

## MÉTHODES ET PROTOCOLES

### Culture des Chlamydomonas reinhardtii

On cultive les Chlamydomonas dans des flacons de culture ClearLine de 50 mL, 25 cm<sup>2</sup> avec un bouchon filtrant de 0,2 µm à 28°C, à lumière et agitation constantes.

Deux fois par semaine, on dilue nos Chlamydomonas en plaçant 1 mL de l'ancienne culture dans un nouveau flacon avec 20 mL de TAP.

Pour une culture plus importante, on utilise les Corning Flask de 275 mL, 75 cm<sup>2</sup> avec un bouchon filtrant de 0,2 µm. On place 10 mL de Chlamydomonas en milieu liquide dans 80 mL de TAP.

Nos Chlamydomonas sont de la souche CC124, fournie par Sandrine Bujaldon du laboratoire de l'IPBC.

*Flacons de culture :*

<https://www.dutscher.com/product/0A-13-01> (50 mL)

<https://ecatalog.corning.com/life-sciences/b2c/US/en/Surfaces/Advanced-Cell-Culture-Surfaces/Corning%C2%AE-and-Costar%C2%AE-Cell-Culture-Flasks/p/430641U> (275 mL)

*Milieu de croissance TAP, optimisé pour la culture de Chlamydomonas :*

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A1379801>

### Fabrication d'une solution de cuivre à 2,4 mM

On pèse 22,9 mg de CuI à la balance de précision. On l'introduit dans un Falcon de 15 mL et on ajoute 15 mL de TAP. On vortex jusqu'à dissolution du cuivre. On filtre ensuite la solution à l'aide d'un filtre de 2 µm dans un Falcon de 50 mL. On remplit ensuite jusqu'à 50 mL avec du TAP.

On part ensuite de cette solution en faisant des dilutions au TAP pour obtenir les autres solutions de cuivre aux concentrations voulues.

### Dichotomie

On effectue ce protocole pour différentes concentrations en cuivre, pour trouver la concentration seuil de mortalité des Chlamydomonas (valeur au-dessus de laquelle le milieu est toxique).

On introduit 0,1 mL d'une culture liquide (TAP) de Chlamydomonas, vieille de 4 jours, dans 15 mL de TAP et de cuivre Cu<sup>+</sup> dans un flacon de culture ClearLine de 50 mL, 25 cm<sup>2</sup> avec un bouchon filtrant de 0,2 µm. On laisse les Chlamydomonas se développer pendant une semaine à 28°C, à lumière et agitation constantes. Si au bout d'une semaine, le milieu de culture est toujours incolore, cela signifie que nos Chlamydomonas n'ont pas réussi à se développer : la valeur seuil recherchée est en dessous de la concentration en cuivre testée. Si le milieu est vert, alors les microalgues ont pu proliférer : la valeur seuil est au-dessus de la concentration testée. En tenant compte des résultats obtenus, on teste de nouvelles concentrations déterminées selon le principe de la dichotomie.

## **Linéarisation des plasmides pour l'électroporation**

**Plasmide sans gène d'intérêt :** On introduit 2 µg de plasmide (4 µL) avec 2 µL de buffer (fourni avec l'enzyme), 2 µL de Scal (enzyme de restriction) et 12 µL d'eau stérile dans un tube Eppendorf de 1,5 mL. On vortex et on met ensuite le tube à incuber à 37°C pendant une heure.

**Plasmide avec gène d'intérêt :** On introduit 2 µg de plasmide avec le gène d'intérêt (10 µL) avec 2 µL de buffer (fourni avec l'enzyme), 2 µL de Scal (enzyme de restriction) et 6 µL d'eau stérile dans un tube Eppendorf de 2 mL. On vortex et on met ensuite le tube à incuber à 37°C pendant une heure.

*NB : l'insertion du gène d'intérêt dans le plasmide a été faite par Genscript, donc nous n'avons pas de protocole relatif à l'insertion (le gène est vendu directement dans un plasmide, que l'on peut choisir)*

**GeneArt™ Chlamydomonas Protein Expression Vector :**

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A24231>

**COPT1 cDNA ORF clone, Chlamydomonas reinhardtii :**

[https://www.genscript.com/gene/chlamydomonas-reinhardtii/5726486/copt1.html#XM\\_001700710.1](https://www.genscript.com/gene/chlamydomonas-reinhardtii/5726486/copt1.html#XM_001700710.1) (le gène est vendu directement dans un plasmide, que l'on peut choisir)

## **Electroporation**

On centrifuge 50 mL d'une culture de Chlamydomonas vieille de 4 jours à 2 500 rpm pendant 5 minutes et on enlève le surnageant. On resuspend les microalgues dans 10 mL de GeneArt MAX Efficiency Transformation Reagent puis on centrifuge à 2 500 rpm pendant 5 minutes et on enlève le surnageant. On réitère cette opération puis on resuspend les cellules dans du GeneArt MAX Efficiency Transformation Reagent pour obtenir une solution de 200 µL de Chlamydomonas à une concentration de  $1.10^8$  à  $3.10^8$  cellules/mL (concentration déterminable avec une cellule de Malassez). On refroidit cette solution dans la glace pendant 5 minutes puis on ajoute 2 µg de plasmide linéarisé (avec ou sans gène d'intérêt).

On introduit les 200 µL de solution dans une cuve d'électroporation de 2 mm. On électropore, avec l'électroporateur Eppendorf Eporator, les cellules à 2300 V pendant 1,3 ms environ (la durée est fixée automatiquement par l'appareil). On transfère les cellules dans 4 mL d'une solution de TAP et de sucrose à 40 mM.

On les laisse incuber à 25°C avec agitation et lumière permanentes pendant une nuit. Le lendemain, on centrifuge à 2 500 rpm pendant 5 minutes et on enlève le surnageant. On resuspend dans 200 µL de solution de TAP et de sucrose (40 mM) et on étale sur une boîte de Petri TAP-Agar-Zéocine (voir ci-dessous). On laisse les cellules se développer une semaine puis on sélectionne les clones que l'on met en culture (resuspension en milieu liquide dans du TAP).

**MAX Efficiency™ Transformation Reagent for Algae :**

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/A24229>

**Electroporateur Eppendorf Eporator® :**

<https://www.dutscher.com/article/035683>

### **Fabrication des boîtes de Petri TAP-Agar-Zéocine**

On place 6 g d'Agar et 400 mL de TAP dans une bouteille Duran 500 mL. On autoclave la bouteille. On attend que la bouteille refroidisse à 55°C et on ajoute 20 µL d'une solution de zéocine à 100 mg/mL. On coule dans des boîtes de Petri de 8 cm de diamètre et on les laisse durcir. On les stocke entre 2 et 8°C.

Zeocin™ Selection Reagent :

<https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/R25001>

Bouteille Duran 500 mL :

<https://www.dutscher.com/article/091378>

### **Solution de TAP-Sucrose**

On pèse 0,685 g de sucrose à la balance de précision. On l'ajoute dans un Falcon de 15 mL avec 2 ml d'eau stérile. On vortex jusqu'à dissolution du sucrose. On filtre la solution avec un filtre de 0,2 µm dans un Falcon de 50 mL. On remplit le Falcon de TAP jusqu'à 50 mL et on vortex. On stocke la solution entre 2 et 8°C.

### **Test de contamination**

On étale 20 µL de notre culture de *Chlamydomonas* sur une boîte de Petri de TAP et Agar (même fabrication que les boîtes TAP-Agar-Zéocine mais sans l'ajout de zéocine).

---

### **Bibliographie**

- Page MD, Kropat J, Hamel PP, Merchant SS. Two *Chlamydomonas* CTR copper transporters with a novel cys-met motif are localized to the plasma membrane and function in copper assimilation. *Plant Cell*. 2009 Mar;21(3):928-43. doi: 10.1105/tpc.108.064907. Epub 2009 Mar 24. PMID: 19318609; PMCID: PMC2671701.  
<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC2671701/>
- Jamers A, Blust R, De Coen W, Griffin JL, Jones OA. Copper toxicity in the microalga *Chlamydomonas reinhardtii*: an integrated approach. *Biometals*. 2013 Oct;26(5):731-40. doi: 10.1007/s10534-013-9648-9. Epub 2013 Jun 18. PMID: 23775669.  
<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/23775669/>