâche à la membrane mitochondriale que le complexe sauvage. Par ailleurs, les protéines ND4 et ND5, très hydrophobes, sont des constituants du bras membranaire du complexe I (Fearnley et Walker, 1992; Mathiesen et Hagerhall, 2002), pouvant être l'une et l'autre situées à l'extrémité distale de ce bras (Holt *et al.*, 2003; Sazanov et Walker, 2000).

Il est intéressant de signaler que chez le mutant NCS2 de *Zea mays*, la délétion du gène *nd4* conduit à la formation d'un sous-complexe qui présente les mêmes caractéristiques que le sous-complexe de nos mutants (Karpova et Newton, 1999). Chez le mutant NCS2, plusieurs sous-unités sont présentes en quantité réduite (ND7 et ND9) et d'autres sous-unités sont indétectables (notamment ND1 et ND4L). De ces observations, il a été suggéré que le sous-complexe du mutant NCS2 est essentiellement constitué de sous-unités assemblées au niveau du bras périphérique (Karpova et Newton, 1999). Chez *Chlamydomonas*, l'absence de la protéine ND1 ou ND4L a cependant un effet plus drastique sur l'assemblage du complexe I (*cf.* points 4.3.1 et 4.3.2). Ceci pourrait indiquer que la perte de la sous-unité ND4 a des répercussions différentes sur l'assemblage du complexe selon l'organisme. Néanmoins, des études antérieures avaient souligné le caractère complexe de la mutation NCS2 et montré que l'expression du gène *nd7* est également altérée (Marienfeld et Newton, 1994), suggérant que le défaut d'assemblage du complexe I chez le mutant NCS2 observé par Karpova et Newton n'est pas uniquement imputable à l'absence de ND4. Des mutations frameshift dans les gènes *nd4* et *nd5* humains (Hofhaus et Attardi, 1993; Hofhaus et Attardi,

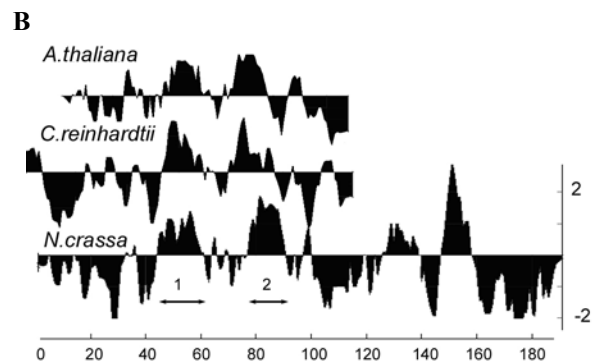
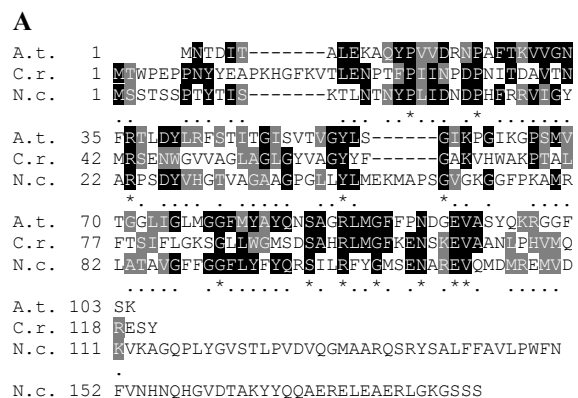
1995) et dans le gène *nd5* murin (Bai *et al.*, 2000) ont par ailleurs été isolées et sont la cause de la réduction drastique, voire totale, de l'activité du complexe I. Aucune donnée claire n'est cependant disponible concernant l'assemblage du complexe I dans les mitochondries de ces lignées.

L'analyse des fragments obtenus par dissociation du complexe I bovin révèle que les protéines ND4 et ND5 sont associées aux protéines B17 et PDSW au sein du petit fragment I $\beta$ L, et à une dizaine de protéines additionnelles au sein du grand fragment hydrophobe I $\beta$  (Figure 5). L'analyse de la composition du complexe I de *Chlamydomonas* indique qu'en plus de ND4 et ND5, six des protéines identifiées dans le fragment I $\beta$  sont conservées : il s'agit des homologues des protéines bovines B12, B18, B22, ESSS, SDAP et PDSW. La somme des masses moléculaires des huit protéines est de 185 kDa. Notons que les sous-unités homologues aux protéines B18, ESSS et PDSW, identifiées par spectrométrie de masse chez la souche sauvage, n'ont pas été détectées dans le sous-complexe de 700 kDa. Cette information est à prendre avec prudence compte tenu du caractère préliminaire de l'analyse protéomique réalisée chez le mutant. Néanmoins, par analogie avec la situation rencontrée chez le bœuf, il est possible que chez *C. reinhardtii*, les protéines ND4 et ND5 soient associées aux homologues des six protéines bovines mentionnées ci-dessus.

Rappelons que la mutation nucléaire *dn26* entraîne également l'assemblage d'un sous-complexe de 700 kDa à activité NADH déshydrogénase. Le séquençage des gènes nucléaires codant pour les six protéines mentionnées ci-dessus pourrait peut-être permettre d'identifier la mutation qui affecte cette souche.

Si l'analyse préliminaire de la composition du sous-complexe de 700 kDa n'a pas permis d'identifier des composants homologues aux constituants du fragment I $\beta$ , onze protéines préalablement identifiées dans le complexe I de la souche sauvage ont été détectées. Chez le bœuf, les homologues de six de ces protéines [75 kDa, 51 kDa, 49 kDa (ND7), 30 kDa (ND9), 24 kDa et AQDQ] appartiennent au sous-complexe I $\lambda$  localisé dans la partie matricielle de l'enzyme. La protéine de 39 kDa, également identifiée dans le sous-complexe de 700 kDa, est quant à elle associée chez le bœuf au petit sous-complexe membranaire I $\gamma$ , qui comprend notamment ND1, ND2, ND3 et ND4L et fait la jonction entre le grand sous-

complexe membranaire I $\beta$  et la fraction I $\lambda$  (Sazanov *et al.*, 2000). L'homologue de la sous-unité 20.9 de *N. crassa* a également été trouvé dans le sous-complexe de *Chlamydomonas*. Cette protéine n'a pas d'équivalent connu chez les mammifères alors qu'une protéine homologue a été identifiée récemment au sein du complexe I chez *Arabidopsis* et chez le riz (Heazlewood *et al.*, 2003). Les protéines de la famille 20.9 partagent le même profil d'hydrophatie et possèdent deux segments hydrophobes dans la région conservée (Figure 37).



**Figure 37.** Comparaison des séquences des protéines de la famille de la sous-unité 20.9 du complexe I de *Neurospora* (*C.reinhardtii* AAQ64641, *A.thaliana* At4g16450, *N.crassa* Q02854). **A**, alignement des séquences par le programme Clustal w (partie supérieure de la figure). Les résidus conservés dans deux séquences sur trois sont surlignés en noir et les résidus similaires en gris. **B**, comparaison des profils d'hydrophatie des séquences polypeptidiques (partie inférieure de la figure), alignées verticalement sur base de l'alignement des séquences polypeptidiques. Les deux régions hydrophobes conservées sont indiquées.

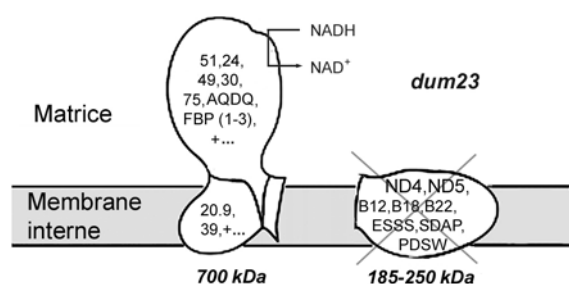
Chez *Neurospora*, l'interruption du gène encodant la sous-unité 20.9 n'empêche pas l'assemblage du bras périphérique et conduit à la formation d'un petit sous-complexe membranaire, suggérant la localisation de la protéine dans le bras membranaire (Schulte et Weiss, 1995). Ces données suggèrent que cette protéine pourrait appartenir au module I $\gamma$  de connexion entre I $\beta$



et  $I\lambda$ , si l'on assume que le fragment  $I\beta$  est bien absent du sous-complexe de 700 kDa (*cf.* ci-dessus).

Enfin, les trois protéines homologues à des protéines bactériennes liant des ferripyochélines (FBP) ont été identifiées dans le sous-complexe de 700 kDa. Les logiciels de prédictions de topologie transmembranaire (TMpred et TMHMM 2.0) prédisent la présence ou non d'une seule hélice transmembranaire pour ces protéines. Elles pourraient être associées à la fraction matricielle du complexe I.

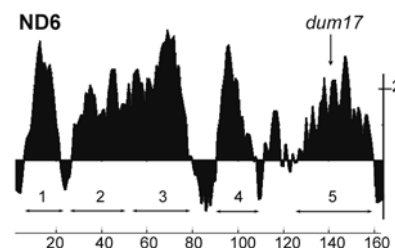
Sur base des observations réalisées chez le mutant *dum23*, un modèle schématique de localisation des sous-unités est proposé à la Figure 38.



**Figure 38.** Modèle de localisation des sous-unités identifiées chez le mutant *dum23* au sein du sous-complexe membranaire de 700 kDa. Le fragment membranaire (et ses sous-unités potentielles) perdu chez le mutant est également indiqué.

#### 4.3.4. ND6

Le gène *nd6* de *Chlamydomonas* encode un polypeptide de 162 acides aminés, homologue aux autres sous-unités ND6 (Boer et Gray, 1989). Parmi quatorze sous-unités homologues aux composants bactériens, les sous-unités ND6 et ND2 sont les moins bien conservées (*cf.* tableau 2 de la Publication 1). Néanmoins, la protéine ND6 de tous les organismes contient 5 segments hydrophobes qui déterminent des hélices transmembranaires potentielles (Fearnley et Walker, 1992). La mutation frameshift *dum17* induit un codon STOP en position 144, dans le segment de la dernière hélice hydrophobe de la séquence peptidique ND6 (Figure 39). Chez le mutant *dum17*, aucun assemblage du complexe I n'a été détecté hormis le sous-complexe de 200 kDa à activité NADH déshydrogénase.



**Figure 39.** Profil d'hydrophatie de la protéine ND6 de *Chlamydomonas reinhardtii*. Les segments hydrophobes sont indiqués ainsi que la position de la mutation *dum17*.

De façon analogue, dans des fibroblastes de souris présentant une mutation frameshift dans le gène *nd6*, la production d'une sous-unité ND6 tronquée et instable est corrélée à la réduction drastique de l'activité NADH:Q<sub>1</sub> oxydoréductase (moins de 1% du témoin), ainsi qu'à une déficience dans l'assemblage des sous-unités encodées par le génome mitochondrial. Par contre, l'activité NADH:K<sub>3</sub>Fe(CN)<sub>6</sub>, dévolue au bras périphérique du complexe I, ne semble pas être altérée (Bai et Attardi, 1998). Signalons enfin que trois mutations de substitution dans le gène *nd6* ont été identifiées chez l'homme. Elles affectent la région la mieux conservée entre les organismes (le troisième segment hydrophobe) et sont responsables de pathologies (Tableau 7). Les mutations aux positions 14459 et 14484 du génome mitochondrial humain pourraient modifier le site de fixation de l'ubiquinone (Carelli *et al.*, 1999; Jun *et al.*, 1994) et la mutation à la position 14487 affecterait l'assemblage du complexe I (Ugalde *et al.*, 2003).

On notera avec intérêt que selon le modèle proposé par Sazanov *et al.*, les protéines ND1, ND2, ND3 et ND4L sont associées aux protéines de 39 kDa et PFFD, au sein du fragment membranaire  $I\gamma$  qui fait la liaison entre la partie membranaire  $I\beta$  (incluant ND4 et ND5) et le bras matriciel ( $I\lambda$ ) (Sazanov *et al.*, 2000). Dans ce modèle, la sous-unité ND6 n'a pas été assignée à un fragment particulier. L'analyse de nos mutants montre que l'absence de la protéine ND6 a les mêmes répercussions sur l'assemblage du complexe I que l'absence des protéines ND1 ou ND4L. Cette observation indique que la protéine ND6 pourrait également être associée au fragment  $I\gamma$ .

#### 4.3.5. ND9

Le gène nucléaire *ND9* de *Chlamydomonas* encode un polypeptide de 282 acides aminés. La protéine possède une séquence d'adressage potentielle

de 75 acides aminés. Le polypeptide mature (207 résidus) ne présente pas de segment hydrophobe capable de former une hélice transmembranaire (données non montrées). Classiquement, la sous-unité ND9 (homologue de la sous-unité de 30 kDa bovine) est localisée dans le bras périphérique du complexe I, près de la sous-unité de 49 kDa (ND7) (Dupuis *et al.*, 2001; Holt *et al.*, 2003). Les deux gènes homologues chez *E.coli* sont par ailleurs fusionnés (Friedrich, 1998). La dislocation du gène correspondant chez *Neurospora* entraîne la disparition de l'activité liée au bras périphérique de l'enzyme sans affecter l'assemblage des sous-unités membranaires (Duarte *et al.*, 1998). Chez *Chlamydomonas*, l'inactivation du gène nucléaire *ND9* résulte également dans l'absence d'assemblage d'un complexe I fonctionnel. Aucun fragment susceptible de correspondre au bras membranaire n'a cependant pu être mis en évidence alors que le fragment à activité NADH déshydrogénase de 200 kDa est toujours présent, suggérant que la sous-unité ND9 n'y est pas impliquée.

#### 4.4. NADH :ubiquinone oxydoréductases mitochondriales additionnelles de *Chlamydomonas*

Les mutants qui ont perdu l'activité du complexe I restent viables, même en conditions hétérotrophes (obscurité + acétate), indiquant que cette activité enzymatique n'est pas indispensable à la survie de *Chlamydomonas*. De manière générale, malgré l'absence ou la réduction d'activité du complexe I chez tous les mutants analysés, l'oxydation du NADH doit être encore possible dans les mitochondries grâce à l'activité de NAD(P)H déshydrogénases alternatives. De telles enzymes ont été identifiées dans les mitochondries de plantes (Michalecka *et al.*, 2003; Rasmusson et Moller, 1991; Rasmusson *et al.*, 1999) et de champignons (Carneiro *et al.*, 2004; Melo *et al.*, 1999). Elles possèdent en outre des homologues bactériens (Kerscher, 2000). L'analyse des protéines mitochondriales de la souche sauvage par BN-PAGE puis coloration NADH/NBT nous a permis de mettre en évidence deux activités NADH déshydrogénases. Ces deux enzymes font respectivement 40 et 200 kDa et sont localisées dans la fraction soluble des mitochondries. Par ailleurs, l'activité NADH :duroquinone oxydoréductase de la fraction soluble est insensible à la roténone et représente 65 % de l'activité mitochondriale totale. Trois pics d'activités NADH déshydrogénase ont été également mis en évidence en séparant les protéines

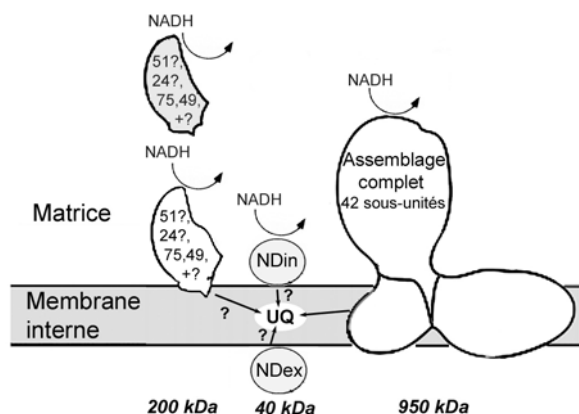
par ultracentrifugation en gradient de saccharose. L'analyse des fractions du gradient par BN-PAGE indique que le premier pic correspond au complexe I ; les deux autres correspondant respectivement aux activités de 200 et 40 kDa. Enfin, trois activités NADH :duroquinone oxydoréductase ont été détectées aux mêmes positions dans le gradient. Seule celle correspondant au complexe I est sensible à la roténone (données non montrées).

Les NADH déshydrogénases alternatives sont rencontrées sous forme de monomères dont la masse moléculaire moyenne est de 50 kDa (Kerscher, 2000; Michalecka *et al.*, 2003). La protéine de 40 kDa est donc un bon candidat pour ce rôle. Une recherche dans les banques de séquences de *Chlamydomonas* indique qu'au moins deux séquences homologues à une des NADH déshydrogénases alternatives d'*Arabidopsis thaliana* (NP\_193880, 568 aa) sont présentes (assemblages d'ESTs 20021010.2745.2 et 20021010.1841.1).

Quant à l'activité NADH déshydrogénase soluble d'environ 200 kDa, elle a été détectée chez toutes les souches. L'analyse sommaire de sa composition chez la souche sauvage suggère la présence des sous-unités de 75 kDa et 49 kDa (ND7) du bras périphérique du complexe I. Ces deux protéines participeraient au flux d'électrons entre le NADH et l'ubiquinone : la première fournit les ligands pour plusieurs centres Fe-S et la seconde pourrait participer à la formation d'un site de liaison de l'ubiquinone (Prieur *et al.*, 2001). Néanmoins, ces sous-unités ne sont pas classiquement associées à l'activité NADH déshydrogénase de l'enzyme. Chez les mammifères et les champignons, l'activité NADH déshydrogénase du complexe I est imputée à la sous-unité de 51 kDa (Walker, 1992), associée au sein de la fraction FP à la protéine de 24 kDa ainsi qu'à une protéine spécifique aux mammifères (10 kDa) (Hatefi, 1985). Chez *Rhodobacter capsulatus*, les sous-unités NuoE et NuoF (24 et 51 kDa) sont également associées (Duborjal *et al.*, 1997). Par ailleurs, l'absence de la protéine de 51 ou de 24 kDa chez *Neurospora* ne perturbe quasiment pas l'assemblage du complexe I mais le rend incapable d'oxyder le NADH en présence de ferricyanure (Almeida *et al.*, 1999; Fecke *et al.*, 1994). Il est donc probable que le sous-complexe de 200 kDa de *Chlamydomonas* contienne les homologues des protéines bovines de 51 et 24 kDa en plus des protéines de 75 et 49 kDa, la somme des masses moléculaires des

quatre protéines étant de 195 kDa (Figure 40). Notons que chez *Aquifex aeolicus*, la sous-unité NuoG (75 kDa) semble être associée aux sous-unités NuoE et NuoF (24 et 51 kDa) de manière stable (Peng *et al.*, 2003) et qu'une interaction entre les protéines de 51 et 75 kDa a été détectée chez le bœuf (Cleeter et Ragan, 1985; Yamaguchi et Hatefi, 1993). Par ailleurs, la protéine de 30 kDa (ND9) semble occuper une position centrale entre les protéines de 49 et 75 kDa (Figure 6) (Cleeter et Ragan, 1985; Yamaguchi et Hatefi, 1993). Cependant, l'absence de la protéine ND9 chez *Chlamydomonas* (mutants coND9-54 et -115) ne modifie pas l'assemblage du sous-complexe de 200 kDa, suggérant que d'autres interactions entre protéines peuvent avoir lieu.

En conclusion, chez *Chlamydomonas*, un groupe de sous-unités du bras matriciel du complexe I pourraient participer à la réduction non phosphorylante du pool d'ubiquinone (Figure 40) comme suggéré chez *Neurospora* pour un fragment de 350 kDa dépourvu des sous-unités mitochondriales ND1-6 et ND4L (Friedrich *et al.*, 1989).



**Figure 40.** NADH :ubiquinone oxydoréductase chez *Chlamydomonas*. De gauche à droite : un sous-complexe de 200 kDa accolé ou non à la membrane interne, une NADH déshydrogénase alternative non identifiée accolée à la face interne ou externe de la membrane interne, le complexe I.

L'existence d'une forme moins complexe de l'enzyme avait par ailleurs déjà été suggérée chez les plantes supérieures. Chez *Zea mays*, le bras périphérique du complexe I existerait en très faible quantité dans les mitochondries et contribuerait à l'oxydation non phosphorylante du NADH matriciel (Soole et Menz, 1995). De même, chez *Solanum tuberosum*, une activité NADH déshydrogénase mitochondriale de 220 kDa a été mise en évidence par

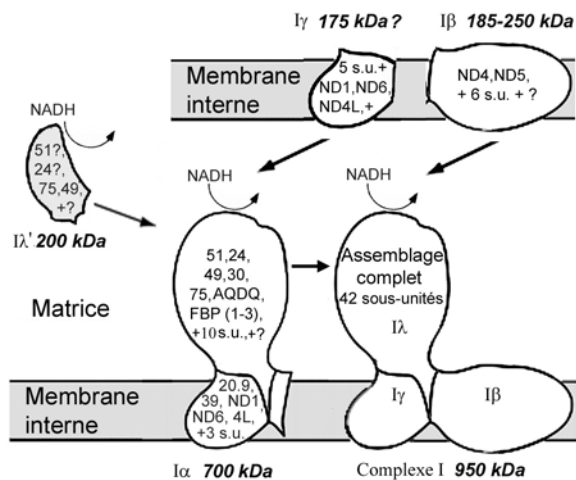
filtration sur gel et la sous-unité de 75 kDa du bras périphérique a été identifiée dans le même pic d'éluion (Bykova *et al.*, 1999).

#### 4.5. Assemblage et composition de modules du complexe I chez *Chlamydomonas*

Les différentes observations concernant l'assemblage du complexe I chez les mutants de *Chlamydomonas* suggèrent la présence de différents modules (Figure 41), susceptibles d'être mis en relation avec les fragments I $\lambda$ , I $\gamma$  et I $\beta$  observés par dissociation du complexe I chez le bœuf (Hirst *et al.*, 2003; Sazanov *et al.*, 2000).

Le sous-complexe à activité NADH déshydrogénase de 200 kDa correspondrait à une partie du fragment I $\lambda$  et contiendrait les homologues des sous-unités de 24, 49, 51 et 75 kDa. La somme des masses moléculaires des sous-unités de *Chlamydomonas* homologues aux constituants du fragment I $\lambda$  complet chez le bœuf est de 390 kDa (16 sous-unités dont 6 identifiées dans le sous-complexe de 700 kDa). Chez *Chlamydomonas*, les protéines similaires aux protéines liant des ferrityochélines pourraient faire partie de ce fragment (masse totale = 480 kDa).

L'association de ce module I $\lambda$  à l'équivalent du fragment membranaire bovin I $\gamma$ , qui contiendrait chez *Chlamydomonas* les sous-unités ND1, ND2, ND3, ND4L, ND6, 39 kDa, PFFD et l'homologue de la sous-unité de *Neurospora* 20.9, pourrait correspondre au sous-complexe de 700 kDa observé en l'absence des protéines ND4 et ND5. Ce sous-complexe de 700 kDa serait donc similaire au sous-complexe I $\alpha$  obtenu chez le bœuf au cours d'expériences de dissociation (Finel *et al.*, 1992). Enfin, l'association entre le sous-complexe de 700 kDa et un fragment membranaire hypothétique de 250 kDa, homologue au fragment bovin I $\beta$  et qui pourrait être composé des sous-unités ND4, ND5, B12, B18, B22, ESSS, SDAP et PDSW, permettrait la formation du complexe I (Figure 41).



**Figure 41.** Modèle d'assemblage du complexe I par modules chez *Chlamydomonas reinhardtii*.

Ce modèle présente des similitudes avec le modèle d'assemblage établi pour le complexe I humain (Antonicka *et al.*, 2003) (Figure 11). Dans les deux cas, l'association du bras périphérique à un module membranaire précède l'assemblage final du complexe I. Par contre, chez *Neurospora*, il apparaît que l'assemblage des bras membranaire et périphérique constitue un prérequis à l'assemblage final de l'enzyme (revue par Videira, 1998) (Figure 10). Néanmoins, on ne peut pas exclure la possibilité que des intermédiaires d'assemblage (bras membranaire complet chez l'homme et chez *Chlamydomonas* ; bras périphérique associé à la membrane chez *Neurospora*) existent mais qu'ils n'ont pas été mis en évidence, peut-être en raison d'un temps de demi-vie très court. La présence de sous-complexes libres chez divers organismes pourrait résulter de la combinaison de deux facteurs : la vitesse de protéolyse propre à chaque organisme et la présence de chaperonnes spécifiques susceptibles de stabiliser un sous-complexe. Rappelons que chez *Neurospora crassa*, deux chaperonnes intervenant dans l'assemblage du bras membranaire ont été identifiées (Kuffner *et al.*, 1998). Il s'agit des protéines CIA30 et CIA84 (Complex I intermediate-associated protein) (*cf* Introduction point 3.4.1). La protéine CIA30 a été récemment identifiée chez l'homme (Janssen *et al.*, 2002). Une recherche dans les banques de séquences indique que la protéine CIA30 est largement conservée chez les eucaryotes (y compris chez *Chlamydomonas*) alors que la protéine CIA84 semble spécifique aux champignons (Tableau 17).

| Espèces                | CIA30 |                 |     |
|------------------------|-------|-----------------|-----|
|                        | AA    | N° d'accension  | Sim |
| <i>N. crassa</i>       | 278   | O42636          |     |
| <i>A. nidulans</i>     | 292   | EAA60782        | 48% |
| <i>D. melanogaster</i> | 296   | NP_651718       | 44% |
| <i>H. sapiens</i>      | 327   | NP_057097       | 52% |
| <i>C. elegans</i>      | 340   | Q18726          | 44% |
| <i>A. thaliana</i>     | 227   | NP_173178       | 42% |
| <i>C. reinhardtii</i>  |       | 20021010.5852.1 | 40% |

| Espèces                | CIA84 |                |     |
|------------------------|-------|----------------|-----|
|                        | AA    | N° d'accension | Sim |
| <i>N. crassa</i>       | 759   | XP_326499      |     |
| <i>A. nidulans</i>     | 800   | EAA62030       | 42% |
| <i>D. melanogaster</i> |       | N.I.           |     |
| <i>H. sapiens</i>      |       | N.I.           |     |
| <i>C. elegans</i>      |       | N.I.           |     |
| <i>A. thaliana</i>     |       | N.I.           |     |
| <i>C. reinhardtii</i>  |       | N.I.           |     |

**Tableau 17.** Séquences homologues aux protéines chaperonnes CIA (Complex I intermediate-associated protein) identifiées chez *Neurospora crassa*. Le numéro d'accension pour la séquence de *C. reinhardtii* CIA30 fait référence à un assemblage d'ESTs. AA : nombre d'acides aminés ; Sim : pourcentage de similarité avec la protéine de *N. crassa* ; N.I. : non identifié.

#### 4.6. Interaction photosynthèse-respiration.

Lorsqu'ils sont cultivés à l'obscurité sur un milieu contenant de l'acétate, les mutants du complexe I présentent une croissance faible alors que les autres mutants (complexe III, IV, I+III et I+IV) ne sont pas capables de se diviser. Cette dépendance des mutants vis-à-vis de la lumière suggère que la synthèse d'ATP dans le chloroplaste est nécessaire pour compenser la diminution des phosphorylations oxydatives dans les mitochondries. Dans le chloroplaste, la phosphorylation de l'ADP peut être énergétiquement couplée soit au transport linéaire, soit au transport cyclique d'électrons. Cependant, il est généralement admis que la majorité de l'ATP produit via le transport linéaire d'électrons dans le chloroplaste est utilisé avec le NAD(P)H dans le cycle de Calvin. Le premier rôle attribué aux transitions d'état dans le chloroplaste est de garantir une excitation équitable des deux photosystèmes en fonction de la qualité de la lumière incidente (Murata, 1970). Chez *Chlamydomonas*, il a été suggéré que les transitions d'état permettent également de moduler la part du transport cyclique d'électrons photosynthétique au détriment du transport linéaire, en vue d'une synthèse accrue d'ATP (Wollman, 2001). L'analyse des mutants mitochondriaux de *Chlamydomonas* montre que sous

éclairage modéré ( $70 \mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-1}$ ) et en présence d'acétate, le transport linéaire d'électrons est réduit (jusqu' à 15% de la valeur du type sauvage chez les doubles mutants) et que le transport cyclique d'électrons est stimulé. Ainsi, une synthèse d'ATP accrue dans le chloroplaste via le transport cyclique d'électrons apparaît comme un mécanisme de compensation vis-à-vis de déficiences dans la synthèse d'ATP mitochondrial. Néanmoins, lorsqu'ils sont cultivés en conditions mixotrophes (lumière + acétate), tous les mutants ont une croissance plus faible que la souche sauvage ; les mutants des complexes III, IV ou les doubles mutants (Remacle *et al.*, 2001b) étant plus affectés que ceux du complexe I. Il apparaît donc que la compensation n'est que partielle. En témoignent les concentrations cellulaires en ATP qui sont plus basses que chez le type sauvage (à l'exception des mutants du complexe I). D'un autre côté, la réduction du rendement du transport linéaire d'électrons photosynthétique limite certainement la fixation du carbone et contribue à la réduction de la vitesse de croissance des mutants. Ainsi, chaque mutant atteint un optimum en ajustant la fixation du  $\text{CO}_2$  et le transport cyclique d'électrons dans le chloroplaste en réponse à l'activité mitochondriale.

Par certains aspects, les mutants du complexe IV se sont révélés moins affectés que les mutants du complexe III (statut rédox du pool de PQ, habilité à réaliser la transition à l'état I). Sur base de leur déficience respiratoire respective, ces mutants sont pourtant équivalents : la voie des cytochromes (complexes III+IV) est inactive et la teneur en ATP des cellules placées à l'obscurité est identique (65-70 % du type sauvage). Il est intéressant de signaler que la dernière étape de la synthèse de l'ascorbate est liée à l'activité du complexe IV dans les mitochondries de plantes supérieures (Bartoli *et al.*, 2000). On peut imaginer qu'il en va de même chez *Chlamydomonas* et que la synthèse d'ascorbate est inhibée dans les mitochondries des mutants du complexe IV. Bien que l'ascorbate soit utilisé en routine pour réduire *in vitro* les plastoquinones (Hou *et al.*, 2003), cette réaction n'a pas été mise en évidence *in vivo*. On peut néanmoins émettre l'hypothèse que l'ascorbate participerait à la réduction non-photochimique des plastoquinones, ce qui initie la transition vers l'état II.

La réduction non-photochimique des plastoquinones semble jouer un rôle majeur dans la transition à l'état II des mutants. Ceci avait déjà été suggéré par des travaux réalisés sur la souche sauvage traitée par des inhibiteurs de la chaîne respiratoire

(Bulté *et al.*, 1990). Le taux élevé de réduction des PQ à l'obscurité chez les mutants explique en partie leur faible propension à effectuer la transition à l'état I. La réduction non-photochimique des PQ a été attribuée à un flux d'électrons chlororespiratoire du NAD(P)H à l'oxygène (Peltier et Cournac, 2002). Le niveau important de réduction des PQ dans les mutants mitochondriaux peut être causé par une production de NADH via la glycolyse qui est stimulée lorsque la concentration en ATP chute (Rebeille et Gans, 1988). Néanmoins, les déficiences en ATP chez les mutants sont partiellement compensées par une stimulation de la glycolyse et du transport cyclique d'électrons. Ainsi, une augmentation du niveau du NAD(P)H résultant directement du taux d'oxydation faible du NADH mitochondrial, pourrait être la cause de l'augmentation de la vitesse de réduction des plastoquinones dans les mutants.



## Matériel et méthodes

Ce chapitre ne concerne que la partie non publiée (ou non soumise pour publication) de la thèse, c'est-à-dire les sections 2.2 et 2.3 des Résultats.

### 1. Matériel

#### 1.1. *Chlamydomonas reinhardtii* : souches et conditions de culture

Les souches utilisées au cours de ce travail dérivent la souche 137c de *Chlamydomonas reinhardtii*, à l'exception du mutant *dum22* qui dérive d'un produit de croisement entre *C. reinhardtii* et *C. smithii* (cc-1373 de la Duke University) (Tableau 18)

| N° de collection | Souches                |                                     | Marqueurs  |               |
|------------------|------------------------|-------------------------------------|------------|---------------|
|                  |                        |                                     | nucléaires | mitochondrial |
| 1                | <i>mt</i> <sup>+</sup> |                                     | -          |               |
| 2                | <i>mt</i> <sup>-</sup> |                                     | -          |               |
| 25               | <i>mt</i> <sup>+</sup> | <i>cw15</i>                         | -          |               |
| 83               | <i>mt</i> <sup>+</sup> | <i>cw15 nit</i> <sup>+</sup>        | -          |               |
| 158              | <i>mt</i> <sup>+</sup> | <i>arg7-2</i>                       | -          |               |
| 169              | <i>mt</i> <sup>-</sup> | <i>dn26</i>                         | -          |               |
| 205              | <i>mt</i> <sup>-</sup> | <i>arg7</i>                         |            | <i>dum20</i>  |
| 233              | <i>mt</i> <sup>-</sup> |                                     |            | <i>dum17</i>  |
| 235              | <i>mt</i> <sup>+</sup> |                                     |            | <i>dum20</i>  |
| 250              | <i>mt</i> <sup>-</sup> | <i>arg7-8</i>                       |            | <i>dum15</i>  |
| 252              | <i>mt</i> <sup>-</sup> | <i>arg7-8</i>                       |            | <i>dum18</i>  |
| 645              | <i>mt</i> <sup>-</sup> | <i>cw15</i>                         |            | <i>dum17</i>  |
| 667              | <i>mt</i> <sup>-</sup> | <i>cw15</i>                         |            | <i>dum22</i>  |
| 325-2            | <i>mt</i> <sup>+</sup> | <i>cw15 arg7-8 nit</i> <sup>+</sup> | -          |               |

**Tableau 18.** Souches de *Chlamydomonas reinhardtii* utilisées. *cw15* : mutation déterminant l'absence de paroi glycoprotéique ; *arg7* ; *arg7-2*, *arg7-8* : mutations du gène encodant l'argininosuccinate lyase (Asl), dernier enzyme de la voie de biosynthèse de l'arginine ; *nit*<sup>+</sup> : les souches porteuses de ce marqueur sont capables de métaboliser le nitrate du milieu de culture ; *mt*<sup>+</sup> et *mt*<sup>-</sup> : allèles déterminant le sexe ("*mating-type*") ; *dum15* : double substitution au codon 140 (TCT → TAC) du gène *cob* (Dorthu *et al.*, 1992) ; *dum18* : addition d'une thymine au codon 145 du gène *cox1* (Colin *et al.*, 1995) ; *dum17* : délétion d'une thymine au codon 146 du gène *nd6* (*cf* publication 2) (Cardol *et al.*, 2002) ; *dum20* : délétion d'une thymine au codon 243 du gène *nd1* (*cf* publication 1) (Remacle *et al.*, 2001a) ; *dum22* : délétion du gène *cob* et de l'extrémité N-terminale du gène *nd4* (Remacle *et al.*, 2001b).

Les cellules sont cultivées à une température de 25°C, en milieu liquide ou sur milieu gélosé (15 g/l d'agar), sous éclairage modéré (70  $\mu\text{mol}\cdot\text{m}^{-2}\cdot\text{s}^{-2}$ ) ou à l'obscurité. Le milieu utilisé en routine est le milieu TAP (Tris-actétate-phosphate). Il s'agit d'une variante du milieu minéral de base pour la croissance autotrophe, tamponné à pH 7,0 par de l'acide acétique. De l'arginine (100 mg/ml) peut être ajouté au milieu

(Gormane et Levine, 1965). La source d'azote classique est le chlorure d'ammonium (400 mg/l), mais elle peut être remplacée par du nitrate de potassium (340 mg/l). Un milieu minimal sans azote est utilisé pour induire la gamétogénèse et la maturation des zygotes (Van Winkle-Swift, 1977).

#### 1.2. *Escherichia coli* : souche et conditions de culture

La souche DH5 $\alpha$  (Invitrogen, Bethesda, USA), de génotype  $\phi 80\text{dlacZ}\Delta\text{M15 } \text{recA1 } \text{endA1 } \text{gyrA96 } \text{thi-1 } \text{hsdR17 } (rk^-, mk^+) \text{ supE44 } \text{relA1 } \text{deoR } \Delta(\text{lacZYA-argF})\text{U169}$  est utilisée comme hôte des différents plasmides. Elle est cultivée à 37°C en milieu liquide ou sur milieu gélosé LB (Sambrook *et al.*, 1989). Ce milieu contient également de l'ampicilline (50 mg/ml).

#### 1.3. Plasmides

Trois plasmides ont été utilisés au cours de ce travail. Il s'agit des vecteurs de clonage pGEM-T *easy* et pNB1, et du plasmide pASL servant à la co-transformation de *C. reinhardtii*.

(i) Le pGEM-T *easy* (3,0 kb, Promega, Madison, USA) est un plasmide conçu pour le *T/A cloning* des produits de PCR amplifiés à l'aide de la *Taq* polymérase. La présence du gène *lacZ* permet le criblage des bactéries recombinants.

(ii) Le pNB1 (2,9 kb) résulte de l'insertion aux sites *HincII* et *HindIII* du pUC19 (2,7 kb) d'un fragment de 229 pb comprenant un motif de 84 pb du promoteur du gène *NIA1* de *Chlamydomonas* et le promoteur minimal du gène de la  $\beta$ -tubuline (98 pb) (Loppes et Radoux, 2002).

(iii) Le plasmide pASL (11,2 kb) résulte de l'insertion aux sites *SalI* et *BamHI* du pBCKS<sup>+</sup> (3,4 kb, *Stratagene, La Jolla, USA*) d'un fragment *SalI-Sau3A* de 7,8 kb porteur du gène *ARG7* encodant l'argininosuccinate lyase (Asl) de *C. reinhardtii* (Adam et Loppes, 1998).

#### 1.4. Oligonucléotides

La liste des oligonucléotides utilisés au cours de ce travail est présentée dans le Tableau 19. Ils ont été conçus à l'aide du logiciel Primer express 1.0 (*Applied Biosystems, Foster City, USA*) et synthétisés par *Oligo Express (Paris, France)* ou *Invitrogen (Bethesda, USA)*.

| Nom           | séquence 5' -> 3'                           | gène concerné | Tm (°C)    | Position dans la séquence génomique mitochondriale |
|---------------|---|---------------|------------|--|
| ND1-1F        | GTTGAATTTTGGACAATCGC                        | <b>nd1</b>    | 51         | 10282  |
| ND1-2R*       | CCGAAATTGAGTGCTTAGGC                        |               | 55         | 11283  |
| ND1-3F        | CTGTTTCGTCACACTGACGGCAC                     |               | 59,5       | 10796  |
| ND1-4R*       | GTGCCGTCAGTGACGAACAG                        |               | 59,5       | 10815  |
| ND4-1F*       | GGGTAGGCTACCAAATGAGTG                       | <b>nd4</b>    | 57,8       | 1629   |
| ND4-2*        | AAGCCATTGGTTTAATACCTAGCC                    |               | 57         | 1715   |
| ND4-2R        | ACAGCGTTCGATTTTAGCAG                        |               | 53,4       | 3301   |
| ND4-3F*       | CGATTTTCTTTAGATCAATTTGACG                   |               | 54         | 2207   |
| ND4-4R        | CGTCAAATTGATCTAAAGAAAATCG                   |               | 54         | 2231   |
| ND4-5F*       | AGTGCGCAGCAACATCATGC                        |               | 57,5       | 2766   |
| ND4-6R        | CATGATGTTGCTGCGCACTG                        |               | 57,5       | 2784   |
| ND26-1F       | GCTGTTACGCGTGTACATAACG                      | <b>nd2</b>    | 58         | 6636   |
| ND26-3F       | TTCTTGCCACCATGACTTCTC                       |               | 56         | 7324   |
| ND26-4R*      | AGAAGTCATGGTGCCAAGAAG                       |               | 56         | 7343   |
| ND26-2R*      | TCCACCGAGTACCCGATAGC                        | <b>nd6</b>    | 59,5       | 8593   |
| ND26-5F       | TGCTCGGCCAGCTCCGCTCGC                       |               | 68         | 7886   |
| ND26-6R*      | TATCCTACGGCAATGCTTAGC                       |               | 56         | 8011   |
| ND5-1F        | TTGGACTCAAACATTGAAAC                        |               | <b>nd5</b> | 62   |
| ND5-2R*       | CATGATAATACCGTGACCGG                        | 58            |            | 5233   |
| ND5-3F        | GTAACGAGCGATGTGCTGGTT                       | 58            |            | 3908   |
| ND5-4F        | CGCACATAAAACAGTAAAGTAGC                     | 57            |            | 4579   |
| ND5-5R*       | GCTACTTTACTGGTTTTATGTGCG                    | 57            |            | 4602   |
| ND5-6R*       | GGTAACCAGCACATCGCTCCGT                      | 60            |            | 3930   |
| ND4L-RNAi-1F  | <b>ATCGATAAGCTTTAGAGTCACAAGAATGTGCGCGGA</b> | <b>ND4L</b>   |            | 63   |
| ND4L-RNAi-2R* | <b>AAGCTTCCATGGGTGGAAGTACGCCACGCACAG</b>    |               | 62         |  |
| ND4L-RNAi-3R* | <b>AAGCTTCCATGGGATACCGGCCCAGAACATCATGT</b>  |               | 64         |  |
| ND9-RNAi-3F   | <b>ATCGATAAGCTTCAGGAGCCCACGATATACACCACG</b> | <b>ND9</b>    | 65         |  |
| ND9-RNAi-4R*  | <b>AAGCTTCTGCAGGCGTCTCCCAAGGGCTGTTG</b>     |               | 64         |  |
| ND9-2R*       | GCGGTGGTTGAACACCTTGCAGA                     |               | 64         |  |
| PU            | GTA AACGACGGCCAG                            |               | 46         |  |
| PR*           | CAGGAAACAGCTATGAC                           | 43            |            |  |

**Tableau 19.** Liste des amorces nucléotidiques utilisées. Les sites de restriction sont indiqués en gras. ATCGAT : *ClaI* ; AAGCTT : *HindIII* ; CCATGG : *NcoI* ; CTGGCA : *PstI*. \*oligonucléotides s'hybridant avec le brin complémentaire de la séquence génique concernée.

## 2. Techniques microbiologiques

### 2.1. Transformation de *Chlamydomonas*

La transformation du génome nucléaire de *C. reinhardtii* a été réalisée par la méthode des billes de verre, applicable à des cellules sans paroi (Kindle, 1990). 500 µl d'une suspension cellulaire ( $2 \cdot 10^8$  cellules.ml<sup>-1</sup>) sont ajoutés à 500 µl de billes de verre stérile ( $\varnothing = 1$  mm). Après ajout de 1 µg de plasmide transformant et de 4-5 µg d'ADN co-transformant, le tube est agité (Vortex génie 2, *Scientific Industries Inc, New York, USA*) pendant 15 secondes à puissance maximale. Les cellules sont lavées puis étalées sur deux boîtes de milieu sélectif. Les transformants apparaissent au bout de 7 jours de croissance en lumière modérée (70 µmol.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup>).

### 2.2. Transformation d'*Escherichia coli*

La transformation d'*E. coli* est réalisée par choc thermique (Inoue *et al.*, 1990). 1-10 ng de plasmide circulaire ou 5 µl d'un mélange de ligation est ajouté à

100 µl de cellules chimio-compétentes. Les cellules sont ensuite placées pendant 30 minutes sur glace, puis pendant 45 secondes à 42° C puis replacées sur glace. Après addition de milieu LB, les cellules sont incubées 30 minutes à 37°C afin de permettre l'expression de gène de résistance porté par le plasmide. Les cellules sont enfin ensemencées sur du milieu sélectif.

### 2.3. Mutagenèse aléatoire

La mutagenèse de la souche sauvage de *Chlamydomonas* (souche 2) a été réalisée par traitement à l'acriflavine, un agent intercalant de l'ADN bicaténaire, selon Duby *et al* (1999) (Duby et Matagne, 1999) et modifiée de la manière suivante. Après 72 h de culture en milieu TAP (cycle 12h lumière 70 µE.m<sup>-2</sup>.s<sup>-1</sup> / 12h obscurité) en présence de l'agent mutagène (acriflavine 5mg.l<sup>-1</sup>), les cellules ont été lavées puis étalées sur milieu TAP gélosé à raison de 200, 2000 ou 20000 cellules par boîte. Après huit jours de croissance sous lumière vive, les colonies sont observées.



#### 2.4. Analyses phénotypiques

La croissance des souches est estimée à partir de l'observation de la taille de colonies isolées (50-150 colonies par boîte) ou de spots réalisés en déposant 15 µl de suspension diluée ( $10^6$ - $10^7$  cellules/ml) sur le milieu. Pour réaliser des répliques (transformants, clones issus de la mutagenèse, descendants méiotiques), les colonies sont reprises individuellement à l'aide de cure-dents et ordonnées à raison de 48-60 colonies par boîte de Pétri. Les colonies sont ensuite répliquées sur différents milieux en utilisant du papier filtre stérile comme support.

#### 2.5. Analyses génétiques

L'isolement et l'analyse des produits méiotiques ont été réalisés selon Matagne *et al.*, 1989 (Matagne *et al.*, 1989). La fréquence de recombinaison est déterminée comme décrit précédemment (Remacle *et al.*, 1995).

### 3. Techniques de biologie moléculaire

#### 3.1. Extraction d'ADN plasmidique de *E. coli*

Les plasmides bactériens sont extraits des cultures d'*E. coli* par la méthode de la lyse alcaline (Sambrook *et al.*, 1989), puis purifiés sur colonne de silice selon les indications des fournisseurs (*Concert plasmid miniprep system, Invitrogen, Bethesda, MD, USA* ; *Nucleobond AX, Macherey Nagel, Düren, Allemagne*).

#### 3.2. Extraction des acides nucléiques de *Chlamydomonas*

L'extraction des acides nucléiques totaux de *Chlamydomonas reinhardtii* est réalisée selon la méthode de Newman (Newman *et al.*, 1990).  $5.10^7$  à  $5.10^8$  cellules sont mises en suspension dans 150 µl d'eau et 300 µl de SDS-EB (2 % SDS, 400 mM NaCl, 40 mM EDTA, 100 mM Tris-HCl, pH 8,0). Deux étapes de séparation de phases sont ensuite effectuées : la première par ajout de 350 µl de phénol:chloroforme:alcool isoamylique (25:24:1), la seconde avec 300 µl de chloroforme:alcool isoamylique (24:1).

L'ADN est précipité en présence de 0,1 volume d'une solution saline (NaCl 3 M ou NaOAc 3 M pH 4,8) et de 2,5 volumes d'éthanol alors que les ARN peuvent être précipités de manière sélective à l'aide d'1/3 de volume de LiCl 8M. Après respectivement 30 minutes et une nuit d'incubation sur glace, les culots sont récoltés par centrifugation puis lavés avec de l'éthanol 70% et finalement remis en suspension dans de l'eau

(additionnée de diméthyl pyrocarbonate (DPMC) pour la préparation d'ARN).

#### 3.3. Amplification d'ADN par PCR

Le principe de la PCR consiste en la récurrence d'un cycle triphasique : dénaturation par la chaleur de l'ADN bicaténaire à amplifier, hybridation de deux amorces de part et d'autre de la séquence cible, élongation des amorces grâce à une ADN polymérase en présence de dNTPs.

Le mélange réactionnel (50 µl) contient 6% DMSO (v/v) 50 ng d'ADN total, 0,5 µM de chaque oligonucléotide, 200 µM de chaque dNTP, du tampon PCR 1x (1,5 mM MgCl<sub>2</sub>), 1 unité de Taq polymérase (*Quiagen, Hilden, Germany* ou *Amersham, Piscataway, USA*).

A l'aide du thermocycleur *GeneAmp PCR system 9700 (Perkin-Elmer, Norwalk, USA)*, après une première phase de dénaturation (3-10 min à 94-95 °C), l'échantillon subit 35 cycles comprenant 30 secondes à la température de dénaturation, 30 secondes à la température d'hybridation (légèrement inférieure au T<sub>m</sub> des primers ; Tableau 19) et 45 à 90 secondes (dépendant de la longueur du fragment à amplifier) à 72°C (température d'élongation). Enfin, le maintien pendant 7 min à la température d'élongation permet d'achever les synthèses d'ADN en cours.

#### 3.4. Séquençage de l'ADN

Toutes les séquences ont été déterminées par *Genome Express (Paris-Grenoble, France)*.

#### 3.5. Restriction de l'ADN

Pour chaque digestion, 1 à 5 unités d'enzyme sont ajoutées par µg d'ADN. La restriction s'effectue pendant deux heures à 37° C dans le tampon recommandé par le fournisseur des endonucléases (*Roche Diagnostics, Mannheim, Allemagne* ; *Invitrogen, Bethesda, USA*).

#### 3.6. Électrophorèse d'acides nucléiques

(i) Pour séparer les fragments d'ADN, une aliquote de la préparation d'acides nucléiques est déposée sur gel d'agarose (*Life Sciences International*) à 0,8 % ou 1 % préparé dans du tampon TEA (Tris 40 mM, EDTA 2 mM, amené à pH 8,0 avec HAC). La migration s'effectue à 80-90 V (cuve d'électrophorèse *Invitrogen, Bethesda, USA* ou *Bio-Rad, Hercules, USA*). Le gel est ensuite coloré dans un bain de bromure d'éthidium (50 µg/ 100 ml) et les bandes d'ADN sont

visualisées au transilluminateur UV (312 nm). Des images du gel et l'analyse du profil des bandes de migration peuvent être réalisées à l'aide du logiciel Bio-Profil v6.0 (Vilber-Lourmat). Trois marqueurs de poids moléculaire ont été utilisés : l'ADN du phage  $\lambda$  digéré par *Hind*III ( $\lambda$ /*Hind*III), le 100 bp ladder et le gene ruler 1 kb DNA ladder (*Invitrogen, Bethesda, USA* ou *MBI Fermentas, Vilnius, Lituanie*).

(ii) Pour séparer les ARN, 15  $\mu$ g de la préparation d'ARN totaux (~5  $\mu$ l) sont additionnés à 15  $\mu$ l d'un mélange dénaturant (50% formamide désionisée, 6,5 % formaldéhyde dans du MOPS 1x [20 mM acide morpholinopropane sulfonique, 5 mM acétate de sodium, 1 mM EDTA, pH 7,0], bromure d'éthidium 25 ng/ $\mu$ l). Les échantillons sont dénaturés 15 minutes à 60°C puis refroidis sur glace. Après ajout de 2  $\mu$ l de tampon de chargement (1 mM EDTA pH 8,0, 50% [v/v] glycérol, 0,5% [w/v] bleu de bromophénol), ils sont déposés sur un gel d'agarose (0,9 % préparé dans du tampon MOPS 1x) qui contient 6% (v/v) de formaldéhyde. La migration s'effectue dans du tampon MOPS 1x sous une différence de potentiel de 80-100 V (cuve d'électrophorèse *Invitrogen, Bethesda, USA*). Les ARNr sont visualisées au transilluminateur UV (312 nm). Le marqueur de poids moléculaire utilisé est le 0,24-9,5 kb RNA ladder (*Invitrogen, Bethesda, USA*).

### 3.7. Purification des fragments d'ADN

Un bloc d'agarose contenant la bande d'intérêt est découpé du gel d'électrophorèse. L'ADN est ensuite purifié à l'aide du kit *Wizard SV gel and PCR clean-up system* (*Promega, Madison, USA*) selon les instructions du fournisseur. Ce kit est également utilisé pour purifier les produits de PCR.

### 3.8. Ligation de fragments d'ADN

Classiquement, le mélange de ligation contient 100 ng d'ADN dans 7  $\mu$ l d'eau (dans un rapport molaire insert :vecteur de 3 :1), 2  $\mu$ l de tampon de ligation 5x et 1 unité de T4 ADN ligase (*Invitrogen Bethesda, USA*). Il est incubé une nuit à 16°C puis utilisé pour transformer *E. coli* (cf. section 2.2).

Les fragments obtenus par PCR avec la Taq polymérase sont clonés dans le vecteur PGEM-T easy (*Promega, Madison, USA*) lors d'une réaction qui met en jeu 50 ng de vecteur (rapport molaire insert :vecteur de 3 :1) et 3 unités de T4 ADN ligase.

### 3.9. Hybridation d'ARN sur Northern blot

(i) *Northern blotting*. Après électrophorèse des ARN totaux (cf. section 3.6), le gel est placé sur une membrane de nylon (Hybond-N, *Amersham, Piscataway, USA*) préalablement traitée par du SSC 2x (SSC 20x : NaCl 3 M, citrate de sodium dihydraté 300 mM, pH 7,0). Après le transfert des ARN par application d'un vide partiel (50-60 mbar durant 2-3 h, *Vacugene 2016 blotting-pump, Pharmacia, Bromma, Sweden*) et en présence de SSC 20x, le gel est lavé dans du SSC 2x. Les ARN sont enfin fixés sur la membrane par incubation sous vide, deux heures à 80°C.

(ii) *Marquage de la sonde*. Après purification, les fragments servant de sonde sont marqués radioactivement au  $\alpha$ -<sup>32</sup>P-dCTP à l'aide du kit *RadPrime DNA labelling system* (*Invitrogen, Bethesda, USA*). 25 ng de sonde dissous dans 21  $\mu$ l d'eau sont dénaturés par un traitement de 5 minutes à 100 °C puis placés sur glace avant d'y ajouter 1 $\mu$ l des solutions de dATP, dGTP et dTTP 500  $\mu$ M, 20  $\mu$ l de solution *Random primers* 2,5x, 5 $\mu$ l de dCTP marqué au <sup>32</sup>P (3000 Ci/mmmole, 10 mCi/ $\mu$ l) et 1 $\mu$ l du fragment de *Klenow* (40 u/ $\mu$ l). Après 10 minutes d'incubation à 37°C, la réaction est arrêtée par ajout d'un tampon "stop". La sonde marquée est ensuite purifiée sur colonne selon les instructions du fournisseur (*mini Quick Spin Column, Boehringer, Ingelheim, Allemagne*).

(iii) *Hybridation et détection*. La membrane est placée dans un tube à hybridation (*Hybridiser HB-ID, Techne, Cambridge, Angleterre*) contenant 15 ml de solution de préhybridation (SSC 6x, 0,1 % BSA, 0,1% ficoll, 0,1% polyvinylpyrrolidone, 50% formamide désionisée, 0,5 % SDS, 100  $\mu$ g/ml d'ADN de sperme de Hareng dénaturé) pendant 3 heures à 42°C. La solution de préhybridation est ensuite remplacée par 15 ml de solution d'hybridation (SSC 6x, 50% formamide désionisée, 0,5% SDS, 100  $\mu$ g/ml d'ADN de sperme de hareng dénaturé, sonde marquée dénaturée [au minimum 10<sup>5</sup> CPM/cm<sup>2</sup> de membrane]) pendant 16h à 42°C. La membrane est successivement lavée deux fois pendant 10 minutes dans du SSC 2x-0,1% SDS à 60°C et 15 minutes dans du SSC 0,1x-0,1% SDS à 60 °C. La membrane est ensuite scellée dans un sac en plastique et mise en cassette en regard d'un film autoradiographique (*Fuji X-Ray*).

## 4. Techniques biochimiques

### 4.1. Préparation des membranes cellulaires totales de *Chlamydomonas*

La purification partielle des membranes repose sur la désintégration des cellules et des organites par sonication (*cf.* publication 2 (Remacle *et al.*, 2001a)).

### 4.2. Purification et fractionnement des mitochondries de *Chlamydomonas*

La méthode de purification des mitochondries par lyse à la digitonine de cellules sans paroi est adaptée du protocole de Klein *et al.* (Klein *et al.*, 1983) pour isoler des chloroplastes intacts de *Chlamydomonas* (*cf.* publication 3 (Cardol *et al.*, 2002)). Le fractionnement des mitochondries purifiées est réalisé par sonication des organites (2x15 secondes) dans un tampon Tris-HCl 20 mM pH 8,0. Les mitochondries intacts sont éliminées par 5 min de centrifugation à 9500 g. La séparation des fractions soluble et membranaire est réalisée par centrifugation à 20000 g pendant 20 min (Cooper et Newton, 1989).

### 4.3. Dosage des protéines

Les concentrations protéiques sont déterminées par la méthode de Bradford (1976) (Bradford, 1976) à l'aide d'un réactif commercial (*Bio-Rad*).

### 4.4. Mesure de la respiration in vivo

La consommation d'oxygène à 25°C et à l'obscurité de cellules cultivées en conditions mixotrophes a été déterminée à l'électrode de Clark (*Hansatech Instrument, King's Lynn, England*) (Duby et Matagne, 1999). La roténone est préparée dans du DMSO à la concentration de 100 µM et 10 µl sont ajoutés par ml de suspension cellulaire.

### 4.5. Dosage d'activités enzymatiques spécifiques

Les activités NADH:duroquinone oxydoréductase (Duby et Matagne, 1999), NADH:ferricyanure oxydoréductase (Majander *et al.*, 1991), cytochrome *c* oxydase, succinate:cytochrome *c* oxydoréductase (Remacle *et al.*, 2001a), succinate:DCIP oxydoréductase et décyloxybenzoquinol:cytochrome *c* oxydoréductase (Remacle *et al.*, 2004) ont été déterminées à 25 °C selon le mode opératoire décrit dans les publications citées, en utilisant un spectrophotomètre UV/VIS Lambda 20 (*Perkin Elmer, Norwalk, USA*).

## 4.6. Electrophorèse de protéines

### 4.6.1. BN-PAGE

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide en conditions non dénaturantes et en présence de bleu de Coomassie G250 (BN-PAGE ou Blue Native PolyAcrylamide Gel Electrophoresis) permet la séparation des complexes protéiques natifs en fonction de leur masse moléculaire (Schägger et Von Jagow, 1991). Elle permet d'estimer la taille des complexes par comparaison avec des marqueurs de masse moléculaire (uréase 272 et 545 kDa, BSA 66 et 132 kDa, thyroglobuline 669 kDa, le complexe I de *Solanum tuberosum*) (Duby *et al.*, 2001). Les complexes protéiques présents dans les membranes sont solubilisés par addition de 0,5 volume de tampon ACA (750 mM acide  $\epsilon$ -amino-n-caproïque, 0,5 mM EDTA, 50 mM Bis-Tris, pH 7,0) et de 0,1 volume de  $\beta$ -D-dodécyl maltoside de 10 %. Les échantillons sont ensuite centrifugés 20 min à 15300 g. Le surnageant est conservé et la concentration protéique déterminée. Pour le chargement, les aliquotes contenant 80-150 µg sont additionnées de Bleu de Coomassie G250 à la concentration finale de 0,3 % (Jansch *et al.*, 1996).

### 4.6.2. SDS-PAGE

La séparation des constituants du sous-complexe I est effectuée dans une approche bidimensionnelle (BN-PAGE puis SDS-PAGE) selon le protocole décrit dans la première publication. Brièvement, la bande du BN-PAGE est découpée et incubée 15 min à 60 °C dans un tampon contenant 10% SDS et 1%  $\beta$ -mercaptoéthanol (Cottingham et Moore, 1988). Le fragment de polyacrylamide est ensuite scellé entre les plaques de verre du système d'électrophorèse et les deux parties du gel Tricine SDS-PAGE sont coulées. La taille des protéines est estimée en fonction de leur migration dans le gel par comparaison avec la migration des marqueurs de masse moléculaire (Precision plus Dual Color, *Biorad Laboratories, Hercules, USA*; Multi-Mark Prestained-Protein Standards, *Invitrogen, Carlsbad, USA*).

### 4.6.3. Coloration des protéines au Bleu de Coomassie

Le protocole de coloration des protéines au bleu de Coomassie est décrit dans la première publication. L'analyse du profil des bandes de migration a été réalisée à l'aide du logiciel Bio-Profil v6.0 (*Vilber-Lourmat*).

#### 4.6.4. Mise en évidence de l'activité NADH déshydrogénase

La mise en évidence des activités NADH déshydrogénases dans le gel est réalisée par une réaction de coloration enzymatique impliquant la réduction du Bleu de Nitrotétrazolium (NBT) par le NADH en un produit insoluble bleu-violet (Kuonen *et al.*, 1986). La réaction de coloration est arrêtée dans un mélange méthanol 50 %, acide acétique 10 % et fixée dans l'acide acétique 10 %.

#### 4.7. Détection des protéines sur Western Blot

Après la séparation dans le gel de polyacrylamide, le transfert des protéines par électroélution sur une membrane en PVDF (polyvinylidène difluorure) conditionnée selon les instructions du fabricant (*Immobilon-P, Millipore*) est réalisée en conditions standards (Duby *et al.*, 2001).

Après transfert, la membrane est mise en contact avec la solution d'anticorps polyclonaux primaires obtenus par immunisation de lapins avec le complexe I de *Neurospora crassa* (Dons des docteur Weiss et Schulte, Université de Düsseldorf, Allemagne). Après lavages, l'hybridation des anticorps est détectée par chemiluminescence selon les instructions du fabricant (*kit ECL, Boehringer Mannheim*).

#### 4.8. Analyse des peptides par spectrométrie de masse

La méthodologie mise en oeuvre pour identifier les polypeptides par spectrométrie de masse est décrite dans la première publication.

### 5. Analyses bioinformatiques

Les références des différents logiciels utilisés sont données dans la première publication.

## Bibliographie

- Abdelnoor R. V., R. Yule, A. Elo, A. C. Christensen, G. Meyer-Gauen et S. A. Mackenzie (2003) Substoichiometric shifting in the plant mitochondrial genome is influenced by a gene homologous to MutS. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **100**, 5968-73.
- Adam M. et R. Loppes (1998) Use of the ARG7 gene as an insertional mutagen to clone PHON24, a gene required for derepressible neutral phosphatase activity in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.*, **258**, 123-32.
- Alexander N. J., N. W. Gillham et J. E. Boynton (1974) The mitochondrial genome of *Chlamydomonas*. Induction of minute colony mutations by acriflavine and their inheritance. *Mol. Gen. Genet.*, **130**, 275-290.
- Allen J. F., J. Bennett, K. E. Steinback et C. J. Arntzen (1981) Chloroplast protein phosphorylation couples plastoquinone redox state to distribution of excitation energy between photosystems. *Nature*, **291**, 25-29.
- Almasan A. et N. C. Mishra (1988) Molecular characterization of the mitochondrial DNA of a new stopper mutant ER-3 of *Neurospora crassa*. *Genetics*, **120**, 935-45.
- Almeida T., M. Duarte, A. M. Melo et A. Videira (1999) The 24-kDa iron-sulphur subunit of complex I is required for enzyme activity. *Eur. J. Biochem.*, **265**, 86-93.
- Alves P. C. et A. Videira (1994) Disruption of the gene coding for the 21.3-kDa subunit of the peripheral arm of complex I from *Neurospora crassa*. *J. Biol. Chem.*, **269**, 7777-84.
- Alves P. C. et A. Videira (1998) The membrane domain of complex I is not assembled in the stopper mutant E35 of *Neurospora*. *Biochem. Cell. Biol.*, **76**, 139-43.
- Antonicka H., I. Ogilvie, T. Taivassalo, R. P. Anitori, R. G. Haller, J. Vissing, N. G. Kennaway et E. A. Shoubridge (2003) Identification and characterization of a common set of complex I assembly intermediates in mitochondria from patients with complex I deficiency. *J Biol Chem*, **278**, 43081-8.
- Atteia A. (1994) Identification of mitochondrial respiratory proteins from the green alga *Chlamydomonas reinhardtii*. *C.R. Acad. Sci. Paris*, **317**, 11-19.
- Bai Y. et G. Attardi (1998) The mtDNA-encoded ND6 subunit of mitochondrial NADH dehydrogenase is essential for the assembly of the membrane arm and the respiratory function of the enzyme. *EMBO J.*, **17**, 4848-58.
- Bai Y., R. M. Shakeley et G. Attardi (2000) Tight control of respiration by NADH dehydrogenase ND5 subunit gene expression in mouse mitochondria. *Mol. Cell. Biol.*, **20**, 805-15.
- Bartoli C. G., G. M. Pastori et C. H. Foyer (2000) Ascorbate biosynthesis in mitochondria is linked to the electron transport chain between complexes III and IV. *Plant Physiol.*, **123**, 335-44.
- Batandier C., A. Picard, N. Tessier et J. Lunardi (2000) Identification of a novel T398A mutation in the ND5 subunit of the mitochondrial complex I and of three novel mtDNA polymorphisms in two patients presenting ocular symptoms. *Hum. Mutat.*, **16**, 532.
- Bennett J. (1977) Phosphorylation of chloroplast membrane proteins. *Nature*, **269**, 344-346
- Bennett J. (1979) The protein kinase of thylakoid membranes is light-dependent. *FEBS Lett.*, **103**, 342-344
- Bennoun P. (1982) A respiratory chain in the thylakoid membranes of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Prog. Clin. Biol. Res.*, **102b**, 291-8.
- Birky C. W., Jr. (2001) The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annu. Rev. Genet.*, **35**, 125-48.
- Boer P. H. et M. W. Gray (1988) Genes encoding a subunit of respiratory NADH dehydrogenase (ND1) and a reverse transcriptase-like protein (RTL) are linked to ribosomal RNA gene pieces in *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondrial DNA. *EMBO J.*, **7**, 3501-8.
- Boer P. H. et M. W. Gray (1989) Nucleotide sequence of a region encoding subunit 6 of NADH dehydrogenase (ND6) and tRNA (Trp) in *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondrial DNA. *Nucleic Acids Res.*, **17**, 3993
- Boer P. H. et M. W. Gray (1991) Short dispersed repeats localized in spacer regions of *Chlamydomonas reinhardtii* mitochondrial DNA. *Curr. Genet.*, **19**, 309-312
- Bonaventura C. et J. Meyers (1969) Fluorescence and oxygen evolution from *Chlorella pyrenoidosa*. *Biochim. Biophys. Acta*, **189**, 366-83.
- Bottcher B., D. Scheide, M. Hesterberg, L. Nagel-Steger et T. Friedrich (2002) A novel, enzymatically active conformation of the *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Biol. Chem.*, **277**, 17970-7.
- Bourges I., B. Mousson de Camaret, R. Beugnot, C. Remacle, P. Cardol, G. Hofhaus et J. P. Issartel (soumis pour publication) Structural organization of mitochondrial human complex I : role of the ND4 and ND5 mitochondria-encoded subunits and interaction with prohibitin. *Bioch. J.*, .
- Boynton J. E., E. H. Harris, B. D. Burkhart, P. M. Lamerson et N. W. Gillham (1987) Transmission of mitochondrial and chloroplast genomes in crosses of *Chlamydomonas*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **84**, 2391-2395
- Bradford M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, **72**, 248-54.
- Brown M. D., E. Starikovskaya, O. Derbeneva, S. Hosseini, J. C. Allen, I. E. Mikhailovskaya, R. I. Sukernik et D. C. Wallace (2002) The role of mtDNA background in

- disease expression: a new primary LHON mutation associated with Western Eurasian haplogroup *J. Hum Genet*, **110**, 130-8
- Brown M. D., I. A. Trounce, A. S. Jun, J. C. Allen et D. C. Wallace (2000) Functional analysis of lymphoblast and cybrid mitochondria containing the 3460, 11778, or 14484 Leber's hereditary optic neuropathy mitochondrial DNA mutation. *J. Biol. Chem.*, **275**, 39831-6.
- Bulté L., P. Gans, F. Rebeillé et F. A. Wollman (1990) ATP control on state transitions *in vivo* in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1020**, 72-80.
- Burrows P. A., L. A. Sazanov, Z. Svab, P. Maliga et P. J. Nixon (1998) Identification of a functional respiratory complex in chloroplasts through analysis of tobacco mutants containing disrupted plastid *ndh* genes. *EMBO J.*, **17**, 868-76.
- Bykova N. V., A. G. Rasmusson, A. U. Igamberdiev, P. Gardestrom et I. M. Moller (1999) Two separate transhydrogenase activities are present in plant mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **265**, 106-11.
- Cardol P., R. F. Matagne et C. Remacle (2002) Impact of mutations affecting ND mitochondria-encoded subunits on the activity and assembly of complex I in *Chlamydomonas*. Implication for the structural organization of the enzyme. *J. Mol. Biol.*, **319**, 1211-21.
- Carelli V., A. Ghelli, L. Bucchi, P. Montagna, A. De Negri, V. Leuzzi, C. Carducci, G. Lenaz, E. Lugaresi et M. Degli Esposti (1999) Biochemical features of mtDNA 14484 (ND6/M64V) point mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Ann. Neurol.*, **45**, 320-8.
- Carelli V., A. Ghelli, M. Ratta, E. Bacchilega, S. Sangiorgi, R. Mancini, V. Leuzzi, P. Cortelli, P. Montagna, E. Lugaresi et M. Degli Esposti (1997) Leber's hereditary optic neuropathy: biochemical effect of 11778/ND4 and 3460/ND1 mutations and correlation with the mitochondrial genotype. *Neurology*, **48**, 1623-32.
- Carneiro P., M. Duarte et A. Videira (2004) The main external alternative NAD(P)H dehydrogenase of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1608**, 45-52.
- Carroll J., R. J. Shannon, I. M. Fearnley, J. E. Walker et J. Hirst (2002) Definition of the nuclear encoded protein composition of bovine heart mitochondrial complex I. Identification two new subunits. *J. Biol. Chem.*, **277**, 50311-7.
- Casano L. M., J. M. Zapata, M. Martin et B. Sabater (2000) Chlororespiration and poisoning of cyclic electron transport. Plastoquinone as electron transporter between thylakoid NADH dehydrogenase and peroxidase. *J. Biol. Chem.*, **275**, 942-8.
- Cerutti H. (2003) RNA interference: traveling in the cell and gaining functions? *Trends Genet*, **19**, 39-46
- Cerutti H., A. M. Johnson, N. W. Gillham et J. E. Boynton (1997) A eubacterial gene conferring spectinomycin resistance on *Chlamydomonas reinhardtii*: integration into the nuclear genome and gene expression. *Genetics*, **145**, 97-110.
- Chol M., S. Lebon, P. Benit, D. Chretien, P. de Lonlay, A. Goldenberg, S. Odent, L. Hertz-Pannier, C. Vincent-Delorme, V. Cormier-Daire, P. Rustin, A. Rotig et A. Munnich (2003) The mitochondrial DNA G13513A MELAS mutation in the NADH dehydrogenase 5 gene is a frequent cause of Leigh-like syndrome with isolated complex I deficiency. *J Med Genet*, **40**, 188-91
- Chomyn A., P. Mariottini, M. W. Cleeter, C. I. Ragan, A. Matsuno-Yagi, Y. Hatefi, R. F. Doolittle et G. Attardi (1985) Six unidentified reading frames of human mitochondrial DNA encode components of the respiratory-chain NADH dehydrogenase. *Nature*, **314**, 592-7.
- Cleeter M. W. et C. I. Ragan (1985) The polypeptide composition of the mitochondrial NADH: ubiquinone reductase complex from several mammalian species. *Biochem. J.*, **230**, 739-46.
- Colin M., M. P. Dorthu, F. DUBY, C. Remacle, M. Dinant, M. R. Wolwertz, C. Duyckaerts, F. Sluse et R. F. Matagne (1995) Mutations affecting the mitochondrial genes encoding the cytochrome oxidase subunit I and apocytochrome b of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.*, **249**, 179-84.
- Colleaux L., M. R. Michel-Wolwertz, R. F. Matagne et B. Dujon (1990) The apocytochrome b gene of *Chlamydomonas smithii* contains a mobile intron related to both *Saccharomyces* and *Neurospora* introns. *Mol. Gen. Genet.*, **223**, 288-96.
- Combettes B. et J. M. Grienerberger (1999) Analysis of wheat mitochondrial complex I purified by a one-step immunoaffinity chromatography. *Biochimie*, **81**, 645-53.
- Cooper P. et K. J. Newton (1989) Maize nuclear background regulates the synthesis of a 22-kDa polypeptide in *Zea luxurians* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **86**, 7423-7426
- Corona P., C. Antozzi, F. Carrara, L. D'Incerti, E. Lamantea, V. Tiranti et M. Zeviani (2001) A novel mtDNA mutation in the ND5 subunit of complex I in two MELAS patients. *Ann Neurol*, **49**, 106-10
- Cottingham I. R. et A. L. Moore (1988) Analysis of NADH dehydrogenases from plant [mung bean (*Phaseolus aureus*)] mitochondrial membranes on non-denaturing polyacrylamide gels and purification of complex I by band excision. *Biochem. J.*, **254**, 303-5.
- Cournac L., E. M. Josse, T. Joet, D. Rumeau, K. Redding, M. Kuntz et G. Peltier (2000) Flexibility in photosynthetic electron transport: a newly identified chloroplast oxidase involved in chlororespiration. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, **355**, 1447-54.
- Crimi M., S. Galbiati, I. Moroni, A. Bordoni, M. P. Perini, E. Lamantea, M. Sciacco, M. Zeviani, I. Biunno, M.

- Moggio, G. Scarlato et G. P. Comi (2003) A missense mutation in the mitochondrial ND5 gene associated with a Leigh-MELAS overlap syndrome. *Neurology*, **60**, 1857-61
- Cruciat C. M., S. Brunner, F. Baumann, W. Neupert et R. A. Stuart (2000) The cytochrome bc<sub>1</sub> and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *J. Biol. Chem.*, **275**, 18093-8.
- da Silva M. V., P. C. Alves, M. Duarte, N. Mota, A. Lobo-da-Cunha, T. A. Harkness, F. E. Nargang et A. Videira (1996) Disruption of the nuclear gene encoding the 20.8-kDa subunit of NADH: ubiquinone reductase of *Neurospora* mitochondria. *Mol. Gen. Genet.*, **252**, 177-83.
- Darrouzet E., J. P. Issartel, J. Lunardi et A. Dupuis (1998) The 49-kDa subunit of NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I) is involved in the binding of piericidin and rotenone, two quinone-related inhibitors. *FEBS Lett.*, **431**, 34-8.
- Delosme R., J. Olive et F. A. Wollman (1996) Changes in light energy distribution upon state transitions : as in vivo photoacoustic study of the wild-type and photosynthesis mutants from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1273**, 150-8.
- Depege N., S. Bellafiore et J. D. Rochaix (2003) Role of chloroplast protein kinase Stt7 in LHClI phosphorylation and state transition in *Chlamydomonas*. *Science*, **299**, 1572-5.
- Devreese B., F. Vanrobaeys, J. Smet, J. Van Beeumen et R. Van Coster (2002) Mass spectrometric identification of mitochondrial oxidative phosphorylation subunits separated by two-dimensional blue-native polyacrylamide gel electrophoresis. *Electrophoresis*, **23**, 2525-33.
- Dinant M., D. Baurain, N. Coosemans, B. Joris et R. F. Matagne (2001) Characterization of two genes encoding the mitochondrial alternative oxidase in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Curr Genet*, **39**, 101-8
- Djafarzadeh R., S. Kerscher, K. Zwicker, M. Radermacher, M. Lindahl, H. Schagger et U. Brandt (2000) Biophysical and structural characterization of proton-translocating NADH-dehydrogenase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1459**, 230-8.
- Dorthu M. P. (1989) Isolement et caractérisation de mutants respiratoires chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Botany, Université de Liège, Liège (Belgique).
- Dorthu M. P., S. Remy, M. R. Michel-Wolwertz, L. Colleaux, D. Breyer, M. C. Beckers, S. Englebert, C. Duyckaerts, F. E. Sluse et R. F. Matagne (1992) Biochemical, genetic and molecular characterization of new respiratory- deficient mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.*, **18**, 759-72.
- Duarte M., N. Mota, L. Pinto et A. Videira (1998) Inactivation of the gene coding for the 30.4-kDa subunit of respiratory chain NADH dehydrogenase: is the enzyme essential for *Neurospora*? *Mol. Gen. Genet.*, **257**, 368-75.
- Duarte M., H. Populo, A. Videira, T. Friedrich et U. Schulte (2002) Disruption of iron-sulphur cluster N2 from NADH: ubiquinone oxidoreductase by site-directed mutagenesis. *Biochem J*, **364**, 833-9
- Duarte M., R. Sousa et A. Videira (1995) Inactivation of genes encoding subunits of the peripheral and membrane arms of *neurospora* mitochondrial complex I and effects on enzyme assembly. *Genetics*, **139**, 1211-21.
- Duarte M. et A. Videira (2000) Respiratory chain complex I is essential for sexual development in *neurospora* and binding of iron sulfur clusters are required for enzyme assembly. *Genetics*, **156**, 607-15.
- Duborjal H., A. Dupuis, A. Chapel, S. Kieffer, J. Lunardi et J. P. Issartel (1997) Immuno-purification of a dimeric subcomplex of the respiratory NADH-CoQ reductase of *Rhodobacter capsulatus* equivalent to the FP fraction of the mitochondrial complex I. *FEBS Lett.*, **405**, 345-50.
- Duby F. (2002) Isolement et caractérisation de mutations de délétion affectant le génome mitochondrial chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Sciences de la Vie (Botanique), ULg, Liège.
- Duby F., P. Cardol, R. F. Matagne et C. Remacle (2001) Structure of the telomeric ends of mt DNA, transcriptional analysis and complex I assembly in the dum24 mitochondrial mutant of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Genet. Genomics*, **266**, 109-14.
- Duby F. et R. F. Matagne (1999) Alteration of dark respiration and reduction of phototrophic growth in a mitochondrial DNA deletion mutant of *Chlamydomonas* lacking cob, nd4, and the 3' end of nd5. *Plant Cell*, **11**, 115-25.
- Dupuis A., M. Chevallet, E. Darrouzet, H. Duborjal, J. Lunardi et J. P. Issartel (1998a) The complex I from *Rhodobacter capsulatus*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 147-65.
- Dupuis A., E. Darrouzet, H. Duborjal, B. Pierrard, M. Chevallet, R. van Belzen, S. P. Albracht et J. Lunardi (1998b) Distal genes of the nuo operon of *Rhodobacter capsulatus* equivalent to the mitochondrial ND subunits are all essential for the biogenesis of the respiratory NADH-ubiquinone oxidoreductase. *Mol. Microbiol.*, **28**, 531-41.
- Dupuis A., I. Prieur et J. Lunardi (2001) Toward a characterization of the connecting module of complex I. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **33**, 159-168.
- Earley F. G., S. D. Patel, I. Ragan et G. Attardi (1987) Photolabelling of a mitochondrially encoded subunit of NADH dehydrogenase with [3H]dihydrorotenone. *FEBS Lett.*, **219**, 108-12.
- Eubel H., L. Jansch et H. P. Braun (2003) New insights into the respiratory chain of plant mitochondria.



- Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol.*, **133**, 274-86.
- Fagard M. et H. Vaucheret (2000) (TRANS)GENE SILENCING IN PLANTS: How Many Mechanisms? *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, **51**, 167-194
- Fang J., Y. Wang et D. S. Beattie (2001) Isolation and characterization of complex I, rotenone-sensitive NADH: ubiquinone oxidoreductase, from the procyclic forms of *Trypanosoma brucei*. *Eur. J. Biochem.*, **268**, 3075-82.
- Fearnley I. M., J. Carroll, R. J. Shannon, M. J. Runswick, J. E. Walker et J. Hirst (2001) GRIM-19, a cell death regulatory gene product, is a subunit of bovine mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Biol. Chem.*, **276**, 38345-8.
- Fearnley I. M. et J. E. Walker (1992) Conservation of sequences of subunits of mitochondrial complex I and their relationships with other proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1140**, 105-34.
- Fecke W., V. D. Sled, T. Ohnishi et H. Weiss (1994) Disruption of the gene encoding the NADH-binding subunit of NADH: ubiquinone oxidoreductase in *Neurospora crassa*. Formation of a partially assembled enzyme without FMN and the iron-sulphur cluster N-3. *Eur. J. Biochem.*, **220**, 551-8.
- Ferreirinha F., M. Duarte, A. M. Melo et A. Videira (1999) Effects of disrupting the 21 kDa subunit of complex I from *Neurospora crassa*. *Biochem. J.*, **342 Pt 3**, 551-4.
- Finazzi G. (1999) State transitions, cyclic and linear electron transport and photophosphorylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1413**, 117-29.
- Finazzi G. (2001) Contrasted effects of inhibitors of cytochrome b6/f complex on state transitions in *Chlamydomonas reinhardtii*: the role of Qo site occupancy in LHCII kinase activation. *J. Biol. Chem.*, **276**, 9770-4.
- Finazzi G., F. Rappaport, A. Furia, M. Fleischmann, J. D. Rochaix, F. Zito et G. Forti (2002) Involvement of state transitions in the switch between linear and cyclic electron flow in *Chlamydomonas reinhardtii*. *EMBO Rep.*, **3**, 280-5.
- Finel M. (1998) Organization and evolution of structural elements within complex I. *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 112-21.
- Finel M., J. M. Skehel, S. P. Albracht, I. M. Fearnley et J. E. Walker (1992) Resolution of NADH:ubiquinone oxidoreductase from bovine heart mitochondria into two subcomplexes, one of which contains the redox centers of the enzyme. *Biochemistry*, **31**, 11425-34.
- Fire A., S. Xu, M. K. Montgomery, S. A. Kostas, S. E. Driver et C. C. Mello (1998) Potent and specific genetic interference by double-stranded RNA in *Caenorhabditis elegans*. *Nature*, **391**, 806-11
- Fisher N. et P. R. Rich (2000) A motif for quinone binding sites in respiratory and photosynthetic systems. *J. Mol. Biol.*, **296**, 1153-62.
- Fleischmann M. M. (1999) Isolation and characterization of photoautotrophic mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* deficient in state transition. *J. Biol. Chem.*, **274**, 30987-94.
- Friedrich T. (1998) The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Escherichia coli*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 134-46.
- Friedrich T. (2001) Complex I: a chimaera of a redox and conformation-driven proton pump? *J. Bioenerg. Biomembr.*, **33**, 169-177.
- Friedrich T. et B. Bottcher (2004) The gross structure of the respiratory complex I: a Lego System. *Biochim. Biophys. Acta*, **1608**, 1-9.
- Friedrich T., B. Brors, P. Hellwig, L. Kintscher, T. Rasmussen, D. Scheide, U. Schulte, W. Mantele et H. Weiss (2000) Characterization of two novel redox groups in the respiratory NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochim. Biophys. Acta*, **1459**, 305-9.
- Friedrich T., G. Hofhaus, W. Ise, U. Nehls, B. Schmitz et H. Weiss (1989) A small isoform of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) without mitochondrially encoded subunits is made in chloramphenicol-treated *Neurospora crassa*. *Eur. J. Biochem.*, **180**, 173-80.
- Friedrich T. et H. Weiss (1996) Origine and evolution of the proton-pumping NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) (205-220.). H. Baltscheffsky, Origin and evolution of Biological conversion, VCH publishers, Stockholm.
- Fuhrmann M. (2002) Expanding the molecular toolkit for *Chlamydomonas reinhardtii*--from history to new frontiers. *Protist*, **153**, 357-64.
- Fuhrmann M., A. Stahlberg, E. Govorunova, S. Rank et P. Hegemann (2001) The abundant retinal protein of the *Chlamydomonas* eye is not the photoreceptor for photoaxis and photophobic responses. *J. Cell. Sci.*, **114**, 3857-63.
- Funes S., E. Davidson, M. G. Claros, R. van Lis, X. Perez-Martinez, M. Vazquez-Acevedo, M. P. King et D. Gonzalez-Halphen (2002) The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F1F0-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem*, **277**, 6051-8
- Galante Y. M. et Y. Hatefi (1979) Purification and molecular and enzymic properties of mitochondrial NADH dehydrogenase. *Arch. Biochem. Biophys.*, **192**, 559-68.
- Gemperli A. C., P. Dimroth et J. Steuber (2003) Sodium ion cycling mediates energy coupling between complex I and ATP synthase. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 839-44.
- Gillham N. W. (1994) Organelle genes and genomes. Oxford University Press, Oxford, New York.
- Gillham N. W., J. E. Boynton et E. H. Harris (1987) Specific elimination of mitochondrial DNA from *Chlamydomonas* by intercalating dyes. *Curr. Genet.*, **12**, 41-47

- Glaser E., S. Sjoling, M. Tanudji et J. Whelan (1998) Mitochondrial protein import in plants. *Plant Mol. Biol.*, **331-338**.
- Gloire G. (2001) Analyse de mutations mitochondriales et études des transitions d'état chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Botanique, ULg, Liège.
- Gong X., T. Xie, L. Yu, M. Hesterberg, D. Scheide, T. Friedrich et C. A. Yu (2003) The ubiquinone-binding site in NADH:ubiquinone oxidoreductase from *Escherichia coli*. *J Biol Chem*, **278**, 25731-7.
- Gormane D. S. et R. P. Levine (1965) Cytochrome f and plastocyanin: their sequence in the photosynthetic electron transport chain of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **54**, 1665-1669
- Grant D. et K. S. Chiang (1980) Physical mapping and characterization of *Chlamydomonas reinhardtii* DNA molecules: their unique ends, sequence homogeneity and conservation. *Plasmid*, **1**, 82-96
- Grigorieff N. (1998) Three-dimensional structure of bovine NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) at 22 Å in ice. *J. Mol. Biol.*, **277**, 1033-46.
- Grossman A. R., E. E. Harris, C. Hauser, P. A. Lefebvre, D. Martinez, D. Rokhsar, J. Shrager, C. D. Silflow, D. Stern, O. Vallon et Z. Zhang (2003) *Chlamydomonas reinhardtii* at the crossroads of genomics. *Eukaryot Cell*, **2**, 1137-50.
- Guenebaut V., A. Schlitt, H. Weiss, K. Leonard et T. Friedrich (1998) Consistent structure between bacterial and mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Mol. Biol.*, **276**, 105-12.
- Guenebaut V., R. Vincentelli, D. Mills, H. Weiss et K. R. Leonard (1997) Three-dimensional structure of NADH-dehydrogenase from *Neurospora crassa* by electron microscopy and conical tilt reconstruction. *J. Mol. Biol.*, **265**, 409-18.
- Gutierrez S., B. Combettes, R. De Paepe, M. Mirande, C. Lelandais, F. Vedel et P. Chetrit (1999) In the *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant, a recombination-mediated change 5' to the first exon of the mitochondrial *nad1* gene is associated with lack of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) NAD1 subunit. *Eur. J. Biochem.*, **261**, 361-70.
- Gutierrez S., M. Sabar, C. Lelandais, P. Chetrit, P. Diolez, H. Degand, M. Boutry, F. Vedel, Y. de Kouchkovsky et R. De Paepe (1997) Lack of mitochondrial and nuclear-encoded subunits of complex I and alteration of the respiratory chain in *Nicotiana sylvestris* mitochondrial deletion mutants. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **94**, 3436-41.
- Hamel P., J. Olive, Y. Pierre, F. A. Wollman et C. de Vitry (2000) A new subunit of cytochrome b6f complex undergoes reversible phosphorylation upon state transition. *J. Biol. Chem.*, **275**, 17072-9.
- Harkness T. A., R. A. Rothery, J. H. Weiner, S. Werner, J. E. Azevedo, A. Videira et F. E. Nargang (1995) Disruption of the gene encoding the 78-kilodalton subunit of the peripheral arm of complex I in *Neurospora crassa* by repeat induced point mutation (RIP). *Curr. Genet.*, **27**, 339-50.
- Harris E. H. (2001) *Chlamydomonas* as a Model Organism. *Annu Rev Plant Physiol. Plant Mol Biol*, **52**, 363-406.
- Hassinen I. E. et P. T. Vuokila (1993) Reaction of dicyclohexylcarbodiimide with mitochondrial proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **1144**, 107-24.
- Hatefi Y. (1985) The mitochondrial electron transport and oxidative phosphorylation system. *Annu. Rev. Biochem.*, **54**, 1015-69.
- Hatefi Y., A. G. Haavik et D. E. Griffiths (1961) Reconstitution of the electron transport system. I. Preparation and properties of the interacting enzyme complexes. *Biochem Biophys Res Commun*, **4**, 441-6.
- Heazlewood J. L., K. A. Howell et A. H. Millar (2003) Mitochondrial complex I from *Arabidopsis* and rice: orthologs of mammalian and fungal components coupled with plant-specific subunits. *Biochim. Biophys. Acta*, **1604**, 159-69.
- Heinrich H. et S. Werner (1992) Identification of the ubiquinone-binding site of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from *Neurospora crassa*. *Biochemistry*, **31**, 11413-9.
- Hirst J. (2003) The dichotomy of complex I: a sodium ion pump or a proton pump. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **100**, 773-5.
- Hirst J., J. Carroll, I. M. Fearnley, R. J. Shannon et J. E. Walker (2003) The nuclear encoded subunits of complex I from bovine heart mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1604**, 135-50.
- Hoefnagel M. H., O. K. Atkin et J. T. Wiskich (1998) Interdependence between chloroplast and mitochondria in the light and the dark. *Biochim. Biophys. Acta*, **1366**, 235-55
- Hofhaus G. et G. Attardi (1993) Lack of assembly of mitochondrial DNA-encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase and loss of enzyme activity in a human cell mutant lacking the mitochondrial ND4 gene product. *EMBO J.*, **12**, 3043-8.
- Hofhaus G. et G. Attardi (1995) Efficient selection and characterization of mutants of a human cell line which are defective in mitochondrial DNA-encoded subunits of respiratory NADH dehydrogenase. *Mol. Cell. Biol.*, **15**, 964-74.
- Hofhaus G., H. Weiss et K. Leonard (1991) Electron microscopic analysis of the peripheral and membrane parts of mitochondrial NADH dehydrogenase (complex I). *J. Mol. Biol.*, **221**, 1027-43.
- Holt P. J., D. J. Morgan et L. A. Sazanov (2003) The location of NuoL and NuoM subunits in the membrane domain of the *Escherichia coli* complex I: implications for the mechanism of proton pumping. *J Biol Chem*, **278**, 43114-20.
- Hou C. X., E. Rintamaki et E. M. Aro (2003) Ascorbate-mediated LHCII protein phosphorylation--LHCII kinase

- regulation in light and in darkness. *Biochemistry*, **42**, 5828-36.
- Inoue H., H. Nojima et H. Okayama (1990) High efficiency transformation of *Escherichia coli* with plasmid. *Gene*, **96**, 23-8
- Jansch L., V. Krufft, U. K. Schmitz et H. P. Braun (1996) New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant J.*, **9**, 357-68.
- Janssen R., J. Smeitink, R. Smeets et L. van Den Heuvel (2002) CIA30 complex I assembly factor: a candidate for human complex I deficiency? *Hum. Genet.*, **110**, 264-70.
- Joet T., L. Cournac, G. Peltier et M. Havaux (2002) Cyclic electron flow around photosystem I in C(3) plants. In vivo control by the redox state of chloroplasts and involvement of the NADH-dehydrogenase complex. *Plant Physiol.*, **128**, 760-9.
- Jun A. S., M. D. Brown et D. C. Wallace (1994) A mitochondrial DNA mutation at nucleotide pair 14459 of the NADH dehydrogenase subunit 6 gene associated with maternally inherited Leber hereditary optic neuropathy and dystonia. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, **91**, 6206-10.
- Karpova O. V. et K. J. Newton (1999) A partially assembled complex I in ND4-deficient mitochondria of maize. *Plant J.*, **17**, 511-521.
- Kashani-Poor N., S. Kerscher, V. Zickermann et U. Brandt (2001a) Efficient large scale purification of his-tagged proton translocating NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from the strictly aerobic yeast *Yarrowia lipolytica*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1504**, 363-70.
- Kashani-Poor N., K. Zwicker, S. Kerscher et U. Brandt (2001b) A central functional role for the 49-kDa subunit within the catalytic core of mitochondrial complex I. *J. Biol. Chem.*, **276**, 24082-7.
- Kerscher S. J. (2000) Diversity and origin of alternative NADH:ubiquinone oxidoreductases. *Biochim. Biophys. Acta*, **1459**, 274-83.
- Kervinen M., J. Patsi, M. Finel et I. E. Hassinen (2004) A pair of membrane-embedded acidic residues in the NuoK subunit of *Escherichia coli* NDH-1, a counterpart of the ND4L subunit of the mitochondrial complex I, are required for high ubiquinone reductase activity. *Biochemistry*, **43**, 773-81.
- Kindle K. L. (1990) High frequency nuclear transformation of *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **87**, 1228-32.
- Klein U., C. Chen, M. Gibbs et P.-a. K. A. (1983) Cellular fractionation of *chlamydomonas reinhardtii* with emphasis on the isolation of the chloroplast. *Plant Physiol.*, **72**, 481-487.
- Kosel S., E. M. Grasbon-Frodl, U. Mautsch, R. Egensperger, U. von Eitzen, D. Frishman, S. Hofmann, K. D. Gerbitz, P. Mehraein et M. B. Graeber (1998) Novel mutations of mitochondrial complex I in pathologically proven Parkinson disease. *Neurogenetics*, **1**, 197-204.
- Kruse O., P. J. Nixon, G. H. Schmid et C. W. Mullineaux (1999) Isolation of state transition mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* by fluorescence video imaging. *Photosynthesis Research*, **61**, 43-51
- Kuffner R., A. Rohr, A. Schmiede, C. Krull et U. Schulte (1998) Involvement of two novel chaperones in the assembly of mitochondrial NADH:Ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Mol. Biol.*, **283**, 409-17.
- Kuonen D. R., P. J. Roberts et I. R. Cottingham (1986) Purification and analysis of mitochondrial membrane proteins on nondenaturing gradient polyacrylamide gels. *Anal. Biochem.*, **153**, 221-6.
- Kurki S., V. Zickermann, M. Kervinen, I. Hassinen et M. Finel (2000) Mutagenesis of three conserved Glu residues in a bacterial homologue of the ND1 subunit of complex I affects ubiquinone reduction kinetics but not inhibition by dicyclohexylcarbodiimide. *Biochemistry*, **39**, 13496-502.
- Lee H., S. E. Bingham et A. N. Weber (1996) Function of the 3' non-coding sequences and stop codon usage in expression of the chloroplast *psaB* gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.*, **31**, 337-354
- Lelandais C., B. Albert, S. Gutierrez, R. De Paepe, B. Godelle, F. Vedel et P. Chetrit (1998) Organization and expression of the mitochondrial genome in the *Nicotiana sylvestris* CMSII mutant. *Genetics*, **150**, 873-82.
- Leterme S. et M. Boutry (1993) Purification and preliminary characterization of mitochondrial complex I (NADH: ubiquinone reductase) from broad bean (*Vicia faba* L.). *Plant Physiol.*, **102**, 435-43.
- Liolitsa D., S. Rahman, S. Benton, L. J. Carr et M. G. Hanna (2003) Is the mitochondrial complex I ND5 gene a hot-spot for MELAS causing mutations? *Ann. Neurol.*, **53**, 128-32.
- Loppes R. et M. Radoux (2002) Two short regions of the promoter are essential for activation and repression of the nitrate reductase gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Molecular Genetics & Genomics: MGG*, **268**, 42-8.
- Lunde C., P. E. Jensen, A. Haldrup, J. Knoetzel et H. V. Scheller (2000) The PSI-H subunit of photosystem I is essential for state transitions in plant photosynthesis. *Nature*, **408**, 613-5.
- Majander A., M. Finel, M. L. Savontaus, E. Nikoskelainen et M. Wikstrom (1996) Catalytic activity of complex I in cell lines that possess replacement mutations in the ND genes in Leber's hereditary optic neuropathy. *Eur. J. Biochem.*, **239**, 201-7.
- Majander A., K. Huoponen, M. L. Savontaus, E. Nikoskelainen et M. Wikstrom (1991) Electron transfer properties of NADH:ubiquinone reductase in the ND1/3460 and the ND4/11778 mutations of the Leber

- hereditary optic neuroretinopathy (LHON). *FEBS Lett.*, **292**, 289-92.
- Mamedova A. A., P. J. Holt, J. Carroll et L. A. Sazanov (2004) Substrate-induced conformational change in bacterial complex I. *J Biol Chem*,
- Mariénfeld J. R. et K. J. Newton (1994) The maize NCS2 abnormal growth mutant has a chimeric nad4-nad7 mitochondrial gene and is associated with reduced complex I function. *Genetics*, **138**, 855-63.
- Marques I., M. Duarte et A. Videira (2003) The 9.8 kDa subunit of complex I, related to bacterial Na(+)-translocating NADH dehydrogenases, is required for enzyme assembly and function in *Neurospora crassa*. *J. Mol. Biol.*, **329**, 283-90.
- Matagne R. F. (1978) Fine structure of the arg-7 ciston in *Chlamydomonas reinhardtii*. Complementation between arg-7 mutants defective in argininosuccinate lyase. *Mol. Gen. Genet.*, **160**, 95-9.
- Matagne R. F. et D. Baurain (2001) A mutation in the GTPase domain of the large subunit rRNA is involved in the suppression of a -1T frameshift mutation affecting a mitochondrial gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Genet. Genomics*, **266**, 103-8.
- Matagne R. F., M. R. Michel-Wolwertz, C. Munaut, C. Duyckaerts et F. Sluse (1989) Induction and characterization of mitochondrial DNA mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell. Biol.*, **108**, 1221-6.
- Matagne R. F. et C. Remacle (2002) The Genetics and molecular biology of mitochondria in *Chlamydomonas*. *Recent. Res. Devel. Plant Biol.*, **2**, 15-32.
- Mathiesen C. et C. Hagerhall (2002) Transmembrane topology of the NuoL, M and N subunits of NADH:quinone oxidoreductase and their homologues among membrane-bound hydrogenases and bona fide antiporters. *Biochim. Biophys. Acta*, **1556**, 121-32.
- Mathiesen C. et C. Hagerhall (2003) The 'antiporter module' of respiratory chain complex I includes the MrpC/NuoK subunit -- a revision of the modular evolution scheme. *FEBS Lett.*, **549**, 7-13.
- Matsuno-Yagi A. et T. Yagi (2001) Introduction: complex I - an L-shaped black box. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **33**, 155-157.
- Melo A. M., M. Duarte et A. Videira (1999) Primary structure and characterisation of a 64 kDa NADH dehydrogenase from the inner membrane of *Neurospora crassa* mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1412**, 282-7.
- Michalecka A. M., A. S. Svensson, F. I. Johansson, S. C. Agius, U. Johanson, A. Brennicke, S. Binder et A. G. Rasmusson (2003) Arabidopsis genes encoding mitochondrial type II NAD(P)H dehydrogenases have different evolutionary origin and show distinct responses to light. *Plant Physiol.*, **133**, 642-52.
- Minet P. (2003) Inactivation par RNA interférence des gènes nucléaires nd4L et nd7 codant pour des sous-unités du complexe I mitochondrial chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Sciences de la Vie, ULg, Liège.
- Murata N. (1969) Control of excitation energy transfer in photosynthesis. I. Light-induced change of chlorophyll a fluorescence in *Porphyra yezoensis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **172**, 242-251
- Murata N. (1970) Control of excitation transfer in photosynthesis. IV. Kinetics of chlorophyll a fluorescence in *Porphyra yezoensis*. *Biochim. Biophys. Acta*, **205**, 379-89.
- Nakamaru-Ogiso E., K. Sakamoto, A. Matsuno-Yagi, H. Miyoshi et T. Yagi (2003) The ND5 subunit was labeled by a photoaffinity analogue of fenpyroximate in bovine mitochondrial complex I. *Biochemistry*, **42**, 746-54
- Nedelcu A. M. et R. W. Lee (1998) Modes and tempos of mitochondrial and chloroplast genome evolution in *Chlamydomonas* : a comparative analysis. (63-91.). J. D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont and S. Merchant, The Molecular biology of Chloroplast and Mitochondria in *Chlamydomonas*, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands.
- Nehls U., T. Friedrich, A. Schmiede, T. Ohnishi et H. Weiss (1992) Characterization of assembly intermediates of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) accumulated in *Neurospora* mitochondria by gene disruption. *J. Mol. Biol.*, **227**, 1032-42.
- Newman S. M., J. E. Boynton, N. W. Gillham, B. L. Randolph-Anderson, A. M. Johnson et E. H. Harris (1990) Transformation of chloroplast ribosomal RNA genes in *Chlamydomonas*: molecular and genetic characterization of integration events. *Genetics*, **126**, 875-88.
- Newton K. J., E. H. Coe et J. R. Gabay-Laughnan (1989) Abnormal expression growth mutant in maize has defective mitochondrial cytochrome oxidase gene. *Plant Cell*, **2**, 107-113.
- Ohnishi T. (1998) Iron-sulfur clusters/semiquinones in complex I. *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 186-206.
- Okun J. G., P. Lummen et U. Brandt (1999) Three classes of inhibitors share a common binding domain in mitochondrial complex I (NADH:ubiquinone oxidoreductase). *J. Biol. Chem.*, **274**, 2625-30.
- Papa S., A. M. Sardanelli, S. Scacco, V. Petruzzella, Z. Technikova-Dobrova, R. Vergari et A. Signorile (2002) The NADH: ubiquinone oxidoreductase (complex I) of the mammalian respiratory chain and the cAMP cascade. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **34**, 1-10.
- Pazour G. J. et G. B. Witman (2000) Forward and reverse genetic analysis of microtubule motors in *Chlamydomonas*. *Methods*, **22**, 285-98
- Peltier G. et L. Cournac (2002) Chlororespiration. *Annu. Rev. Plant. Biol.*, **53**, 523-50.
- Peng G., G. Fritzsche, V. Zickermann, H. Schagger, R. Mentele, F. Lottspeich, M. Bostina, M. Radermacher, R. Huber, K. O. Stetter et H. Michel (2003) Isolation,

- characterization and electron microscopic single particle analysis of the NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) from the hyperthermophilic eubacterium *Aquifex aeolicus*. *Biochemistry*, **42**, 3032-9.
- Perez-Martinez X., A. Antaramian, M. Vazquez-Acevedo, S. Funes, E. Tolkunova, J. d'Alayer, M. G. Claros, E. Davidson, M. P. King et D. Gonzalez-Halphen (2001) Subunit II of cytochrome c oxidase in *Chlamydomonas* algae is a heterodimer encoded by two independent nuclear genes. *J. Biol. Chem.*, **276**, 11302-9.
- Perez-Martinez X., M. Vazquez-Acevedo, E. Tolkunova, S. Funes, M. G. Claros, E. Davidson, M. P. King et D. Gonzalez-Halphen (2000) Unusual location of a mitochondrial gene. Subunit III of cytochrome C oxidase is encoded in the nucleus of *Chlamydomonas* algae. *J. Biol. Chem.*, **275**, 30144-52.
- Pirotte D. (2003) Inactivation par RNA interférence du gène *nd9* codant pour une sous-unité du complexe I mitochondrial chez *Chlamydomonas reinhardtii*. Sciences de la vie, ULg, Liège.
- Prieur I., J. Lunardi et A. Dupuis (2001) Evidence for a quinone binding site close to the interface between NUOD and NUOB subunits of Complex I. *Biochim. Biophys. Acta*, **1504**, 173-178.
- Quesada A. et E. Fernandez (1994) Expression of nitrate assimilation related genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol Biol*, **24**, 185-94
- Quiles M. J., M. E. Albacete, B. Sabater et J. Cuello (1996) Isolation and partial characterization of the NADH dehydrogenase complex from barley chloroplast thylakoids. *Plant Cell Physiol.*, **37**, 1134-1142.
- Race H. L., R. G. Herrmann et W. Martin (1999) Why have organelles retained genomes? *Trends Genet.*, **15**, 364-70.
- Ragan C. I. et E. Racker (1973) Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. 28. The reconstitution of the first site of energy conservation. *J. Biol. Chem.*, **248**, 2563-9.
- Rasmussen T., D. Scheide, B. Brors, L. Kintscher, H. Weiss et T. Friedrich (2001) Identification of two tetranuclear FeS clusters on the ferredoxin-type subunit of NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I). *Biochemistry*, **40**, 6124-31.
- Rasmusson A. G., V. V. Heiser, E. Zabaleta, A. Brennicke et L. Grohmann (1998) Physiological, biochemical and molecular aspects of mitochondrial complex I in plants. *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 101-11.
- Rasmusson A. G., J. Mendel-Hartvig, I. M. Moller et J. T. Wiskich (1994) Isolation of the rotenone-sensitive NADH-ubiquinone reductase (complex I) from red beet mitochondria. *Physiol. Plant.*, **90**, 607-615.
- Rasmusson A. G. et I. M. Moller (1991) NAD(P)H dehydrogenases on the inner surface of the inner mitochondrial membrane studied using inside-out submitochondrial particles. *Physiol. Plant.*, **83**, 357-365.
- Rasmusson A. G., A. S. Svensson, V. Knoop, L. Grohmann et A. Brennicke (1999) Homologues of yeast and bacterial rotenone-insensitive NADH dehydrogenases in higher eukaryotes: two enzymes are present in potato mitochondria. *Plant J.*, **20**, 79-87.
- Rawn J. D. (1990) Production et mise en réserve de l'énergie métabolique Biochimie, Editions universitaires De Boeck, Bruxelles.
- Rebeille F. et P. Gans (1988) Interaction between chloroplasts and mitochondria in microalgae. Role of glycolysis. *Plant Physiol.*, **88**, 973-5.
- Remacle C., D. Baurain, P. Cardol et R. F. Matagne (2001a) Mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* Deficient in Mitochondrial Complex I. Characterization of two mutations affecting the *nd1* coding sequence. *Genetics*, **158**, 1051-60.
- Remacle C., M. Colin et R. F. Matagne (1995) Genetic mapping of mitochondrial markers by recombinational analysis in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Mol. Gen. Genet.*, **249**, 185-90.
- Remacle C., F. Duby, P. Cardol et R. F. Matagne (2001b) Mutations inactivating mitochondrial genes in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Biochem. Soc. Trans.*, **29**, 442-6.
- Remacle C., G. Gloire, P. Cardol et R. Matagne (2004) Characterization of a mutation in the mitochondrial LSU rRNA gene from *Chlamydomonas reinhardtii* : impact on respiratory-chain complexes and on suppression of mutations. *Curr. Genet.*, **accepté pour publication**, .
- Remacle C. et R. F. Matagne (1993) Transmission, recombination and conversion of mitochondrial markers in relation to the mobility of a group I intron in *Chlamydomonas*. *Curr. Genet.*, **23**, 518-25.
- Remacle C. et R. F. Matagne (1998) Mitochondrial genetics (661-674.). J. D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont and S. Merchant, Molecular biology of chloroplasts and mitochondria in *Chlamydomonas*, Kluwer Academic Publishers, Dordrecht.
- Rochaix J. D. (2002) *Chlamydomonas*, a model system for studying the assembly and dynamics of photosynthetic complexes. *FEBS Lett.*, **529**, 34-8.
- Roth R. et C. Hagerhall (2001) Transmembrane orientation and topology of the NADH:quinone oxidoreductase putative quinone binding subunit NuoH. *Biochim. Biophys. Acta*, **1504**, 352-62.
- Ryan R., D. Grant, K. S. Chiang et H. Swift (1978) Isolation and characterization of the mitochondrial DNA from *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, **75**, 3268-3272
- Sambrook J., F. E.F. et T. Maniatis (1989) Molecular cloning. A laboratory manual. Second Edition. New York.
- Sazanov L. A., J. Carroll, P. Holt, L. Toime et I. M. Fearnley (2003) A role for native lipids in the stabilization and two-dimensional crystallization of the *Escherichia coli* NADH-ubiquinone oxidoreductase (complex I). *J. Biol. Chem.*, **278**, 19483-91.

- Sazanov L. A., S. Y. Peak-Chew, I. M. Fearnley et J. E. Walker (2000) Resolution of the membrane domain of bovine complex I into subcomplexes: implications for the structural organization of the enzyme. *Biochemistry*, **39**, 7229-35.
- Sazanov L. A. et J. E. Walker (2000) Cryo-electron crystallography of two sub-complexes of bovine complex I reveals the relationship between the membrane and peripheral arms. *J. Mol. Biol.*, **302**, 455-64.
- Schagger H. et K. Pfeiffer (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J.*, **19**, 1777-83.
- Schägger H. et G. Von Jagow (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.*, **199**, 223-231.
- Schmidt M., T. Friedrich, J. Wallrath, T. Ohnishi et H. Weiss (1992) Accumulation of the pre-assembled membrane arm of NADH:ubiquinone oxidoreductase in mitochondria of manganese-limited grown *Neurospora crassa*. *FEBS Lett.*, **313**, 8-11.
- Schneider R., M. Massow, T. Lisowsky et H. Weiss (1995) Different respiratory-defective phenotypes of *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae* after inactivation of the gene encoding the mitochondrial acyl carrier protein. *Curr. Genet.*, **29**, 10-7.
- Schuler F. et J. E. Casida (2001) Functional coupling of PSST and ND1 subunits in NADH:ubiquinone oxidoreductase established by photoaffinity labeling. *Biochim. Biophys. Acta*, **1506**, 79-87.
- Schulte U., V. Haupt, A. Abelmann, W. Fecke, B. Brors, T. Rasmussen, T. Friedrich et H. Weiss (1999) A reductase/isomerase subunit of mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) carries an NADPH and is involved in the biogenesis of the complex. *J. Mol. Biol.*, **292**, 569-80.
- Schulte U. et H. Weiss (1995) Generation and characterization of NADH: ubiquinone oxidoreductase mutants in *Neurospora crassa*. *Methods Enzymol.*, **260**, 3-14.
- Shrager J., C. Hauser, C. W. Chang, E. H. Harris, J. Davies, J. McDermott, R. Tamse, Z. Zhang et A. R. Grossman (2003) *Chlamydomonas reinhardtii* genome project. A guide to the generation and use of the cDNA information. *Plant Physiol.*, **131**, 401-8.
- Silflow C. D. (1998) Organization of the Nuclear Genome (25-40.). J. D. Rochaix, M. Goldschmidt-Clermont and S. Merchant, The molecular biology of chloroplasts and mitochondria in *Chlamydomonas*, Kluwer Academic Publishers,
- Sineshchekov O. A., K. H. Jung et J. L. Spudich (2002) Two rhodopsins mediate phototaxis to low- and high-intensity light in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **99**, 8689-94.
- Smeitink J., R. Sengers, F. Trijbels et L. van den Heuvel (2001) Human NADH:ubiquinone oxidoreductase. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **33**, 259-266.
- Snyders S. et B. D. Kohorn (1999) TAKs, thylakoid membrane protein kinases associated with energy transduction. *J. Biol. Chem.*, **274**, 9137-40.
- Snyders S. et B. D. Kohorn (2001) Disruption of thylakoid-associated kinase 1 leads to alteration of light harvesting in *Arabidopsis*. *J. Biol. Chem.*, **276**, 32169-76.
- Soole K. L. et R. I. Menz (1995) Functional molecular aspects of the NADH dehydrogenases of plant mitochondria. *J. Bioenerg. Biomembr.*, **27**, 397-406.
- Steuber J. (2001) Na(+) translocation by bacterial NADH:quinone oxidoreductases: an extension to the complex-I family of primary redox pumps. *Biochim. Biophys. Acta*, **1505**, 45-56.
- Steuber J. (2003) The C-terminally truncated NuoL subunit (ND5 homologue) of the Na<sup>+</sup>-dependent complex I from *Escherichia coli* transports Na<sup>+</sup>. *J. Bio. Chem.*, **278**, 26817-22;
- Stolpe S. et T. Friedrich (2004) The *Escherichia coli* NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) is a primary proton-pump but may be capable of secondary sodium antiport. *J. Biol. Chem.*,
- Taylor R. W., R. Singh-Kler, C. M. Hayes, P. E. Smith et D. M. Turnbull (2001) Progressive mitochondrial disease resulting from a novel missense mutation in the mitochondrial DNA ND3 gene. *Ann. Neurol.*, **50**, 104-7.
- Tsang W. Y. et B. D. Lemire (2003) The role of mitochondria in the life of the nematode, *Caenorhabditis elegans*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1638**, 91-105.
- Tuschen G., U. Sackmann, U. Nehls, H. Haiker, G. Buse et H. Weiss (1990) Assembly of NADH: ubiquinone reductase (complex I) in *Neurospora* mitochondria. Independent pathways of nuclear-encoded and mitochondrially encoded subunits. *J. Mol. Biol.*, **213**, 845-57.
- Ugalde C., R. H. Triepels, M. J. Coenen, L. P. van den Heuvel, R. Smeets, J. Uusimaa, P. Briones, J. Campistol, K. Majamaa, J. A. Smeitink et L. G. Nijtmans (2003) Impaired complex I assembly in a Leigh syndrome patient with a novel missense mutation in the ND6 gene. *Ann. Neurol.*, **54**, 665-9.
- Vahrenholz C., E. Pratje, G. Michaelis et B. Dujon (1985) Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii* : sequence and arrangement of *URF5* and the gene for cytochrome oxidase subunit I. *Mol. Gen. Genet.*, **201**, 213-224.
- Vahrenholz C., G. Riemen, E. Pratje, B. Dujon et G. Michaelis (1993) Mitochondrial DNA of *Chlamydomonas reinhardtii* : the structure of the ends of the linear 15.8-kb genome suggests mechanisms for DNA replication. *Curr. Genet.*, **24**, 241-247.

- Vallon O. (1991) Lateral redistribution of cytochrome b6/f complexes along thylakoid membranes upon state transitions. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, **88**, 8262-6.
- van Lis R., A. Atteia, G. Mendoza-Hernandez et D. Gonzalez-Halphen (2003) Identification of novel mitochondrial protein components of *Chlamydomonas reinhardtii*. A proteomic approach. *Plant Physiol.*, **132**, 318-30.
- Van Winkle-Swift K. P. (1977) Maturation of algal zygotes: alternative experimental approaches for *Chlamydomonas reinhardtii* (chlorophyceae). *J. Phycol.*, **13**, 225-231.
- Vedel F., E. Lalanne, M. Sabar, P. Chetrit et R. De Paepé (1999) The mitochondrial respiratory-chain and ATP synthase complexes: Composition, structure and mutational studies. *Plant Physiol. Biochem.*, **37**, 629-43.
- Videira A. (1998) Complex I from the fungus *Neurospora crassa*. *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 89-100.
- Videira A. et M. Duarte (2002) From NADH to ubiquinone in *Neurospora* mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta*, **1555**, 187-91.
- Walker J. E. (1992) The NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I) of respiratory chains. *Q. Rev. Biophys.*, **25**, 253-324.
- Wallace D. C., G. Singh, M. T. Lott, J. A. Hodge, T. G. Schurr, A. M. Lezza, L. J. Elsas, 2nd et E. K. Nikoskelainen (1988) Mitochondrial DNA mutation associated with Leber's hereditary optic neuropathy. *Science*, **242**, 1427-30.
- Weiss H., T. Friedrich, G. Hofhaus et D. Preis (1991) The respiratory-chain NADH dehydrogenase (complex I) of mitochondria. *Eur. J. Biochem.*, **197**, 563-76.
- Wiseman A., N. W. Gillham et J. E. Boynton (1977) Nuclear mutations affecting mitochondrial structure and function in *Chlamydomonas*. *J. Cell. Biol.*, **73**, 56-77.
- Wollman F. A. (2001) State transitions reveal the dynamics and flexibility of the photosynthetic apparatus. *EMBO J.*, **20**, 3623-30.
- Wollman F. A. et P. Delepelaire (1984) Correlation between changes in light energy distribution and changes in thylakoid membrane polypeptide phosphorylation in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J. Cell. Biol.*, **98**, 1-7.
- Wollman F. A. et C. Lemaire (1988) Studies on kinase-controlled state transitions in photosystem II and b6/f mutants from *Chlamydomonas reinhardtii* which lack quinone-binding proteins. *Biochim. Biophys. Acta*, **85**, 85-94
- Yadava N., P. Potluri, E. N. Smith, A. Bisevac et I. E. Scheffler (2002) Species-specific and mutant MWFE proteins. Their effect on the assembly of a functional mammalian mitochondrial complex I. *J Biol Chem*, **277**, 21221-30.
- Yagi T. et Y. Hatefi (1988) Identification of the dicyclohexylcarbodiimide-binding subunit of NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I). *J. Biol. Chem.*, **263**, 16150-5.
- Yagi T., T. Yano, S. Di Bernardo et A. Matsuno-Yagi (1998) Prokaryotic complex I (NDH-1), an overview. *Biochim. Biophys. Acta*, **1364**, 125-33.
- Yamaguchi M., G. I. Belogradov et Y. Hatefi (1998) Mitochondrial NADH-ubiquinone oxidoreductase (Complex I). Effect of substrates on the fragmentation of subunits by trypsin. *J. Biol. Chem.*, **273**, 8094-8.
- Yamaguchi M. et Y. Hatefi (1993) Mitochondrial NADH:ubiquinone oxidoreductase (complex I): proximity of the subunits of the flavoprotein and the iron-sulfur protein subcomplexes. *Biochemistry*, **32**, 1935-9
- Yamato K. T. et K. J. Newton (1999) Heteroplasmy and homoplasmy for maize mitochondrial mutants: a rare homoplasmic *nd4* deletion mutant plant. *J. Heredity*, **90**, 369-373.
- Zhang Z., L. Huang, V. M. Shulmeister, Y. I. Chi, K. K. Kim, L. W. Hung, A. R. Crofts, E. A. Berry et S. H. Kim (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome bc1. *Nature*, **392**, 677-84.
- Zito F., G. Finazzi, R. Delosme, W. Nitschke, D. Picot et F. A. Wollman (1999) The Qo site of cytochrome b6/f complexes controls the activation of the LHCII kinase. *Embo J.*, **18**, 2961-9.