



HAL
open science

Agents antimicrobiens ciblant le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale : caractérisation de nouveaux inhibiteurs et étude du développement des résistances

Cindy Vallières

► To cite this version:

Cindy Vallières. Agents antimicrobiens ciblant le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale : caractérisation de nouveaux inhibiteurs et étude du développement des résistances. Sciences agricoles. Université Paris Sud - Paris XI, 2012. Français. NNT : 2012PA112180 . tel-00840029

HAL Id: tel-00840029

<https://theses.hal.science/tel-00840029>

Submitted on 1 Jul 2013

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.



ECOLE DOCTORALE GÈNES, GÉNOMES, CELLULES

Thèse présentée par:

Cindy VALLIERES

Pour obtenir le grade de:

Docteur en Biologie de l'Université Paris-Sud 11

Agents antimicrobiens ciblant le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale : caractérisation de nouveaux inhibiteurs et étude du développement des résistances

Soutenue publiquement le 21 septembre 2012 devant le jury composé de:

Pr. Annie SAINSARD-CHANET	Professeur	Président
Dr. Claire REMACLE	Professeur	Rapporteur
Dr. Francesca ZITO	Chargé de recherche	Rapporteur
Dr. Thierry LETELLIER	Chargé de recherche	Examineur
Dr. Odile MERCEREAU-PUIJALON	Directeur de recherche	Examineur
Dr. Brigitte MEUNIER	Chargé de recherche	Directeur de thèse



ECOLE DOCTORALE GÈNES, GÉNOMES, CELLULES

Thèse présentée par:

Cindy VALLIERES

Pour obtenir le grade de:

Docteur en Biologie de l'Université Paris-Sud 11

Agents antimicrobiens ciblant le complexe III de la chaîne respiratoire mitochondriale : caractérisation de nouveaux inhibiteurs et étude du développement des résistances

Soutenue publiquement le 21 septembre 2012 devant le jury composé de:

Pr. Annie SAINSARD-CHANET	Professeur	Président
Dr. Claire REMACLE	Professeur	Rapporteur
Dr. Francesca ZITO	Chargé de recherche	Rapporteur
Dr. Thierry LETELLIER	Chargé de recherche	Examineur
Dr. Odile MERCEREAU-PUIJALON	Directeur de recherche	Examineur
Dr. Brigitte MEUNIER	Chargé de recherche	Directeur de thèse

Remerciements

Cette thèse est le fruit de nombreuses rencontres que je souhaite remercier ici pour toute l'aide, le soutien, les conseils qu'elles m'ont apporté ou tout simplement pour leur bonne humeur et leur joie de vivre qui ont fait de ces trois années une aventure incroyable.

Un grand merci...

En tout premier lieu à ma directrice de thèse Brigitte Meunier pour avoir fait confiance à une « petite » étudiante qui ne connaissait rien à la levure et aux mitochondries pour mener à bien son projet. Je la remercie pour sa pédagogie et sa disponibilité (pour répondre à mes « petites questions ») mais également pour m'avoir fait découvrir le monde de la vulgarisation scientifique.

Aux membres de mon jury de thèse pour avoir accepté d'examiner et de juger mon travail : Thierry Letellier, Odile Mercereau-Puijalon, Annie Sainsard-Chanet, Claire Remacle et Francesca Zito. Un merci particulier à Francesca qui m'a suivi tout au long de ma thèse en tant que tutrice.

A Geneviève, la chef mais également « maman » de l'équipe « biogenèse et fonctionnement des complexes respiratoires mitochondriaux », pour m'avoir accueilli au sein de son équipe, pour son enthousiasme et toutes nos discussions scientifiques ou non.

Aux autres membres de l'équipe et en particulier à Cristina la reine de la BM et à Bernard une personne aussi gourmande que moi... je garderai de chacun d'eux de très bons souvenirs.

Aux équipes du département « régulation et compartimentation des fonctions cellulaires » pour les longs échanges constructifs en réunion.

A Anita et Anne-Marie pour leur aide précieuse.

A tous nos collaborateurs impliqués dans les différents projets de ma thèse. Un merci particulier à Anne-Sophie Walker, Fabrice Rappaport, Martin Trouillard et Gaël Brasseur pour nos discussions autour du complexe III.

Aux « Worm » et « Séléno » teams, deux équipes « funky ». Merci pour votre bonne humeur et votre sens de l'humour (un peu particulier parfois...).

A mes collègues thésards/postdoc et surtout amis : Antoine B (thèse, radio, théâtre, etc... c'est quoi sa drogue ?), Antoine M (le bisounours de la team de l'étoile verte), Elodie (la fille du sud... merci !), Emmanuelle (ses tic tic tic m'ont donné mal à la tête mais je l'aime bien quand même), Jelena (la grande blonde avec qui j'ai adoré partager mon bureau), Marion (la « maman » du groupe), Mathieu (un problème ? appelez drosos info service !), Yona (une fille loin d'être stupide ☺) et Zahia (elle a su rendre mes trajets en rer un peu moins pénible). Je tiens à les remercier pour tous ces merveilleux moments et pour leur soutien. Je leur dois beaucoup.

A mes amis de l'UPMC... Céline, Célya, Eric, Marie, Nicolas et Ralitsa pour les bons moments passés ensemble.

A Simon. Je le remercie pour sa patience, ses conseils et ses critiques... et surtout d'être toujours à mes côtés dans les bons comme les mauvais moments.

A ma famille et surtout à mes parents... sans eux, je ne serai jamais arrivée jusque là. Je leur serai toujours reconnaissante pour avoir cru en moi et pour leur soutien sans faille.

Résumé

Des inhibiteurs du complexe bc_1 de la chaîne respiratoire mitochondriale ont été développés comme agents antimicrobiens pour lutter contre des pathogènes de l'Homme et de plantes. Ces drogues ciblent les poches catalytiques Q_o et Q_i formées par le cytochrome b . La comparaison de séquences de cette protéine montre que les sites Q_o et Q_i sont bien conservés entre les organismes mais qu'il existe toutefois des variations qui pourraient expliquer leur différence de sensibilité aux drogues. A l'aide du modèle levure *S. cerevisiae*, nous avons étudié les déterminants de la résistance/sensibilité naturelle à deux antipaludiques se liant au site Q_o de *Plasmodium*: l'atovaquone et RCQ06. Nous avons notamment montré que le résidu 275 joue un rôle clé dans ce phénomène. Une approche similaire est actuellement utilisée pour identifier les facteurs de la sensibilité différentielle à deux drogues ciblant le site Q_i des oomycètes.

Malheureusement, des cas de résistance acquise à ces antimicrobiens ont été rapportés et ont pour origine des mutations dans le cytochrome b . De ce fait, de nouvelles molécules sont requises pour court-circuiter ces résistances. Au cours de ma thèse, nous avons mis au point un test qui permet de cribler des molécules capables d'inhiber la fonction respiratoire. Nous avons ainsi pu identifier un nouvel inhibiteur du complexe bc_1 : D12. Nous avons ensuite déterminé le mode de liaison de cette molécule ainsi que celui d'un composé capable d'inhiber la prolifération de *Plasmodium*, HDQ, grâce à une collection de mutants des poches catalytiques. HDQ s'est avéré être un inhibiteur du site Q_i . Il pourrait être utilisé avec un inhibiteur du site Q_o afin de limiter l'apparition de mutations de résistance. D12 est un inhibiteur du site Q_o qui est capable notamment de court-circuiter la mutation de résistance à des fongicides du site Q_o G143A. Cette dernière, trouvée chez de nombreux phytopathogènes, n'est cependant pas apparue chez des champignons possédant un intron immédiatement après le codon codant pour la glycine 143. En utilisant la levure, nous avons montré que la mutation empêche l'épissage de l'intron en altérant la structure exon/intron. Nous avons également identifié des mécanismes de « by-pass » qui permettent de restaurer la fonction respiratoire du mutant et qui pourraient apparaître chez les pathogènes.

Les mutants créés au cours de ma thèse pourront aider à identifier, concevoir et caractériser de nouveaux antimicrobiens et à étudier l'apparition de mutations de résistance.

TABLE DES MATIERES

INTRODUCTION	19
I. La mitochondrie	19
A. Structure et fonctions	19
B. ADN mitochondrial	20
C. Interactions nucléo-mitochondriales	21
II. La phosphorylation oxydative chez les eucaryotes	22
III. La levure <i>S. cerevisiae</i>, un organisme modèle dans l'étude des fonctions respiratoires	25
IV. Le complexe III (ou complexe bc_1)	26
A. Structure du complexe bc_1	27
1. Les sous-unités catalytiques	28
a. Le cytochrome b	28
b. Le cytochrome c_1	29
c. La protéine de Rieske (ou Rip1)	30
2. Les sous-unités surnuméraires	31
B. Assemblage du complexe bc_1	33
C. Activité du complexe bc_1	34
1. Le cycle Q	34
a. Liaison des quinones dans les poches catalytiques Q_o et Q_i	36
i. Site Q_o	36
ii. Site Q_i	38
b. Importance de la bifurcation des électrons au centre Q_o	38
c. Conduction des protons	39
D. Inhibiteurs et résistance	39
1. Inhibiteurs du site Q_o (Q_o Is)	41
a. Les fongicides	41
b. L'atovaquone	45
2. Inhibiteurs du site Q_i (Q_i Is)	48
3. Inhibiteurs des deux sites	49
4. Développement de nouveaux inhibiteurs ciblant le complexe bc_1	49
a. Les antipaludiques	49
b. Les fongicides	50
5. Sensibilité différentielle aux drogues	51
a. Sensibilité différentielle aux Q_o Is	52
b. Sensibilité différentielle aux Q_i Is	53
CHAPITRE I : LES ANTIPALUDIQUES CIBLANT LE COMPLEXE BC_1	59
CHAPITRE I-A : ETUDE DE LA SENSIBILITE DIFFERENTIELLE ENTRE LES ENZYMES DE LA LEVURE, DE <i>P. FALCIPARUM</i> ET DE L'HOMME A DES ANTIPALUDIQUES CIBLANT LE SITE Q_o DU COMPLEXE BC_1	64
I. Introduction	64

II. Résultats	64
A. Modélisation du site Q _o de <i>P. falciparum</i> dans la levure	64
1. Choix des variations introduites dans la levure	64
2. Impact des variations sur la croissance respiratoire, l'assemblage et l'activité du complexe bc ₁	66
3. Recherche de supresseurs capables de compenser l'effet délétère de Δ158-161	68
a. Recherche de supresseurs mutlicopies	69
b. Recherche de mutations compensatoires	70
i. Suppresseurs de classe I	70
ii. Suppresseurs de classe II	71
iii. Autres modifications apportées à Rip1	74
4. Conclusion et perspectives	76
B. Modélisation du site Q _o humain dans la levure	78
1. Choix des variations introduites dans la levure	78
2. Impact des variations sur la croissance respiratoire, sur l'assemblage et l'activité du complexe bc ₁	80
3. Cas du mutant L275F-F278A (LFFA)	82
C. Analyse des différentes versions du complexe bc ₁	83
1. Sensibilité des mutants à l'atovaquone	84
2. Sensibilité des mutants à RCQ06	84
3. Sensibilité à l'azoxystrobine	85
III. Conclusion et perspectives	86

CHAPITRE I-B : HDQ, UN PUISSANT INHIBITEUR DE LA PROLIFERATION DE *PLASMODIUM FALCIPARUM*, SE LIE AU SITE Q_I DU COMPLEXE BC₁ **88**

I. Introduction	88
II. Article	89
III. Résumé de l'article et résultats supplémentaires	112
A. HDQ bloque la croissance respiratoire de <i>S. cerevisiae</i> via une inhibition du complexe bc ₁	112
B. HDQ agit au niveau du site Q _i du complexe bc ₁	113
C. Conclusion	115

CONCLUSION DU CHAPITRE **116**

CHAPITRE II : LES FONGICIDES ET ANTIOOMYCETES CIBLANT LE COMPLEXE BC₁ **117**

CHAPITRE II-A : EFFET DELETERE DE LA MUTATION DE RESISTANCE AUX INHIBITEURS DU SITE Q_o, G143A, CHEZ LES PHYTOPATHOGENES POSSEDANT UN GENE, CODANT POUR LE CYT B, AVEC INTRON ET MECANISMES DE CONTOURNEMENT **119**

I. Introduction	119
II. Article	121

III. Résumé de l'article et résultats supplémentaires	137
A. Effet de G143A sur l'épissage de l'intron bi2 du cytochrome <i>b</i> de la levure	137
B. Mécanismes de contournement du défaut respiratoire	137
1. Mutations compensatrices dans le génome mitochondrial	137
2. Suppresseurs multicopies	138
C. Conclusion	139
CHAPITRE II-B : DEVELOPPEMENT D'UN TEST RAPIDE POUR CRIBLER, DANS DES CHIMIOTHEQUES, DES DROGUES CAPABLES D'INHIBER LA FONCTION RESPIRATOIRE	141
I. Introduction	141
II. Article	142
III. Résumé de l'article et résultats supplémentaires	157
IV. Conclusion et Perspectives	159
CHAPITRE II-C: ETUDE DE LA DIFFERENCE DE SENSIBILITE DE PLUSIEURS ORGANISMES AUX ANTIOOMYCETES CIBLANT LE SITE Q_i DU COMPLEXE BC₁.	160
I. Introduction	160
II. Résultats	161
A. Détermination du site de liaison de l'amectotradine	161
B. Identification des résidus impliqués dans la liaison des antioomycètes au site Q _i	162
III. Conclusion et perspectives	166
CONCLUSION DU CHAPITRE	167
DISCUSSION GENERALE	171
I. Rechercher de nouvelles molécules capables d'inhiber le complexe bc₁	173
A. Etude des sensibilités différentielles aux inhibiteurs	173
B. Identifier des nouveaux composés dans des chimiothèques	173
II. Caractérisations des nouveaux inhibiteurs du complexe bc₁	175
A. Cas des molécules inhibant l'enzyme de <i>S. cerevisiae</i>	175
B. Cas des molécules se liant peu voire pas au complexe bc ₁ de la levure	175
III. Etude de l'évolution de la résistance aux molécules capables de bloquer l'activité du complexe bc₁	176
IV. Autres applications : étude des mutations et polymorphismes humains	177
ANNEXES	173
BIBLIOGRAPHIE	201

LISTE DES FIGURES

Figure 1 : Représentation de l'ADNmit de la levure <i>S. cerevisiae</i> et de l'Homme	21
Figure 2 : Représentation de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexe I à IV) et de l'ATP synthase (complexe V)	22
Figure 3 : Supercomplexes dans les mitochondries de levure	24
Figure 4 : Croissance sur milieu fermentescible et respiratoire d'une souche sauvage de levure et d'un mutant respiratoire	26
Figure 5 : Structure cristallographique du complexe bc_1 de <i>S. cerevisiae</i>	28
Figure 6 : Représentation de la structure du cytochrome <i>b</i>	29
Figure 7 : Positions du domaine catalytique de Rip1	31
Figure 8 : Modèle des différentes étapes d'assemblage du complexe bc_1 de <i>S. cerevisiae</i>	34
Figure 9 : Le cycle Q – trajet des électrons et des protons au sein du complexe bc_1	35
Figure 10 : Structure de l'ubiquinone	36
Figure 11 : Modification de la structure du cytochrome <i>b</i> et du positionnement de Rip1 en fonction du type d'inhibiteurs	37
Figure 12 : Localisation, dans le cytochrome <i>b</i> , des résidus mutés chez les champignons et oomycètes phytopathogènes résistants aux strobilurines	42
Figure 13 : Modélisation de la liaison de l'atovaquone dans la poche catalytique Q_o de la levure	45
Figure 14 : Localisation, dans le cytochrome <i>b</i> , des résidus mutés chez les pathogènes résistants à l'atovaquone	47
Figure 15 : Localisation de résidus, qui mutés chez la levure, confèrent des résistances à différents inhibiteurs du site Q_i	49
Figure 16 : Alignement de la séquence des régions Q_o et Q_i du cytochrome <i>b</i> de plusieurs organismes	52
Figure 17 : Importance du complexe III dans le métabolisme de <i>Plasmodium</i>	60
Figure 18 : Structure de l'atovaquone	61
Figure 19 : Activité de l'atovaquone à travers le cycle de vie de <i>Plasmodium</i> chez l'Homme et chez le moustique	61
Figure 20 : Résidus modifiés dans le site Q_o de la levure pour mimer la poche catalytique de <i>Plasmodium</i>	65
Figure 21 : Impacts des variations sur la croissance des mutants « <i>Plasmodiumisés</i> » sur milieu fermentescible et sur milieu respiratoire	66
Figure 22 : Impact de la délétion des résidus 158-161 sur l'assemblage du complexe bc_1	67
Figure 23 : Des mutations dans la région de liaison flexible de Rip1 sont capables de	71

compenser l'effet délétère de la délétion des résidus 158-161

Figure 24 : Cinétique de réduction des hèmes des cytochromes $c+c_1$ dans le complexe bc_1 de la souche sauvage et du mutant PF3	72
Figure 25 : Croissance respiratoire de mutants combinant une mutation dans le cytochrome b et dans le domaine flexible de Rip1	73
Figure 26 : Croissances des mutants PF3 et PF7 avec ou sans mutation dans le domaine flexible de Rip1	74
Figure 27 : Croissance de la souche sauvage et du mutant PF3 portant deux (A90V et A92D) ou trois (A90V, A92D, K93E) mutations dans le domaine flexible de Rip1	75
Figure 28 : Impact de l'ajout ou de la délétion d'une alanine dans le domaine flexible de Rip1 ainsi que du remplacement de cette région par celle de <i>Plasmodium</i> sur la croissance respiratoire	76
Figure 29 : Superposition du cytochrome b de <i>S. cerevisiae</i> , du bœuf et de <i>P. falciparum</i>	77
Figure 30 : Alignement de la séquence de Rip1 de la levure avec celle de <i>Plasmodium</i>	78
Figure 31 : Résidus modifiés dans le site Q_o de la levure pour mimer la poche catalytique de l'Homme	79
Figure 32 : Impacts des variations sur la croissance des mutants humanisés sur milieu fermentescible et sur milieu respiratoire	80
Figure 33 : Consommation en oxygène de la souche sauvage et des mutants L275F, F278A, LFFA	82
Figure 34 : Structure d'HDQ et d'HQNO	88
Figure 35 : Sensibilité de la croissance respiratoire de la souche sauvage à l'HDQ	112
Figure 36 : Sensibilité et résistance de la croissance respiratoire des mutants du site Q_o et Q_i à l'HDQ	114
Figure 37 : Structure de la région de <i>CYTB</i> codant pour les résidus 120 à 170 de différentes phytopatogènes	119
Figure 38 : Mécanisme d'épissage de l'intron bi2 chez <i>S. cerevisiae</i>	120
Figure 39 : Schéma de la stratégie employée pour identifier de nouveaux composés capables d'inhiber la fonction respiratoire	158
Figure 40 : Structure du cyazofamide, de l'amisulbrom et de l'ametoctradine	160
Figure 41 : Sensibilité/résistance de la croissance respiratoire de la souche WT et des mutants Q_o et Q_i aux trois antioomycètes et à l'azoxystrobine	162
Figure 42 : Alignement de séquences de la région Q_i du cytochrome b	163
Figure 43 : Sensibilité/résistance de la croissance de <i>C. reinhardtii</i> (sauvage et mutants Δbc_1 et Δb_6f) aux antioomycètes	165

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1 : Mutations de résistance au site Q_o et Q_i chez les eucaryotes	40
Tableau 2 : Mutants possédant des résidus « <i>Plasmodiumisés</i> »	66
Tableau 3 : Activité et propriétés catalytiques du complexe bc_1 des mutants « <i>Plasmodiumisés</i> »	68
Tableau 4 : Mutants possédant des résidus humanisés	80
Tableau 5 : Activité et propriétés catalytiques du complexe bc_1 des mutants humanisés	81
Tableau 6 : Mutants du site Q_o : sensibilité à l'atovaquone, RCQ06 et azoxystrobine	86

LISTE DES ABBREVIATIONS

- ADNmit** : acide desoxyribonucléique mitochondrial
- AOX** : alternative oxydase
- ARNm** : acide ribonucléique messenger
- ARNr** : acide ribonucléique ribosomal
- ARNt** : acide ribonucléique ribosomique
- ATP** : adénosine triphosphate
- BN-PAGE** : blue native polyacrylamide gel electrophoresis, gel non dénaturant
- Cyt** : cytochrome
- ERO** : espèces réactives de l'oxygène
- FeS** : fer-soufre
- HDQ** : 1-Hydroxy-2-dodecyl-4(1*H*)quinolone
- HQNO** : 2-n-Heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide
- IC₅₀** : half maximal inhibitory concentration, concentration inhibitrice médiane
- (K)pb** : (kilo) paires de bases
- kDa** : kilo dalton
- MOA** : acide β -methoxyacrylate
- NADH** : nicotinamide adénine dinucléotide
- NQNO** : 2-nonyl-4-hydroxyquinoline N-oxide
- OXPHOS** : oxydation phosphorylative
- PCR** : polymerase chain reaction, réaction en chaîne par polymérase
- QIs** : inhibiteurs du complexe bc_1
- Q_iIs** : inhibiteurs du site Q_i
- Q_oIs** : inhibiteurs du site Q_o
- RPE** : résonance para-électromagnétique
- TTC** : triphenyltetrazolium chloride
- (U)Q** : (ubi)quinone
- (U)QH₂** : (ubi)quinol
- UTR** : untranslated region, région non traduite

INTRODUCTION

INTRODUCTION

Le travail présenté dans ce manuscrit a pour but de caractériser de nouveaux agents antimicrobiens ciblant le complexe bc_1 de la chaîne respiratoire mitochondriale et d'étudier le développement de résistances en utilisant la levure *Saccharomyces cerevisiae* comme modèle.

Je développerai dans une première partie de cette introduction certains aspects généraux ayant trait aux mitochondries et à la phosphorylation oxydative puis je finirai par une description plus détaillée du complexe bc_1 et de ses inhibiteurs.

I. La mitochondrie

A. Structure et fonctions

Les mitochondries, uniquement présentes chez les eucaryotes, forment au sein de la cellule un réseau extrêmement dynamique. En effet, la distribution intracellulaire mais également le nombre de mitochondries et leur morphologie, modifiés par des processus continus de fusion et fission des membranes, varient en fonction des besoins de la cellule (pour revue, (Malka et al., 2004)).

Cet organite est constitué d'une double membrane : une membrane externe composée d'un grand nombre de porines permettant le passage de molécules hydrophiles d'une masse inférieure à 10 kDa (anions, cations, acides gras, pyruvate...) et une membrane interne relativement imperméable, ample et hautement repliée en une série de crêtes. Le transfert de molécules chargées à travers cette membrane se fait *via* des transporteurs spécifiques et rend la membrane interne polarisée ; le maintien de ce potentiel de membrane est primordial pour l'intégrité et les fonctions de la mitochondrie. Les deux membranes délimitent trois espaces : le cytoplasme de la cellule,

l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale où sont assurées de nombreuses fonctions métaboliques comme le cycle de Krebs et la biogenèse des clusters FeS (matrice). Elle assure notamment une fonction vitale à toute cellule aérobie stricte : la production d'ATP, principale source d'énergie de la cellule, par le processus de phosphorylation oxydative (membrane interne); la mitochondrie est pour cette raison souvent nommée « centrale énergétique de la cellule ». Au cours de ce processus, il peut y avoir production d'Espèces Réactives de l'Oxygène (ERO). Ces ERO ont un rôle important dans les voies de signalisation qui coordonnent noyau et mitochondrie ainsi que dans l'homéostasie cellulaire. Cependant, en forte concentration, elles peuvent provoquer des dommages responsables de la mort cellulaire. La mitochondrie joue également un rôle dans l'apoptose par l'intermédiaire de Bcl2 (membrane externe) et du cytochrome *c* (espace intermembranaire), deux facteurs apoptotiques.

B. ADN mitochondrial

La mitochondrie possède son propre ADN indiquant une origine exogène de cet organite. En effet, la mitochondrie est issue de l'internalisation d'une α -protéobactérie par une cellule pré-eucaryotique. Cependant, au cours de l'évolution, une partie du génome de l'endosymbionte a été perdue et une autre partie a été transférée vers le noyau. Une partie des gènes procaryotiques maintenus dans le génome mitochondrial code pour des protéines très hydrophobes qui ne peuvent être importés dans l'organite ; c'est le cas du cytochrome *b*, une sous-unité catalytique du complexe *bc₁* (Claros et al. 1995). L'ADN mitochondrial (ADNmit) codant de manière générale pour des sous-unités de la chaîne respiratoire et des composants de la machinerie de traduction mitochondriale (ARNr, ARNt et parfois des protéines ribosomales) présente une grande diversité de structure (circulaire ou linéaire), de taille (de 6 à plusieurs centaines de kb) et d'organisation (nombre de gènes, longueur des régions intergéniques, nombre de régions introniques) (Figure 1). L'ADNmit est associé à des protéines et forme une structure compacte appelée nucléoïde lié à la membrane interne (pour revue, (Chen & Butow 2005)). Son code génétique diffère du code génétique nucléaire. Le génome mitochondrial des plantes et des animaux est hétéroplasmique, en d'autres termes, différentes formes peuvent coexister au sein d'une même cellule.

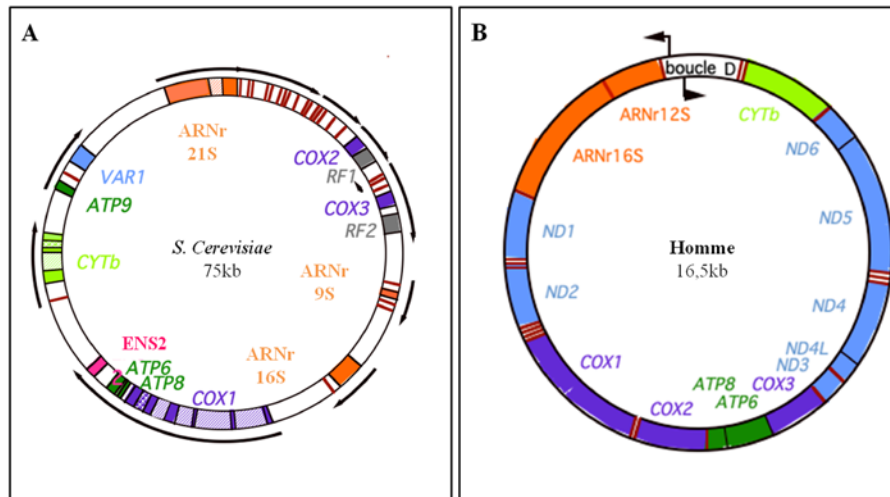


Figure 1: Représentation de l'ADNmit de la levure *S. cerevisiae* (A) et de l'Homme (B). L'ADNmit de la levure code pour deux ARN ribosomiaux (ARNr 21S et 16S), une protéine du ribosome mitochondrial (Var1p), un ARN de la RNaseP (ARNr 9S), une endonucléase qui peut être absente chez certaines souches (Ens2p) et sept des sous-unités des complexes OXPHOS III (Cyt *b*), IV (Cox1p, Cox2p et Cox3p) et V (Atp6p, Atp8p et Atp9p) ainsi que pour 24 ARNr indiqués par des traits marrons. RF1 et RF2 sont deux phases ouvertes de lecture interrompues par des séries de GC. Le nombre d'introns codants (en hachuré) ou non codants (en damier), chez cet organisme, peut varier selon les souches. L'ADNmit de l'Homme code pour deux ARN ribosomiaux (ARNr 12S et ARNr 16S), 22 ARNr et 13 des sous-unités des complexes OXPHOS I (Nd1-6p), III (Cyt *b*), IV (Cox1p, Cox2p et Cox3p) et V (Atp6p et Atp8p). La boucle D est la région de régulation de la réplication et de la transcription. Les flèches indiquent le sens et l'unité de transcription. Figure réalisée par G. Dujardin.

C. Interactions nucléo-mitochondriales

L'expression coordonnée des gènes mitochondriaux et nucléaires ainsi que l'import de certaines molécules et protéines dans la mitochondrie sont essentiels à la biogénèse mitochondriale. La coordination entre le noyau et la mitochondrie se fait *via* des signaux allant du noyau vers la mitochondrie (signalisation antérograde) ou de la mitochondrie vers le noyau (signalisation rétrograde). La signalisation antérograde se fait pour répondre à des besoins énergétiques ou à des changements environnementaux. Les protéines codées par le noyau sont alors importées dans la mitochondrie par l'intermédiaire des translocases de la membrane externe (TOM, Translocase of the OuterMembrane) et de la membrane interne (TIM, Translocase of the InnerMembrane) (pour revues, (Chacinska et al., 2009; Neupert & Herrmann, 2007)). L'import peut être post-traductionnel lorsque les protéines sont traduites par des ribosomes libres dans le cytosol ou co-traductionnel quand elles sont traduites par des ribosomes liés à la mitochondrie (Kellems et al. 1974; Kellems & Butow 1974; Kellems et al. 1975; Crowley & Payne 1998). Afin de faciliter leur importation dans la mitochondrie, les protéines

sont associées à des chaperonnes qui les maintiennent dans une conformation non repliée et possèdent, le plus souvent, une séquence d'adressage généralement en N-terminale et clivable qui détermine avec la nature de la protéine (membranaire, tonneau β , soluble) le lieu de leur insertion dans l'organite (pour revues, (Neupert & Herrmann 2007; Chacinska et al. 2009)). La signalisation rétrograde, quant à elle, est un processus qui permet d'ajuster le métabolisme cellulaire en réponse à un changement d'état de la mitochondrie (déficience respiratoire, production d'ERO,...) (pour revue, (Butow & Avadhani 2004)).

II. La phosphorylation oxydative chez les eucaryotes

La phosphorylation oxydative (OXPHOS) est un processus métabolique qui couple l'oxydation de molécules de NADH et FADH₂, produites lors du cycle de Krebs et de la β -oxydation, par les quatre complexes de la chaîne respiratoire et la synthèse d'ATP au niveau d'un cinquième complexe, l'ATP synthase. Comme mentionné précédemment, ce processus est vital pour un grand nombre d'organismes dont des pathogènes de l'Homme et de plantes. Ces complexes enzymatiques sont donc des cibles de choix pour lutter contre ces derniers.

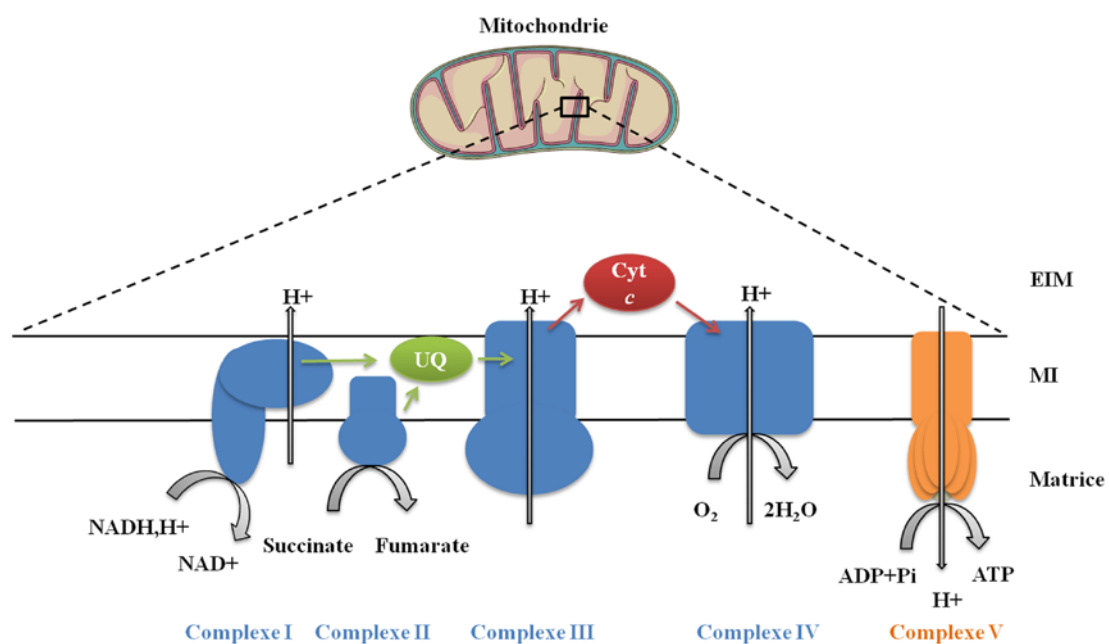


Figure 2: Représentation de la chaîne respiratoire mitochondriale (complexe I à IV) et de l'ATP synthase (complexe V). EIM: espace intermembranaire; MI: membrane interne; UQ: ubiquinone. Le transfert des électrons entre les complexes est représenté par les flèches vertes et rouges.

Les molécules de NADH et de FADH₂ fournissent leurs électrons aux complexes I (NADH déshydrogénase) et II (succinate déshydrogénase) qui sont ensuite transmis, par l'intermédiaire de l'ubiquinol, au complexe III (ubiquinol-cytochrome *c* oxydoréductase ou complexe *bc₁*). Le cytochrome *c*, localisé dans l'espace intermembranaire, sert de navette entre les complexes III et IV (cytochrome *c* oxydase). Ce dernier constituant l'étape finale du transfert des électrons en réduisant l'oxygène en eau. Le passage des électrons *via* les complexes I, III et IV est couplé à un transfert de protons à travers la membrane interne. Les protons ainsi accumulés dans l'espace intermembranaire génèrent un gradient électrochimique qui, en se dissipant, permet au complexe V de catalyser la condensation de l'ADP et du phosphate inorganique en ATP, source principale d'énergie de la cellule (Figure 2).

Le nombre de complexes enzymatiques peut cependant varier selon les organismes. Par exemple, *S. cerevisiae* ne possède pas de complexe I mais trois NADH déshydrogénases : deux internes permettant l'oxydation du NADH produit par le cycle de Krebs et une externe catalysant l'oxydation du NADH produit dans le cytosol. Ces NADH déshydrogénases réalisent un transfert d'électrons non couplé à une éjection de protons. D'autres organismes comme les plantes, certains champignons et protistes possèdent deux NADH déshydrogénases dites alternatives, en plus du complexe I, et une oxydase alternative (AOX). Les NADH déshydrogénases interne et externe permettent un contournement du complexe I (pour revue, (Kersch et al. 2008)). L'AOX est, quant à elle, une seconde oxydase qui transfère les électrons des quinols à l'oxygène en contournant ainsi les complexes III et IV. Elle est insensible à l'antimycine et au cyanure, des inhibiteurs des complexes III et IV respectivement (Sluse & Jarmuszkiewicz 1998). Comme les NADH déshydrogénases, l'AOX ne permet pas le transfert de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire ce qui a pour conséquence une diminution de la production d'ATP lorsque celle-ci est exprimée. Néanmoins, dans le cas de la forme sanguine du protozoaire *Trypanosoma brucei*, responsable de la maladie du sommeil, la respiration cellulaire repose uniquement sur la voie de l'oxydase alternative (Clarkson et al. 1989; Chaudhuri et al. 2006). Chez les plantes, cette oxydase a notamment pour rôle d'oxyder rapidement les substrats respiratoires lorsque la charge énergétique est élevée et de réduire le niveau d'ERO produites par le complexe III (pour revue, (Juszczuk & Rychter 2003)). En conditions normales, elle est faiblement exprimée. Chez certains champignons, elle l'est uniquement en cas de déficience du complexe III et/ou IV. L'AOX

peut ainsi participer à la résistance aux fongicides ciblant le complexe III tels que les strobilurines (Miguez et al. 2004). Cependant, comme l'utilisation de cette voie génère moins d'ATP, ces fongicides sont encore efficaces dans la prévention de la germination des spores qui est un processus requérant une quantité importante d'énergie (Avila-Adame & Köller 2003).

Ces complexes respiratoires ne s'organisent pas de façon linéaire, comme représentés dans la figure 2, mais forment une structure particulière appelée supercomplexes (pour revue, (Boekema & Braun 2007)) que l'on peut observer par Blue Native Poly Acrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) et par microscopie électronique (Figure 3). Ces supercomplexes joueraient un rôle dans la stabilité des complexes respiratoires. Le complexe III, par exemple, est requis dans le maintien du complexe I chez les mammifères (Acín-Pérez et al. 2004). Un rôle de ces structures dans l'optimisation du transfert des électrons a également été proposé. Cependant, Trouillard et ses collaborateurs n'ont pas observé de différence dans la vitesse d'oxydation du cytochrome *c* entre des cellules intactes de *S. cerevisiae* et celles d'un mutant présentant une diminution de la stabilité des supercomplexes III-IV (Trouillard et al. 2011).

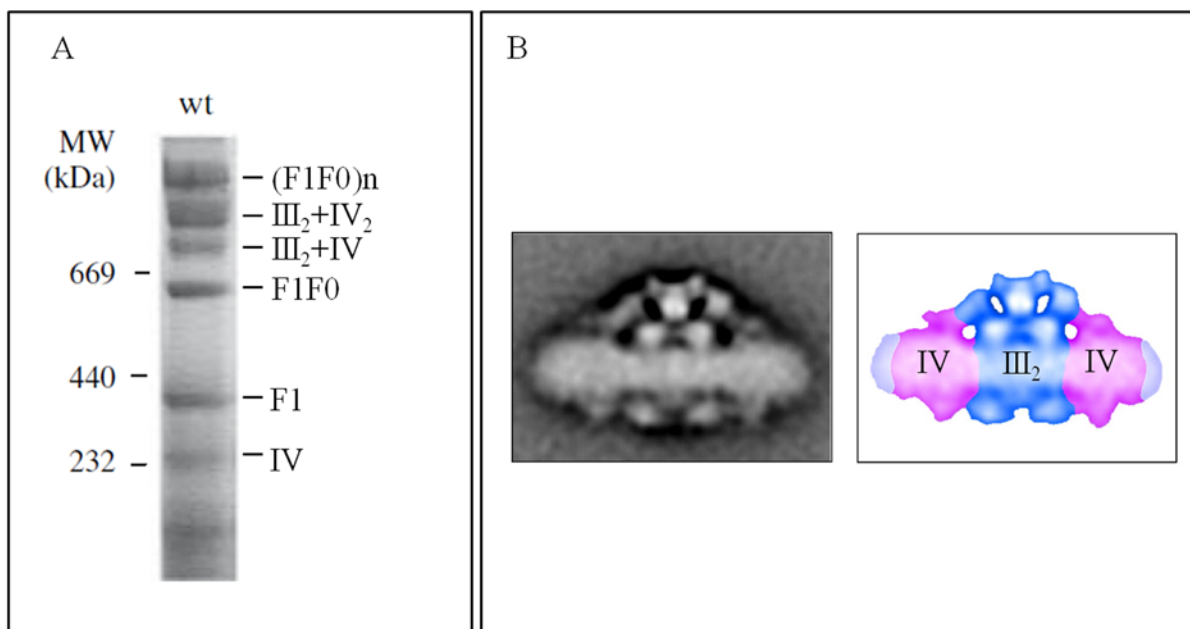


Figure 3: Supercomplexes dans les mitochondries de levure. (A) Supercomplexes dans des mitochondries d'une souche sauvage analysés par BN-PAGE. Les extraits mitochondriaux sont séparés sur BN-PAGE après solubilisation à la digitonine. Les complexes sont ensuite détectés par coloration au bleu colloïdal (Figure adaptée de (Lemaire & Geneviève Dujardin 2008)). (B) Structure du supercomplexe III₂+IV₂ révélée par microscopie électronique (Figure adaptée de (Boekema & Braun 2007)).

III. La levure *Saccharomyces cerevisiae*, un organisme modèle dans l'étude des fonctions respiratoires

La levure *S. cerevisiae* est un eucaryote unicellulaire fréquemment utilisé comme organisme modèle. De nombreux outils génétiques, moléculaires et biochimiques ont été développés et son génome a entièrement été séquencé. Elle présente également de nombreux avantages dont une recombinaison homologue efficace.

Cet organisme a permis de faire de grandes avancées dans la compréhension de la fonction respiratoire. En effet, une des particularités de cette levure est sa capacité à produire l'énergie nécessaire à sa survie et à sa reproduction par la respiration mais également par la fermentation ; de ce fait, elle reste viable sur milieu fermentescible en l'absence d'une chaîne respiratoire fonctionnelle (Figure 4). L'absence d'une ou plusieurs enzymes de cette chaîne n'est donc pas létale pour la levure. Il existe différents types de mutants respiratoires. Les mutations peuvent concerner soit le génome mitochondrial comme pour les mutants *mit* (mutations ponctuelles ou petites délétions) et *rho*/*rho*⁰ (grandes délétions/perde totale de l'ADNmit) soit le génome nucléaire comme pour les mutants *pet*. Les mutations peuvent apparaître spontanément ou être induites par des drogues comme l'acriflavine ou le bromure d'éthidium. Il est également possible chez *S. cerevisiae* d'introduire des mutations dans le génome mitochondrial par transformation biolistique. La transformation du génome mitochondrial est, à l'heure actuelle, uniquement possible chez cette levure et chez l'algue, *Chlamydomonas reinhardtii* (Bonnefoy et al. 2007). Un outil d'étude particulièrement performant chez la levure est la sélection de supprimeurs (ou révertants) sur substrat respiratoire (glycérol, éthanol ou lactate) à partir de mutants *mit* ou *pet* dont la croissance respiratoire est nulle. Ces mutations secondaires qui restaurent, au moins partiellement, la fonction respiratoire permettent de mettre en évidence des partenaires fonctionnels et de proposer des mécanismes de compensation. Les mutants *rho*/*rho*⁰ sont incapables de réverter car une partie ou la totalité de l'ADNmit est perdu.

L'étude du développement de mutations de résistance aux agents antimicrobiens ciblant le complexe III et la caractérisation de nouveaux inhibiteurs directement chez les organismes pathogènes est très difficile voire impossible pour certains d'entre eux : la culture en laboratoire de certains phytopathogènes n'a pas encore été établie et

l'obtention de mitochondries de qualité suffisante pour des analyses biochimiques n'est pas chose aisée chez des pathogènes comme *Plasmodium*, l'agent du paludisme (les préparations en mitochondries sont contaminées par des molécules d'hèmes polymérisées à la suite de la dégradation de l'hémoglobine par le parasite (hémozoïne) ce qui gêne les mesures spectroscopiques). La séquence du cytochrome *b*, sous-unité centrale du complexe, étant plutôt bien conservée entre la levure et les eucaryotes pathogènes (36% d'identité de séquence avec *P. falciparum*, 63% avec *Pneumocystis jirovecii*, un champignon pathogène de l'Homme, 62% avec *Botrytis cinerea*, un champignon phytopathogène), *S. cerevisiae* paraît être un bon modèle pour ces études. De plus, la structure du complexe III de la levure a été résolue.

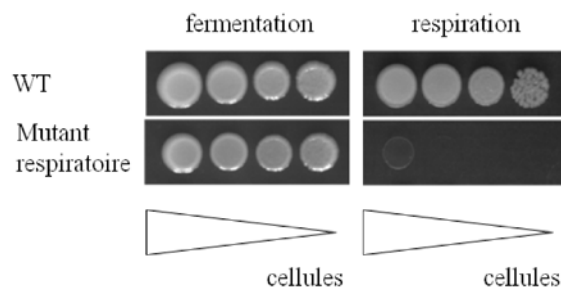


Figure 4: Croissance sur milieu fermentescible et respiratoire d'une souche sauvage de levure et d'un mutant respiratoire.

IV. Le complexe III (ou complexe bc_1)

Le complexe III ou complexe bc_1 occupe une place centrale dans la bioénergétique mitochondriale en participant au processus de production d'énergie. Son rôle est de catalyser le transfert d'électrons de la quinol vers le cytochrome *c* et de coupler ce mouvement d'électrons à la translocation de protons à travers la membrane mitochondriale interne. Ce complexe enzymatique est également l'un des principaux sites de production d'ERO et la cible d'agents antimicrobiens utilisés contre des pathogènes de l'Homme et de plantes.

Le complexe bc_1 est apparenté au cytochrome b_{6f} chloroplastique et des cyanobactéries (pour revue, (Schütz et al. 2000)). Le complexe bc_1 mitochondrial diffère de son équivalent bactérien par le nombre de sous-unités non catalytiques qui sont le plus souvent absentes des complexes bc_1 bactériens (pour revue, (Schütz et al. 2000)).

L'étude de mutants du complexe III présentant des défauts d'activité ou d'assemblage et la recherche de suppresseurs de ces mutations ont apporté de précieuses informations sur son mécanisme mais ont également mis en évidence des interactions entre les différentes sous-unités du complexe enzymatique. Tout comme ces mutants, les inhibiteurs de l'enzyme et les mutations de résistance à ces molécules ont joué un grand rôle dans l'étude du mécanisme de ce complexe avant même que les structures du complexe bc_1 soient disponibles.

N.B : Les protéines ainsi que le numéro des résidus sont donnés, tout le long du texte, pour *S. cerevisiae*.

A. Structure du complexe bc_1

Les premières structures du complexe bc_1 ont été obtenues à la fin des années 90 à partir de mitochondries de cœur de bœuf (Xia et al. 1997; Iwata et al. 1998) et de poulet (Zhang et al. 1998). La structure générale du complexe bc_1 de *S. cerevisiae* (Hunte et al. 2000) (Figure 5) est similaire à celle obtenue lors de la cristallisation des enzymes bovine et aviaire. Le complexe se présente sous la forme d'un homodimère d'environ 500 kDa chez la levure. Chaque monomère est composé de 11 sous-unités chez les mammifères et 10 sous-unités chez *S. cerevisiae* dont trois forment le cœur catalytique du complexe en participant au transfert des électrons *via* leurs groupements redox ; il s'agit du cytochrome *b* (Cyt *b*), de la protéine de Rieske (ISP ou Rip1) et du cytochrome c_1 (Cyt c_1). Les autres sous-unités sont appelées sous-unités surnuméraires et joueraient un rôle dans l'assemblage ou protégeraient les sous-unités catalytiques de la dégradation. Nous n'avons pas à notre disposition de structures du complexe bc_1 d'organismes pathogènes tels que des phytopathogènes ou *Plasmodium*.

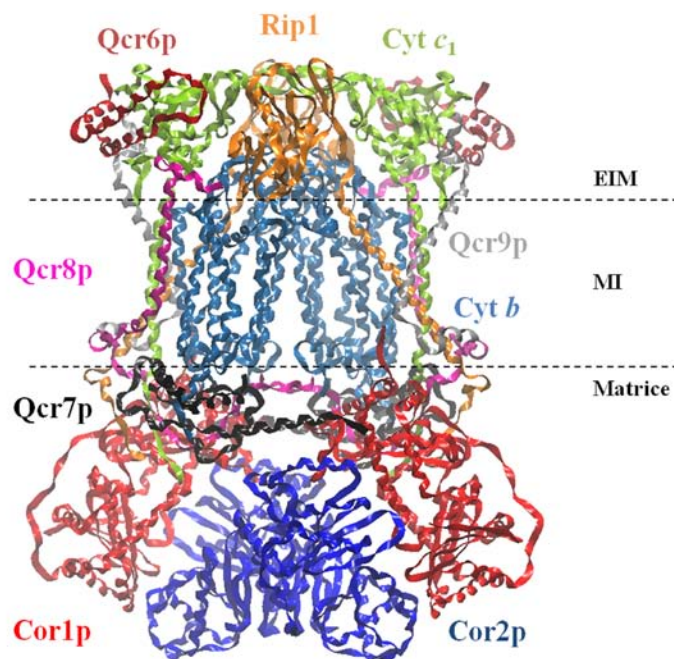


Figure 5: Structure cristallographique du complexe bc_1 de *S. cerevisiae*. Le complexe bc_1 se présente sous la forme d'un homodimère. Chaque monomère est composé, chez la levure, de 10 sous-unités dont 3 sous-unités catalytiques (Cyt c_1 , Rip1 et Cyt b). La sous-unité Qcr10 n'a pas été purifiée avec le dimère chez *S. cerevisiae*. Structure 1KYO.pdb. EIM: espace intermembranaire; MI: membrane interne.

1. Les sous-unités catalytiques

a. Le cytochrome b

Le cytochrome b est la seule sous-unité du complexe bc_1 à être codée par le génome mitochondrial.

Cette protéine occupe une position centrale dans la structure atomique du complexe avec ses huit hélices transmembranaires (A à H) liées par de larges boucles pouvant porter, elles-mêmes, une ou deux hélices positionnées parallèlement à la surface de la membrane (Figure 6). Par exemple, la boucle ef reliant les segments transmembranaires E et F porte une hélice tandis que la boucle cd reliant les segments C et D porte 2 hélices appelées cd1 et cd2. Les extrémités N- et C-terminales de la sous-unité sont localisées dans la matrice. La dimérisation du cytochrome b conduit à la formation de cavités hydrophobes à l'entrée desquelles se réarrangent les segments transmembranaires des deux autres sous-unités catalytiques et d'une sous-unité surnuméraire, Qcr9p.

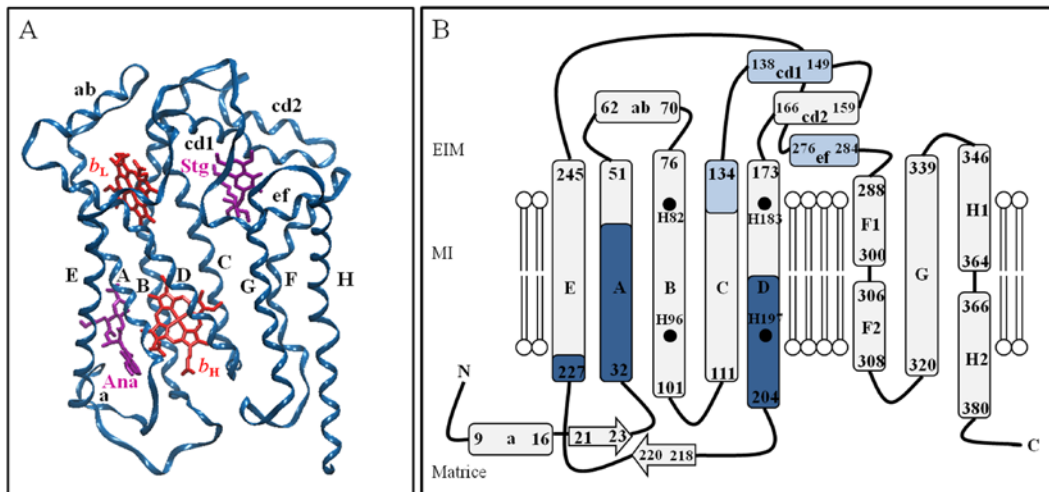


Figure 6: Représentation de la structure du cytochrome *b*. Le cytochrome *b* constitue le cœur catalytique de l'enzyme en formant les deux poches de liaison des quinones: Q_o , site d'oxydation de la quinol (en bleu clair sur la fig. 6B) et Q_i , site de réduction de la quinone (en bleu foncé sur la fig. 6B). Ces deux poches sont reliées par un chemin de transfert des électrons *via* les hèmes de type *b*, b_L et b_H . (A) La structure du cytochrome *b* représentée ici est celle du boeuf (1PPJ.pdb). Stg: stigmatelline; Ana: antimycine. (B) Représentation du cytochrome *b*. Les ronds noirs représentent les histidines liant les atomes de fer des hèmes (figure adaptée de (Fisher & Meunier 2008)).

Le cytochrome *b* constitue le cœur catalytique de l'enzyme en formant les deux sites de liaison des quinones situés de part et d'autre de la membrane interne: la poche catalytique Q_o ou P (site d'oxydation de la quinol) et la poche catalytique Q_i ou N (site de réduction de la quinone). Ces deux sites sont reliés par un chemin de transfert d'électrons *via* les hèmes de type *b*, b_L et b_H . Ces deux hèmes possèdent des propriétés physico-chimiques différentes ; l'hème b_L , proche de l'espace intermembranaire et dit de bas potentiel, absorbe à 565 nm tandis que l'hème b_H , proche de la matrice et dit de haut potentiel, absorbe à 562 nm. Ces hèmes s'intercalent entre les hélices A, B, C et D. Ils sont stabilisés dans le cytochrome *b* par des liaisons hydrogènes et les atomes de fer sont liés par des résidus histidines (H82 et 183 pour b_L et H96 et 197 pour b_H). Le cytochrome *b* fournit également les voies de conduction des protons et forme la plateforme sur laquelle va se positionner Rip1 pour récupérer les électrons (plateforme de « docking »).

b. Le cytochrome c_1

Le cytochrome c_1 est synthétisé sous forme d'apocytochrome c_1 dans le cytoplasme puis est importé dans la mitochondrie où il va subir deux clivages successifs. La première coupure a lieu dans la matrice et la seconde dans l'espace

intermembranaire. Cette protéine est composée de trois domaines : un domaine catalytique en N-terminal, un domaine transmembranaire et un domaine C-terminal. Le domaine catalytique localisé dans l'espace intermembranaire est hydrophile. Il porte un hème de type c_1 lié covalamment à la protéine par des résidus cystéines (C101 et C104) et dont les atomes de fer sont liés par l'histidine 105 et la méthionine 225. Le domaine transmembranaire permet d'ancrer fortement la sous-unité dans la membrane interne et le domaine en C-terminal est impliqué dans l'insertion du cytochrome c_1 dans la membrane (Arnold et al. 1998). La protéine interagit avec Rip1 de l'autre monomère et le cytochrome c . L'interaction entre les cytochromes c et c_1 serait stabilisée par la sous-unité surnuméraire Qcr6p.

c. La protéine de Rieske (ou Rip1)

Comme le cytochrome c_1 , la protéine de Rieske ou Rip1, est synthétisée dans le cytoplasme puis importée dans la mitochondrie où elle subit deux clivages successifs de sa préséquence par la peptidase matricielle MPP (Matrix Processing Peptidase) puis par la peptidase mitochondriale intermédiaire MIP (Matrix Intermediate Peptidase). La maturation de la protéine par MIP ne semble pas être nécessaire à l'assemblage de la sous-unité au sein de l'enzyme puisque une mutation du site de coupure de cette peptidase n'empêche pas l'insertion de la protéine dans le complexe (Nett & Trumpower 1999). De plus, les formes non matures de Rip1 sont catalytiquement actives ce qui suggère que le cluster $[2Fe-2S]$ s'insère correctement dans le domaine catalytique en l'absence de la maturation de la sous-unité (Nett & Trumpower 1999).

Rip1 est composée de quatre domaines : un domaine N-terminal situé dans la matrice et un segment transmembranaire qui sont tous les deux très peu conservés entre les espèces, un domaine de liaison flexible et enfin un domaine catalytique en C-terminal situé dans l'espace intermembranaire et portant le cluster $[2Fe-2S]$. Ce cluster est lié de façon non covalente par deux histidines (H161 et 181) et quatre cystéines (C159, C164, C178 et C180).

Des délétions dans les domaines extramembranaires entraînent un défaut d'assemblage de la protéine au sein du complexe tandis que des délétions dans le domaine intramembranaire n'affectent pas l'intégration de Rip1 suggérant ainsi la

présence d'interaction entre la protéine et une ou plusieurs sous-unités *via* les domaines extramembranaires (Beattie et al. 1999).

Dans les structures cristallographiques, le domaine catalytique de Rip1 a été trouvé dans différentes positions allant d'une position proche du cytochrome c_1 de l'autre monomère appelée « distal » ou « c_1 » à une position proche du cytochrome b de ce même monomère appelée « proximal » ou « b » (pour revue, (Berry & Huang 2011)) (Figure 7). Cette mobilité est rendue possible grâce à la flexion du domaine de liaison et permet ainsi le passage des électrons (séquence : SMTATADVLAMA (81-92)) (Tian et al. 1998; Nett et al. 2000; Darrouzet et al. 2001).

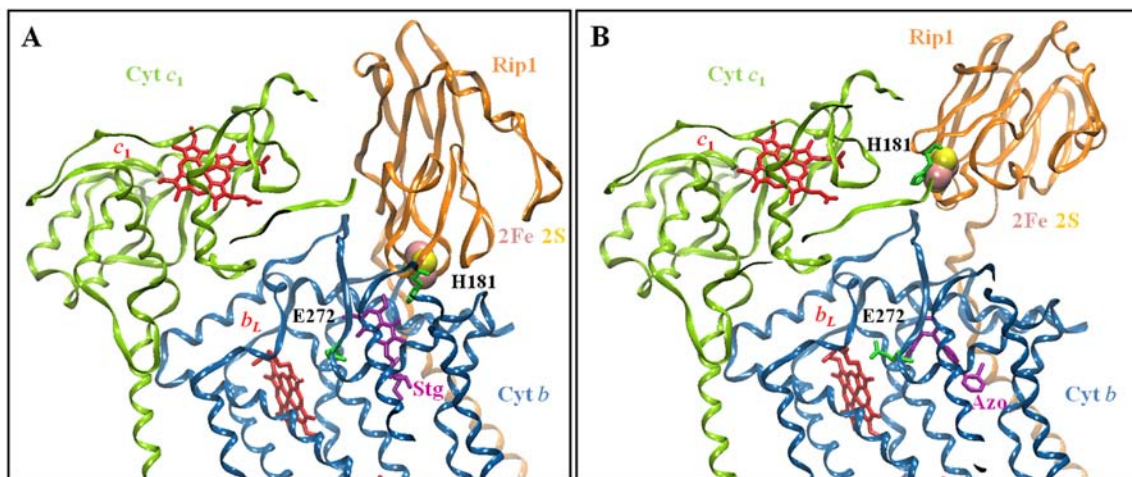


Figure 7: Positions du domaine catalytique de Rip1. (A) Complexe bc_1 du poulet cristallisé en présence de stigmatelline (Stg) (3H1J.pdb) (B) Complexe bc_1 du poulet cristallisé en présence d'azoxystrobine (Azo) (3L71.pdb). Dans les structures cristallographiques, le domaine catalytique de Rip1 a été trouvé dans différentes positions allant d'une position proche du cytochrome b (A) à une position proche du cytochrome c_1 (B) permettant ainsi le transfert des électrons. La liaison de la quinol/quinone au site Q_o , comme celle des inhibiteurs (ici stigmatelline et azoxystrobine) va entraîner une modification de la position de Rip1 mais également de la structure du cytochrome b (exemple du résidu E272 du motif conservé PEWY).

2. Les sous-unités surnuméraires

Une délétion systématique des gènes codant pour les différentes sous-unités surnuméraires du complexe bc_1 a été entreprise chez *S. cerevisiae* et a montré qu'une délétion des gènes *COR1*, *COR2*, *QCR7* et *QCR8* conduit à une déficience respiratoire absolue tandis que celle de *QCR6* et *QCR9* entraîne une déficience respiratoire thermosensible. La délétion de *QCR10* n'a, quant à elle, aucun effet sur le phénotype respiratoire (Winzeler et al. 1999).

Qcr6p, située dans l'espace intermembranaire, participerait à la maturation du cytochrome c_1 (Yang & Trumpower 1994) et jouerait un rôle dans l'interaction cytochrome c_1 – cytochrome c *via* son domaine N-terminal chargé négativement qui permettrait le positionnement correct du cytochrome c (Lange & Hunte 2002) facilitant ainsi le transfert des électrons. Il a été montré qu'une version tronquée de Qcr6p induit un défaut d'assemblage du complexe qui peut être supprimé par une surexpression de la sous-unité surnuméraire Qcr9p indiquant une interaction de ces deux protéines lors de l'assemblage de l'enzyme (Schmitt & Trumpower 1991).

Qcr7p, localisée à la surface du cytochrome b du côté matriciel (Hunte et al. 2000), serait nécessaire à l'assemblage du complexe bc_1 en permettant la formation d'un sous-complexe incluant le cytochrome b et Qcr8p *via* son domaine N-terminal (Lee et al. 2001; Crivellone et al. 1988; Malaney et al. 1997). Cette protéine jouerait également un rôle dans la transduction des protons de la matrice aux centres rédox du cytochrome b . En effet, Lee et ses collaborateurs ont montré qu'une mutation des résidus aspartate 46 et 47 en glycine ou asparagine entraîne une forte diminution de la synthèse d'ATP sans modification du transfert des électrons dans le complexe bc_1 (Lee et al. 2001).

Qcr8p se trouvant à l'interface des deux monomères pourrait jouer un rôle important dans l'assemblage en interagissant avec plusieurs sous-unités ; son extrémité N-terminal interagirait avec le cytochrome b de l'autre monomère tandis que son extrémité C-terminal lierait les sous-unités Qcr6p et Cyt c_1 (Hunte et al. 2000).

Qcr9p semble être peu impliquée dans l'assemblage du complexe bc_1 . Elle interagirait néanmoins avec les trois sous-unités catalytiques de l'enzyme. Il a été montré notamment qu'une mutation dans le cytochrome b est capable de restaurer partiellement la croissance respiratoire d'un mutant $\Delta QCR9$ (Saint-Georges et al. 2002) suggérant l'existence d'interactions entre les deux protéines. Il a également été observé, par résonance para-électromagnétique (RPE), que Qcr9p est requise pour l'insertion du cluster [2Fe-2S] dans Rip1 (Phillips et al. 1993).

La structure de la sous-unité Qcr10p de la levure n'a pas été obtenue contrairement à celle du bœuf. Cette protéine pourrait, elle aussi, avoir un rôle dans l'assemblage en stabilisant Rip1 dans le complexe (Brandt et al. 1994).

Cor1p et Cor2p, localisées dans la matrice, appartiennent à la famille des métallo-endopeptidases zinc-dépendantes qui inclue les MPP (Rawlings & Barrett 1991). Ces dernières jouent un rôle dans le clivage des précurseurs protéiques lors de leur import

dans la mitochondrie (Yang et al. 1988). Cependant, contrairement à leurs homologues chez les plantes, Cor1p et Cor2p du bœuf possèdent une faible activité peptidase et cette activité est même absente chez *S. cerevisiae*. Ces deux sous-unités sont associées entre elles et au cytochrome *b* du côté matriciel. Elles seraient impliquées dans l'assemblage du complexe et pourraient notamment protéger les cytochromes de la dégradation (Tzagoloff et al. 1986; di Rago et al. 1997).

Il a été trouvé, chez l'Homme et le bœuf, une sous-unité supplémentaire qui correspondrait à la préséquence de Rip1 (Brandt et al. 1993) ; son rôle n'est pas encore connu.

B. Assemblage du complexe *bc*₁

L'assemblage du complexe *bc*₁ a surtout été étudié chez *S. cerevisiae* par une approche de simple et double délétions systématiques des différents gènes. D'après le modèle établi par Zara et ses collaborateurs, deux sous-complexes formés par les protéines Qcr7p/Qcr8p/Cyt *b* et Cyt *c*₁/Cor1p/Cor2p s'assembleraient puis ce nouveau pré-complexe s'associerait avec Qcr6p pour former un sous-complexe d'environ 500 kDa. Les sous-unités Qcr9p, Rip1 et Qcr10p s'intégreraient au pré-complexe pour former le complexe *bc*₁ mature (Figure 8). Avant de se lier aux autres sous-unités Qcr9p et Rip1 pourrait s'associer dans le but de se protéger de la protéolyse (Zara et al. 2009).

A l'heure actuelle, seuls 6 facteurs spécifiques de l'assemblage du complexe *bc*₁ de la levure ont été décrit à savoir : Cbp3p, Cbp4p, Cbp6p, Bca1p, Bcs1p, et Mzm1p (pour revue, (Smith et al. 2012)) (Figure 8). Cbp3p et Cbp6p ont d'abord été identifiés comme étant des activateurs de la traduction de l'ARNm *CYTB* mais récemment ces deux protéines ont été trouvées sous forme d'un complexe associé au Cyt *b* nouvellement synthétisé. Le complexe Cbp3p-Cbp6p recruterait un autre facteur d'assemblage, Cbp4p (Gruschke et al. 2011; Kronekova & Rödel 2005). La fonction exacte de ce nouveau complexe est encore inconnue mais il pourrait permettre de stabiliser la sous-unité catalytique. Bca1p est une protéine de la membrane interne impliquée dans la formation du pré-complexe chez les champignons (Mathieu et al. 2011). Bcs1p appartient à la famille des protéines AAA (ATPases Associated with diverse cellular Activities) et est requise pour l'insertion de Rip1 dans le complexe *bc*₁ (Nobrega et al. 1992; Wagener et al. 2011). Mzm1p est une protéine de la matrice également impliqué dans l'insertion de

Rip1 dans l'enzyme (Atkinson et al. 2011). Un autre facteur d'assemblage du complexe bc_1 a été identifié chez les métazoaires ; il s'agit de TTC119 (Ghezzi et al. 2011) dont des orthologues chez les autres eucaryotes (plantes ou champignons) n'ont pas été identifiés.

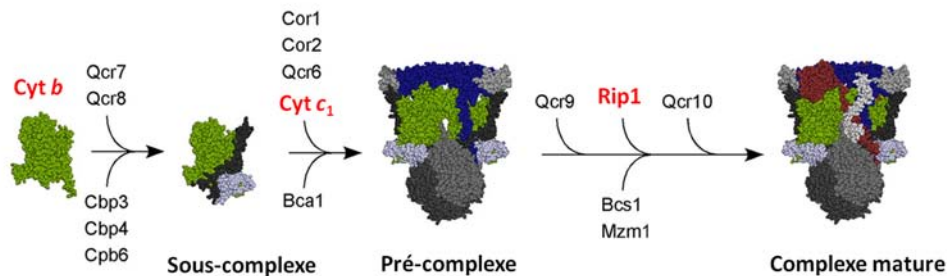


Figure 8: Modèle des différentes étapes d'assemblage du complexe bc_1 de *S. cerevisiae*. Cyt b , Qcr7p, Qcr8p, Cor1p, Cor2p, Qcr6p, Cyt c_1 , Qcr9p, Rip1 et Qcr10p sont les sous-unités formant le complexe bc_1 ; les sous-unités catalytiques sont indiquées en rouge. Cbp3p, Cbp4p, Cpb6p, Bca1p, Bcs1p et Mzm1p sont des facteurs d'assemblage de l'enzyme (Figure adaptée de (Atkinson et al. 2011)).

C. Activité du complexe bc_1

1. Le cycle Q

Le complexe bc_1 catalyse l'oxydation de la quinol et la réduction du cytochrome c , et couple ce transfert d'électrons à la translocation de protons à travers la membrane interne. Le mécanisme catalytique, appelé cycle Q, requière deux sites de liaisons de la quinone situés de part et d'autre de la membrane : le site Q_o ou centre P, site d'oxydation de la quinol localisé du côté positif de la membrane, et le site Q_i ou centre N, site de réduction de la quinone situé du côté négatif (pour revues, (Hunte et al. 2003; Mitchell 1975; Brandt & Trumpower 1994)). Le cycle Q est composé de deux étapes (Figure 9). Lors de la première étape, une molécule de quinol (QH_2) est oxydée au site Q_o en cédant un électron à Rip1 et un électron à l'hème b_L . Cette phase est associée à la présence transitoire d'une semiquinone ($Q\cdot^-$) au site Q_o et permet l'éjection de deux protons dans l'espace intermembranaire. Les deux électrons issus de l'oxydation de la quinol vont donc suivre des chemins différents ; l'électron transféré à Rip1 va être transmis au cytochrome c_1 puis au cytochrome c tandis que l'électron cédé à l'hème b_L va réduire l'hème b_H qui, à son tour, va réduire une quinone matricielle (Q) en semiquinone au site

Q_i. Le passage du premier électron du cytochrome *b* au cytochrome *c*₁ est rendu possible grâce au changement de position du large domaine de Rip1 portant le groupement [2Fe-2S]. Une seconde réaction d'oxydoréduction initiée au site Q_o complète le cycle Q. Une deuxième molécule de quinol va ainsi être oxydée au site Q_o ce qui conduit à la libération de deux protons et à la réduction d'une nouvelle molécule de cytochrome *c* et de l'hème *b_L*. Ce dernier va transférer l'électron à la semiquinone formée lors de la première étape et, dans une réaction qui consomme deux protons provenant de la matrice, la semiquinone régénère une molécule de quinol au site Q_i. La somme de ces deux étapes aboutit donc à la réduction de deux molécules de cytochrome *c*, à l'éjection de quatre protons dans l'espace intermembranaire et à la consommation de deux protons issus de la matrice pour une molécule de quinol oxydée.

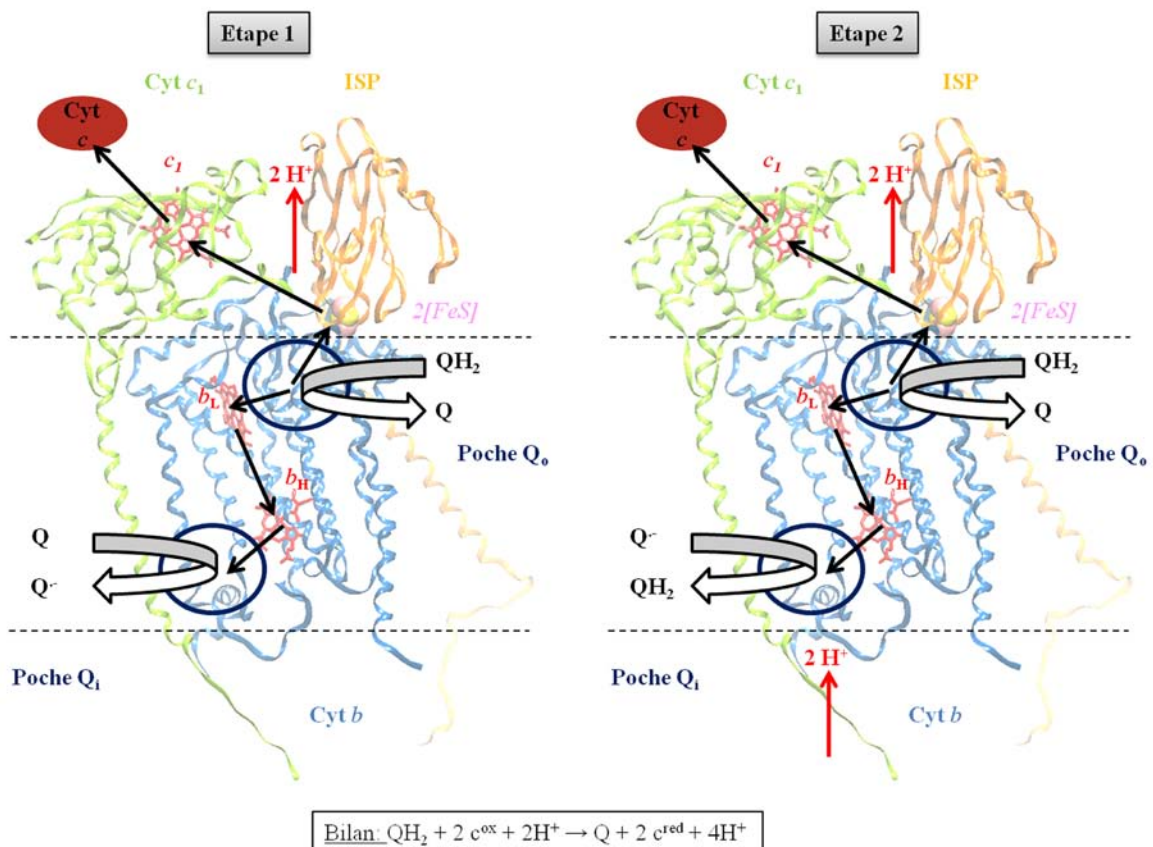


Figure 9: Le cycle Q - trajet des électrons et des protons au sein du complexe *bc*₁.

a. Liaison des quinones dans les poches catalytiques Q_o et Q_i

L'ubiquinone est une molécule liposoluble amphipathique avec une tête cyclique et une queue hydrophobe carbonée permettant le transport des électrons dans la membrane interne mitochondriale (Figure 10).

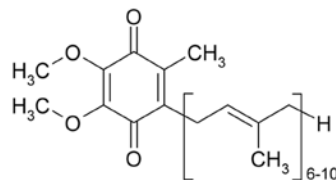


Figure 10: Structure de l'ubiquinone.

i. Site Q_o

Aucune donnée structurale montrant la liaison de la quinone au site Q_o n'est disponible actuellement mais la caractérisation d'inhibiteurs analogues de la quinone et de mutants du cytochrome *b* a fourni des informations sur ce mécanisme. Le site Q_o est une large région formée par le domaine C-terminal de l'hélice transmembranaire C, l'hélice de surface cd1, la région comprenant les résidus conservés PEWY, l'hélice de surface ef et une partie de l'hélice transmembranaire F (Figure 6). Le site Q_o , tout comme le site Q_i , est ouvert sur une cavité hydrophobe permettant l'échange de substrats. Il existe deux cavités partagées entre les monomères ; le site Q_o d'un monomère et le site Q_i de l'autre sont ouverts sur la même cavité.

Les inhibiteurs du site Q_o (Q_o Is) peuvent se lier à deux endroits de ce site ; ils sont donc classés en deux groupes en fonction du domaine qu'ils occupent (Crofts et al. 2004). A noter toutefois qu'il ne peut y avoir qu'un seul Q_o I à la fois dans la poche catalytique ; les deux domaines de liaison se chevauchant (pour revue, (Hunte et al. 2008). Les Q_o Is de classe I comme la stigmatelline, l'UHDBT (5-*n*-undecyl-6-hydroxy-4,7-dioxobenzothiazole) et le NQNO (2-nonyl-4-hydroxyquinoline N-oxide) se lient dans la partie distale de l'hème b_L , proche du site de « docking » de Rip1, et interagissent avec cette dernière *via* une forte liaison hydrogène entre l'inhibiteur et l'histidine 181 de Rip1. Les Q_o Is de classe II tels que le myxothiazole et les inhibiteurs de type MOA (acide β -methoxyacrylate) comme les strobilurines se lient dans la partie proximale de l'hème b_L et n'interagissent pas avec Rip1, laquelle, dans la plupart des structures obtenues avec ces Q_o Is, est trouvée dans une position proche du cytochrome c_1 (Figure 11). Le

famoxadone, commercialisé en tant que fongicide Q_oI, fait le lien entre ces deux classes d'inhibiteurs. En effet, ce composé se lie comme les inhibiteurs de type MOA mais, à l'inverse de ces molécules, maintient Rip1 en position *b* et contrairement aux inhibiteurs de classe I, ce maintien se fait sans contact direct entre la protéine fer-soufre et le famoxadone (Berry & Huang, 2011) (Figure 11). La formation d'une liaison hydrogène entre la tyrosine 279 du cytochrome *b* et l'histidine 181 de Rip1 pourrait être responsable du positionnement de la protéine de Rieske dans ce cas. Cette interaction pourrait avoir une fonction de « pré-docking » en maintenant Rip1 en position *b* pendant que la quinol se déplacerait dans le site Q_o pour arriver à une position similaire à celle d'un inhibiteur de classe I.

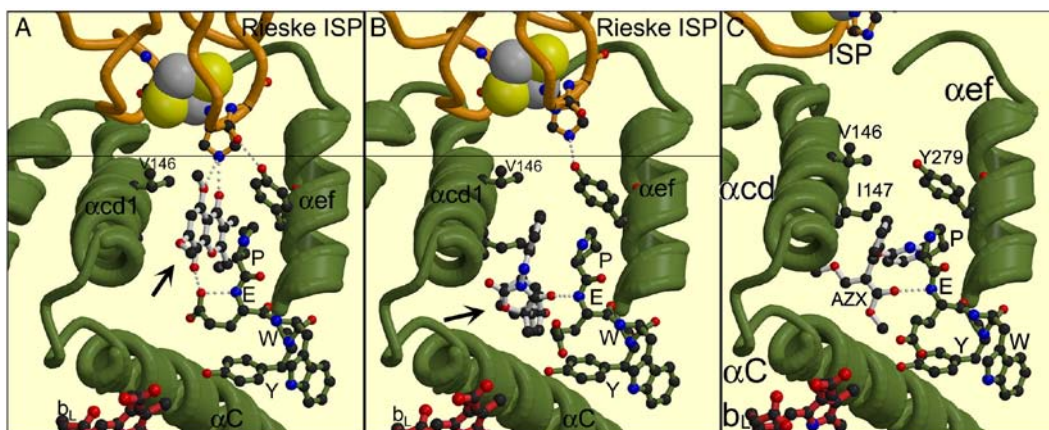


Figure 11: Modification de la structure du cytochrome *b* et du positionnement de Rip1 en fonction du type d'inhibiteurs. En présence de stigmatelline (A) ou de famoxadone (B), Rip1 se trouve en position *b*. Cependant, l'extrémité de la protéine fer-soufre est localisée moins profondément dans le cytochrome *b* en présence de famoxadone. Le famoxadone et l'azoxystrobine (C) forment une liaison hydrogène avec l'azote du glutamate 272 du motif PEWY.

Des études mutationnelles ont montré l'importance de la tyrosine 279 pour l'activité du complexe. Chez *Rhodobacter sphaeroides*, la mutation de cette tyrosine n'a pas d'effet sur l'activité lorsque celle-ci est remplacée par une phénylalanine, a un faible effet quand elle est remplacée par une leucine (diminution d'un facteur 3) et a un effet plus important lorsque le résidu introduit est une glycine (diminution d'un facteur 20) (Crofts et al. 2000). Chez la levure, le remplacement de la tyrosine par une alanine, une cystéine ou une sérine cause une diminution de l'activité d'un facteur 5, 2, et 4 respectivement et l'analyse par spectroscopie RPE des mutants indique une perturbation au niveau du site Q_o (Fisher et al. 2004; Wenz et al. 2007). Un résidu aromatique ou du moins un résidu hydrophobe est donc nécessaire à cette position pour maintenir une activité correcte de l'enzyme.

D'autres résidus vont jouer un rôle important dans l'activité du complexe. C'est le cas notamment du glutamate 272 appartenant au motif très conservé PEWY. Dans une structure contenant la stigmatelline, la chaîne latérale du résidu E272 occupe une majeure partie du volume dans lequel le pharmacophore des inhibiteurs de classe II et du famoxadone pourrait se loger ; par conséquent, pour s'accommoder de ces molécules, la chaîne latérale du résidu va effectuer une rotation (Crofts 2004) (Figure 11). La substitution de ce résidu chez la bactérie *R. sphaeroides* aboutit à une résistance à la stigmatelline ainsi qu'à une baisse de l'oxydation des quinols (Brasseur et al. 1996). Des analyses mutationnelles effectuées chez la levure (E272D et E272Q) (Wenz et al. 2006) et chez *Rhodobacter capsulatus* (E272A, V, F, H, K et Q) (Osyczka et al. 2006) confirment que ce résidu permet une oxydation efficace de la quinol.

ii. Site Q_i

Le site de réduction de la quinone est formé de la région C-terminale de l'hélice D et de la région N-terminale des hélices A et E (Figure 6).

Des structures des complexes bc_1 de la levure (Hunte et al. 2000), du bœuf (Gao et al. 2003; Huang et al. 2005) et du poulet (Zhang et al. 1998) en présence de quinone au site Q_i ont été obtenues et révèlent que l'acide aspartique 229, l'histidine 202 et la sérine 206 forment des liaisons hydrogène, directement (S206) ou par l'intermédiaire de molécules d'eau (D229 et H202), avec la quinone permettant son orientation et sa stabilisation dans le site. La quinone se lie à proximité de l'hème b_H (3.5 Å) favorisant ainsi un transfert rapide des électrons.

b. Importance de la bifurcation des électrons au centre Q_o

La bifurcation des électrons au centre Q_o est très importante pour l'établissement du potentiel électrochimique nécessaire à la production d'ATP. Un passage linéaire des électrons du cytochrome *b* au cytochrome *c* aurait pour conséquence une perte considérable en énergie car seulement deux protons seraient transférés vers l'espace intermembranaire (Muller et al. 2002; Osyczka et al. 2005; Kramer et al. 2004). En plus de la perte d'énergie, ce court-circuit du cycle Q induirait la formation d'ions superoxyde par la réaction de la semiquinone produite au site Q_o lors de la première

étape ou produite par retour des électrons des hèmes *b* vers le site Q_o avec l'oxygène (Rottenberg et al. 2009). Le mécanisme physico-chimique de la bifurcation des électrons n'est pas entièrement compris. Cependant, il a été montré par une approche stochastique que les distances entre les sites rédox et leurs potentiels d'oxydoréduction permettent d'expliquer cette bifurcation (Mazat & Ransac 2010).

c. Conduction des protons

Les deux protons provenant de l'oxydation de la quinol au site Q_o suivraient des chemins différents. Le premier proton serait transféré sur l'histidine 181 de Rip1 et accompagnerait l'électron en suivant le mouvement du domaine catalytique de Rip1 avant d'être relâché dans l'espace intermembranaire. Le trajet du second proton n'est pas encore connu (Crofts et al. 1999).

Des études ont montré l'importance des phospholipides et notamment des cardiolipines dans le fonctionnement du complexe. Les cardiolipines stabiliseraient l'architecture du chemin des protons et pourraient être impliquées dans la capture de ces derniers (Klingen et al. 2007; Lange et al. 2001; Wenz et al. 2009).

D. Inhibiteurs et résistance

En plus d'être des outils très puissants dans la compréhension du fonctionnement du complexe bc_1 , les inhibiteurs de cette enzyme sont également des armes redoutables contre des pathogènes de plantes ou de l'Homme. Les premiers inhibiteurs qui ont servi à l'étude du fonctionnement de l'enzyme comme l'antimycine, la stigmatelline ou le myxothiazole bloquent efficacement l'activité de l'enzyme mais sont extrêmement toxiques pour les mammifères et les autres organismes non pathogènes et ne peuvent donc pas être utilisés en traitement. Il y a 15-20 ans, des inhibiteurs spécifiques du cœur catalytique du complexe bc_1 d'organismes pathogènes ont été découverts comme les strobilurines et le cyazofamide utilisés en agriculture contre les champignons phytopathogènes et l'atovaquone employé en médecine dans le traitement du paludisme mais également contre d'autres pathogènes comme *Toxoplasma gondii*, agent de la toxoplasmose et *Pneumocystis jirovecii*, un champignon responsable de la pneumocystose. Malheureusement, de nombreux cas de résistance à ces inhibiteurs ont

été rapportés et ont pour origine des mutations dans le cytochrome *b* (pour revue, (Fisher & Meunier 2008)) (Tableau 1). Ces mutations ont un impact économique et social considérable. De ce fait, il est important d'étudier ces résistances et de contrôler leur apparition ainsi que de développer de nouveaux traitements pour faire face à la prolifération de ces pathogènes.

Tableau 1: Mutations de résistance au site Q_o et Q_i chez les eucaryotes. Myxo. : myxothiazole ; Strob. : strobilurines ; ATV : atovaquone ; Stg. : stigmatelline ; Ili. H : Ilicicoline H ; Fun. : Funiculosine ; ANA : antimycine ; Sc : *Saccharomyces cerevisiae* ; Pj : *Pneumocystis jirovecii* ; CP : champignons phytopathogènes ; Tg : *Toxoplasma gondii* ; Pb : *Plasmodium berghei* ; Pf : *Plasmodium falciparum* ; Py : *Plasmodium yoelii* ; Lt : *Leishmania tarentolae*. * Organisme chez qui la mutation a été isolée ou étudiée pour la première fois.

Mutation	Résistance à	Organisme*	Références
Site Q_o			
A126T	Myxo.	Sc	(Colson 1993)
T127I	ATV	Pj	(Kazanjian et al. 2001)
F129L	Myxo, Strob	Sc, CP	(di Rago et al. 1989); site de la FRAC
C133Y	Myxo.	Sc	(Brandt et al. 1994; Basseur et al. 1996)
G137R, E, V	Myxo., Stig.	Sc	(di Rago et al. 1989; Basseur et al. 1996)
G137R	Strob.	CP	site de la FRAC
M139L	ATV	Tg	(McFadden et al. 2000)
M139I	ATV	Pb, Pf	(Syafuruddin et al. 1999; Korsinczky et al. 2000)
W142R, K, T	Myxo.	Sc	(Basseur et al. 1996)
G143A	Strob.	CP	site de la FRAC
I147F	Stg.	Sc	(di Rago et al. 1989)
I147V	ATV	Pj	(Kazanjian et al. 2001)
T148I	ATV	Pj	(Walker et al. 1998)
L150F	ATV	Pj	(Walker et al. 1998)
L150S	ATV	Pb	(Korsinczky et al. 2000)
S152A	ATV	Pj	(Kazanjian et al. 2001)
N256Y	Myxo., Strob.	Sc	(di Rago et al. 1989)
P266L	ATV	Pj	(Kazanjian et al. 2001)
I269M	ATV	Py	(Srivastava et al. 1999)
I269L	ATV	Tg	(McFadden et al. 2000)
Y274N	Strob.	Sc	(di Rago et al. 1989)
L275F,S,T	Myxo., Strob.	Sc	(di Rago et al. 1989)
L275F	ATV	Pj	(Kazanjian et al. 2001)
F278I	ATV	Py	(Srivastava et al. 1999)
Y279C	ATV	Py	(Srivastava et al. 1999)
Y279S	ATV	Pf	(Korsinczky et al. 2000)
Y279N	ATV	Pf	(Fivelman et al. 2002)

L282V	ATV	Py	(Srivastava et al. 1999)
L282F	ATV	Pf	(Korsinczky et al. 2000)
K283R	ATV	Py, Pf	(Srivastava et al. 1999; Korsinczky et al. 2000)
P286T	ATV	Pf	(Korsinczky et al. 2000)
G291D	ATV	Pf	(Korsinczky et al. 2000)
V295F	ATV	Pf, Pb	(Korsinczky et al. 2000)
Site Q _i			
I17F	Diuron	Sc	(di Rago et al. 1986)
S20L,T	Ili. H	Sc	(Ding et al. 2006)
Q22E, T	Ili. H	Sc	(Ding et al. 2006)
W30C	Fun.	Sc	(Rotsaert et al. 2008)
N31K	Diuron	Sc	(di Rago et al. 1986)
G33A	Fun., HQNO	Sc	(Brasseur & Brivet-Chevillotte 1995)
G33V	ANA	Lt	(Schnauffer et al. 2000)
G37V	ANA	Sc	(di Rago & Colson 1988)
G37D,S	Ili. H	Sc	(Ding et al. 2006)
L198F	Fun., Ili. H	Sc	(di Rago et al. 1990; Ding et al. 2006)
H204Y	HQNO	Sc	(Brasseur & Brivet-Chevillotte 1995)
S206T,V	HQNO	Sc	(Brasseur & Brivet-Chevillotte 1995)
M221Q	HQNO	Sc	(Brasseur & Brivet-Chevillotte 1995; Rotsaert et al. 2008)
F225S,L	Diuron, HQNO	Sc	(di Rago et al., 1986; di Rago & Colson, 1988)
K228M	ANA	Sc	(di Rago & Colson 1988)

1. Inhibiteurs du site Q_o (Q_oIs)

a. Les fongicides

De nombreux fongicides (azoxystrobine, pyraclostrobine, triclopyricarbe, kresoxim-methyl, pyribencarbe, famoxadone, fenamidone,...) sont actuellement employés en agriculture. Un grand nombre de ces composés sont des dérivés d'inhibiteurs de type MOA. Par exemple, l'azoxystrobine, une molécule synthétique dérivée d'un fongicide naturel produit par le basidiomycète *Strobilurus tenacellus* (strobilurine A) agit efficacement contre le complexe *bc*₁ de champignons phytopathogènes (concentrations requises de l'ordre du nanomolaire). Cet inhibiteur a été développé dans les années 80-90 et introduit sur le marché en 1996 (Clough & Godfrey 1995). Malheureusement, dès 1998 les premières populations de pathogènes résistants sont apparues et se sont largement répandues depuis.

On dénombre à ce jour trois mutations dans le cytochrome *b* conférant une résistance aux fongicides Q_oIs. Il s'agit des mutations F129L, G137R et G143A (Figure 12).

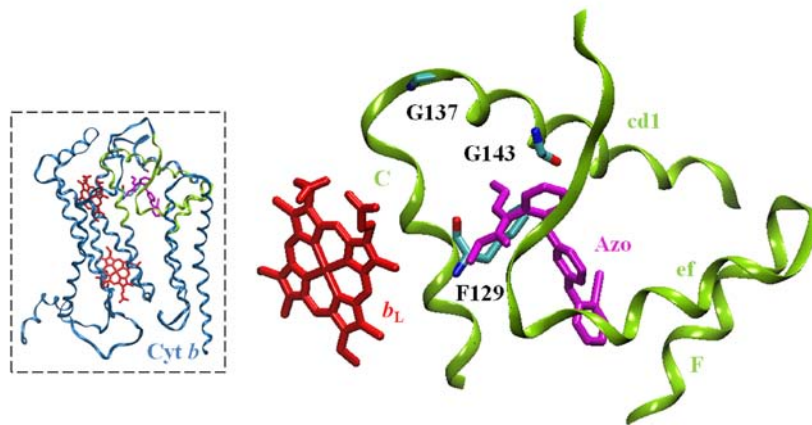


Figure 12: Localisation, dans le cytochrome *b*, des résidus mutés chez les champignons et oomycètes phytopathogènes résistants aux strobilurines. En vert, les hélices constituant le site Q_o. Azo: azoxystrobine. Structure du poulet 3L71.pdb.

Le résidu F129 est localisé dans l'hélice transmembranaire C. Les structures du complexe *bc*₁ obtenues en présence de myxothiazole, de stigmatelline ou d'azoxystrobine montrent que la phénylalanine 129 est impliquée dans la liaison de ces inhibiteurs au site Q_o *via* une liaison de van der Waals entre la chaîne latérale du résidu et les Q_oIs. Le remplacement de la phénylalanine par une leucine abolit l'interaction aromatique-aromatique entre les Q_oIs et l'enzyme causant une diminution de la sensibilité à ces drogues. Chez la levure mutante, l'IC₅₀ pour l'azoxystrobine, le pyraclostrobine et le myxothiazole augmente respectivement d'un facteur 6, 32 et 400 par rapport à une levure sauvage (Fisher & Meunier 2005). La mutation F129L confère aussi une résistance à la stigmatelline (Fisher & Meunier 2005).

Le résidu G137 est, quant à lui, localisé au niveau de la région N-terminale de l'hélice cd1, proche de la région de « docking » de Rip1. Le remplacement de la glycine par une arginine, un résidu plus volumineux, entraînerait une distorsion de la région connectant les hélices C et cd1. En absence de pression de sélection, la mutation G137R pourrait aussi être associée à une perte de fitness chez les pathogènes ; la mutation causant un défaut respiratoire chez la levure (Fisher & Meunier 2001).

Le résidu G143 est localisé dans l'hélice cd1. La structure du complexe *bc*₁ du bœuf inhibé par l'azoxystrobine montre que le remplacement de la glycine par une alanine cause un encombrement stérique. La mutation G143A a été rapportée chez la

plupart des pathogènes Q_oI-résistants (site de la FRAC) et confère un niveau de résistance plus élevé que celui induit par les mutations F129L et G137R. Chez la levure, l'IC₅₀ pour l'azoxystrobine, le pyraclostrobine et le myxothiazole augmente respectivement d'un facteur 66, 1300 et 6700 mais contrairement à la mutation F129L, la liaison de la stigmatelline n'est pas affectée (Fisher & Meunier 2005). De manière intéressante, le résidu en position 143 retrouvé chez le basidiomycète producteur de strobilurines est une alanine (Kraiczky et al. 1996).

Sur le terrain, l'apparition de la mutation G143A a causé des pertes économiques importantes. Il est donc nécessaire de surveiller les pathogènes traités avec les Q_oIs et de trouver un moyen de lutter efficacement contre ces organismes afin de réduire la propagation de la mutation. La mutation de résistance G143A est apparue et s'est propagée rapidement chez certains pathogènes tandis qu'elle n'a pas encore été détectée chez d'autres espèces (Gisi et al. 2002). Deux facteurs pourraient expliquer cette différence dans l'évolution de la mutation : des variations dans la structure du site de liaison des Q_oIs et dans la structure exon/intron du gène codant pour le cytochrome *b*.

Pour vérifier la première hypothèse, des résidus de la levure ont été modifiés pour mimer le site de liaison des strobilurines de quatre pathogènes : *Blumeria graminis*, *Venturia inaequalis*, *Sphaerotheca fuliginea* et *Phytophthora megasparma* puis ces quatre modèles ont ensuite été utilisés pour étudier l'effet de la mutation G143A sur l'activité de leur complexe. Il a été montré que G143A a un léger effet délétère sur l'activité de l'enzyme des différents modèles à l'exception de celui de *B. graminis* suggérant que la mutation touche différemment le fitness des pathogènes ; ceci pourrait expliquer la différence d'évolution de la résistance observée entre de nombreuses espèces de champignons et oomycètes (Fisher et al. 2004).

D'autres études ont montré qu'il existe une différence dans la structure exon/intron du gène codant pour le cytochrome *b* des champignons et oomycètes (Grasso et al. 2006). En effet, certaines espèces possèdent un intron – similaire à l'intron bi2 présents chez la plupart des souches de *S. cerevisiae* – localisé immédiatement après le codon G143. De manière intéressante, chez les espèces possédant cet intron telles que *Puccinia sp.* et *Alternaria solani* la mutation G143A n'a pas encore été rapportée. Par contre, chez les espèces où la mutation a été détectée comme *B. graminis* et *V. inaequalis* l'intron n'est pas présent. *Botrytis cinerea* est, quant à lui, particulièrement intéressant

car ce pathogène présente deux types de cytochrome *b* ; certains isolats contiennent l'intron et d'autres non. Ces observations suggèrent que la présence ou l'absence de cet intron influerait sur l'apparition de la mutation G143A. La mutation pourrait affecter l'épissage de l'intron induisant une diminution du niveau d'ARNm matures et, par conséquent, du niveau de complexe *bc*₁ provoquant ainsi une baisse de la fonction respiratoire (Grasso et al. 2006). De ce fait, G143A serait contre-sélectionnée en champs en affectant le fitness de ces organismes. La mutation ne pourrait donc pas apparaître chez les pathogènes possédants l'intron sauf si ces derniers développent des mécanismes permettant de restaurer la fonction respiratoire. Ce point fait l'objet du chapitre II-A de ma thèse.

Chapitre II-A : Effet délétère de la mutation de résistance aux inhibiteurs du site Q_o, G143A, chez les champignons et oomycètes phytopathogènes possédant un gène codant pour le cytochrome *b* avec intron et mécanismes de « by-pass ».

En utilisant *S. cerevisiae* comme organisme modèle, nous avons montré que la modification du codon GGT en GCT, lequel conduit au remplacement de la glycine en position 143 par une alanine, empêche l'épissage de l'intron bi2 en altérant la structure exon/intron nécessaire à l'épissage. Cela a pour effet une diminution du niveau de cytochrome *b* et de la croissance respiratoire. Nous avons ensuite recherché de possibles mécanismes de « by-pass » qui pourraient restaurer la fonction respiratoire du mutant. Des mutations secondaires ont été trouvées dans le génome mitochondrial : une mutation ponctuelle dans l'intron bi2 restaurant la structure exon/intron et une délétion de l'intron bi2. Nous avons aussi trouvé que la surexpression des gènes nucléaires *MRS2* et *MRS3*, codant pour des transporteurs d'ions métalliques à travers la membrane mitochondriale, restaurent partiellement la croissance respiratoire du mutant G143A. De manière intéressante, le gène *MRS3* provenant du champignon phytopathogène, *B. cinerea* et surexprimé chez le mutant levure G143A a un effet similaire. Ces mécanismes de contournement de l'effet délétère de la mutation identifiés chez la levure pourraient apparaître chez les organismes pathogènes. Ces données apportent une information intéressante sur la possible émergence de la mutation de résistance chez les pathogènes possédants l'intron de type bi2.

b. L'atovaquone

L'atovaquone est un inhibiteur synthétique utilisé en médecine dans le traitement du paludisme (*P. falciparum*), de la pneumocystose (*P. jirovecii*), de la toxoplasmose (*T. gondii*) et des babésioses (*Babesia sp.*). Cette hydroxynaphtoquinone a d'abord été développé pour lutter contre le paludisme puis a été intégré, au début des années 90, dans le traitement des infections liées à *P. jirovecii* et *T. gondii*, des pathogènes opportunistes.

Contrairement à l'azoxystrobine, aucune structure du complexe bc_1 en présence d'atovaquone n'est actuellement disponible. Ce composé étant un bon inhibiteur du complexe bc_1 de *S. cerevisiae*, cette levure a donc été choisie comme modèle d'étude de l'interaction de la drogue avec sa cible (Kessl et al. 2003). Les effets de la molécule sur Rip1 ont été mesurés par spectroscopie RPE et montrent que, comme la stigmatelline, l'atovaquone se lie au centre Q_o et interagit avec Rip1. Les données obtenues ont été ensuite utilisées pour créer un modèle de liaison de l'inhibiteur dans la poche catalytique. L'atovaquone formerait une liaison hydrogène avec l'histidine 181 de Rip1 et une molécule d'eau qui forme un pont entre l'inhibiteur et le résidu E272 du cytochrome *b* à travers une seconde liaison hydrogène comme indiqué dans la figure 13.

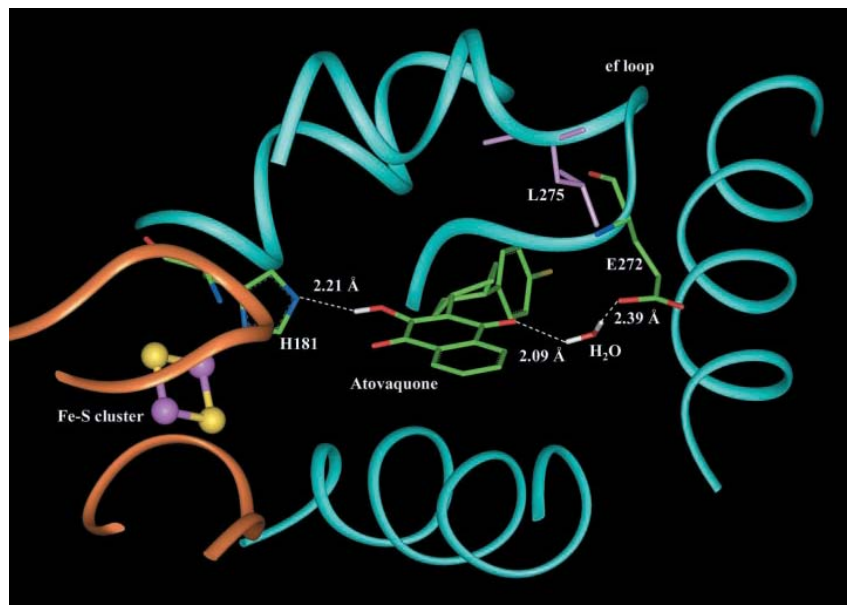


Figure 13: Modélisation de la liaison de l'atovaquone dans la poche catalytique Q_o de la levure. Figure extraite de (Kessl et al. 2003).

Comme pour les fongicides, des résistances à l'atovaquone ont été rapportées chez les différents pathogènes issus de patients ayant subi un échec thérapeutique ou cultivés *in vitro* dans un milieu sélectif ou chez des souris traitées avec la drogue (Figure 14).

Une étude menée sur des patients atteints du SIDA et infectés par *P. jirovecii* a montré qu'une exposition prolongée à l'atovaquone augmente la fréquence des mutations dans le cytochrome *b* conférant une résistance à la drogue (Walker et al. 1998; Kazanjian et al. 2001). Comme le champignon pathogène ne peut être cultivé en laboratoire et que la séquence de son cytochrome *b* possède un pourcentage d'identité élevé avec celle de *S. cerevisiae* (63%), les mutations ont été introduites chez la levure afin de montrer la relation entre les mutations et la résistance à l'atovaquone (Hill et al. 2003). Six mutations sur les sept introduites confèrent une résistance à l'atovaquone. Les mutations n'ont peu voire pas d'effets sur le niveau de complexe *bc₁* et sur la croissance respiratoire. Les mutations I147V, T148I et L150F diminuent la sensibilité à l'inhibiteur d'un facteur 2-3 conférant au pathogène exposé à la drogue un petit avantage tandis que les mutations P266L, L275F et S152A causent une forte résistance au traitement en diminuant la sensibilité à l'atovaquone d'un facteur 7-8. La mutation T127I n'a pas d'effet sur la sensibilité à l'atovaquone et pourrait être considérée comme un polymorphisme. L'inhibiteur se lie de la même manière que la stigmatelline, la liaison de l'inhibiteur dans le complexe a été modélisée en utilisant les coordonnées du complexe *bc₁* de levure inhibé par la stigmatelline (Kessl et al. 2003). Les mutations L150F, P266L et L275F introduisent une chaîne latérale non polaire volumineuse qui empêche la liaison de l'inhibiteur par encombrement stérique (Kessl et al. 2004). I147V ne modifie pas la structure du complexe mais pourrait abolir une interaction entre l'enzyme et l'inhibiteur. Les mutations S152A et T148I induisent le remplacement d'une chaîne latérale polaire par une non-polaire abolissant probablement les interactions hydrogène impliquant ces résidus ce qui induirait une légère modification structurale de la poche catalytique et de ce fait une diminution de l'affinité de la drogue (Kessl et al. 2004).

A la suite de ces travaux, d'autres mutations de résistance à l'atovaquone, retrouvées chez *Plasmodium* (Korsinczky et al. 2000; Srivastava et al. 1999) et *Toxoplasma* (McFadden et al. 2000), ont été analysées : I269M, F278I, Y279C/S et L282V (Kessl et al. 2005). Comme les mutations L150F, P266L et L275F, la mutation I269M

introduit un résidu volumineux dans la structure de l'enzyme. La modélisation de la mutation L282V montre que celle-ci induit une rotation du résidu Y279 et, par conséquent, une variation de l'interaction entre ce résidu et l'atovaquone. Les mutations F278I et Y279C/S enlèvent un résidu aromatique localisé près du site de liaison de l'atovaquone et suppriment ainsi des interactions importantes entre la drogue et le site de liaison.

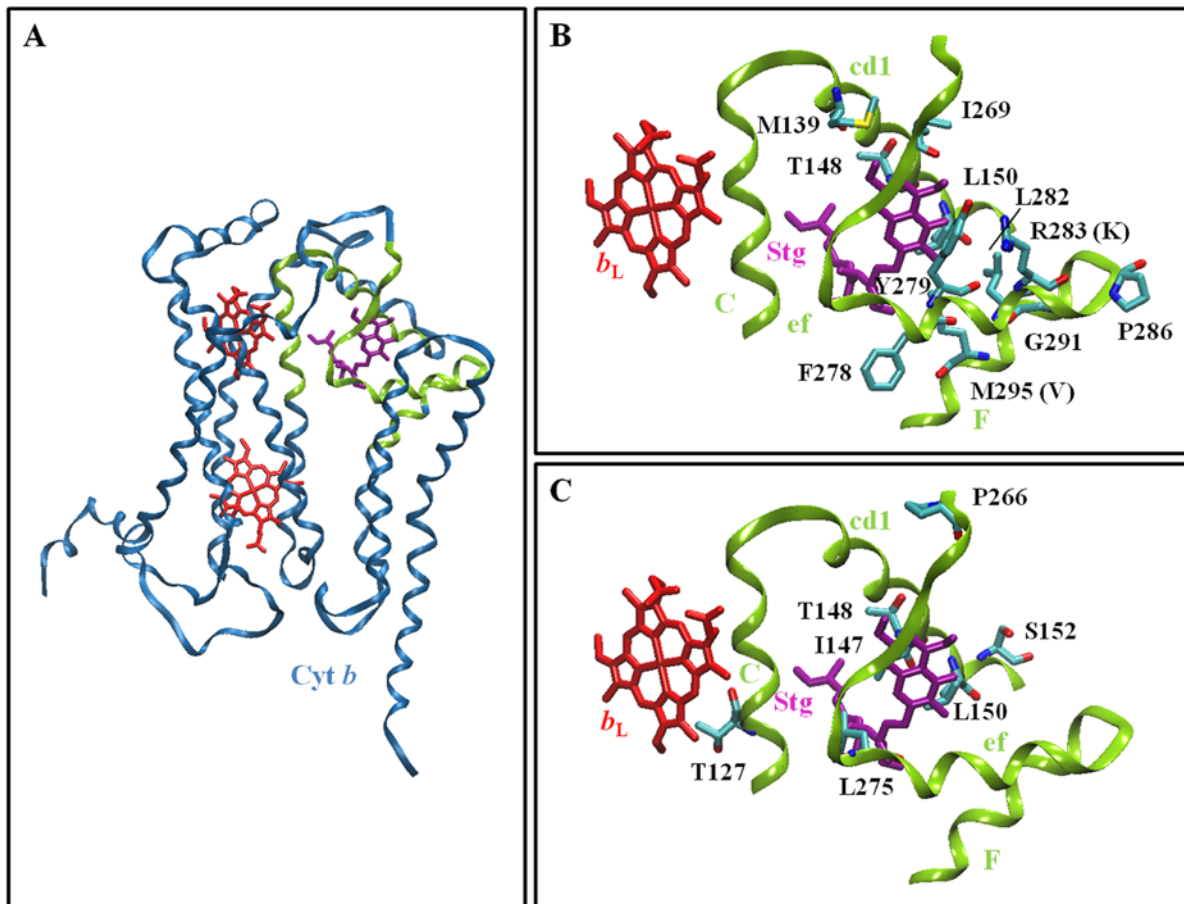


Figure 14: Localisation, dans le cytochrome *b*, des résidus mutés chez les pathogènes résistants à l'atovaquone. Ces résidus sont montrés dans le cytochrome *b* de levure liant la stigmatelline (stg) (1KY0.pdb) (A). (B) Résidus mutés chez *Plasmodium* et *T. gondii*. (C) Résidus mutés chez *P. jirovecii*. En vert, les hélices formant le site Q₀.

Les mutations Y279C et Y279S confèrent un haut degré de résistance à la drogue. Chez la levure, l'IC₅₀ est supérieure à 4 µM pour les mutants contre 60 nM pour la souche sauvage (Fisher & Meunier 2005). Lorsque la tyrosine 279 est remplacée par une cystéine ou une sérine, l'activité de l'enzyme chez la levure est sévèrement compromise (Fisher & Meunier 2005; Wenz et al. 2007). La perte de fitness observée chez le mutant levure a également été observée chez *Plasmodium*. Il a été montré récemment que la mutation Y279S induit une diminution de l'activité du complexe *bc*₁ du parasite et

affecte la stabilité de Rip1 dans le complexe expliquant la perte de fitness observée chez *P. falciparum* (Fisher et al. 2012). Cette instabilité de Rip1 due à la mutation n'a pas été observée chez *S. cerevisiae*. Une surexpression des gènes codant pour des sous-unités du complexe bc_1 chez les parasites portant la mutation Y279S a également été observée; les auteurs suggèrent que cette surexpression compense l'effet délétère de la mutation afin de maintenir la viabilité du parasite (Fisher et al. 2012). Comme la mutation induit une perte de fitness, on peut supposer qu'une réversion de la mutation apparaisse spontanément afin que le parasite récupère un fitness sauvage si l'atovaquone est retiré du marché. Il a aussi été montré, chez *R. capsulatus*, que cette mutation induit la production d'ERO par le complexe (Lee et al. 2011). La mutation Y279C a été également observé chez des patients présentant de sévère intolérance à l'exercice, une surdité et un retard mental (Fisher et al. 2004; Wibrand et al. 2001).

2. Inhibiteurs du site Q_i (Q_i Is)

Des Q_i Is, ciblant notamment le complexe bc_1 de la levure, sont connus depuis longtemps comme le diuron ou DCMU, un faible inhibiteur du complexe bc_1 mais qui est très actif contre le système photosynthétique (il était d'ailleurs utilisé comme herbicide) ; l'HQNO (2-n-Heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide), un composé synthétique ; le funiculosine, provenant de *Penicillium funiculosum* ; l'ilicoline H produit par *Cylindrocladium ilicicola* et l'antimycine isolé des *Streptomyces*.

A l'heure actuelle, seules deux drogues ciblant le site Q_i ont été commercialisées pour être employées contre les pathogènes. Il s'agit du cyazofamide et de l'amisulbrom. Ces molécules sont uniquement actives contre les oomycètes tels que *Phytophthora infestans* responsable du mildiou de la pomme de terre (Mitani et al. 2001).

Tout comme les mutations de résistance observées au niveau du site Q_o , les mutations de résistance aux Q_i Is obtenues en laboratoire induisent un encombrement stérique ou une perte des interactions drogue – site de liaison.

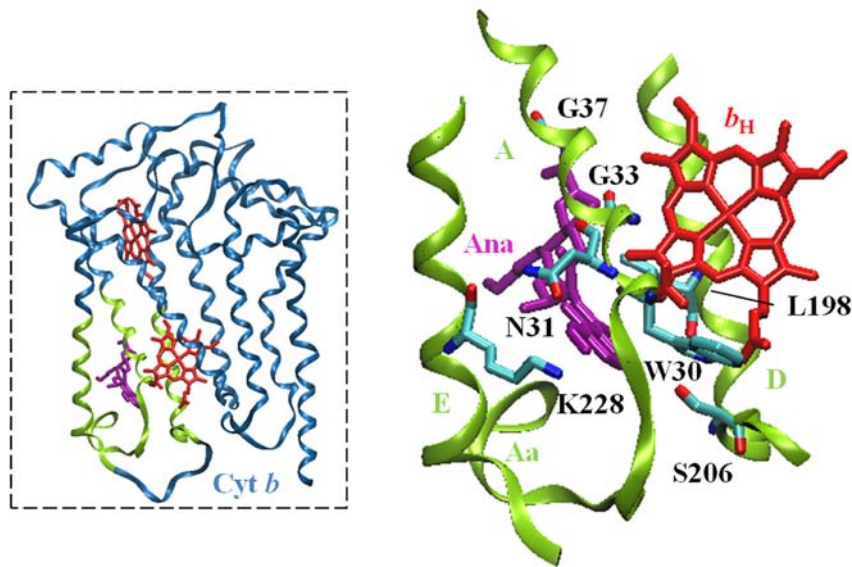


Figure 15: Localisation de résidus, qui mutés chez la levure, confèrent des résistances à différents inhibiteurs du site Q_i . Structure du cytochrome *b* du bœuf (1PPJ.pdb). En vert, les hélices constituant le site Q_i .

3. Inhibiteurs des deux sites

Il a été montré que certains inhibiteurs peuvent se loger dans les deux poches catalytiques ; c'est le cas de l'ascochlorine, un composé produit par le champignon phytopathogène *Ascochyta viciae* (Berry et al. 2010) et du NQNO (2-*n*-nonyl-4-hydroxyquinoline N-oxide) (Gao et al. 2003).

4. Développement de nouveaux inhibiteurs ciblant le complexe bc_1

a. Les antipaludiques

Face à l'augmentation des cas de résistance à l'atovaquone, de nouveaux composés ont été élaborés pour lutter contre la propagation de *Plasmodium* (pour revue, (Barton et al. 2010)). Parmi ces molécules, on retrouve d'autres hydroxynapthoquinones dont certaines sont efficaces contre les parasites porteurs de la mutation de résistance Y279S (Hughes et al. 2011). Des pyridones (Bueno et al. 2011), des benzodiazepines tétracycliques (Dong et al. 2011) et le décoquinate (Nam et al. 2011) présentent également cette caractéristique. D'autres inhibiteurs qui ont été développés possèdent l'avantage d'avoir un double mécanisme d'action ; c'est le cas des acridinediones et des acridones ainsi que de certaines quinolones. Les premiers, en plus d'inhiber le complexe

bc_1 du parasite, lie l'hème et prévient ainsi la formation d'hémozoïne (l'hème libre est toxique pour le pathogène) (Biagini et al. 2008). Certaines quinolones ciblent deux enzymes de la chaîne respiratoire de *Plasmodium* : le complexe bc_1 et la NADH déshydrogénase NDH2 (Biagini et al. 2012). Le chapitre I-B est consacré à la caractérisation d'un de ces nouveaux inhibiteurs, l'HDQ.

Chapitre I-B : HDQ, un puissant inhibiteur de la prolifération de *P. falciparum* ciblant le site Q_i du complexe bc_1

Dans ce sous-chapitre, nous caractérisons un puissant inhibiteur de la prolifération de *P. falciparum*, le 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone (HDQ). Nous avons montré que le complexe bc_1 du parasite sauvage et résistant à l'atovaquone est inhibé avec des concentrations en HDQ de l'ordre du nanomolaire indiquant notamment que l'HDQ et l'atovaquone ont une cible différente dans le complexe. Le site de liaison de l'inhibiteur a été déterminé en utilisant la levure comme organisme modèle. Nous avons ainsi observé que les mutations G33A, H204Y, M221Q et K228M localisées dans le site Q_i confèrent un haut degré de résistance à la drogue et suggèrent une liaison de ce composé au site Q_i . La modélisation du docking d'HDQ dans la poche catalytique Q_i soutient les données obtenues par l'analyse de la sensibilité à la drogue des mutants. Cette étude montre ainsi que le site Q_i peut être utilisé comme cible d'antipaludiques.

b. Les fongicides

La résistance au famoxadone, un fongicide Q_oI appartenant à la famille des oxazolidinediones, s'est développée plus lentement que la résistance aux inhibiteurs de type MOA comme l'azoxystrobine ou le kresoxim-méthyle. De ce fait, des dérivés d'oxazolidinediones ont été conçus afin de découvrir de nouveaux fongicides efficaces contre les phytopathogènes (Wang et al. 2011). Dans le but également d'identifier de nouveaux composés capables d'inhiber la fonction respiratoire de ces champignons, nous avons mis en place un test rapide de criblage. Cette méthode est décrite dans le chapitre II-B de la thèse.

Chapitre II-B: Développement d'un test rapide pour cribler, dans des chimiothèques, des drogues capables d'inhiber la fonction respiratoire.

De nombreux fongicides, ciblant les complexes II et III de la chaîne respiratoire, sont utilisés en agriculture. Ils sont actifs contre un large spectre de phytopathogènes. Malheureusement, un nombre croissant de cas de résistance a été rapporté. De nouvelles molécules capables de contourner les mutations de résistance sont donc attendues. De ce fait, nous avons développé un test rapide, basé sur l'utilisation de la levure et du triphenyltetrazolium chloride, pour identifier des inhibiteurs de la fonction respiratoire au sein de chimiothèques. Ce criblage, suivi par une série de tests, nous a permis d'identifier un nouvel inhibiteur du complexe III ; la molécule d12. Nous avons montré que cette drogue, qui ne ressemble à aucun autre inhibiteur du complexe III, n'a pas d'effet sur l'enzyme bovine et est capable d'inhiber la croissance du mutant G143A qui est fortement résistant aux fongicides Q_oIs. En utilisant une collection de mutants des sites Q_o et Q_i, nous avons montré que d12 cible le site Q_o de l'enzyme et que son activité inhibitrice est diminuée par la mutation L275F. De manière intéressante, une phénylalanine est naturellement présente en position 275 dans le complexe III des mammifères et pourrait expliquer la différence de sensibilité à d12 entre l'enzyme bovine et celle de la levure. Des dérivés de d12 (plus actifs) pourraient être développés comme fongicides.

5. Sensibilité différentielle aux drogues

Les poches catalytiques portées par le cytochrome *b* sont bien conservées entre les organismes. Cependant, il existe des variations qui pourraient expliquer la différence de sensibilité aux drogues (Figure 16). Cette différence de sensibilité est nécessaire pour qu'un composé soit développé comme antimicrobiens. En effet, la drogue doit inhiber efficacement l'enzyme du pathogène et doit avoir une faible réactivité envers l'enzyme des mammifères.

Région Q₀

		C		cdI				ef		F	
<i>Sc</i>	125	IATAFLGYCCVYGQMSHWGATVITNLFSAIP	155	-----	251	LGHDPNYIPGNPLVTPASIVPEWYLLPFYAILRSIPDKLLGVITMFAAI	299				
<i>Hs</i>	124	MATAFMGYVLPWGQMSFWGATVITNLLSAIP	154	-----	250	LGDPDNYTLANPLNTPPHIKPEWYFLFAYTILRSVPNKLGGVLALLLSI	298				
<i>Bt</i>	124	MATAFMGYVLPWGQMSFWGATVITNLLSAIP	154	-----	250	LGDPDNYTPANPLNTPPHIKPEWYFLFAYAILRSIPNKLGGVLALAFSI	298				
<i>Pj</i>	98	IVTAFVGYVLPWGQMSLWGATVITNLSAIP	128	-----	224	LGHSDNYIMANPMATPPSIVPEWYLLPFYAILRSIPNKLFGVAVMLAAI	272				
<i>Pf</i>	119	IVTAFVGYVLPWGQMSYWGATVITNLLSSIP	149	-----	240	LSHPDNAIVVNTYVTPSQIVPEWYFLPFYAMLKTVPSKPAGLVIVLLSL	288				
<i>Tg</i>	124	IATAFLGYVLPWGQMSFWGATVITNLLSIP	154	-----	245	LSHPDNSIPVNRFTPLHIVPEWYFLAYYAVLKVIPSKTGGLLVFMSSL	293				
<i>Bc</i>	125	IVTAFVGYVLPWGQMSLWGATVITNLSAVP	155	-----	252	LGDSDNYIMANPMQTPPAIVPEWYLLPFYAILRSIPNKLGVIAMLSAI	300				
<i>Pv</i>	125	MATAFMGYVLPWGQMSFWGATVITNLFSAIP	155	-----	251	LGHDPNYIEANPMKTPHLHIVPEWYFLPFYAILRSIPNKLGGVIAMFGSL	299				

Région Q_i

		A				D				E	
<i>Sc</i>	16	YIIDSPQSSINYNWNNMGSLLGLCLVIQIVTGIFMAMHY	54	-----	191	AAMVINMHLMALH-IHGSSNPLGITGNLDRIPMHSYFIFKDL	230				
<i>Hs</i>	17	SFIDLPTPSNISAWNFGSLLGACILQITGLFLAMHY	55	-----	190	AALALHLLFLH-ETGSSNPLGITSHSDKITFHEYYTIKDA	229				
<i>Bt</i>	17	AFIDLPAASNISWNNFGSLLGICILQILTGLFLAMHY	55	-----	190	MAIAMVHLLFLH-ETGSSNPTGISSDVDKIPFHEYYTIKDI	229				
<i>Pj</i>		-----YLNWYGSLSGLCLIIQIITGVTLAMHY	27	-----	164	LALVVAHLISLH-VHGSSNPLGVTGNSDRLPFFHYPFSFKDL	203				
<i>Pf</i>	12	HLINYPCLNINFLWNYGFLGIIFFIQQIITGVFLASRY	50	-----	181	LCIVFIHIFFLH-LHGSTNPLGYDTAL-KIPFYENLLSLDV	219				
<i>Tg</i>	16	HLVFYRCALNLSYNGFLVAMTFVLIQIITGITLAFRY	54	-----	186	CIIIVLHIFYLH-LNGSSNPAIDTAL-KVAFYPHMLMTDA	224				
<i>Bc</i>	16	YMIDSPQSSNLSYLNWYGSLLAVCLVIQIITGVTLAMHY	54	-----	191	AALALMHLIALHDSAGSGNPLGISGNYDRLAFAPYFLFKDL	231				
<i>Pv</i>	16	HLIDYPTPINLNYFYGSLAGIMLVVQILTGITLAMHY	54	-----	191	VGAVLIHLLH-EVGSNPLGITLTKTENIPFYFYFTKDL	230				

Figure 16: Alignement de la séquence des régions Q₀ et Q_i du cytochrome *b* de plusieurs organismes. En bleu, les résidus conservés entre la levure et les autres organismes. En rouge, la phénylalanine en position 275 qui pourrait être impliquée dans la différence de sensibilité à l'atovaquone. Les astérisques indiquent la position de mutations de résistance à des Q₀Is et Q_iIs (Tableau 1). *Sc*: *Saccharomyces cerevisiae*; *Hs*: Homme; *Bt*: Bœuf; *Pj*: *Pneumocystis jirovecii*; *Pf*: *Plasmodium falciparum*; *Tg*: *Toxoplasma gondii*; *Bc*: *Botrytis cinerea*; *Pv*: *Plasmopara viticola*.

a. Sensibilité différentielle aux Q₀Is

Le complexe *bc*₁ de la levure tout comme celui de *P. falciparum* est plus sensible à l'atovaquone que l'enzyme des mammifères. La modélisation de la liaison de l'atovaquone dans la poche catalytique de l'enzyme de levure suggère que le résidu en position 275 joue un rôle clé dans la sensibilité différentielle. En effet, la présence d'une phénylalanine dans l'enzyme de mammifère pourrait gêner la liaison de la drogue. La phénylalanine étant remplacée par une leucine chez la levure, la contrainte stérique serait moindre et la sensibilité à l'inhibiteur accrue (Kessl et al. 2003). On retrouve aussi une leucine dans l'enzyme de *Pneumocystis jirovecii* qui est également sensible à l'atovaquone. Des mutations de résistance à l'atovaquone ont été rapportées chez ce pathogène dont la mutation L275F. Cette dernière a été introduite dans la levure et le mutant résultant de cette transformation est aussi résistant à la drogue (Hill et al. 2003; Kessl et al. 2003). Cependant, dans le cytochrome *b* de *Plasmodium* comme celui de *Toxoplasma*, une phénylalanine est naturellement présente en position 275. Or ces parasites possèdent un complexe *bc*₁ fortement sensible à l'inhibiteur. De ce fait,

d'autres variations pourraient expliquer la différence de sensibilité à ce Q_oI entre les enzymes du parasite et de l'Homme. L'identification de ces variations fait l'objet du chapitre I-A de cette thèse.

Chapitre I-A: Etude de la sensibilité différentielle entre les enzymes de *S. cerevisiae*, de *P. falciparum* et de l'Homme à des antipaludiques ciblant le site Q_o du complexe *bc*₁.

Les enzymes de la levure et de *P. falciparum* sont fortement sensibles à l'atovaquone tandis que l'enzyme de mammifère l'est faiblement. Dans le but d'identifier les résidus impliqués dans la sensibilité/résistance à l'atovaquone mais également à un autre antipaludique, RCQ06, nous avons construit une série de mutants dans lesquels des résidus de la levure ont été remplacés par leurs équivalents chez l'Homme et chez *P. falciparum*. Nous avons ensuite analysé la sensibilité de ces différents mutants aux deux inhibiteurs. Le résidu en position 275 semble jouer un rôle clé dans la sensibilité différentielle. En effet, dans le cas de RCQ06, la phénylalanine stabilise la drogue dans la poche catalytique tandis que dans le cas de l'atovaquone, ce résidu confère une résistance à ce Q_oI. Malgré la présence de F275, l'enzyme du parasite est sensible à l'atovaquone ; cette sensibilité pourrait s'expliquer par la combinaison d'autres variations qui annuleraient la résistance induite par la phénylalanine.

b. Sensibilité différentielle aux Q_iIs

Les premières études sur la sensibilité différentielle aux Q_iIs ont été faites par Rotsaert et ses collaborateurs. Ils ont montré que le funiculosine, l'ilicoline H et l'antimycine, qui possèdent des caractéristiques structurales communes, ont un mode d'inhibition qui diffèrent significativement (Rotsaert et al. 2008). L'antimycine, contrairement aux deux autres inhibiteurs, agit de manière très efficace sur l'enzyme des différents organismes. Les structures du complexe *bc*₁ de bœuf et de poulet en présence d'antimycine montrent que le site de liaison de l'antimycine et celui de la quinone se chevauchent (Huang et al. 2005; Berry et al. 1999). Les résidus S34, K228, D229 participent à la formation de liaisons hydrogène avec la drogue. L'ilicoline H est actif contre le complexe *bc*₁ de la levure (IC₅₀ 3-5 nM), moins contre celui du bœuf (IC₅₀

200-250 nM) et n'inhibe pas le complexe de la bactérie *Paracoccus denitrificans*. Le funiculosine, quant à lui, inhibe l'enzyme de la levure et celle du bœuf avec une IC₅₀ d'environ 10 nM et le complexe de *P. denitrificans* avec une IC₅₀ dix fois plus élevée. La comparaison des séquences et des structures du complexe bc₁ de différents organismes montre des caractéristiques communes dans la liaison de la quinone. Cependant, un certain nombre de résidus proches du site de liaison de celle-ci (dans les 5 Å) ne sont pas conservés (S20, Q22, L198 et M221 par exemple) ce qui pourrait expliquer les différences de sensibilité aux Q_iIs.

Des différences de sensibilité à deux autres Q_iIs ont également été observé ; il s'agit du cyazofamide et de l'amisulbrom. Ces molécules sont uniquement actives contre les oomycètes. Cette différence de sensibilité entre l'enzyme de levure et celle des oomycètes fait l'objet d'une étude décrite dans la chapitre II-C de la thèse.

Chapitre II-C : Etude de la différence de sensibilité de plusieurs organismes aux antioomycètes ciblant le site Q_i du complexe bc₁.

Deux molécules qui cibleraient le site Q_i du complexe bc₁ ont été récemment commercialisées ; il s'agit du cyazofamide et de l'amisulbrom. Ces drogues sont uniquement actives contre l'enzyme des oomycètes tels que *Phytium*, *Phytophthora* et *Plasmopara*. L'enzyme de levure est naturellement résistante à ces deux molécules. Afin d'identifier les résidus impliqués dans cette sensibilité différentielle, le site Q_i des oomycètes sera construit progressivement dans la levure et l'effet de ces variations sur la sensibilité aux deux composés sera ensuite analysé. En parallèle, nous avons testés les Q_iIs sur deux autres organismes : l'algue verte, *Chlamydomonas reinhardtii*, et le parasite, *Plasmodium falciparum*. La comparaison des séquences du cytochrome *b* montre que ces deux organismes partagent des variations dans le site avec les oomycètes. Cette analyse pourrait guider la construction d'un modèle levure sensible aux antioomycètes.

En résumé, cette thèse porte sur les inhibiteurs du complexe bc₁ qui sont de puissantes drogues contre d'importants pathogènes de l'Homme (Plasmodium, Toxoplasma, Pneumocystis) et de plantes (champignons et oomycètes phytopathogènes). Malheureusement, de nombreux cas de résistance à ces molécules sont apparus. De ce fait, il est important de développer de nouveaux traitements. La levure Saccharomyces cerevisiae sera utilisée comme outil pour identifier et caractériser de nouveaux composés (HDQ et d12, Chapitres I-B et II-B) mais également pour contrôler l'évolution de mutations de résistance existantes (G143A, Chapitre II-A). Le cytochrome b de la levure sera aussi remodelé pour mimer les poches catalytiques des organismes pathogènes (Plasmodium falciparum et oomycètes) et de l'Homme afin d'étudier l'impact de variations dans les sites de liaisons des inhibiteurs, entre ces organismes, sur la sensibilité aux drogues (Chapitre I-A et II-C). Les données obtenues pourraient permettre de concevoir des molécules à réactivité spécifique et les mutants construits pourront servir au criblage de chimiothèques afin d'identifier de nouveaux composés et à l'étude de l'apparition de mutations de résistance aux inhibiteurs du complexe bc₁.

RESULTATS

Chapitre I : Les antipaludiques ciblant le complexe bc_1

Le paludisme est une maladie parasitaire endémique dans plus d'une centaine de pays de la zone intertropicale. L'organisation Mondiale de la Santé a estimé que sur près de 3 milliards d'individus exposés dans le monde, le paludisme a touché environ 216 millions de personnes en 2010 avec près de 655 000 cas mortels principalement des enfants de moins de cinq ans. Le continent africain est de loin le plus touché avec 81% des cas (Organisation mondiale de la Santé 2011).

L'agent responsable du paludisme est un protozoaire du genre *Plasmodium*. Cinq espèces infectent l'Homme : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae*, *P. ovale* et *P. knowlesi* (pour revue, (Greenwood et al. 2008)). *P. falciparum* est responsable de la quasi-totalité des cas graves et mortels de paludisme. Le parasite alterne son cycle de développement entre deux hôtes : un moustique hématophage femelle du genre *Anopheles* et l'Homme chez qui on dénote deux phases, une phase hépatocytaire asymptomatique et une phase érythrocytaire symptomatique.

A partir des années 40, des molécules aux propriétés antipaludiques ont été développées comme la chloroquine qui inhibe la détoxification de l'hème en hémazoïne (Dorn et al. 1998) et la pyriméthamine et la sulfadoxine qui sont deux inhibiteurs de la synthèse des acides nucléiques (Ferone et al. 1969; Triglia et al. 1997). Cependant, des cas de résistance à ces drogues ont été rapportés (pour revue, (Le Bras et al. 2006)). De nouveaux composés ont alors été mis au point ; c'est le cas notamment de l'atovaquone, une hydroxynaphthoquinone, qui inhibe le complexe bc_1 du parasite (Fry & Pudney 1992).

Quelques mots sur la chaîne respiratoire de Plasmodium...

Plasmodium se trouve chez le moustique dans un environnement riche en oxygène et dépourvu de glucose. L'ATP produit va alors provenir de la phosphorylation oxydative (Boysen & Matuschewski 2011). *A contrario*, chez l'Homme le parasite devient

microaérophile et ne peut donc vivre qu'en présence d'une faible concentration en oxygène (optimum entre 0,5 et 3%) (Scheibel et al. 1979). De ce fait, sa principale source d'ATP provient non pas de la phosphorylation oxydative mais de la glycolyse anaérobie (Sherman 1979). Les enzymes de la chaîne respiratoire sont cependant présentes chez le parasite car elles vont avoir pour rôle de générer un potentiel de membrane nécessaire au transport de métabolites et de protéines à travers la membrane interne mitochondriale mais également de ré-oxyder des enzymes du métabolisme et, en particulier, la dihydroorotate déshydrogénase (DHOD) impliquée dans la synthèse des pyrimidines. La DHOD, localisée dans la membrane interne de la mitochondrie, a besoin pour fonctionner que le pool de quinones soit maintenu en place par le complexe bc_1 car ces quinones vont lui servir d'accepteur d'électrons (Painter et al. 2007) (Figure 17). La synthèse des pyrimidines est essentielle à la survie du parasite puisqu'il est incapable d'utiliser celles de l'hôte (Van Dyke et al. 1970). La chaîne respiratoire du parasite va également permettre de réduire la formation d'espèces réactives de l'oxygène en éliminant l'oxygène.

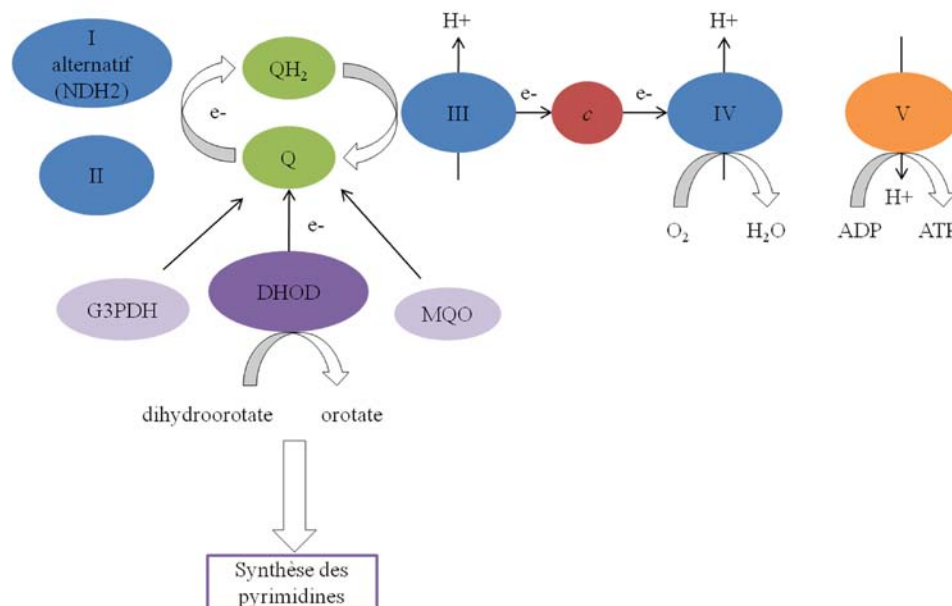


Figure 17: Importance du complexe III dans le métabolisme de Plasmodium. Le complexe III va participer à la production d'ATP et au maintien du potentiel de membrane nécessaire au transport des métabolites et des protéines à travers la membrane interne mais va également permettre la réoxydation de nombreuses enzymes du métabolisme (la glycérol-3-phosphate déshydrogénase (G3PDH), la malate:quinone oxydoréductase (MQO) et la dihydroorotate déshydrogénase (DHOD)). La DHOD est impliquée dans la synthèse des pyrimidines qui sont essentielles à la survie du parasite. En bleu, les enzymes de la chaîne respiratoire : I, complexe I alternatif ou NDH2 ; II, complexe II ; III, complexe III ; IV, complexe IV. En vert, la quinol (QH_2) et la quinone (Q). En rouge, le cytochrome c. En orange, l'ATP synthase (V).

... et sur l'atovaquone

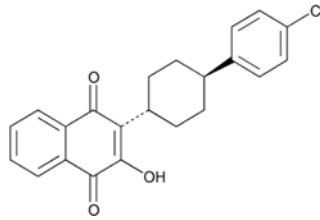


Figure 18: Structure de l'atovaquone

L'atovaquone (Figure 18) est à l'heure actuelle associée en thérapie à une autre molécule, le proguanil, sous le nom de Malarone®. Le proguanil métabolisé par l'organisme en cycloguanil va permettre d'inhiber la synthèse des purines et des pyrimidines au niveau de la dihydrofolate réductase parasitaire (Carrington et al. 1951) tandis que le proguanil non métabolisé va agir en synergie avec l'atovaquone sur le potentiel de membrane ; l'ajout de proguanil va ainsi permettre de multiplier par huit le niveau de dépolarisation membranaire dû à l'atovaquone seule (Srivastava & Vaidya 1999). La cible du proguanil n'a pas encore été identifiée contrairement à celle de l'atovaquone. Cette dernière présente l'avantage d'être active aux différents stades du cycle du parasite (Figure 19) et est bien tolérée par les enfants et les femmes enceintes.

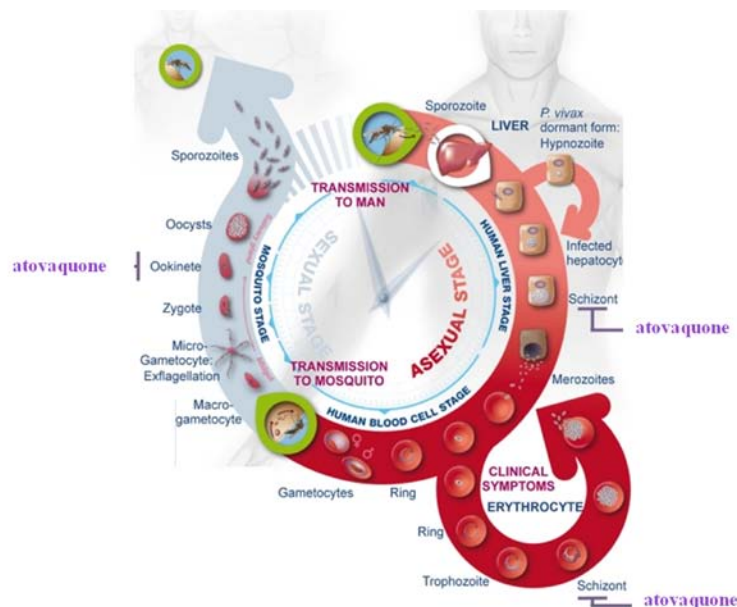


Figure 19: Activité de l'atovaquone à travers le cycle de vie de *Plasmodium* chez l'Homme (en rouge) et chez le moustique (en gris). L'atovaquone agit aux différents stades du cycle parasitaire chez l'Homme (phase hépatocytaire et érythrocytaire) et chez le moustique (Figure adaptée de (Delves et al. 2012))

Tout comme la stigmatelline et le myxothiazole, l'atovaquone est un inhibiteur compétitif spécifique du site Q_o du complexe bc_1 ($K_i = 9$ nM) (Kessl et al. 2003). Les travaux de Korsinczky et de Kessl présentés dans l'introduction de cette thèse ont permis d'établir un modèle de liaison de l'atovaquone à la poche catalytique Q_o (Korsinczky et al. 2000; Kessl et al. 2004, 2005). Ainsi, l'hydroxyle du cycle quinone de l'inhibiteur se lierait *via* une liaison hydrogène à l'azote de l'histidine 181 de Rip1 et le carbonyle en position 4 de ce même cycle interagirait *via* une molécule d'eau à l'acide glutamique 272 du cytochrome *b* (Figure 13). Le reste des interactions atovaquone-cytochrome *b* seraient essentiellement hydrophobes et impliqueraient des résidus à chaînes aromatiques ou aliphatiques proches de la drogue (résidus dans les régions 117-155 et 251-300 du cytochrome *b*).

L'atovaquone, en se fixant dans le complexe bc_1 , va entraîner une inhibition du transfert des électrons ainsi qu'une dépolarisation de la membrane (Srivastava et al. 1997). L'arrêt du transfert des électrons conduit à une inhibition de la respiration de 73% (Murphy & Lang-unnasch 1999) ainsi qu'à une inhibition importante de l'activité de la DHOD et, par conséquent, de la synthèse des pyrimidines (Ittarat et al. 1994). L'atovaquone pourrait également avoir des cibles secondaires telle que la DHOD, comme cela a été montré chez le rat (Hansen et al. 2004), ou des enzymes de la synthèse de l'ubiquinone, comme cela a été décrit chez *Pneumocystis* (Basselin et al. 2005).

Cette molécule est employée dans le traitement du paludisme car elle est efficace contre l'enzyme du parasite et possède une faible réactivité envers l'enzyme humaine. Cette différence de sensibilité pourrait s'expliquer par des variations entre la séquence du cytochrome *b* de ces deux organismes. Au cours de ma thèse, j'ai étudié l'impact de ces variations sur la sensibilité à l'atovaquone mais également à un autre antipaludique, RCQ06. Les résultats de cette étude sont décrits dans la partie A de ce chapitre et font l'objet d'une publication en préparation.

Malheureusement des résistances à l'atovaquone ont été rapportées chez des parasites issus de patients ayant subi un échec thérapeutique et dans des parasites cultivés *in vitro* en présence de la drogue comme je l'ai écrit précédemment dans l'introduction de la thèse. Ces mutations de résistance sont localisées dans les régions 117-155 et 251-300 du cytochrome *b* (Tableau 1 et Figure 14). La résistance à l'atovaquone est conférée soit par un encombrement stérique (exemple : I269M (I258M

chez *Plasmodium*) soit par une perte d'interaction entre la protéine et la drogue (exemples : F278I (F267I chez *Plasmodium*) et Y279C/S/N (Y268C/S/N chez *Plasmodium*)). La mutation de résistance L282V (L271V chez *Plasmodium*) va, quant à elle, induire une rotation du résidu en position 279 entraînant une perte de l'interaction entre ce résidu et l'atovaquone.

Les mutations de résistance ont un impact socio-économique considérable. Au niveau de l'individu, les échecs thérapeutiques générés par ces résistances augmentent la mortalité liée à la maladie (Trape 2001) et la persistance des parasites accroît le risque d'anémie chez le patient et, de ce fait, la fréquence des transfusions sanguines avec tous les risques que cela comporte dans les pays du tiers monde (transmission du VIH, hépatite...). D'un point de vue collectif, les résistances augmentent le taux de transmission du paludisme ce qui a un réel impact sur l'économie des pays touchés. On estime à environ 15 euros le coût d'un accès palustre soit l'équivalent de 21 jours de travail d'une personne dans la plupart des zones d'endémie et à plus de 9 milliards d'euros la perte annuelle du PIB liée au paludisme en Afrique subsaharienne (Pradines et al. 2010). De ce fait, il est devenu important de développer de nouveaux inhibiteurs capables d'inhiber spécifiquement et efficacement le complexe bc_1 du parasite et notamment des parasites résistants à l'atovaquone. La partie B de ce chapitre de ma thèse aura pour but de caractériser un nouvel inhibiteur du complexe bc_1 de *P. falciparum*, HDQ. Ce projet a fait l'objet d'un article.

Chapitre I-A : Etude de la sensibilité différentielle entre les enzymes de la levure, de *P. falciparum* et de l'Homme à des antipaludiques ciblant le site Q_o du complexe bc₁

I. Introduction

Comme présenté dans l'introduction de la thèse, des variations interespèces dans le site Q_o pourraient expliquer les différences de sensibilité à l'atovaquone observées entre l'enzyme de levure, de *Plasmodium* et de l'Homme. Dans le but de déterminer quels résidus sont impliqués dans la sensibilité/résistance à l'atovaquone mais également à un autre antipaludique, RCQ06, nous avons construit une série de mutants dans lesquels des résidus de levure ont été remplacés par leurs équivalents chez l'Homme et chez *P. falciparum*. La modélisation du site Q_o de *P. falciparum* est décrite dans la partie II.A. et celle de l'Homme dans la partie II.B. Nous avons ensuite caractérisé ces nouvelles enzymes et en particulier leur sensibilité aux inhibiteurs (partie II.C).

II. Résultats

A. Modélisation du site Q_o de *P. falciparum* dans la levure

1. Choix des variations introduites dans la levure

La comparaison de séquence du cytochrome *b* de la levure et du parasite, tous deux sensibles à l'atovaquone, montre que la région Q_o est bien conservée entre ces deux organismes. Il existe cependant des variations au niveau des résidus qui seraient impliqués dans la liaison à l'atovaquone à savoir les résidus en position 275 (L/F), 283 (R/K), 295 (M/V), 296 (F/L) et 299 (I/L) (Figure 20). La leucine en position 275 chez la levure est remplacée par une phénylalanine chez le parasite comme chez la plupart des eucaryotes. Cette phénylalanine introduite chez *S. cerevisiae* confère une résistance à l'atovaquone (Hill et al. 2003). De la même façon, l'arginine en position 283, naturellement présente chez la levure, correspond à une mutation de résistance à

l'atovaquone retrouvée chez *Plasmodium*. Il semble donc que plusieurs résidus soient impliqués dans la sensibilité à cette drogue.

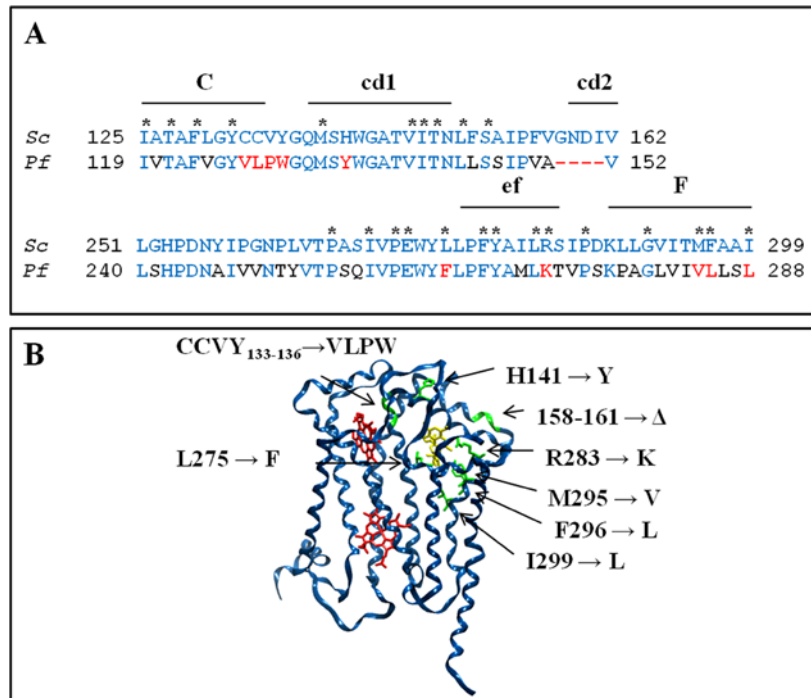


Figure 20: Résidus modifiés dans le site Q_o de la levure pour mimer la poche catalytique de *Plasmodium*. (A) Alignement de la séquence de la région Q_o du cytochrome *b* de la levure (*Sc*) et de *P. falciparum* (*Pf*). En bleu, les résidus conservés entre la levure et le parasite. En rouge, les résidus modifiés dans cette étude. Les astérisques indiquent la position des résidus qui seraient en contact avec l'atovaquone ((Korsinczky et al. 2000) et Tableau 1). (B) Localisation des résidus modifiés dans le cytochrome *b* de levure (1KY0.pdb). La stigmatelline est représentée en jaune.

D'autres changements pourraient avoir un impact sur la sensibilité à l'atovaquone comme les résidus en position 133-136 et 141. La levure possède un motif Cys-Cys-Val (CCV) en position 133-135 qui est remplacé par Val-Leu-Pro (VLP) dans la plupart des autres organismes dont *P. falciparum* et les résidus en position 136 et 141 diffèrent également entre la levure et la plupart des autres organismes (ici, Y136W et H141Y). Il existe également une différence notable, à proximité du site Q_o, entre ces deux eucaryotes qui correspond à une délétion de quatre résidus au niveau de l'hélice cd2. Cette délétion pourrait affecter l'architecture de la poche catalytique, et par conséquent, la liaison des inhibiteurs. De manière intéressante cette délétion est présente chez l'ensemble des Apicomplexa (*Plasmodium*, *Toxoplasma*, *Babesia*, *Eimeria*, *Theileria*...).

Six mutants portant différentes combinaisons de ces variations ont été construits par transformation par balistique comme décrit dans (Hill et al. 2003) (Tableau 2) puis analysés.

Tableau 2: Mutants possédant des résidus « *Plasmodiumisés* »

Mutant	Mutations
PF1	CCVY ₁₃₃₋₁₃₆ VLPW, H141Y
PF2	CCVY ₁₃₃₋₁₃₆ VLPW, H141Y, L275F
PF3	Δ158-161
PF4	CCVY ₁₃₃₋₁₃₆ VLPW, H141Y, Δ158-161, L275F
PF7	CCVY ₁₃₃₋₁₃₆ VLPW, H141Y, Δ158-161, L275F, R283K, M295V, F296L, I299L
PF8	L275F, R283K, M295V, F296L, I299L

2. Impact des variations sur la croissance respiratoire, l'assemblage et l'activité du complexe *bc*₁

L'impact de ces variations sur la croissance respiratoire a été analysé (Figure 21). Les mutants PF1, PF2 et PF8 ne présente pas de défaut de croissance sur milieu respiratoire glycérol/éthanol contrairement aux mutants PF3, PF4 et PF7. Ces derniers, qui sont incapables de croître sur milieu respiratoire, ont en commun la délétion des résidus 158-161.

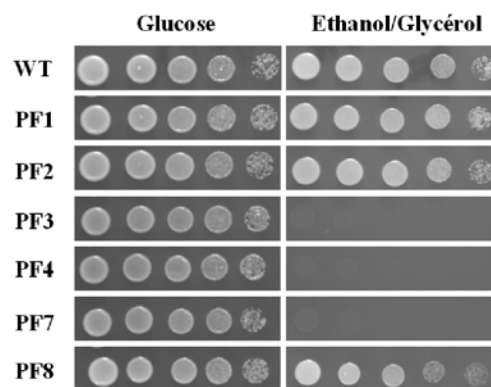


Figure 21: Impacts des variations sur la croissance des mutants « *Plasmodiumisés* » sur milieu fermentescible (glucose) et sur milieu respiratoire (éthanol/glycérol). Des dilutions en séries des différentes souches ont été déposées sur les deux milieux et mises à incuber pendant deux jours à 28°C.

Un défaut d'assemblage du complexe *bc*₁ dû à la délétion pourrait expliquer l'absence de croissance ; l'assemblage des sous-unités catalytiques de l'enzyme a donc été analysé (Figure 22). Le niveau du cytochrome *b* des différents mutants, mesuré par spectrophotométrie sur cellules intactes, est diminué de 30% pour les mutants portant la délétion et de 20% pour les mutants PF2 et PF8 par rapport au sauvage. Le mutant PF1, quant à lui, ne présente pas de perte de cytochrome *b*. Le niveau du cytochrome *c*₁

et de Rip1 analysé par western blot est également très peu ou pas affecté ; par exemple, le mutant PF4 présente, comme pour le cytochrome *b*, une diminution de 30% des deux sous-unités catalytiques. L'assemblage du complexe bc_1 du mutant portant la délétion seule (PF3) a également été analysé par BN-PAGE. Comme attendu après les deux premières analyses (spectres de cytochromes et western blot), l'anticorps anti-Cyt c_1 révèle la présence des supercomplexes III_2+IV_2 et III_2+IV chez le sauvage et le mutant PF3. En cas de défaut d'assemblage, une diminution sévère de Rip1 aurait été observée par western blot – la sous-unité étant vite dégradée si elle n'est pas correctement assemblée dans le complexe – et l'accumulation d'un pré-complexe III en BN-PAGE (Cruciat et al. 1999; Schägger & Pfeiffer 2000).

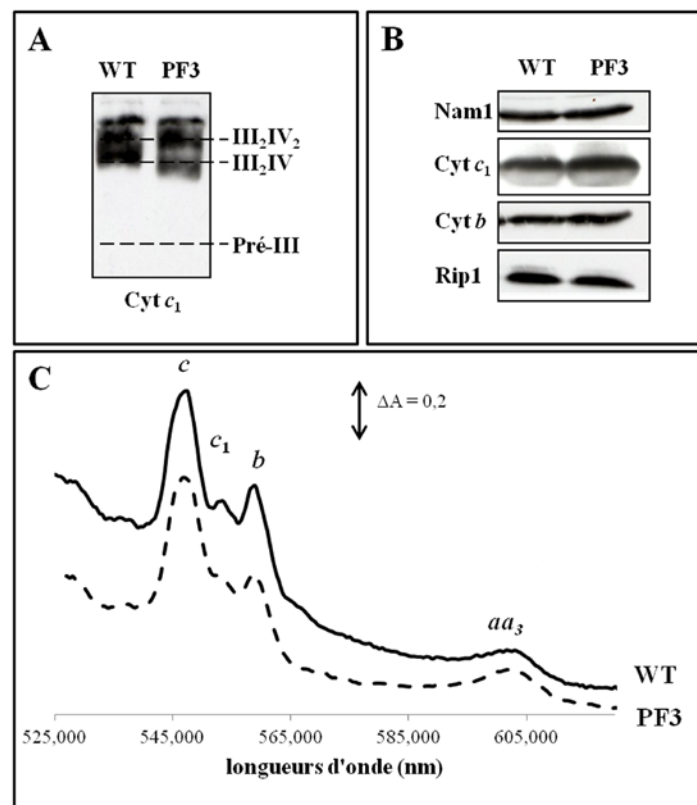


Figure 22: Impact de la délétion des résidus 158-161 sur l'assemblage du complexe bc_1 . (A) L'assemblage du complexe bc_1 a été analysé par BN-PAGE. Pour cela, les mitochondries ont été solubilisées avec un détergent, la digitonine, qui préserve les interactions entre les complexes puis déposées sur gel. Un western blot a ensuite été effectué. Le complexe bc_1 a été détecté avec un anticorps anti-Cyt c_1 . (B) Le niveau des sous-unités catalytiques du complexe bc_1 , dans les préparations de mitochondries, a été analysé par SDS-PAGE suivi d'un western blot. Les anticorps utilisés sont : anti-Cyt c_1 , anti-Cyt b , anti-Rip1 et anti-Nam1 ; ce dernier sert de contrôle de charge. (C) Le niveau des cytochromes *c*, c_1 , *b* (complexe III) et aa_3 (cytochrome oxydase) a été mesuré par spectrophotométrie sur cellules intactes. (Lemaire & Dujardin 2008)

Le défaut d'assemblage ne pouvant expliquer l'absence de croissance sur milieu respiratoire, l'activité quinol – cytochrome *c* réductase des mutants a été mesurée (Tableau 3). L'activité des mutants PF2 et PF8 n'est pas affectée. Le mutant PF1 présente une diminution de près de 50% de l'activité comparé au sauvage ce qui n'a pas d'impact sur sa croissance. Par contre, l'activité du complexe *bc*₁ des mutants PF3, PF4 et PF7 est diminuée de plus de 85% par rapport au sauvage. Le défaut de croissance sur milieu respiratoire peut donc s'expliquer par une perte importante de l'activité du complexe. D'après les données de Denke et ses collaborateurs, un minimum de 30% d'activité de l'enzyme serait requis pour la croissance des levure sur une source de carbone non fermentescible (Denke et al. 1998). La liaison de la quinol dans la poche catalytique ne semble pas être affectée par la délétion ; le K_m pour la quinol des enzymes PF3, PF4 et PF7 étant similaire au K_m pour la quinol de l'enzyme sauvage.

Tableau 3: Activité et propriétés catalytiques du complexe *bc*₁ des mutants « *Plasmodiumisés* ». Les conditions expérimentales sont présentées l'annexe 1. ^a Cytochrome *c* réduit par complexe *bc*₁ par seconde en utilisant 20 μ M de décylubiquinol (DQH₂). Les mesures ont été r p t es au moins deux fois et moyenn es. L'erreur n'excède pas 10% des valeurs pr sent es (20% pour PF3, PF4 et PF8 qui présentent une faible activité). Les valeurs sont repr sent es en % de l'activité du WT. ^b La V_{max} représente l'activité DQH₂ – cyt *c* réductase maximale mesur e à 550 - 540 nm. ^c Le K_m pour la DQH₂ est déduit, comme pour la V_{max} , de la titration de l'activité DQH₂ – cyt *c* réductase avec des concentrations croissantes en substrat (représentation Eadie-Hofstee). ^d Le k_{min} (V_{max}/K_m) représente l'efficacité catalytique de l'enzyme pour la DQH₂.

Souche	Activité (%) ^a	V_{max} (s ⁻¹) ^b	K_m (DQH ₂ μ M) ^c	k_{min} ^d
WT	100	160	2,7	59
PF1	52	98	4,5	22
PF2	105	170	3,7	46
PF3	14	22	2,9	8
PF4	12	18	1,6	11
PF7	8	15	2,8	5
PF8	107	165	4,3	38

3. Recherche de supresseurs capables de compenser l'effet délétère de Δ 158-161

Comme la mutation cause un sévère défaut de croissance sur milieu respiratoire, il est possible de sélectionner des supresseurs c'est-à-dire des clones capables de

pousser sur milieu respiratoire et obtenus à partir du mutant PF3 haploïde. L'analyse de ces supresseurs devrait nous apporter des informations sur la cause de la perte d'activité du mutant PF3 et nous permettre d'obtenir une enzyme fonctionnelle. Deux approches ont été utilisées pour identifier des supresseurs : la sélection directe de clones capables de croître sur milieu respiratoire obtenus spontanément ou après traitement mutagène et la sélection de supresseurs multicopies obtenus après transformation du mutant PF3 avec une banque génomique. En utilisant la première approche, on recherche des mutations secondaires compensatrices dans le génome nucléaire (traitement UV) ou dans le génome mitochondrial (traitement au chlorure de manganèse) ; en utilisant la seconde approche, on espère trouver des gènes qui surexprimés permettraient de restaurer la croissance respiratoire.

a. Recherche de supresseurs multicopies

50 clones ont été sélectionnés parmi les clones capables de croître sur milieu respiratoire et sur ces 50 clones, 5 présentent une co-ségrégation entre le marqueur porté par le plasmide et la croissance respiratoire. Les cinq inserts ont été séquencés. Sur les 5 clones, 2 portent le gène *TAR1* qui code pour une protéine impliquée dans la régulation du métabolisme respiratoire. Il a été montré en 2002 que la surexpression de Tar1p permet de restaurer le phénotype de petite colonie dû à une mutation dans le domaine N-terminal de l'ARN polymérase mitochondriale (Coelho et al. 2002) (ce phénotype correspond à une déficience en ADNmit). Ce domaine étant impliqué dans la stabilité de l'ADNmit (Wang & Shadel 1999) et interagissant avec Nam1p (Rodeheffer et al. 2001) et Sls1p (Bryan et al. 2002), deux protéines impliquées dans l'expression des gènes mitochondriaux au niveau post-transcriptionnel, les auteurs suggèrent que Tar1p augmente l'efficacité de la phosphorylation oxydative directement ou indirectement en influençant la stabilité de l'ADNmit ou l'expression des gènes mitochondriaux à un niveau post-transcriptionnel (Coelho et al. 2002). Les 3 autres gènes identifiés sont *CAD1*, *PPX1* et *IMP2*. Cad1p est un facteur de transcription impliqué dans de nombreuses voies (réponse au stress, métabolisme du fer, résistance à des drogues) et contrôle de nombreux gènes impliqués dans la stabilité des protéines (Azevedo et al. 2007; Vilela et al. 1999). Ppx1p présente dans toute la cellule et notamment dans la matrice mitochondriale participe au processus bioénergétique en hydrolysant les

polyphosphates inorganiques (Beauvoit et al. 1989). Imp2p est une sous-unité catalytique du complexe peptidase de la membrane interne mitochondriale requis pour la maturation de protéines de l'espace intermembranaire et notamment du cytochrome c_1 (Nunnari et al. 1993; Luo et al. 2006).

La surexpression de ces différents gènes pourrait permettre d'augmenter la biogénèse mitochondriale et ainsi permettre au mutant de croître sur milieu respiratoire. Cependant, la surexpression de ces différents gènes restaure que très faiblement la croissance du mutant.

b. Recherche de mutations compensatoires

53 clones ont été sélectionnés parmi les clones capables de croître sur milieu respiratoire (après traitement mutagène ou non). Sur ces 53 clones, 10 sont réellement capables de pousser sur un milieu contenant de l'éthanol ou du glycérol. Une analyse génétique a permis de classer ces supresseurs en deux groupes : les supresseurs nucléaires récessifs (8/10) et les supresseurs nucléaires dominants (2/10). Aucune mutation secondaire dans le génome mitochondrial n'a été identifiée. Comme pour les supresseurs multicopies, la croissance de ces deux groupes de supresseurs sur milieu respiratoire est relativement faible. En parallèle, l'effet des mutations « supresseur » sur la croissance respiratoire d'une souche ayant une chaîne respiratoire sauvage a été observé. Pour obtenir de telles souches, les supresseurs (Su) possédant le génome mitochondrial PF3 ([PF3]) ont été traités au BET afin de leur faire perdre leur ADNmit puis le génome mitochondrial sauvage a été introduit dans la Su[ρ^0] par cytoduction (Annexe 2). Les mutations secondaires ne confèrent pas de phénotypes particuliers. Nous avons ensuite procédé à l'identification des mutations secondaires.

i. Suppresseurs de classe I

Pour les supresseurs de classe I, nucléaires récessifs, une approche de séquençage haut-débit a été effectuée en collaboration avec la plateforme d'Imagif. Un des huit supresseurs a été séquencé. L'apparition d'un codon stop dans le gène codant pour Sin4p a été identifiée. Sin4p est une sous-unité de l'ARN polymérase II. Cette sous-unité

participe à la fois à la régulation positive et négative de la transcription (Li et al. 1995; Myers & Kornberg 2000). Cette mutation a été aussi trouvée chez un des sept autres suppresseurs de classe I. Ces suppresseurs permettent à la levure de restaurer partiellement la croissance sur milieu respiratoire et n'ont pas d'effet direct sur le complexe *bc*₁. L'analyse de ces suppresseurs n'a donc pas été plus approfondie.

ii. *Suppresseurs de classe II*

Pour les suppresseurs de classe II, nucléaires dominants, une approche gène candidat a été utilisée. Les résidus 158-161 étant localisés dans l'hélice cd2 c'est-à-dire proche de Rip1 (environ 10 Å), le gène codant pour cette sous-unité a été séquencé. Su46 présente une mutation dans la région de liaison flexible de la protéine (A90V) et Su49 possède une mutation à proximité de ce domaine (K93E). Cette partie de la protéine de Rieske (S₈₁MTATADVLAMA₉₂ chez la levure) joue un rôle primordiale dans le mouvement de la sous-unité et donc dans le transfert des électrons du cytochrome *b* au cytochrome *c*₁ (Tian et al. 1998; Nett et al. 2000; Darrouzet et al. 2001).

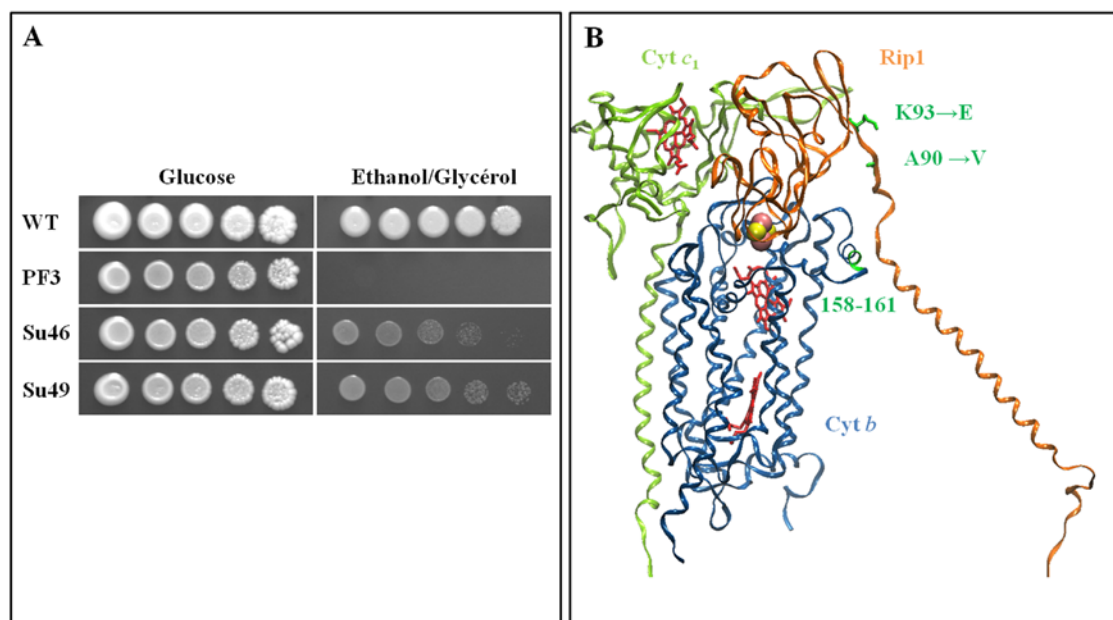


Figure 23: Des mutations dans la région de liaison flexible de Rip1 sont capables de compenser l'effet délétère de la délétion des résidus 158-161. (A) Des dilutions en série de chaque souche sont déposées sur milieu fermentescible (glucose) et respiratoire (éthanol/glycérol) et mises à incuber 6 jours à 28°C. (B) Localisation des deux mutations compensatoires dans la domaine flexible de Rip1 (1KY0.pdb).

Il se pourrait donc que la délétion induise une modification importante de l'architecture de Cyt *b* ce qui causerait une mauvaise interaction entre cette sous-unité catalytique et Rip1 et par conséquent, un ralentissement dans le transfert des électrons du cytochrome *b* vers les cytochromes *c* et *c*₁. Des mesures de réduction de ces cytochromes ont été effectuées sur notre mutant PF3 par Gaël Brasseur et montrent, comme on peut le voir figure 24, un ralentissement de la réduction des cytochromes *c* + *c*₁ ; la réduction de Cyt *b* n'est pas affectée par la délétion.

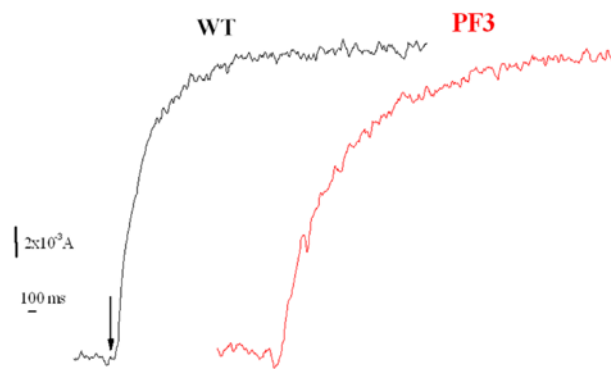


Figure 24: Cinétique de réduction des hèmes des cytochromes *c*+*c*₁ dans le complexe *bc*₁ de la souche sauvage et du mutant PF3. Un mélange de NADH (2mM) et KCN (2mM) a été utilisé pour initier la réduction des hèmes (marquée par une flèche). La réaction a été suivie à 551/540nm. Données fournies par Gaël Brasseur.

Plusieurs hypothèses peuvent être émises quant à la nature de la modification induite par la délétion. Celle-ci pourrait, par exemple, rapprocher l'hélice cd2 du domaine flexible et ainsi perturber le mouvement de Rip1 ou éloigner le domaine catalytique de Rip1 de la plateforme de « docking ». Dans le cas de la mutation G167E, localisée dans l'hélice cd2 et retrouvée chez des patients atteints de cardiomyopathie (Valnot et al. 1999), la première hypothèse avait été émise ; G167 étant à 5Å des résidus formant le domaine flexible de Rip1 (Fisher et al. 2004). En 2004, il a été montré que des mutations localisées dans le domaine flexible de Rip1 peuvent compenser l'effet délétère des mutations A144F (Brasseur et al. 2004), S152P et G291D (Fisher et al., 2004) (Figure 25A). La mutation A144F conduit à une déficience respiratoire chez la levure qui peut s'expliquer par une perte importante de l'activité du complexe *bc*₁ due à une modification de l'affinité de l'enzyme pour la quinol (Brasseur et al. 2004). Les mutations S152P et G291D, associées à une intolérance à l'exercice (Legros et al. 2001;

Dumoulin et al. 1996), induisent une perte de la sous-unité Rip1 et donc une perte de l'activité de l'enzyme (Fisher et al. 2004). Les mutations des résidus 85, 92 et 93 compensent uniquement A144F. Les auteurs suggèrent que ces mutations permettent, en altérant la structure de la région de liaison de Rip1, un meilleur « docking » de la sous-unité sur le site Q_o altéré par A144F (Fisher et al. 2004). La mutation A90D qui restaure la croissance des mutants S152P et G291D stabiliserait la liaison de la protéine au complexe (Fisher et al. 2004).

Au vu de ces données, nous avons transformé une souche *RIP1* contenant la délétion des résidus 158-161 avec des plasmides centromériques portant le gène *RIP1* muté à différentes positions du domaine flexible puis nous avons suivi la croissance des différentes souches sur milieu respiratoire (Figure 25B). Les mutations T85S et A92D compensent l'effet délétère de la délétion au même niveau que les mutations A90V et K93E. Si on suit l'hypothèse émise par (Fisher et al. 2004), il se pourrait que la délétion entraîne une modification de la structure du cytochrome *b* et notamment de la plateforme sur laquelle va se positionner le domaine catalytique de la protéine fer-soufre entraînant ainsi un ralentissement du transfert des électrons du cytochrome *b* vers Rip1. Les mutations secondaires obtenues dans la région de liaison pourraient alors permettre une meilleure interaction entre les deux sous-unités catalytiques.

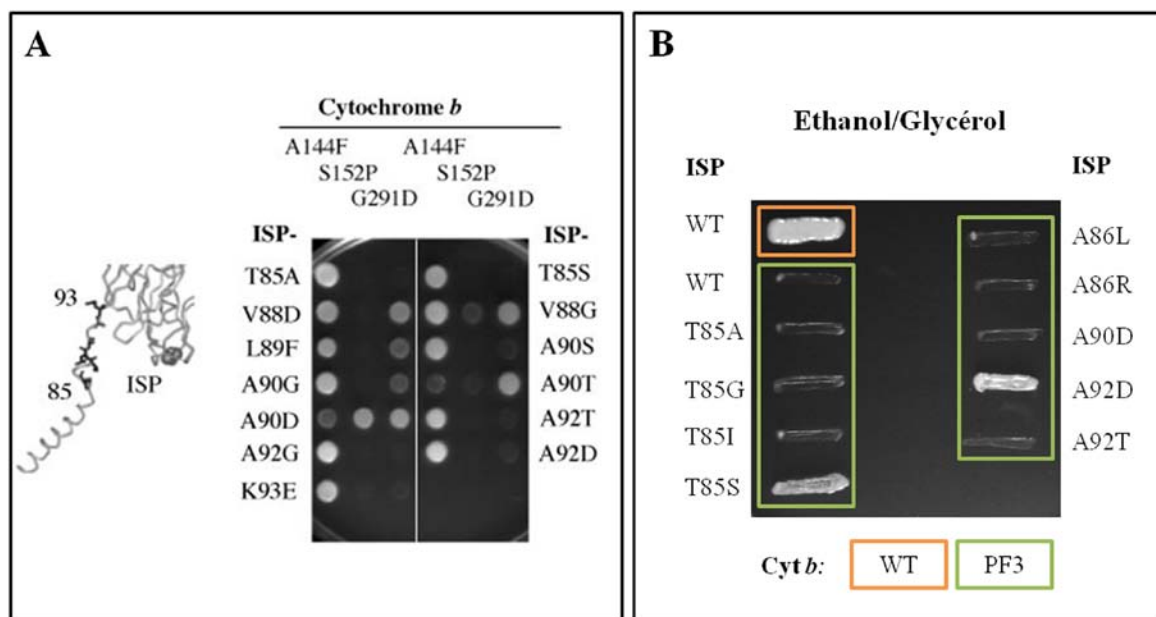


Figure 25: Croissance respiratoire de mutants combinant une mutation dans le cytochrome *b* et dans le domaine flexible de Rip1. Les souches combinant les mutations, dans le cytochrome *b*, A144F, S152P, G291D (A) ou Δ 158-161 (B) et dans la région de liaison de Rip1(ou ISP) sont inoculées sur milieu respiratoire et incubées 3 jours à 28°C. La Figure A est extraite de (Fisher et al. 2004).

L'activité quinol-cytochrome *c* réductase du mutant Su49 est à peine plus élevée que celle du mutant PF3 (18% pour Su49 contre 14% pour PF3) mais apparemment suffisante pour que la levure puisse croître sur milieu respiratoire. Cependant, lorsqu'on introduit la mutation compensatoire dans PF7, qui présente une activité plus faible que PF3 (Tableau 3), la souche est toujours incapable de croître sur milieu non fermentescible (Figure 26). Un seul changement ne semble donc pas être suffisant pour réajuster le site Q_o.

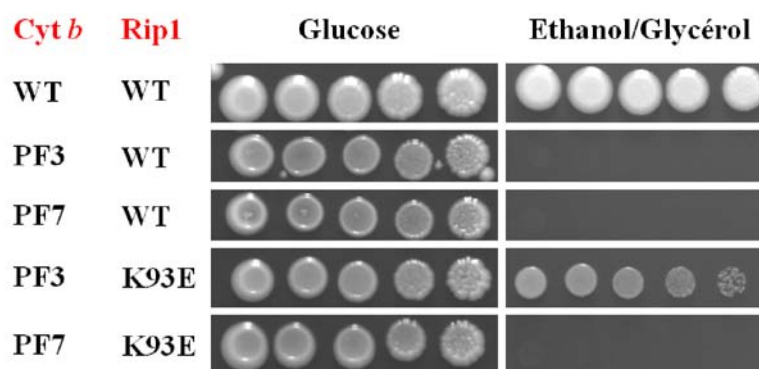


Figure 26: Croissance des mutants PF3 et PF7 avec ou sans mutation dans le domaine flexible de Rip1. Des dilutions en série de chaque souche sont déposées sur milieu fermentescible (glucose) et respiratoire (éthanol/glycérol) et mises à incuber 6 jours à 28°C.

iii. Autres modifications apportées à Rip1

Afin d'obtenir une enzyme pleinement fonctionnelle permettant une bonne croissance sur milieu respiratoire, d'autres modifications ont été apporté à Rip1.

Dans un premier temps, nous avons combiné deux (A90V et A92D) puis trois des mutations décrites précédemment (A90V, A92D et K93E). Comme cela est montré sur la figure 27, les deux types de combinaisons ne permettent pas de restaurer la croissance du mutant PF3 sur milieu respiratoire. Ces combinaisons sont également mal (A90V et A92D) voire pas (A90V, A92D et K93E) tolérées dans un contexte sauvage contrairement aux mutations seules.

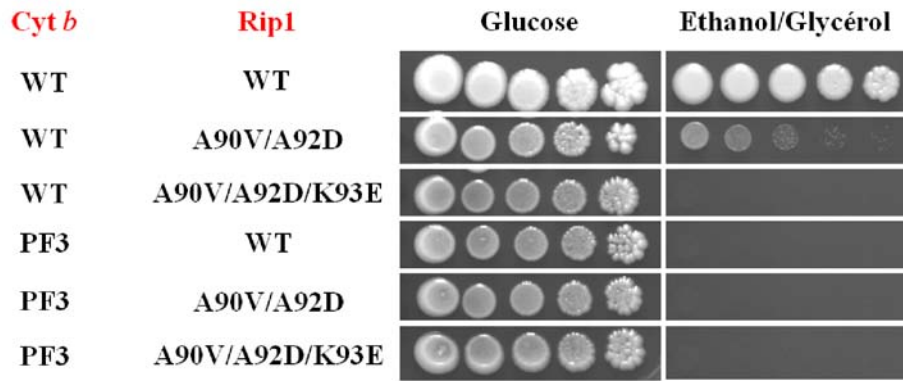


Figure 27: Croissance de la souche sauvage et du mutant PF3 portant deux (A90V et A92D) ou trois (A90V, A92D, K93E) mutations dans le domaine flexible de Rip1. Des dilutions en série de chaque souche sont déposées sur milieu fermentescible (glucose) et respiratoire (éthanol/glycérol) et mises à incuber 6 jours à 28°C.

En partant de l'hypothèse que la délétion entraîne une modification de la plateforme de « docking » de Rip1 – espace trop important entre les deux sous-unités catalytiques ou au contraire réduit – la longueur de la région de liaison flexible a été modifiée en ajoutant un résidu de petite taille à savoir une alanine entre la Val88 et la Leu89 ou en déléant l'alanine en position 90 (Figure 28A). Il a été montré que ce type de modification est relativement bien tolérée par la levure : les mutants sont capables de croître sur milieu respiratoire, présentent une activité diminuée de moitié comparé au sauvage et pas de perte de Rip1 (Nett et al. 2000). Cependant l'introduction, tout comme la délétion, d'une alanine ne permet pas de restaurer la croissance respiratoire du mutant PF3 (Figure 28B).

Un alignement des séquences du domaine flexible de Rip1 de la levure et de *P. falciparum* montre que cette partie de la sous-unité catalytique n'est pas conservée entre les deux organismes. Il se pourrait que la région flexible de la protéine de *P. falciparum* soit adaptée à la modification structurale engendrée par la délétion des résidus 158-161. Cette région a donc été introduite dans la levure. Ce changement n'est pas très bien toléré dans un contexte sauvage et ne permet pas de restaurer la croissance de PF3 sur milieu glycérol/éthanol (Figure 28C).

On ne peut pas exclure qu'en modifiant le domaine de liaison de la protéine fer-soufre afin de restaurer l'interaction *Cyt b* – Rip1, on ait perturbé l'interaction *Cyt c*₁ – Rip1.

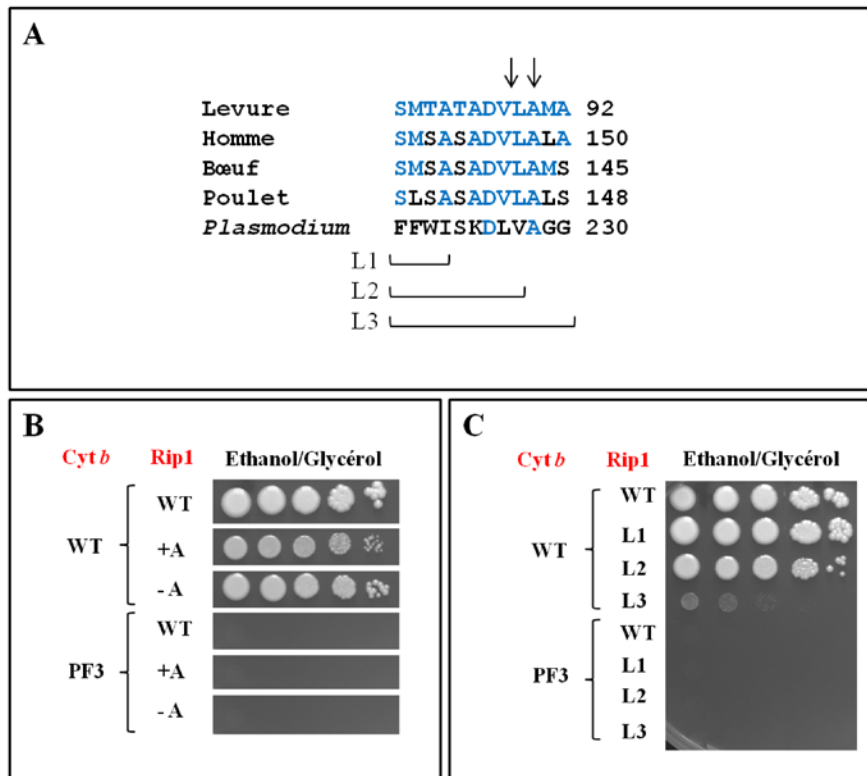


Figure 28: Impact de l'ajout ou de la délétion d'une alanine dans le domaine flexible de Rip1 ainsi que du remplacement de cette région par celle de *Plasmodium* sur la croissance respiratoire de la souche sauvage et du mutant PF3. (A) Alignement de la séquence du domaine flexible de la protéine fer-soufre de cinq organismes : la levure *S. cerevisiae*, l'Homme, le Bœuf, le Poulet et *P. falciparum*. En bleu, les résidus conservés entre la levure et les autres organismes. Les flèches indiquent la position de l'alanine introduite ou délétée. L1, L2, L3 correspondent aux trois étapes du remplacement de la région de liaison de Rip1 de la levure par celle du parasite. (B) Croissance respiratoire des souches dans lesquelles une alanine a été introduite entre la valine 88 et la leucine 89 (+A) ou délétée en position 90 (-A). (C) Croissance respiratoire des souches dans lesquelles le domaine flexible de Rip1 a été remplacé, en 3 étapes (L1 à L3), par celui de *P. falciparum*. Des dilutions en série de chaque souche sont déposées sur milieu respiratoire (éthanol/glycérol) et mises à incuber 6 jours à 28°C.

4. Conclusion et perspectives

La délétion des résidus 158-161 du cytochrome *b* empêche la levure de croître sur milieu respiratoire. Des mutations dans la région flexible de Rip1 permettant de compenser l'effet délétère de $\Delta 158-161$ ont été identifiées. Cependant, ces mutations compensatoires introduites dans le domaine flexible du mutant PF7 ne permettent pas de restaurer la croissance de la souche. Un seul changement ne semble donc pas être suffisant pour réajuster le site Q_o . Plusieurs modifications ont été apportées à Rip1 mais non malheureusement pas permis de compenser le défaut de croissance. La construction *in silico* d'un modèle de l'enzyme modifiée, par homologie avec des structures du

complexe bc_1 disponibles, pourrait permettre d'identifier les changements à effectuer dans les sous-unités qui permettraient de restaurer l'activité du complexe. Les mutants PF3, PF4 et PF7 présentent cependant suffisamment d'activité pour pouvoir faire une analyse de sensibilité différentielle *in vitro*.

Les différentes observations nous ont amené à nous intéresser au complexe bc_1 de *Plasmodium*. Comme mentionné précédemment, les poches catalytiques portées par le cytochrome *b* sont bien conservées (57% d'identité de séquences pour la région Q_o du parasite avec celle de la levure et 43% pour le site Q_i) mais le reste de la protéine l'est un peu moins (36% d'identité de séquences). On observe notamment des délétions/insertions qui modifient l'architecture de la protéine (Figure 29).

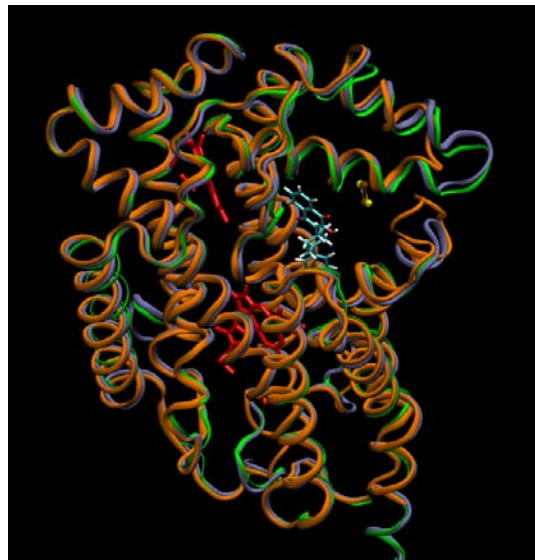


Figure 29: Superposition du cytochrome *b* de *S. cerevisiae* (violet), du bœuf (vert) et de *P. falciparum* (orange). Le cytochrome *b* de *Plasmodium* a été modélisé à partir de celui de la levure. Figure réalisée par Nicholas Fisher.

La protéine Rip1 du parasite fait environ 41kDa contre 23kDa pour celle de la levure (Figure 30). Le domaine portant le groupement [2Fe-2S] est bien conservé. Le rôle des 20kDa supplémentaire reste inconnu. Le blast de cette partie de la protéine ne nous a pas permis d'identifier des homologues avec d'autres protéines. De plus, seules quatre des sous-unités non catalytiques du complexes bc_1 de la levure (Qcr6p, Qcr7p, Qcr8p, Qcr9p, Qcr10p, Cor1p et Cor2p) ont été retrouvées chez le parasite à savoir Qcr6p (PF14_0248), Qcr7p (PF10_0120), Cor1p (PFE1155c) et Cor2p (PFI1625c); d'autres protéines pourraient jouer le rôle des autres sous-unités comme les 20kDa

supplémentaire de Rip1. Une analyse du complexe bc_1 par BN-PAGE/SDS-PAGE deux dimensions ou une immunoprécipitation avec un anticorps anti-complexe bc_1 pourraient permettre d'identifier l'ensemble des protéines composant l'enzyme. La technique de BN-PAGE/SDS-PAGE deux dimensions consiste à : (1) solubiliser les mitochondries avec un détergent, le lauryl maltoside, qui va permettre notamment de dissocier le complexe bc_1 du complexe IV avec qui il forme des supercomplexes (2) faire migrer les échantillons en BN-PAGE afin de séparer les complexes puis en SDS-PAGE pour séparer les différentes sous-unités. L'identification des protéines se fait ensuite par spectrométrie de masse. Le complexe bc_1 de *Plasmodium* semble donc être structuralement différent de celui de la levure ou des mammifères.

Levure	-----	
<i>Plasmodium</i>	MNNIKYVELFYKCKIFRKNGLNRIIRRNGGTFNHNKENERIPPAEDPSYKNLFDHAED	60
Levure	-----MLGIRS-----SVKTCFKPMS-----	16
<i>Plasmodium</i>	IKLWEIEEKQNVSHKKVEDLSELVEPSNHPHQYEGIFARTRYAHYNQTAEPVFPKPDLE	120
Levure	-LTSKR-LISQS-----LLASK-----STYRTPNFDDVLK	44
<i>Plasmodium</i>	KGELASGANVTRTDVWHNPKEPAIVSIGKFEPRNFRPAGYAENCNPESINSDHHPDFRE	180
Levure	ENNDA-DKGR- SYAYFMV GAMGLLS SAGAK STVETFISSMTATAD VLAMAKVE EVNLAaip	102
<i>Plasmodium</i>	YRLRSGNED RRS FM YF I S A S Y F F I M S S I M R S AICKSVH FFWISKDLVAGG TTELDMRTVN	240
Levure	LGKNVV KWQ GKPVFIRHRT PHEIQE ANSVD--MSALKDPQTDADRVKDP QWLIMLGICT	160
<i>Plasmodium</i>	PGEHV VIKWR GKPVF VK HRT PEDIQRA KEDEKLIQTMRDP QLDS DRTIK PEWLVNIGICT	300
Levure	HLGCV PIGEAGDFGG WFC CHGSHYDISGRIR KGPAPLNLEI PAYEFDGD-KVIVG	215
<i>Plasmodium</i>	HLGCV PAQ-GGNYS GYFC CHGSHYD NSGRIRQGPAPSNLEV PPYEFVDENTIKIG	355

Figure 30: Alignement de la séquence de Rip1 de la levure avec celle de *Plasmodium*. En gras, les résidus conservés entre les deux organismes. En rouge, le domaine transmembranaire (prédiction du domaine transmembranaire du parasite à l'aide du logiciel toppred). En vert, la région correspondant au domaine flexible de la protéine. En bleu, les résidus impliqués dans la liaison du cluster [2Fe-2S].

B. Modélisation du site Q_0 humain dans la levure

1. Choix des variations introduites dans la levure

Comme pour la modélisation du site Q_0 de *Plasmodium* dans la levure, la comparaison de séquence du cytochrome *b* de la levure et de l'Homme montre que la région Q_0 est bien conservée entre ces deux organismes et qu'il existe également des

variations au niveau des résidus impliqués dans la liaison aux Q_oIs qui pourraient expliquer la différence de sensibilité des enzymes à l'atovaquone (Figure 31). On retrouve notamment les variations en position 133-135 (CCV/VLP), 136 (Y/W), 141 (H/F) et 275 (L/F) ainsi que deux autres variations en position 278 (F/A) et 295 (M/L). Les résidus en position 275, 278 et 295 sont associées à des mutations de résistance à l'atovaquone chez *P. jirovecii* ou *Plasmodium*.

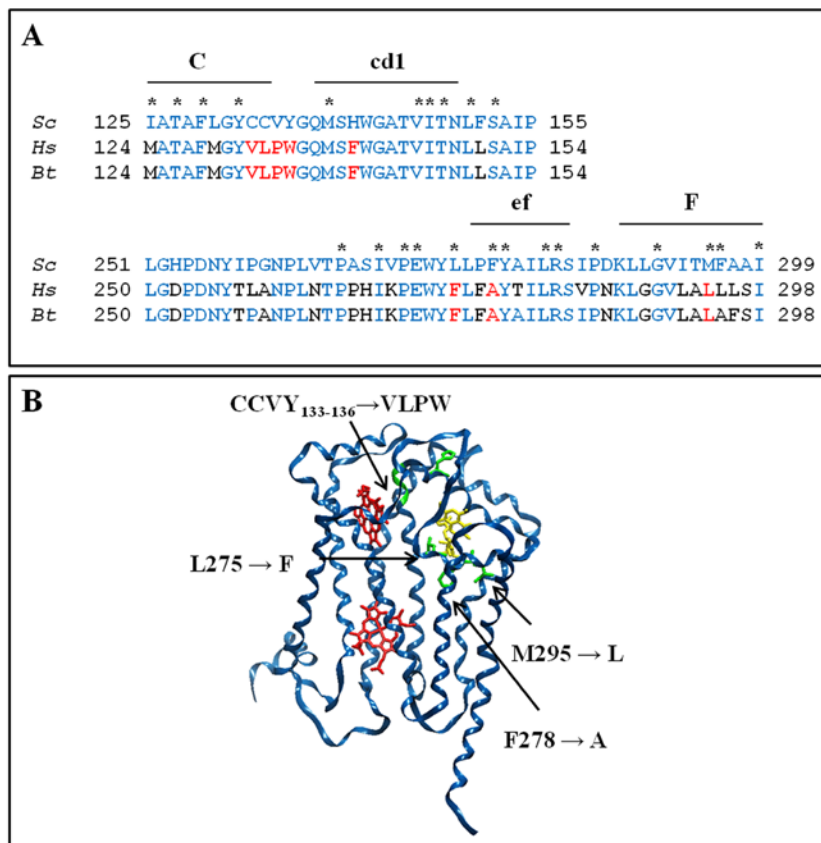


Figure 31: Résidus modifiés dans le site Q_o de la levure pour mimer la poche catalytique de l'Homme. (A) Alignement de la séquence de la région Q_o du cytochrome *b* de la levure (*Sc*), de l'Homme (*Hs*) et du bœuf (*Bt*). En bleu, les résidus conservés entre la levure et le parasite. En rouge, les résidus modifiés dans cette étude. Les astérisques indiquent la position des résidus qui seraient en contact avec l'atovaquone ([Korsinczky et al. 2000] et Tableau 1). (B) Localisation des résidus modifiés dans le cytochrome *b* de levure (1KY0.pdb). La stigmatelline est représentée en jaune.

Sept mutants possédant les mutations VLPWF, L275F, F278A, M295L seules ou combinées ont été construits (Tableau 4) puis analysés.

Tableau 4: Mutants possédant des résidus humanisés

Mutant	Mutations
LF	L275F
FA	F278A
ML	M295L
LFFA	L275, F278A
HS1	L275F, F278A, M295L
AB9	CCVY ₁₃₃₋₁₃₆ VLPW, H141F
AB21	CCVY ₁₃₃₋₁₃₆ VLPW, H141F, L275F, F278A, M295L

2. Impact des variations sur la croissance respiratoire, sur l'assemblage et l'activité du complexe bc₁

La croissance des mutants sur milieu respiratoire a été analysée dans deux contextes nucléaires différents : W3031-B (ou CW, notre de souche de référence) et JC8 (ou CK, qui possède une capacité respiratoire plus faible et qui nous permet d'observer plus facilement des différences de croissance entre les mutants) (Figure 32). Dans un contexte CW, les simples mutants ont une croissance sauvage ou quasi-sauvage. Le double mutant L275F-F278A comme le triple mutant L275F-F278A-M295L présente une diminution importante de la croissance respiratoire. L'introduction des variations VLPWF permet de restaurer partiellement cette croissance. Dans un contexte CK, où les différences entre les souches sont plus nettes, les mutants F278A et les mutants possédant les variations VLPWF poussent moins bien que les mutants M295L et L275F.

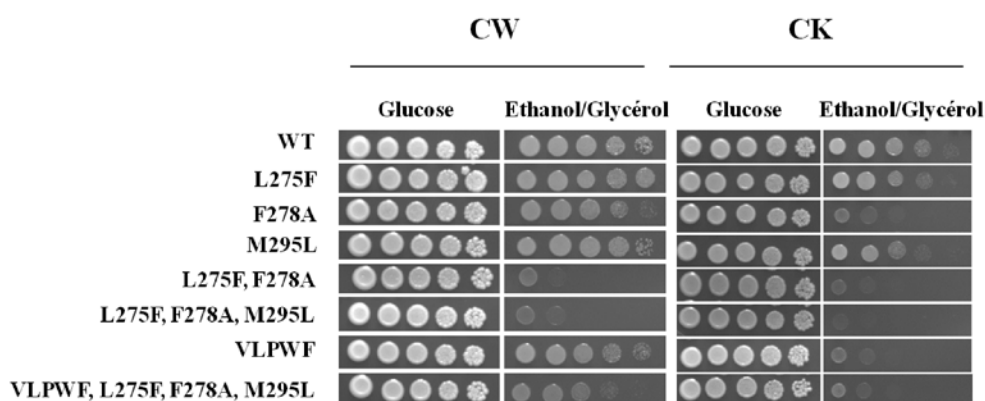


Figure 32: Impacts des variations sur la croissance des mutants humanisés sur milieu fermentescible (glucose) et sur milieu respiratoire (éthanol/glycérol). Les mutations ont été introduites dans deux contextes nucléaires différents : CW et CK. Des dilutions en séries des différentes souches ont été déposées sur les deux milieux et mises à incuber pendant trois jours à 28°C.

Afin de comprendre la diminution de la croissance respiratoire de certains mutants, le niveau de cytochrome *b* dans les cellules intactes a été mesuré par spectrophotométrie. Le niveau de cytochrome *b* des mutants est diminué de seulement 10 à 20% et n'explique donc pas la diminution sévère de la croissance sur milieu non fermentescible des mutants L275F-F278A et L275F-F278A-M295L. L'activité quinol-cytochrome *c* réductase des mutants a donc été mesurée (Tableau 5). Les mutations L275F et M295L seules ne semblent pas affecter l'activité du complexe. Les données obtenues montrent une diminution de près de 40% du mutant F278A par rapport au sauvage expliquant la diminution de croissance de ce mutant dans le contexte CK. Le triple mutant L275F-F278A-M295L présente une diminution d'activité d'environ 50% qui est restaurée par l'ajout des résidus VLPWF comme on peut l'observer en croissance. Le mutant combinant les mutations L275F et F278A présente une activité de 81% comparée au sauvage ce qui ne va pas dans le sens des données de croissance respiratoire où ce mutant a une croissance plus faible que le mutant F278A par exemple. A noter également, qu'il ne semble pas y avoir de modification de l'affinité de la quinol pour l'ensemble des mutants.

Tableau 5: Activité et propriétés catalytiques du complexe *bc*₁ des mutants humanisés. Les conditions expérimentales sont présentées l'annexe 1. ^a Cytochrome *c* réduit par complexe *bc*₁ par seconde en utilisant 20 μM de décyubiquinol (DQH₂). Les mesures ont été répétées au moins deux fois et moyennées. L'erreur n'excède pas 10% des valeurs présentées. Les valeurs sont représentées en % de l'activité du WT. ^b La V_{max} représente l'activité DQH₂ - cyt *c* réductase maximale mesurée à 550 - 540 nm. La V_{max} du WT est de 100 s⁻¹ contre 160 s⁻¹ pour le WT tableau 3 ; les deux séries de mutants - « *Plasmodiumisés* » et humanisés - ont le même génome mitochondrial (à l'exception des mutations introduites dans cette étude) mais ont un génome nucléaire différent (diploïde pour les mutants « *Plasmodiumisés* » et CW pour les mutants humanisés) ce qui change la valeur de l'activité du complexe *bc*₁ mais n'a pas d'effet les résistances/sensibilités aux inhibiteurs. ^c Le K_m pour la DQH₂ est déduit, comme pour la V_{max} , de la titration de l'activité DQH₂ - cyt *c* réductase avec des concentrations croissantes en substrat (représentation Eadie-Hofstee). ^d Le $k_{min} = V_{max}/K_m$.

Souche	Activité (%) ^a	V_{max} (s ⁻¹) ^b	K_m (DQH ₂ μM) ^c	k_{min} ^d
WT	100	100	3,4	29
L275F	111	105	3,3	32
F278A	61	63	3,1	20
M295L	123	119	3,2	37
L275F,F278A	81	75	3,3	23
L275F,F278A,M295L	47	43	3,2	13
VLPWF	34	32	4,0	8
VLPWF,L275F,F278A,M295L	89	96	4,2	23

3. Cas du mutant L275F-F278A (LFFA)

Afin de comprendre la différence observée entre la croissance respiratoire et l'activité quinol-cytochrome *c* réductase du double mutant, nous avons mesuré la consommation d'oxygène des cellules intactes à l'aide d'une électrode à oxygène de type Clark en présence d'un agent découpleur, le CCCP (carbonyl cyanide-*m*-chlorophenylhydrazone). L'électrode va enregistrer le courant électrique qui est proportionnel à la concentration en oxygène dissous dans le milieu. Le CCCP va dissiper artificiellement le gradient de protons ce qui entraîne une inhibition de la synthèse d'ATP; le transfert des électrons et la consommation d'oxygène sont alors à leur maximum. Les données montrent une diminution de près de 50% de la consommation du mutant LFFA comparé au sauvage mais également aux simples mutants, L275F et F278A (Figure 33). Ces données vont dans le même sens que celles obtenues avec les croissances sur milieu non fermentescible.

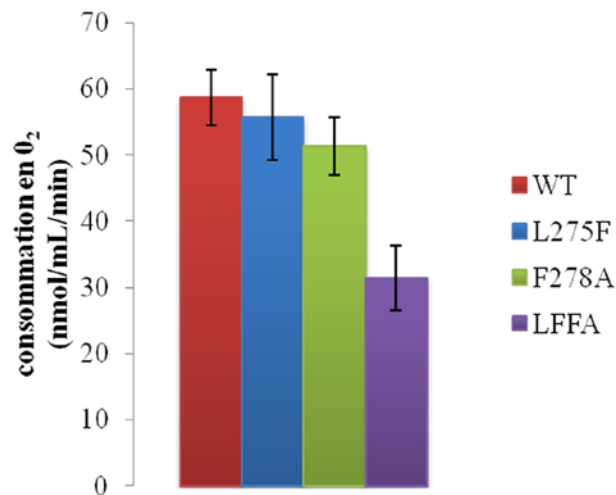


Figure 33: Consommation en oxygène de la souche sauvage et des mutants L275F, F278A et LFFA. La consommation en oxygène des cellules intactes a été mesurée à l'aide d'une électrode à oxygène et en présence de 10 μ M de CCCP. Pour toutes les souches analysées, une même quantité de cellules est utilisée pour la mesure (correspondant à une densité optique à 600nm dans la chambre de mesure de 4).

Une production d'espèces réactives de l'oxygène pourrait expliquer l'activité quinol-cytochrome *c* réductase élevée du mutant LFFA. En effet, lors de la mesure de cette activité, les ions superoxydes produits par le complexe III réduisent le cytochrome *c*. L'activité du complexe *bc*₁ du mutant a donc été mesurée en présence et en absence de deux enzymes du système antioxydant: la superoxyde dismutase qui catalyse la

dismutation du superoxyde en oxygène et peroxyde d'hydrogène et la catalase qui catalyse la dismutation du peroxyde d'hydrogène en oxygène et eau ; l'activité reste inchangée ce qui semble exclure la surproduction d'ERO.

La mesure d'activité du complexe bc_1 se fait en présence d'un substrat non naturel pour la cellule, la décylubiquinol, qui pourrait masquer une légère déficience. Lorsque nous mesurons l'activité NADH-cytochrome c réductase, c'est-à-dire en présence de la quinol native, on constate une diminution de l'activité du complexe de près de 40%. L'emploi de la décylubiquinol pourrait donc expliquer l'activité apparente du double mutant.

C. Analyse des différentes versions du complexe bc_1

Dans le but d'obtenir des informations sur la base structurale de la différence de sensibilité aux inhibiteurs du site Q_o entre l'enzyme de la levure, de l'Homme et de *P. falciparum*, nous avons comparé la sensibilité des différentes enzymes construites à deux antipaludiques : l'atovaquone, qui est le seul inhibiteur du complexe bc_1 du parasite à être commercialisé et RCQ06, qui a été développé récemment. Nous avons également étudié la sensibilité de ces enzymes à l'azoxystrobine, un fongicide employé en agriculture. RCQ06 a été décrit lors d'une étude sur le développement de quinolones comme antipaludiques (Cowley et al. 2012). Il a été montré que ce composé inhibe efficacement le complexe bc_1 du parasite ; l'IC₅₀ est d'environ 1,3 nM ce qui est du même ordre que l'IC₅₀ de l'atovaquone (Biagini et al. 2008). L'analyse *in silico* de la liaison de cet inhibiteur dans le site Q_o du complexe suggère que cette molécule se fixe dans une position distale de l'hème b_L et proximale du site de « docking » de Rip1 (Cowley et al. 2012), comme l'atovaquone. L'azoxystrobine, qui a également été testé, se fixe quant à elle dans une position proximale de l'hème b_L et distal de Rip1 (Esser et al. 2004). L'activité du complexe bc_1 des différentes constructions a été mesurée en présence de différentes concentrations en inhibiteurs afin de déterminer un IC₅₀ permettant de comparer les différentes constructions (Tableau 6). Cette étude fait l'objet d'un article en préparation joint en annexe.

1. Sensibilité des mutants à l'atovaquone

Comme cela a été cité précédemment, le complexe bc_1 de *P. falciparum* et de la levure sont fortement sensibles à l'atovaquone tandis que l'enzyme de mammifère est moins réactive. L'introduction du variant L275F dans la levure rend l'enzyme de cette dernière résistante à l'atovaquone (rapport IC_{50} L275F / IC_{50} WT est de 40). L'introduction de deux autres variants humains, à savoir, F278A et M295L confère également une résistance au composé qui est, cependant, moins importante que celle induite par l'introduction d'une phénylalanine en position 275. La combinaison des trois mutations cause une augmentation de la résistance. Lorsque les variations humaines en position 133-136 et 141 sont introduites dans le triple mutant, la résistance à l'atovaquone est diminuée mais l'enzyme reste 11 fois plus résistante que l'enzyme de levure sauvage avec un rapport IC_{50}/bc_1 de 60 ce qui est proche du rapport IC_{50}/bc_1 de 75 obtenu pour l'enzyme bovine. Ces données suggèrent que la combinaison de F275, A278 et L295 dans le complexe bc_1 humain est responsable de la faible réactivité de l'enzyme à l'atovaquone. Dans le cas du modèle « *P. falciparum* », lorsque la variation L275F est combinée à d'autres variations (VLPWY (PF2) ou Δ 158-161 (PF4) ou résidus 283-299 (PF8) ou l'ensemble (PF7)), l'impact de F275 sur la sensibilité à l'atovaquone est diminué ; l'enzyme PF7 est même plus sensible que l'enzyme de levure sauvage. La sensibilité de l'enzyme du parasite à l'atovaquone pourrait donc s'expliquer par la combinaison de variations (VLPWY, Δ 158-161, résidus 283-299) qui annulerait la résistance induite par F275.

2. Sensibilité des mutants à RCQ06

Comme cela a été décrit dans (Cowley et al. 2012) le complexe bc_1 de *P. falciparum* est sensible à RCQ06. Cependant, et contrairement à l'atovaquone, l'enzyme de levure est fortement résistante au nouvel antipaludique ($IC_{50}/bc_1 > 500$). De manière intéressante, l'introduction de la phénylalanine en position 275 n'induit pas une forte résistance, comme dans le cas de l'atovaquone, mais au contraire rend l'enzyme de levure fortement sensible à RCQ06 (IC_{50}/bc_1 de 10). Les autres variations humaines ou parasitaires, à l'exception de M295L (IC_{50}/bc_1 de 90), introduites chez la levure ne rendent pas l'enzyme plus sensible à la molécule. L'ensemble des mutants portant F275

sont sensibles à l'inhibiteur (IC_{50}/bc_1 de 5 à 50). La délétion $\Delta 158-161$ et les résidus 283-299 introduits dans la levure pour mimer l'enzyme de *Plasmodium* diminuent, cependant, l'effet de F275. RCQ06 serait donc, dans l'enzyme humaine et dans celle du parasite, stabilisé par un résidu aromatique en position 275 tandis que la liaison de l'atovaquone serait perturbée par ce résidu volumineux.

3. Sensibilité à l'azoxystrobine

L'atovaquone et RCQ06 se lient, tout deux, en position distale de l'hème b_L et interagissant avec la protéine fer-soufre, nous avons voulu tester l'impact des variants humains et du parasite sur la sensibilité de l'enzyme à l'azoxystrobine qui se lie en position proximale de l'hème b_L . L'enzyme de levure est sensible à ce QoI. L'azoxystrobine a une faible réactivité envers le complexe bc_1 des mammifères. Aucune donnée n'est disponible pour le complexe bc_1 de *Plasmodium*. Les résidus F275, A278 et L295 seuls ou combinés dans le modèle « humain » confèrent une résistance à l'azoxystrobine. Les changements en position 133-141 diminuent cette résistance. Comme pour l'atovaquone, la faible sensibilité de l'enzyme mammifère à l'azoxystrobine pourrait s'expliquer par la combinaison des trois résidus : F275, A278 et L295. Dans les mutants « *Plasmodium* », les résidus 275-299 confèrent une forte résistance à la molécule tandis que les variations 133-141 et la délétion des résidus 158-161 augmentent la sensibilité à l'azoxystrobine et masquent la résistance causée par F275. Il est probable que les changements structuraux induits par VLPWH et $\Delta 158-161$ stabilisent la drogue dans la poche catalytique.

Tableau 6: Mutants du site Q_o: sensibilité à l'atovaquone, RCQ06 et azoxystrobine. ^a Les valeurs présentées correspondent au rapport IC₅₀ sur la concentration en complexe bc₁ monomérique. Par exemple, 4 molécules d'atovaquone par complexe bc₁ de levure sauvage sont nécessaires pour inhiber l'activité quinol-cytochrome c réductase de 50%. ^b (Biagini et al. 2008). ^c (Cowley et al. 2012). ^d Les mitochondries de bœuf ont été fournies par P. Rich, UCL, Londres.

enzyme		IC ₅₀ inhibiteur/[bc ₁] ^a		
		atovaquone	azoxystrobine	RCQ06
Plasmodium		3 nM ^b	nd	1.3 nM ^c
Bovine^d		75	180	40
Levure				
Mutants « Plasmodiumisés »				
	WT	4	17	>500
PF7	VLPWY,Δ158-161, L275F ,R283K,M295V,F296L,I299L	1	10	30
PF3	Δ158-161	12 (x3)	6	>500
PF4	VLPWY,Δ158-161, L275F	4	8	50
PF1	VLPWY	2	5	>500
PF2	VLPWY, L275F	10	16	10
PF8	L275F ,R283K,M295V,F296L,I299L	16 (x2,5)	220 (x13)	40
Mutants humanisés				
	WT	4	17	>500
LF	L275F	150 (x35)	30 (x2)	10
FA	F278A	35 (x9)	120 (x7)	>500
ML	M295L	10 (x2,5)	44 (2,5)	90
LFFA	L275F ,F278A	200 (x50)	130 (x8)	6
HS1	L275F ,F278A,M295L	170 (x40)	160 (x9)	10
AB9	VLPWF	2	10	>500
AB21	VLPWF, L275F ,F278A,M295L	60 (x15)	140 (x8)	10

III. Conclusion et perspectives

Les données obtenues ont montré que le résidu en position 275 joue un rôle clé dans la sensibilité différentielle à l'atovaquone et à RCQ06. En effet, l'introduction d'une phénylalanine dans le complexe bc₁ de la levure induit une forte résistance à l'atovaquone probablement par encombrement stérique. Ce résidu, associé à A278 et L295, expliquerait la faible sensibilité de l'enzyme humain à l'atovaquone. *Plasmodium* qui possède une phénylalanine en position 275 est, contrairement à l'Homme, sensible à l'inhibiteur. Cette sensibilité de l'enzyme à la drogue pourrait s'expliquer par la

combinaison des variations (VLPWY, Δ 158-161, résidus 283-299) qui annule la résistance induite par F275 dans notre modèle. Pour le composé RCQ06, ce résidu expliquerait la sensibilité de l'enzyme humaine et du parasite à la molécule ; tous les mutants possédant cette phénylalanine étant sensible à cette drogue. L'introduction d'un résidu aromatique pourrait stabiliser la drogue dans la poche catalytique. Les données obtenues, d'une part, valident nos deux modèles – enzyme humanisée et enzyme « *Plasmodiumisée* » – et d'autre part, nous permettent de mieux comprendre les différences de sensibilité des enzymes de levure, humaine et du parasite aux Q_oIs.

Nous nous sommes intéressés aux résidus qui ont été décrits comme étant impliqués dans la liaison des inhibiteurs du site Q_o (d'après des données structurales ou des mutations de résistance aux Q_oIs) mais nous ne pouvons pas exclure que d'autres résidus jouent également un rôle dans la sensibilité différentielle.

Les informations obtenues pourraient être utilisées pour la conception et les modèles, pour le criblage de nouveaux agents thérapeutiques. Nous avons développé, au cours de ma thèse, un test rapide pour cribler des molécules capables d'inhiber la fonction respiratoire. Ce test, décrit dans la partie B du chapitre II, pourrait être utilisé sur les mutants mimant les poches catalytiques de *Plasmodium* et de l'Homme afin d'identifier des molécules capables d'inhiber spécifiquement le complexe *bc*₁ du parasite. Cependant, il est nécessaire pour ce test d'avoir des souches qui respirent suffisamment ce qui n'est pas le cas du mutant PF7. Au vu des résultats obtenus au cours de cette étude, il semble que la délétion des résidus 158-161 n'est pas un rôle majeur dans la sensibilité du parasite aux antipaludiques. De ce fait, une souche avec l'ensemble des mutations introduites dans PF7 à l'exception de la délétion pourrait être créée pour ce test. Le modèle « *Plasmodium* », en plus de permettre le design et le criblage de nouveaux composés, pourrait être utilisé pour suivre l'apparition des résistances aux inhibiteurs en développement.

Chapitre I-B : HDQ, un puissant inhibiteur de la prolifération de *Plasmodium falciparum*, se lie au site Q_i du complexe bc₁

I. Introduction

Face à l'apparition de parasites résistants à l'atovaquone, seul antipaludique ciblant le complexe bc₁ à être commercialisé, de nouvelles molécules capables d'inhiber la prolifération de ces parasites doivent être développées.

L'1-Hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone (HDQ) a été décrit comme étant un inhibiteur de la réplication de *P. falciparum* et de *T. gondii* (Saleh et al. 2007). Cet analogue des quinones inhibe la NADH déshydrogénase alternative 2 et le complexe I de la levure *Yarrowia lipolytica* (Eschemann et al. 2005) ainsi que la NDH2 de *T. gondii* exprimée chez cette levure (Lin et al. 2008). La structure d'HDQ est très proche de celle d'HQNO, un Q_iI du complexe bc₁ des mammifères et de la levure (Figure 34). Il se pourrait donc que l'activité antipaludique d'HDQ soit médiée par une inhibition du complexe bc₁, et plus spécifiquement, par un blocage de la fonction du site Q_i. Nos collaborateurs du Liverpool School of Tropical Medicine ont montré qu'HDQ interrompt la fonction mitochondriale en inhibant efficacement la PfNDH2 et aussi le complexe bc₁ de *P. falciparum*. Mon rôle dans ce projet a été de déterminer le site de liaison de l'inhibiteur. Comme il est difficile d'obtenir des mitochondries plasmodiales en quantité et en qualité suffisante pour ce type d'analyse, nous avons choisi d'utiliser la levure comme organisme modèle. Cette étude a fait l'objet d'une publication (partie II). Les résultats obtenus avec le modèle levure sont résumés dans la partie III du chapitre.

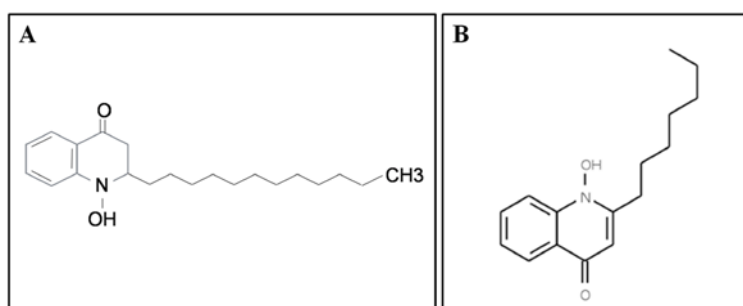


Figure 34: Structure d'HDQ (A) et d'HQNO (B).

II. Article

Antimicrob Agents Chemother. 2012 Jul;56(7):3739-47. Epub 2012 Apr 30.

HDQ, a potent inhibitor of *Plasmodium falciparum* proliferation, binds to the quinone reduction site of the cytochrome *bc*₁ complex.

Cindy Vallières¹, Nicholas Fisher^{2§}, Thomas Antoine², Mohammed Al-Helal², Paul Stocks², Neil G Berry³, Alexandre S Lawrenson³, Stephen A Ward², Paul M O' Neill³, Giancarlo A Biagini^{2†} and Brigitte Meunier^{1*}

¹ Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, FRC 3115, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France. ² Centre for Tropical and Infectious Diseases, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool, L3 5QA, UK. ³ Department of Chemistry, University of Liverpool, Liverpool L69 7ZD, U.K.

Running title: *bc*₁ complex inhibitor HDQ

Keywords: *Plasmodium*, respiratory chain inhibitor, complex III

§ Present address: DOE-Plant Research Laboratory, Michigan State University, S220 Plant Biology Building, East Lansing, MI 48824, USA

Corresponding authors. †Giancarlo A Biagini, Centre for Tropical and Infectious Diseases, Liverpool School of Tropical Medicine, Pembroke Place, Liverpool, L3 5QA, UK. Tel.: 44 151 705 3151; Fax: 44 151 705 3371; e-mail: biagini@liverpool.ac.uk; *Brigitte Meunier, Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France. Tel.: 33 1 6982 3156; Fax: 33 1 69823160; e-mail: meunier@cgm.cnrs-gif.fr

Abbreviations used: Q_i, quinone reduction site; Q_o, quinol oxidation site of the *bc*₁ complex; HDQ, 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone; DHODH, dihydroorotate dehydrogenase; NQNO, 2-nonyl-4-hydroxyquinoline N-oxide; HQNO, 2-heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide; NDH2, NADH dehydrogenase; IC₅₀, inhibitor concentration required to obtain 50% of inhibition.

The mitochondrial *bc*₁ complex is a multi-subunit enzyme that catalyses the transfer of electrons from ubiquinol to cytochrome *c* coupled to the vectorial translocation of protons across the inner mitochondrial membrane. The complex contains two distinct quinone-binding sites, Q_o and Q_i, located on opposite sides of the membrane within cytochrome *b*. Inhibitors of the Q_o site such as atovaquone, active against the *bc*₁ complex of *Plasmodium falciparum*, have been developed and formulated as antimalarial

drugs. Unfortunately, single point mutations in the Q_o site can rapidly render atovaquone ineffective. The development of drugs that could circumvent cross-resistance with atovaquone is needed. Here, we report on the mode of action of a potent inhibitor of *P. falciparum* proliferation, 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone (HDQ). We show that the parasite bc_1 complex - from both control and atovaquone resistant strains - is inhibited by submicromolar concentrations of HDQ, indicating the two drugs have different targets within the complex. The binding site of HDQ was then determined by using a yeast model. Introduction of point mutations into the Q_i site, namely G33A, H204Y, M221Q and K228M, markedly decreased HDQ inhibition. By contrast, known inhibitor resistance mutations at the Q_o site did not cause HDQ resistance. This study, using HDQ as a proof-of-principle inhibitor, indicates that the Q_i site of the bc_1 complex is a viable target for antimalarial drug development.

INTRODUCTION

Toxoplasma gondii and *Plasmodium falciparum* are apicomplexan parasites causing toxoplasmosis and malaria, respectively. This latter disease is among the most serious health problems in the world, leading to over 1 million deaths per year. Over recent years, an increase in malaria mortality has been attributed to the development of parasite resistance to first line therapies, which has raised calls for the urgent development of new drugs with novel modes of action (e.g. (6)). The mitochondrial respiratory chain is an effective target for antimicrobial agents directed against these pathogens. Differences between respiratory chain enzymes of mammals and pathogenic organisms have been exploited to develop compounds used for drug therapy such as atovaquone. Atovaquone is a hydroxynaphthoquinone active against different parasitic diseases (malaria, toxoplasmosis and *Pneumocystis pneumonia* caused by the opportunistic pathogen fungus *Pneumocystis jirovecii*). Atovaquone inhibits the activity of the bc_1 complex activity, a central enzyme of the respiratory chain (24). The mitochondrial bc_1 complex is a multi-subunit enzyme that catalyses the transfer of electrons from ubiquinol to cytochrome *c* and couples this electron transfer to the vectorial translocation of protons across the inner mitochondrial membrane. The

complex contains two distinct quinone-binding sites (Q_o , quinol oxidation site, and Q_i , quinone reduction site), which are located on opposite sides of the membrane. Cytochrome *b*, the central membrane - embedded subunit, encoded by the mitochondrial genome, provides both Q_o and Q_i binding pockets. As a consequence of atovaquone-mediated bc_1 complex inhibition, the electron transfer through the respiratory chain stops and the mitochondrial membrane potential of *P. falciparum* collapses. In addition, without a functioning bc_1 complex to oxidize ubiquinol, the dihydroorotate dehydrogenase oxidization (DHODH) comes to a halt as oxidized ubiquinone is required as an electron acceptor for the DHODH. Pyrimidine biosynthesis is thus inhibited which is lethal for the parasite (39,44,45). Unfortunately, resistance to atovaquone has been observed in both *P. falciparum* and *T. gondii*. This resistance is often associated with mutations in the target site, cytochrome *b*, the main subunit of the bc_1 complex (reviewed in (21)). As atovaquone is effective against both circulating asexual stage parasites and liver stage parasites, it is a useful drug for both malaria treatment and prophylaxis. Therefore new drugs that target the bc_1 complex but that can circumvent atovaquone resistance and/or are more recalcitrant to resistance would be very welcomed. Currently, several different chemotypes targeting the bc_1 complex have been developed, these include the hydroxynaphthoquinones (atovaquone analogues), pyridones (clopidol analogues) and acridine related compounds (acridinediones, acridones and quinolones, reviewed in (1)).

1-Hydroxy-2-dodecyl-4(1*H*)quinolone (HDQ) was recently shown to inhibit parasite replication of *T. gondii* and *P. falciparum* in nanomolar concentrations (40). HDQ treatment in *T. gondii* causes a loss of the mitochondrial inner-membrane potential and a severe ATP depletion due to the block of the electron flow (34). Because of the structural similarity between HDQ and ubiquinol, it seems likely that the drug could target ubiquinol binding sites of respiratory enzymes. Consistent with this hypothesis, HDQ has been shown to inhibit the mitochondrial alternative NADH dehydrogenase (NDH2) and Complex I of the yeast *Yarrowia lipolytica*, albeit with different efficiencies (IC_{50} values were 0.2 μ M and 2 μ M, respectively) (16). The *T. gondii* type-II NADH dehydrogenase expressed in *Y. lipolytica* has also been shown to be inhibited by HDQ with an IC_{50} value of 0.3 μ M (36). Furthermore, the HDQ-related compound HQNO (2-heptyl-4-hydroxyquinoline N-oxide) is a known inhibitor of mammalian and *S. cerevisiae*

*bc*₁ complex. Mutations causing resistance to HQNO have been reported in yeast; they are located at the Q_i site of the complex (reviewed in (10)). This led us to question whether the antimalarial activity of HDQ may be mediated via *bc*₁ complex inhibition, and more specifically, by blocking the Q_i site function.

Here, we demonstrate that in *P. falciparum*, HDQ, in addition to its inhibitory action towards the NADH:ubiquinone-oxidoreductase (PfNDH2), disrupts mitochondrial function through the potent inhibition of the *bc*₁ complex. By studying yeast with specific cytochrome *b* mutations in the Q_o and Q_i sites, and using molecular modeling, we show that HDQ inhibition of the *bc*₁ complex is mediated via Q_i binding. HDQ therefore displays a novel inhibitory mode of action against an important antimalarial target.

MATERIALS AND METHODS

Chemical synthesis of 1-Hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone (HDQ). Synthesis of HDQ was based on the method of Woscheck, et al. (49) (see Fig. S1 for route of synthesis). Briefly, ethyl 3-oxopentadecanoate (prepared according to (46)) was condensed with aniline using a catalytic amount of p-toluenesulfonic acid and azeotropic removal of water. The crude enamine was cyclised in Dowtherm to give 2-dodecylquinolin-4(1H)-one. Treatment of this 4(1H)-quinolone with potassium tert-butoxide followed by esterification with ethyl chloroformate gave the 4-(ethoxycarbonyloxy)quinoline. Oxidation of this with mCPBA gave the N-oxide. Hydrolysis of the N-oxide with potassium hydroxide in aqueous ethanol, followed by acidic workup and recrystallization gave HDQ. All spectroscopic data and CHN analysis was in accord with the proposed structure.

Parasites, culture and drug sensitivity testing. *Plasmodium falciparum* (3D7 strain) cultures consisted of a 2 % suspension of O+ erythrocytes in RPMI 1640 medium (R8758, glutamine, and NaHCO₃) supplemented with 10 % pooled human AB+ serum, 25 mM HEPES (pH 7.4), and 20 μM gentamicin sulfate (47). Cultures were grown under a gaseous headspace of 4% O₂, 3% CO₂ in N₂ at 37°C. Parasite growth was synchronized by treatment with sorbitol (32). Drug susceptibilities were assessed by the measurement of fluorescence after the addition of SYBR Green I as described in (42). Drug IC₅₀ values were calculated from the log of the dose/response relationship, as fitted with Grafit software (Erithacus Software, Kent, United Kingdom). Results are given as the means of at least three separate experiments. The atovaquone resistant isolate TM90C2B (Thailand) was generously provided by Professor Dennis Kyle (College of Public Health, University of South Florida, 13201 Bruce B. Downs Boulevard, MDC 56, Tampa, Florida 33612, USA).

Transgenic Parasites. 3D7-yDHOD-GFP, a transgenic derivative of *P. falciparum* 3D7 containing yeast dihydroorotate dehydrogenase (DHODH) was generated through electroporation of purified pHHyDHOD-

GFP plasmid into ring stages of *P. falciparum* using a BioRad GenePulser following the method in (39). Purified pHHyDHOD–GFP plasmid was generously provided by Professor Akhil Vaidya (Drexel University College of Medicine, 2900 W. Queen Lane, Philadelphia, PA 19129, USA). This plasmid contains a human dihydrofolate reductase gene as a WR99210-selectable marker (39).

Preparation of *P. falciparum* cell-free extracts. Free parasites were prepared from aliquots of infected erythrocytes (approximately 8×10^9 cells ml⁻¹) by adding 5 volumes of 0.15% (wt/vol) saponin in phosphate-buffered saline (137 mM NaCl, 2.7 mM KCl, 1.76 mM K₂HPO₄, 8.0 mM Na₂HPO₄, 5.5 mM D-glucose, pH 7.4) for 5 min, followed by three washes by centrifugation and resuspension in HEPES (25 mM)-buffered RPMI containing a protease inhibitor cocktail (Complete Mini, Roche). Cell extract was prepared by repeated freeze-thawing in liquid N₂, followed by disruption with a sonicating probe.

Preparation of recombinant *P. falciparum* NADH dehydrogenase (PfNDH2). Recombinant PfNDH2 was prepared from the *E. coli* heterologous expression strain F571 as described in (22) and used as a crude membrane preparation at a total protein concentration of 15 µg/ml for NADH:decylubiquinone oxidoreductase activity measurement.

Measurement of NADH:decylubiquinone oxidoreductase activity. Recombinant PfNDH2 and yeast NDH2 activities (using samples prepared as in (19)) were assayed in a reaction medium consisting of 50 mM potassium phosphate (pH 7.5), 2 mM EDTA, 200 µM NADH and 10 mM KCN. NADH:decylubiquinone oxidoreductase activity was initiated by the addition of 50 µM decylubiquinone. Decylubiquinone reduction was monitored at 283 nm ($\epsilon_{283} = 8.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$) in a Cary 4000 spectrophotometer, with rate- and IC₅₀ data determined as described for the cytochrome *c* reductase assay.

Measurement of cytochrome *c* reductase activity in *P. falciparum* samples. Cytochrome *c* reductase activity measurements were assayed in 50 mM potassium phosphate (pH 7.5), 2 mM EDTA, 10 mM KCN, and 30 µM equine cytochrome *c* (Sigma) at room temperature (4,22). Cytochrome *c* reductase activity was initiated by the addition of decylubiquinol (50 µM). Reduction of cytochrome *c* was monitored in a Cary 4000 spectrophotometer at 550 versus 542 nm. Initial rates (computer-fitted as zero-order kinetics) were measured as a function of decylubiquinol concentration. Turnover rates of cytochrome *c* reduction were determined using $\epsilon_{550-542} = 18.1 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Inhibitors of *bc*₁ activity were added without prior incubation. DMSO in the assays did not exceed 0.3 % (v/v). IC₅₀s were calculated by using the four-parameter logistic method. As we previously showed in Fisher et al., 2009 (22), the spectrophotometric challenge presented by the presence of hemozoin is countered by adjusting the protein concentration within the cuvette such that the total absorbance is under 2.0 units (i.e. 1% transmitted light), which, coupled with the use of exogenous cytochrome *c* for the enzymatic assay ($\Delta A = 0.02/\text{min}$), is well within the operating parameters of the Cary 4000 spectrophotometer used in the assays. It should be noted that, in addition to the above, hemozoin is chemically inert under our assay conditions and so will not cause a drift in the measured absorbance.

Real-time single-cell monitoring of membrane potential (Ψ_m). The rhodamine derivative, TMRE (tetramethylrhodamine ethyl ester), was used to monitor the membrane potential (Ψ_m) of the plasma-membrane and mitochondria of malaria infected red blood cells, as described previously (4,5).

Yeast mutant strains. The mutations of the cytochrome *b* gene are listed in Table 1. The mutated and WT mitochondrial genomes were transferred by cytoduction into AD1-9 (α *ura3 his1, yor1Δ::hisG, snq2Δ::hisG, pdr5Δ::hisG, pdr10Δ::hisG, pdr11Δ::hisG, ycf1Δ::hisG, pdr3Δ::hisG, pdr15Δ::hisG, pdr1Δ::hisG*) (kindly given by M.Ghislain, UCL, Belgium) and into BY4742 Δ *cox7* (α *ura3 his3 leu2 lys2 Δcox7::G418*) (purchased from Euroscarf). All of the strains analyzed in this study of the AD1-9 or the BY4742 series were isogenic. The BY4742 Δ *cox7* series were used for the cytochrome *c* reductase assays. As the strain lacks a functional cytochrome oxidase due to the nuclear Δ *cox7* mutation, the quinol cytochrome *c* reductase activity could be measured without added KCN. The AD1-9 series were used for all the growth experiments, as the multiple deletions in the ABC transporter genes render the strains more sensitive to drugs than standard yeast strains (26). The yeast culture media were as described in (19).

Measurement of quinol cytochrome *c* reductase activity in yeast mitochondria. Mitochondria were prepared as in (33). Quinol cytochrome *c* reductase activity measurements were performed in 10mM potassium phosphate pH 7 and 20 μ M equine cytochrome *c* at room temperature. Mitochondria were diluted to 5-30 nM *bc*₁ complex. Concentrations were determined from reduced optical spectra, using $\epsilon=28.5$ mM⁻¹.cm⁻¹ at 562nm *minus* 575nm. Activity was initiated by the addition of 40 μ M decylubiquinol. Cytochrome *c* reduction was recorded at 550nm *versus* 540nm over a 3-min time-course in a Beckmann DU 640 spectrophotometer. Initial rates were measured. IC₅₀ values were determined by inhibitor titration over a 10-100% inhibition range. The measurements were repeated at least twice and averaged.

Molecular docking. Equilibrium geometry was performed on HDQ using *Spartan '08* (<http://www.computational-chemistry.co.uk/spartan08.html>) with molecular mechanics; MMFF. Molecular docking of HDQ into the Q_i site of yeast *bc*₁ complex (PDB: 3CX5) was performed using *GOLD 5.0.1* (48). Hydrogen atoms were added to the protein and all crystallographic water molecules removed. The yeast protein was aligned with that of bovine *bc*₁ complex (PDB: 1SQX) which is highly conserved at the Q_i site and co-crystallised with ubiquinone. The location of ubiquinone was used in the modelling to define the search space for the docking algorithm. The site for docking was defined to be all residues within 5Å of ubiquinone in the yeast protein. Docking was also performed including waters within 3Å of the binding site but did not yield different results compared with no waters present. No water molecules were close enough to the various docking poses to form hydrogen bonds. Analysis is based on results with no water molecules present. GoldScore fitness function was used to perform the docking. GoldScore is a molecular mechanics based scoring function that uses protein-ligand hydrogen bond and Van der Waals terms to optimise for the prediction of ligand binding poses. The docking was repeated 10 times, with early termination criteria disabled and default GA settings applied.

RESULTS

HDQ disrupts *P. falciparum* mitochondrial function and inhibits PfNDH2 and the *bc*₁ complex.

HDQ displayed potent inhibitory activity of *P. falciparum* growth proliferation with an IC₅₀ of 86.5 ± 2.6 nM against the control strain 3D7 (all values are derived from 3 or more independent experiments performed as described in Materials and Methods). The drug was markedly less effective against the transgenic strain containing yeast dihydroorotate dehydrogenase (3D7-yDHODH-GFP) with IC₅₀ of 6.1 ± 0.9 μM, as previously reported in (15). The decreased sensitivity clearly indicates that HDQ inhibits mitochondrial function, as the expression of the yeast dihydroorotate dehydrogenase has been shown to by-pass the need for an efficient quinol oxidation by the *bc*₁ complex (39). Addition of proguanil (1 μM final concentration) was observed to reverse the resistance of the transgenic 3D7-yDHODH-GFP strain to HDQ, as has been shown for atovaquone (39). Interestingly the isolate TM90C2B that carries the cytochrome *b* mutation Y268S (yeast Y279S) and shows a high level of atovaquone resistance (IC₅₀ mutant/control >1000), is highly sensitive to HDQ (IC₅₀ of 64 ± 7.2 nM), which suggests that these inhibitors have a different mode/site of action. As described earlier, HDQ has previously been reported to act as an inhibitor of the type II NADH dehydrogenase (NDH2) in *Y. lipolytica* (16) and of NDH2 from *T. gondii* expressed in *Y. lipolytica* (36). In agreement with these published data, we found that the activity of the recombinant malaria parasite PfNDH2 was sensitive to submicromolar concentrations of HDQ with a measured IC₅₀ of 77 ± 4.2 nM (Fig. 1a). A previous study reported that PfNDH2 was not sensitive to HDQ (15). The discrepancy is likely to originate from the significant differences in the heterologous expression strategy used for this enzyme, as well as differences in the assay conditions, these issues have been discussed previously (22).

Interestingly, the parasite *bc*₁ complex activity, was also found to be inhibited by nanomolar concentration of HDQ with a IC₅₀ = 19 ± 1.3 nM (Fig. 1a), which is in the same range as the IC₅₀ for the Q_o site inhibitors atovaquone and the acridinedione WR249685 (IC₅₀ = 3-5 nM) (4). Thus the quinol analog appears to have a dual action, targeting two respiratory enzymes, the PfNDH2 and the *bc*₁ complex. Consistent with HDQ inhibiting

these respiratory enzymes, perfusion of HDQ to trophozoites-stage parasites resulted in a rapid depolarisation of mitochondrial membrane potential (Fig. 1b).

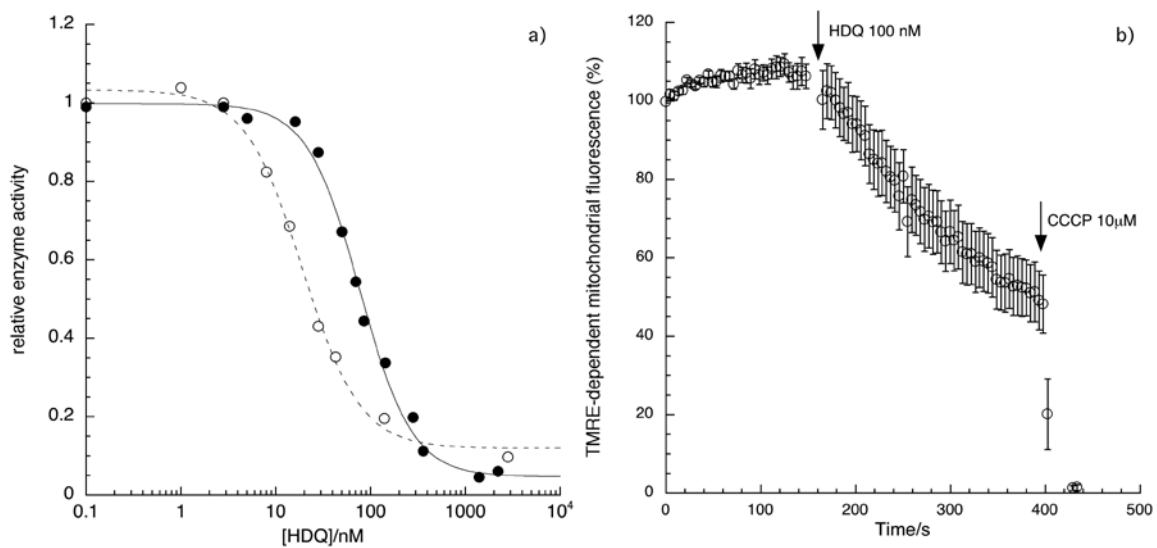


Fig.1. Effect of HDQ on *P. falciparum* PfNDH2, *bc*₁ complex and mitochondrial membrane potential. a) The PfNDH2 activity (closed circles) was determined by monitoring NADH oxidation and concomitant decylquinone reduction; the *bc*₁ activity (open circles) was determined by monitoring cytochrome *c* reduction using decylubiquinol as electron donor (Materials and Methods). All data have been acquired from multiple observations from at least three separate preparations. DMSO in the assays did not exceed 0.3%. IC₅₀ values were calculated by using the four-parameter logistic method. b) Effect of HDQ on the mitochondrial membrane potential (Ψ_m) of *P. falciparum*. Time course of TMRE-dependent fluorescence after the addition of HDQ (100 nM) to *P. falciparum*-infected erythrocytes. Data were normalized to 100% in untreated and to 0% in CCCP (10 μ M)-treated cells. Graph shows mean data derived from experiments performed independently \pm standard errors ($n \geq 3$).

Furthermore, we observed that the *bc*₁ complex activity of the atovaquone resistant isolate TM90C2B was as sensitive to HDQ as the wild type (atovaquone sensitive) strain 3D7, with 200 nM HDQ reducing QH₂-cytochrome *c* reductase activity by 74% and 77%, respectively. The TM902CB and 3D7 strains were similarly sensitive to the Q_i-site inhibitor antimycin (5 μ M), displaying 80% and 73% inhibition, respectively, whilst 50 nM atovaquone reduced 3D7 *bc*₁ activity by 75% whilst only affecting TM902CB *bc*₁ activity by 10% (all experiments performed in triplicate as described in Materials and Methods). These data confirm that the atovaquone resistance mutation Y268S found in the TM902CB strain does not confer cross-resistance to HDQ, indicating that the two drugs have distinct binding sites in the *bc*₁ complex. In order to further probe the specific binding site of HDQ to the *bc*₁ complex, we used yeast as a model system, owing to its tractability in being genetically/biochemically manipulated.

We then generated a number of yeast mutants with specific point mutations in the Q_o and Q_i sites and monitored their impact on HDQ sensitivity.

HDQ blocks the respiratory growth of *S. cerevisiae* through inhibition of the *bc*₁ complex.

We first monitored the effect of HDQ on the growth of yeast cells cultured in respiratory medium, using ethanol as substrate and in fermentable medium using glucose as substrate (10% glucose without aeration) (data not shown). HDQ inhibited the respiratory growth with an IC₅₀ of approximately 1 μM. Yeast growth in fermentable medium was not affected by 20 μM HDQ, indicating that HDQ has no effect on cell growth supported by fermentation. For comparison, the IC₅₀ values for atovaquone and HQNO were approximately 20 and 5 μM, respectively. The sensitivity of the yeast NDH2 activity to HDQ was then assayed. We found that HDQ was a weak inhibitor of the *S. cerevisiae* NDH2 (<10% inhibition of NADH:decylubiquinone oxidoreductase activity with 1 μM HDQ, measured as described in Materials and Methods). Yeast *bc*₁ complex activity, on the contrary, was sensitive to HDQ (Fig. 2) with a ratio of IC₅₀ per *bc*₁ complex of 4-5, which is similar to the inhibitory effect of azoxystrobin, a *bc*₁ complex inhibitor acting at the Q_o site and used to control plant pathogenic fungi.

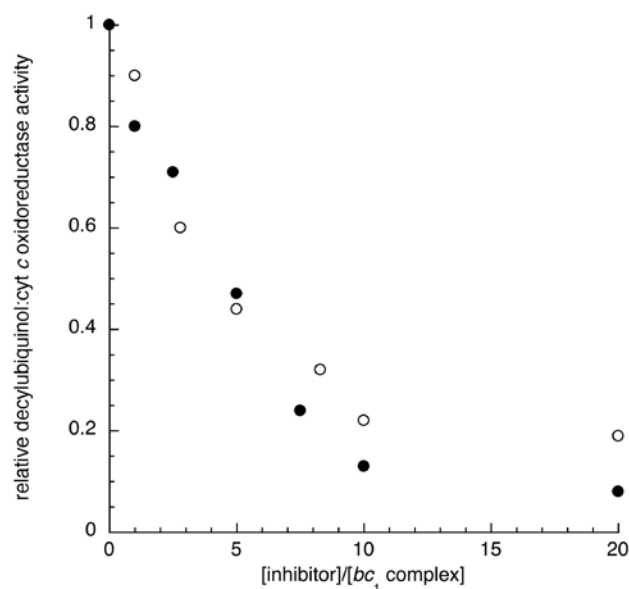


Fig. 2. Sensitivity of the yeast *bc*₁ complex activity to HDQ and to the Q_o site inhibitor azoxystrobin. The quinol cytochrome *c* reductase activity was measured using mitochondria prepared from WT yeast cells (Materials and Methods). The measures were repeated at least three times and averaged. The errors did not exceed 10% of the presented values. The data are presented as the ratio of inhibitor concentration (open circles, azoxystrobin; close circles, HDQ) on *bc*₁ complex concentration. An IC₅₀ value of 4-5 (inhibitor molecules per *bc*₁ complex) was estimated from the plots.

HDQ acts at the Q_i site of the *bc*₁ complex.

In order to determine the site of binding of HDQ, we monitored the impact of mutations introduced in the Q_o and Q_i sites on the sensitivity to HDQ.

TABLE 1. Mutations in Cytochrome *b*

Mutations	References	Mutations	References
G33A	This work*	R218K	This work*
G37S	This work*	M221Q	(11)
T127I	(26)	F225L	This work*
G143A	(20)	K228M/I	This work*
I147V	(26)	L275F	(26)
S152A	(26)	Y279C	(19)
H204Y	(11)	Y279S	(20)
S206T/V	(11)	G143A+K228M	This work*
N208V	This work*		

*site directed mutations are introduced in the mitochondrial cytochrome *b* gene by microprojectile bombardment-mediated mitochondrial transformation as described previously (26).

First, we measured the quinol-cytochrome *c* reductase activity as described in Fig. 2 and determined the IC₅₀ for HDQ. For comparison, we estimated the IC₅₀ for two other *bc*₁ complex inhibitors: the Q_i site binding compound, antimycin and the Q_o site binding compound, azoxystrobin (Table 2). Two Q_i site mutations G33A and K228M, previously reported as causing resistance to HQNO and antimycin, respectively (8,13), decreased the sensitivity of the *bc*₁ complex towards HDQ (Table 2): the IC₅₀ increased approximately 7- and 10 fold for G33A and K228M, respectively. K228M had a moderate effect on antimycin sensitivity while the sensitivity towards the Q_o site inhibitor (azoxystrobin) was unchanged. The Q_o site mutation G143A that causes a high level of resistance towards azoxystrobin, myxothiazol and atovaquone (20) had no effect on HDQ sensitivity. When G143A and K228M mutations were combined, the resulting mutant showed resistance towards both Q_o and Q_i site inhibitors. We tested a third Q_i site change, G37S, reported as causing weak resistance to ilicicolin H (14). This mutation had no effect on HDQ sensitivity. For all of the mutations located in the active sites (Q_o or Q_i), we observed a 1.5 to 2-fold decreased in *bc*₁ complex activity.

TABLE 2. Inhibitory effect of HDQ on the quinol cytochrome *c* reductase of WT and mutant mitochondria

Cytochrome <i>b</i> mutations	TN ^a (s ⁻¹)	IC ₅₀ / <i>bc</i> ₁ complex ^b		
		HDQ	antimycin	azoxystrobin
WT	33	4	0.5	5
<i>Q_i site</i>				
G33A	20	30	0.4	nd
G37S	20	4	0.4	nd
K228M	16	30-50	0.8	4
<i>Q_o site</i>				
G143A	15	4	0.5	>20
<i>Q_i and Q_o</i>				
G143A+K228M	18	30-40	0.9	>20

^a TN : turnover number, cytochrome *c* reduced per *bc*₁ complex per second using 40 μM decylubiquinol (Materials and Methods). The measurements have been repeated at least twice. The errors did not exceed 10% of the presented values.

^b Values are presented as ratio of IC₅₀ on the concentration of monomeric *bc*₁ complex (estimated using cytochrome optical signal as in Materials and Methods). For example, 0.5 molecules of the tight binding inhibitor antimycin were added per monomeric *bc*₁ complex to inhibit the quinol cytochrome *c* reductase activity by 50%.

We then monitored the inhibitory effect of HDQ on the respiratory growth of a collection of *Q_i* mutants chosen on the basis of the structure (28,29) and/or on previous report of their effect on HQNO sensitivity (10) (Table 3). In line with the enzymatic data presented in Table 2, G33A and K228M (and the double change G143A+K228M) conferred a high level of resistance (IC₅₀ >10 μM compared to 1 μM for the WT). These mutants also showed a marked (>10-fold) resistance towards HQNO (data not shown). Two other *Q_i* mutations (causing HQNO resistance (10)) resulted in an increased resistance towards HDQ, H204Y and M221Q, while mutations in positions 208, 218 and 225 had little effect. Interestingly the HDQ sensitivity of mutant K228I was similar to WT, in direct contrast to K228M. S206T/V and G37S appeared more sensitive to HDQ. The increased sensitivity of the respiratory growth of G37S might seem surprising, as the sensitivity of the mutated *bc*₁ complex was unchanged compared to WT. However this behaviour can be explained by the decreased activity of the *bc*₁ complex in the mutant (Table 2). As the level of *bc*₁ complex activity is lower in the mutant cells, its titration by HDQ in the culture gave a lower value. A similar behaviour explains the increased sensitivity of S206V/T. Note that the respiratory growth of the mutants with lower *bc*₁ activity was not decreased in absence of inhibitor. The *bc*₁ complex activity is

in excess in WT yeast cell and only a severe decrease in the activity or level of the complex results in a defective respiratory growth.

For comparison, we monitored the inhibitory effect of HDQ on respiratory growth of Q_o site mutants (Table 3). T127I, I147V, S152A and L275F are mutations found in the human pathogenic fungus *P. jiroveci*, after atovaquone treatment (26); Y279C and S are atovaquone resistance mutations reported in *P. falciparum* (Y268C/S in *P. falciparum*). G143A causes high level of resistance towards Q_o site fungicides in plant pathogenic fungi and was shown to confer atovaquone-resistance when introduced in yeast (20) (for a review of cytochrome *b* mutations see (21)). None of the atovaquone-resistance mutations conferred cross-resistance towards HDQ. An increased sensitivity towards HDQ was observed for several mutants. The increased sensitivity correlates with a decreased activity of the mutated *bc*₁ complex caused by the Q_o site mutation. T127I and I147V had no or mild effect on the *bc*₁ complex activity (26) and on the sensitivity towards HDQ, whereas S152A caused a 5-fold decrease in the activity (26) and a marked sensitivity towards HDQ. G143A, resulted in a 2-fold decrease in quinol cytochrome *c* reductase activity and a >10-fold decrease in the sensitivity of the respiratory growth to HDQ (Tables 2 & 3). L275F had no effect on the respiratory growth sensitivity and the *bc*₁ complex activity (not shown). Y279C/S has previously been shown to severely impair *bc*₁ complex activity (31), and accordingly, the IC₅₀ on respiratory growth was markedly more sensitive to HDQ (< 0.05 μM). Consistent with these data, Q_i site mutants with reduced *bc*₁ activity showed an increased sensitivity towards the Q_o site inhibitor atovaquone (data not shown). The double mutant that combines Q_o and Q_i site resistance mutations G143A+K228M expressed the combined resistance towards Q_o and Q_i inhibitors.

In summary, four Q_i site HQNO-resistance mutations caused a marked cross-resistance to HDQ, while none of the atovaquone-resistant Q_o site mutations tested conferred cross-resistance to HDQ. It is interesting to note that, as described above for *P. falciparum* TM902CB, the mutation Y279S (Y268S in *P. falciparum*), when introduced in yeast, caused a marked decreased in *bc*₁ complex activity, a high level of resistance to atovaquone (20,31) but no cross-resistance towards HDQ. These data are consistent with the hypothesis that HDQ targets the Q_i site of the *bc*₁ complex. Molecular modelling

was then performed to further explore the molecular interactions of HDQ binding at the Q_i site of the *bc*₁ complex.

TABLE 3. Differential effects of cytochrome *b* mutations on the sensitivity of the respiratory growth towards HDQ

Q _i site mutations	IC ₅₀ (μM) ^a	Q _o site mutations	IC ₅₀ (μM) ^a
WT	1		
G33A	>10	T127I	1
G37S	<0.05	G143A	0.05-0.1
H204Y	>10	I147V	0.5
S206T/V	<1	S152A	0.05
N208V	1-2	L275F	0.5-1
R218K	1-2	Y279C	<0.05
M221Q	>10	Y279S	<0.05
F225L	1-2		
K228M	>10		
K228I	1		
G143A+K228M	>10		

^a The values of IC₅₀ were estimated as described in Materials and Methods. Cells were cultured in respiratory medium (ethanol) in presence of increasing concentration of HDQ. Cell density was measured at early stationary phase. The cell density of the mutants in absence of inhibitors was similar to that of the WT. The measures were repeated at least twice.

Molecular modelling of HDQ binding at the Q_i site of the *S. cerevisiae bc*₁ complex.

The analysis was performed using *GOLD 5.0.1* with 3CX5.PDB as template (Materials and Methods). The best scoring pose had a GoldScore of 59.4, indicative of a good binding orientation within the Q_i site. Subsequent poses supported the predicted orientation. A detailed description of the model of docking and associated data are presented in the supplementary data (Fig. S2, Table S1). For comparison purposes, *in silico* docking of ubiquinone-6 within the Q_i site of yeast *bc*₁ resulted in a 'best solution' binding pose with a GoldScore of 50.4. Docking of stigmatellin at the Q_o- and Q_i sites of yeast *bc*₁ resulted in GoldScores of 111.6 and 56.3 respectively, in agreement with the expected binding site for this inhibitor. Interestingly, the favoured docking pose for HDQ within the Q_o site had a GoldScore value of 65.4, which is suggestive of an apparently more favourable interaction than that observed at Q_i. However, it should be noted that hydrogen bonds are more highly weighted than hydrophobic- and van der Waals

threonine in mammals, and has a closest approach of 10 Å to the quinolone headgroup of NQNO in the bovine atomic structure (25). A similar separation is observed in our HDQ-docked yeast model. It is thus not immediately apparent why this mutation should affect quinolone binding and yet not be deleterious for *bc*₁ complex activity (9), although it may be postulated that introduction of the bulkier tyrosyl sidechain results in local reorganisation in the packing of sidechains or conformation in the DE loop. M221Q (transmembrane helix E) causes resistance to HQNO but not antimycin, and has a near-wildtype level of *bc*₁ complex activity (8). The εC methyl group of M221 is predicted to be in a stabilising hydrophobic interaction with the quinolone ring of HDQ in our yeast structural model (3.6 Å closest approach). This residue is replaced by phenylalanine in mammalian and *Plasmodium* cytochrome *b*. In the NQNO-inhibited bovine enzyme, this phenylalanine sidechain participates in a stabilising aromatic-aromatic interaction with the bound quinolone. Mutation to the more polar glutamine sidechain removes this interaction. K228M (transmembrane helix E) confers weak resistance to antimycin, but marked resistance to HDQ (Table 2). The terminal amino group of this residue participates in a water-mediated H-bond to the formyl amino oxygen atom of bound antimycin in bovine *bc*₁ complex (28). A similar bridged hydrogen-bonding association has been suggested for this residue and substrate ubiquinone in the yeast *bc*₁ structure, where it was proposed to form part of a proton-uptake pathway for quinone redox chemistry at Q_i (30). Interestingly, the sidechain appears to demonstrate considerably mobility, and can be modelled in two different conformations (the terminal NE atoms of K228 point in different directions in the yeast and bovine crystal structures (25)). This residue has a closest approach of 5.5 Å to NQNO in the bovine structure, although it is unclear if it is participating in a water-bridged H-bond with the quinolone N-oxide moiety. In our structural model, which was based on the yeast co-ordinates (3CX5 (43)), the sidechain of K228 is oriented 'distal' to the Q_i pocket, and so we observe a separation of 13 Å to the quinone headgroup of bound HDQ. Rotation of this residue into the Q_i 'proximal' position would facilitate a bridged hydrogen bond between the terminal amino group and the HDQ quinolone headgroup. It should be noted, however, that the mutation of this residue to isoleucine did not confer resistance to HDQ (and K228 is replaced by leucine in *P. falciparum* cytochrome *b*), and so it is unlikely that hydrogen bonds to this position are a significant factor in quinolone binding. It is therefore unclear

why the K228M mutation should confer HDQ resistance, it may arise from distortion of the nearby aA loop, a region of the Q_i site predicted to contain several residues in close association with bound HDQ.

G37S (transmembrane helix A) has been reported previously as causing resistance to ilicicolin H (14); no resistance to HDQ was observed here. This residue has a closest approach of 8.3 Å to HDQ in our docking model. S206 (DE loop) is conserved in eukaryotic cytochrome *b*, and is predicted to be a H-bond donor via its hydroxyl moiety to the methoxy oxygen atom of Q_i-bound ubiquinone in the bovine and yeast *bc*₁ complex crystal structures (28,29). Mutation to threonine or valine, however, has no effect on *bc*₁ complex catalytic activity (9), and confers no resistance to HDQ. F225L (transmembrane helix E) has previously reported as causing resistance to diuron (13). The phenyl ring of this residue has a closest contact of 3.1 Å with the quinolone group of HDQ in our docking model, with the rings oriented at 120 degrees with respect to each other and a van der Waals contact surface area of 19 Å². The isobutyl group of leucine is likely to be able to form a similar stabilising hydrophobic interaction with HDQ in the F225L mutant, and indeed, leucine is found in this position in the sequence of *P. falciparum* cytochrome *b*. N208V and R218K, both located in the DE loop (proposed as a proton input pathway for quinone redox chemistry at Q_i (30)), are approximately 10 Å from HDQ in our binding model.

DISCUSSION

HDQ has been shown previously to display potent antimalarial activity (40). Here we confirm this observation and additionally show that this compound is active against the atovaquone resistance parasite TM90C2B (carrying the Y268S mutation), suggesting a different target site of action to atovaquone. The lack of activity of HDQ against the transgenic 3D7-yDHODH-GFP strain (39), indicated that this compound targets mitochondrial function. Consistent with this, assessment of mitochondrial function using single-cell imaging of parasite mitochondria revealed that addition of HDQ rapidly depolarized the mitochondrial membrane potential. Assessment of electron transport chain enzymes NADH:ubiquinone oxidoreductase (PfNDH2, (18)) and *bc*₁ complex, revealed that HDQ is a potent inhibitor of both enzymes. HDQ therefore

displays characteristics of a privileged pharmacophore able to inhibit more than one enzyme. It is not clear however from our data alone whether parasite kill is afforded via the inhibition of bc_1 alone or via a combination of the inhibition of bc_1 and PfNDH2. A recent study, performed in the rodent malaria *P. berghei*, indicates that deletion of the NDH2 gene is not lethal to erythrocytic stages of the parasite (7). Our observation that proguanil reverses the resistance of the transgenic 3D7-yDHODH-GFP to HDQ, is consistent with similar observations using bc_1 -acting inhibitors (39). However, this same experiment has not been performed with a known PfNDH2-selective drug and is therefore difficult to interpret. Clearly further, definitive investigations are required to determine the essentiality of PfNDH2 in *P. falciparum*. It is worth noting however, that historically, anti-infectives displaying polypharmacology show greater efficacy over single-targeting inhibitors (27). In *Toxoplasma gondii*, the deletion of type II NADH:dehydrogenase genes is not lethal but is shown to be required for optimal tachyzoite growth (35). Interestingly, HDQ has been shown to be synergistic with atovaquone for growth inhibition (36) which may be attributed to the polypharmacological effect of HDQ against the type II NADH : dehydrogenases as well as the Q_o and Q_i sites of the bc_1 complex.

In order to determine the mode of action of HDQ against the bc_1 complex, yeast mutants were generated carrying specific amino acid substitutions in the two catalytic sites, Q_o and Q_i (Table 1). The specific Q_i point mutations tested were chosen because of their involvement in the binding of antimycin and ubiquinol in the Q_i site of the bovine enzyme, as revealed by crystal structures (28,29) and/or of previous report of the effect on HQNO sensitivity (10): S206T/V, H204Y, K228M/I, G33A, G37S, M221Q and F225L. Two residues located in a possible proton pathway towards the Q_i site (30) were also tested, R218K and N208V. The Q_o site mutations were atovaquone-resistant mutations reported in human and plant pathogens. None of the Q_o site mutations conferred cross-resistance to HDQ while four Q_i site mutations caused a cross-resistance towards HDQ and HQNO, namely G33A, H204Y, M221Q and K228M (Tables 2 & 3). Thus it could be suggested that these residues are involved in the stabilisation of HDQ in the Q_i site. As described, molecular modelling of HDQ bound to the Q_i site supports the importance of residues G33, H204, M221 for the binding interaction, however it is at this stage not clear why the K228M mutation affects this process.

The mutational study can not exclude that HDQ could also bind at the Q_o site with a lower affinity. Inhibitors have been described that bind at both Q_o and Q_i sites. For instance, spectroscopic studies have shown that Ascochlorin acted at both sites of the bacterial and vertebrate *bc*₁ complex and crystallographic analyses has revealed its precise binding sites in the two quinone pockets of the chicken enzyme (3). Crystallographic analysis of the bovine *bc*₁ complex showed that 2-nonyl-4-hydroxyquinoline N-oxide (NQNO) binds at both sites in the crystal structure (25). It is likely that HQNO could also bind at the Q_o site. However, amino acid substitutions causing resistance to HQNO have only been found in the Q_i site (10). This suggests that the affinity of NQNO/HQNO for the Q_o site would be lower; thus resistance could not develop by mutation of the Q_o site.

Comparison of sequences (Fig.3B) shows that Q_i site residues involved in HDQ stabilisation (as judged by mutational analysis) are well conserved between yeast and *P. falciparum* enzyme. It is likely that HDQ would also target the Q_i site of *P. falciparum*, which is in agreement with the observation that the atovaquone resistance *P. falciparum* isolate TM90C2B (with the Q_o site mutation Y279S (Y268S in *P. falciparum*)) is sensitive to HDQ.

The *bc*₁ complex of the malaria parasite is a proven drug target, and is an essential component for various stages of the parasite life cycle including the liver stages and the circulating asexual stages. This enzyme is therefore the only validated malarial drug target that has utility for both curative and prophylaxis treatment. Unfortunately, atovaquone resistant parasites have been observed in the field following atovaquone or Malarone treatment failures (e.g. (2,23,38,41)). Atovaquone, as do the fungicides and pesticides targeting the *bc*₁ complex, binds at the Q_o site (the only exception is the fungicide cyazofamid that targets the Q_i site and is only active against oomycetes (37)). Mutations in the Q_o site have been reported that compromise the pathogen control (reviewed in (21)). In addition, the Q_o inhibitors have similar mode of binding and thus cross-resistance towards the drugs is observed. Thus inhibitors acting at the Q_i site would be invaluable tools against pathogens.

With the exception of cyazofamid, most *bc*₁ inhibitors that have been developed into drugs or pesticides do not target the Q_i. The Q_i site is less conserved amongst species than the Q_o site. From an alignment of 16 diverse cytochrome *b* sequences -

vertebrates, invertebrates, fungi, plants and protozoa, the estimated sequence similarity at the Q_o site is 48% for the ef loop and 60% for the C-terminus of the helix C and the cd1 loop; the sequence similarity at the Q_i site is 30% for the aA loop and N-terminus of helix A, 36% for the C-terminus of helix D and the DE loop and 44% for the N-terminus of helix E (data not shown). Thus from the drug development point of view, the relative sequence diversity of the Q_i pocket should have favoured selectivity. On the other hand, Q_i appears to be more structurally rigid (25,28), with no evidence of movement on antimycin binding whereas the Q_o site shows more mechanical flexibility on inhibitor binding (17). It was previously reported that in the Q_o pocket, H-bonds between side-chains of a few conserved residues hold together the components of the site that are regions of the cytochrome *b* distant in the sequence. Crofts et al. described the feature as a “loose stitching” that would allow the expansion of the site upon binding of inhibitors (12). That property presumably allows the site to accommodate more diverse molecules and could explain the development of specific Q_o inhibitors active against pathogens.

Here we showed that HDQ, active against *P. falciparum*, is a proof-of-concept molecule that targets the Q_i site and that can therefore circumvent atovaquone resistance. HDQ is not active *in vivo* using the *P. berghei* rodent model (7), but given its potent activity against *bc*₁, this is most probably due to poor drug exposure. Drugs developed on the HDQ scaffold targeting the Q_i site, but with improved pharmacokinetic features, may therefore be a valuable tool in combating parasite drug resistance as we would predict that if used in combination, Q_i and Q_o site inhibitors would be more recalcitrant to the emergence of resistance. Double mutations at both active sites, if they arose, would result in a severe loss of function and thus of cell fitness and are unlikely to be tolerated.

Further synthetic studies are now underway to develop more drug-like inhibitors of the Q_i site of the *bc*₁ complex.

ACKNOWLEDGEMENTS

We thank Professor Dennis Kyle (College of Public Health, University of South Florida) for supplying the atovaquone resistant isolate TM90C2B (Thailand) and Professor Akhil Vaidya (Drexel University College of Medicine, Philadelphia) for supplying purified pHHyDHOD-GFP plasmid. We also thank the staff and patients of Ward 7Y and the Gastroenterology Unit, Royal Liverpool Hospital, for their generous donation of blood. This work was supported by grants from the Leverhulme Trust, the Wellcome Trust, the National Institute of Health Research (NHIR, BRC Liverpool) and the Agence National de la Recherche (ANR)

REFERENCES

1. **Barton, V., N. Fisher, G. A. Biagini, S. A. Ward, and P. O'Neill.** 2010. Inhibiting *Plasmodium* cytochrome *bc*₁: a complex issue. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **14**:1-7.
2. **Berry, A., A. Senescau, J. Lelievre, F. Benoit-Vical, R. Fabre, B. Marchou, and J. F. Magnaval.** 2006. Prevalence of *Plasmodium falciparum* cytochrome *b* gene mutations in isolates imported from Africa, and implications for atovaquone resistance. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* **100**:986-988.
3. **Berry, E. A., L.-S. Huang, D.-W. Lee, F. Daldal, K. Nagai, and N. Minagawa.** 2010. Ascochlorin is a novel, specific inhibitor of the mitochondrial cytochrome *bc*₁ complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1797**:360-370.
4. **Biagini, G., N. Fisher, N. Berry, P. Stocks, B. Meunier, D. Williams, R. Bonar-Law, P. Bray, A. Owen, P. O'Neill, and S. Ward.** 2008. Acridinediones: Selective and potent inhibitors of the malaria parasite mitochondrial *bc*₁ complex. *Mol. Pharmacol.* **73**:1347-1355.
5. **Biagini, G. A., P. Viriyavejakul, P. M. O'Neill, P. G. Bray, and S. A. Ward.** 2006. Functional characterization and target validation of alternative complex I of *Plasmodium falciparum* mitochondria. *Antimicrob. Agents Chemother.* **50**:1841-1851.
6. **Boulton, I. C., S. Nwaka, I. Bathurst, M. Lanzer, D. Taramelli, H. Vial, C. Doerig, K. Chibale, and S. A. Ward.** 2010. CRIMALDDI: a co-ordinated, rational, and integrated effort to set logical priorities in anti-malarial drug discovery initiatives. *Malar. J.* **9**:202.
7. **Boysen, K. E. and K. Matuschewski.** 2011. Arrested oocyst maturation in *Plasmodium* parasites lacking type II NADH:ubiquinone dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **286**:32661-32671.
8. **Brasseur, G. and P. Brivet-Chevillotte.** 1995. Characterization of mutations in the mitochondrial cytochrome *b* gene of *Saccharomyces cerevisiae* affecting the quinone reductase site (Q_N). *Eur. J. Biochem.* **230**:1118-1124.
9. **Brasseur, G., J.-Y. Coppee, A.-M. Colson, and P. Brivet-Chevillotte.** 1995. Structure-function relationships of the mitochondrial *bc*₁ complex in temperature-sensitive mutants of the cytochrome *b* gene, impaired in the catalytic center N. *J. Biol. Chem.* **270**:29356-29364.
10. **Brasseur, G., A. S. Saribas, and F. Daldal.** 1996. A compilation of mutations located in the cytochrome *b* subunit of the bacterial and mitochondrial *bc*₁ complex. *Biochim. Biophys. Acta* **1275**:61-69.
11. **Coppee, J.-Y., G. Brasseur, P. Brivet-Chevillotte, and A.-M. Colson.** 1994. Non-native intragenic reversions selected from *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *b*-deficient mutants. *J. Biol. Chem.* **269**:4221-4226.
12. **Crofts, A. R., B. Barquera, R. B. Gennis, R. Kuras, M. Guergova-Kuras, and E. A. Berry.** 1999. Mechanism of Ubiquinol Oxidation by the *bc*₁ Complex: Different Domains of the Quinol Binding Pocket and Their Role in the Mechanism and Binding of Inhibitors. *Biochemistry* **38**:15807-15826.
13. **di Rago, J.-P. and A.-M. Colson.** 1988. Molecular basis for resistance to antimycin and diruon, Q-cycle inhibitors acting at the Q_i site in the mitochondrial ubiquinol-cytochrome *c* reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **263**:12564-12570.

14. **Ding, M. G., J.-P. di Rago, and B. L. Trumpower.** 2006. Investigating the Q_n site of the cytochrome *bc*₁ complex in *S. cerevisiae* with mutants resistant to Ilicicolin H, a novel Q_n site inhibitor. *J. Biol. Chem.* **281**:36036-36043.
15. **Dong, C. K., V. Patel, J. C. Yang, J. D. Dvorin, M. T. Duraisingh, J. Clardy, and D. F. Wirth.** 2009. Type II NADH dehydrogenase of the respiratory chain of *Plasmodium falciparum* and its inhibitors. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**:972-975.
16. **Eschemann, A., A. G. Galkin, W. Oettmeier, U. Brandt, and S. Kerscher.** 2005. HDQ (1-Hydroxy-2-dodecyl-4(1*H*)quinolone), a high affinity inhibitor for mitochondrial alternative NADH dehydrogenase. *J. Biol. Chem.* **280**:3138-3142.
17. **Esser, L., B. Quinn, Y.-F. Li, M. Zhang, M. Elberry, L. Yu, C.-A. Yu, and D. Xia.** 2004. Crystallographic studies of quinol oxidation site inhibitors: A modified classification of inhibitors for cytochrome *bc*₁ complex. *J. Mol. Biol.* **341**:281-302.
18. **Fisher, N., P. G. Bray, S. A. Ward, and G. A. Biagini.** 2007. The malaria parasite type II NADH:quinone oxidoreductase: and alternative enzyme for an alternative lifestyle. *Trends in Parasitology* **23**:305-310.
19. **Fisher, N., C. K. Castleden, I. Bourges, G. Brasseur, G. Dujardin, and B. Meunier.** 2004. Human disease-related mutations in cytochrome *b* studied in yeast. *J. Biol. Chem.* **279**:12951-12958.
20. **Fisher, N. and B. Meunier.** 2005. Re-examination of inhibitor resistance conferred by Q_o site mutations in cytochrome *b* using yeast as a model system. *Pest. Manag. Sci.* **61**:973-978.
21. **Fisher, N. and B. Meunier.** 2008. Molecular basis of resistance to cytochrome *bc*₁ inhibitors. *FEMS Yeast Res.* **8**:183-192.
22. **Fisher, N., A. J. Warman, S. A. Ward, and G. A. Biagini.** 2009. Chapter 17 Type II NADH: quinone oxidoreductases of *Plasmodium falciparum* and *Mycobacterium tuberculosis* kinetic and high-throughput assays. *Methods Enzymol.* **456**:303-320.
23. **Fivelman, Q. L., G. A. Butcher, I. S. Adagu, D. C. Warhurst, and G. Pasvol.** 2002. Malarone treatment failure and in vitro confirmation of resistance of *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria. *Malar. J* **1**:1.
24. **Fry, M. and M. Pudney.** 1992. Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochem. Pharmacol.* **43**:1545-1553.
25. **Gao, X., X. Wen, L. Esser, B. Quinn, L. Yu, C.-A. Yu, and D. Xia.** 2003. Structural basis for the quinone reduction in the *bc*₁ complex: a comparative analysis of crystal structures of mitochondrial cytochrome *bc*₁ with bound substrate and inhibitors at the Q_i site. *Biochemistry* **42**:9067-9080.
26. **Hill, P., J. Kessl, N. Fisher, S. Meshnick, B. Trumpower, and B. Meunier.** 2003. Recapitulation in *Saccharomyces cerevisiae* of cytochrome *b* mutations conferring resistance to atovaquone in *Pneumocystis jiroveci*. *Antimicrob. Agents Chemother.* **47**:2725-2731.
27. **Hopkins, A. L.** 2008. Network pharmacology: the next paradigm in drug discovery. *Nat. Chem. Biol.* **4**:682-690.

28. **Huang, L.-S., D. Cobessi, E. Tung, and E. A. Berry.** 2005. Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial *bc*₁ complex: A new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern. *J. Mol. Biol.* **351**:573-597.
29. **Hunte, C., J. Koepke, C. Lange, T. Rossmann, and H. Michel.** 2000. Structure at 2.3 angstrom resolution of the cytochrome *bc*₁ complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure Fold. Des.* **8**:669-684.
30. **Hunte, C., H. Palsdottir, and B. L. Trumpower.** 2003. Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome *bc*₁ complex. *FEBS Lett.* **545**:39-46.
31. **Kessl, J., K. H. Ha, A. K. Merritt, B. B. Lange, P. Hill, B. Meunier, S. R. Meshnick, and B. L. Trumpower.** 2005. Cytochrome *b* mutations that modify the ubiquinol-binding pocket of the cytochrome *bc*₁ and confer anti-malarial drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* **280**:17142-17148.
32. **Lambros, C. and J. P. Vanderberg.** 1979. Synchronization of *Plasmodium falciparum* erythrocytic stages in culture. *J. Parasitol.* **65**:418-420.
33. **Lemaire, C. and G. Dujardin.** 2008. Preparation of respiratory chain complexes from *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and mutant mitochondria: activity measurement and subunit composition analysis. *Methods Mol. Biol.* **432**:65-81.
34. **Lin, S. S., U. Gross, and W. Bohne.** 2009. Type II NADH dehydrogenase inhibitor 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone leads to collapse of mitochondrial inner-membrane potential and ATP depletion in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryotic Cell* **8**:877-887.
35. **Lin, S. S., U. Gross, and W. Bohne.** 2011. Two internal type II NADH dehydrogenases of *Toxoplasma gondii* are both required for optimal tachyzoite growth. *Mol. Microbiol.* **82**:209-221.
36. **Lin, S. S., S. Kerscher, A. Saleh, U. Brandt, U. Gross, and W. Bohne.** 2008. The *Toxoplasma gondii* type-II NADH dehydrogenase TgNDH2-I is inhibited by 1-hydroxy-2-alkyl-4(1H)quinolones. *Biochim. Biophys. Acta* **1777**:1455-1462.
37. **Mitani, S., S. Araki, Y. Takii, T. Ohshima, N. Matsuo, and H. Miyoshi.** 2001. The biochemical mode of action of the novel selective fungicide Cyazofamid: Specific inhibition of mitochondrial complex III in *Phytophthora infestans*. *Pestic. Biochem. Physiol.* **71**:107-115.
38. **Musset, L., O. Bouchaud, S. Matheron, L. Massias, and J. Le Bras.** 2006. Clinical atovaquone-proguanil resistance of *Plasmodium falciparum* associated with cytochrome *b* codon 268 mutations. *Microbes Infect.* **8**:2599-2604.
39. **Painter, H. J., J. M. Morrissey, M. W. Mather, and A. B. Vaidya.** 2007. Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature* **446**:88-91.
40. **Saleh, A., J. Friesen, S. Baumeister, U. Gross, and W. Bohne.** 2007. Growth inhibition of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* by nanomolar concentrations of 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone, a high-affinity inhibitor of alternative (type II) NADH dehydrogenases. *Antimicrob. Agents Chemother.* **51**:1217-1222.
41. **Schwartz, E., S. Bujanover, and K. C. Kain.** 2003. Genetic confirmation of atovaquone-proguanil-resistant *Plasmodium falciparum* malaria acquired by a nonimmune traveler to East Africa. *Clin. Infect. Dis.* **37**:450-451.

42. **Smilkstein, M., N. Sriwilaijaroen, J. X. Kelly, P. Wilairat, and M. Riscoe.** 2004. Simple and inexpensive fluorescence-based technique for high-throughput antimalarial drug screening. *Antimicrob. Agents Chemother.* **48**:1803-1806.
43. **Solmaz, S. R. and C. Hunte.** 2008. Structure of complex III with bound cytochrome *c* in reduced state and definition of a minimal core interface for electron transfer. *J. Biol. Chem.* **283**:17542-17549.
44. **Srivastava, I. K., J. M. Morrissey, E. Darrouzet, F. Daldal, and A. B. Vaidya.** 1999. Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome *b* in malaria parasites. *Mol. Microbiol.* **33**:704-711.
45. **Srivastava, I. K., Rottenburg, and A. B. Vaidya.** 1997. Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *J. Biol. Chem.* **272**:3961-3966.
46. **Tietze, L. F. and L. Ma.** 2010. Synthesis of Novel 1-Hydroxyquinolones with High Anti-Toxoplasma Activity. *Heterocycles* **82**:377-396.
47. **Trager, W. and J. B. Jensen.** 1976. Human malaria parasites in continuous culture. *Science* **193**:673-675.
48. **Verdonk, M. L., J. C. Cole, M. J. Hartshorn, C. W. Murray, and R. D. Taylor.** 2003. Improved Protein-Ligand Docking Using GOLD. *Proteins* **52**:609-623.
49. **Woschek, A., M. Mahout, K. Mereiter, and F. Hammerschmidt.** 2007. Synthesis of 2-Heptyl-1-hydroxy-4(1H)-quinolone - Unexpected Rearrangement of 4-(Alkoxy-carbonyloxy)quinoline N-Oxides to 1-(Alkoxy-carbonyl-oxy)-4(1H)-quinolones. *Synthesis-Stuttgart* **10**:1517-1522.

III. Résumé de l'article et résultats supplémentaires

A. HDQ bloque la croissance respiratoire de *S. cerevisiae* via une inhibition du complexe bc_1

Dans un premier temps, l'effet d'HDQ sur la croissance des levures cultivées en milieu respiratoire et en milieu fermentescible a été analysé. Etant donné que la levure possède un système de pompes permettant l'efflux de molécules performant, nous utilisons au laboratoire des souches dont des gènes impliqués dans ce processus de résistance aux drogues ont été délétés ; il s'agit des gènes *YOR1*, *SNQ2*, *PDR5*, *PDR10*, *PDR11*, *YCF1*, *PDR3*, *PDR15*, *PDR1*. *PDR1* et *PDR3* code pour des facteurs de transcription tandis que les autres gènes codent pour des transporteurs ABC (pour revue, (Wolfger et al. 2001)). Des mécanismes similaires existent chez des champignons pathogènes tels que *Candida* et *Aspergillus sp.* (Vanden Bossche et al. 1998) mais également chez *Plasmodium* (Peel 2001). Comme on peut le voir sur la figure 35, la drogue inhibe la croissance respiratoire avec une IC_{50} d'environ 1 μ M et n'a pas d'effet sur la croissance fermentescible. En comparaison, les IC_{50} obtenues pour l'atovaquone, inhibiteur du site Q_o , et l'HQNO, inhibiteur du site Q_i , sont respectivement de 20 et 5 μ M. L'activité du complexe bc_1 de la levure en présence de doses croissantes d'inhibiteur a été mesurée et l' IC_{50} déterminée; le rapport IC_{50} /concentration en complexe bc_1 est de 4-5 et est similaire à celui obtenu pour l'azoxystrobine, un fongicide du site Q_o .

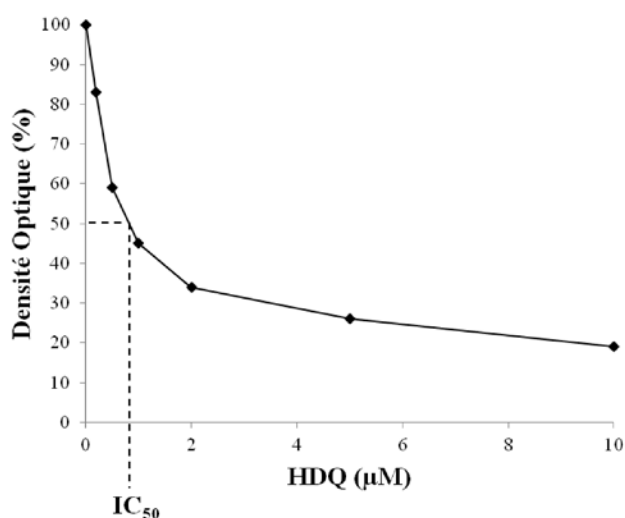


Figure 35: Sensibilité de la croissance respiratoire de la souche sauvage à l'HDQ. Les cellules sont cultivées en milieu respiratoire (éthanol) en présence de doses croissantes d'inhibiteur. La densité optique des cellules est mesurée à 600 nm et en début de phase stationnaire.

B. HDQ agit au niveau du site Q_i du complexe bc_1

Afin de déterminer le site de liaison de HDQ, l'impact de mutations introduites dans les poches catalytiques du complexe bc_1 de levure sur la sensibilité à l'HDQ a été étudié. Dans un premier temps, nous avons mesuré l'activité quinol-cytochrome c réductase et déterminé l' IC_{50} pour l'inhibiteur de trois mutants : G143A, un mutant de résistance à des inhibiteurs du site Q_o (Fisher & Meunier 2005), K228M, un mutant de résistance à l'antimycine, inhibiteur du site Q_i (di Rago & Colson 1988) et G143A/K228M. Nous avons comparé les IC_{50} obtenues avec celles pour l'antimycine et l'azoxystrobine. K228M entraîne une diminution de la sensibilité à l'HDQ et à l'antimycine et n'a aucun effet sur la sensibilité du complexe à l'azoxystrobine. G143A qui confère une forte résistance à l'azoxystrobine n'a pas d'impact sur la sensibilité de l'enzyme à l'HDQ. Lorsque les mutations K228M et G143A sont combinées, l'enzyme modifiée est fortement résistante aux inhibiteurs du site Q_i et Q_o (Tableau 2 de l'article). Des mesures de consommation d'oxygène de ces différentes souches en présence d'inhibiteurs ont également été effectuées et les résultats vont dans le même sens que les données obtenues ci-dessus.

L'effet d'HDQ sur la croissance respiratoire sur boîte et en milieu liquide d'une collection de mutants du site Q_i et du site Q_o a été analysé. En comparaison, nous avons également observé l'effet d'un inhibiteur du site Q_i (HQNO) et d'un inhibiteur du site Q_o (atovaquone) sur la croissance respiratoire des différents mutants. Les résultats sont montrés dans la figure 36 et dans le tableau 3 de l'article. Comme observé lors des mesures de l'activité des différentes enzymes mutées en présence d'HDQ, les mutants K228M et G143A/K228M sont fortement résistants à la drogue ($IC_{50} > 10 \mu\text{M}$ contre $1 \mu\text{M}$ pour le sauvage) tandis que le mutant G143A est sensible à l'HDQ et même plus sensible que la souche sauvage ; cette augmentation de la sensibilité de la croissance respiratoire du mutant à l'inhibiteur peut s'expliquer par une baisse de l'activité du complexe bc_1 du mutant (Tableau 2 de l'article). Parmi les autres mutants, trois autres mutants du site Q_i sont fortement résistants à l'HDQ ; il s'agit des mutants G33A, H204Y et M221Q qui ont été décrits comme étant des mutants de résistance à l'HQNO (Bresseur et al. 1996). Le rapport IC_{50} pour l'HDQ/complexe bc_1 du mutant G33A est similaire à celui de K228M (Tableau 2 de l'article). Les données obtenues semblent indiquer qu'HDQ cible le site Q_i du complexe bc_1 .

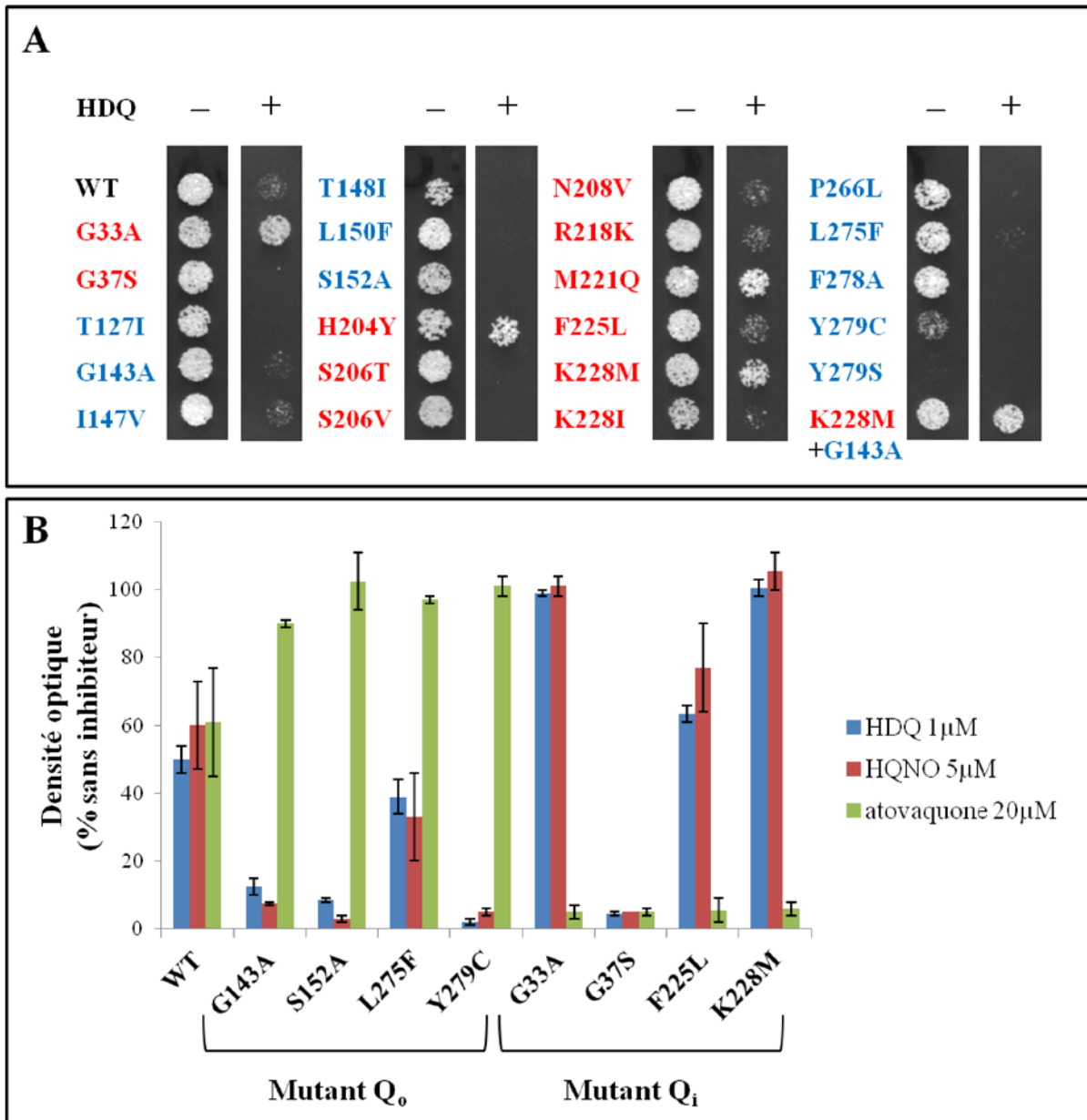


Figure 36: Sensibilité et résistance de la croissance respiratoire des mutants du site Q_0 et Q_i à l'HDQ. (A) Les cellules sont cultivées en milieu respiratoire (éthanol/glycérol) en absence ou en présence de la drogue ($10 \mu\text{M}$) et incubées 3 jours à 28°C . En rouge, les mutants du site Q_i et en bleu, les mutants du site Q_0 . (B) Les cellules sont cultivées en milieu respiratoire (éthanol) en présence ou en absence d' $1 \mu\text{M}$ d'HDQ, $5 \mu\text{M}$ de HQNO, un inhibiteur du site Q_i et de $20 \mu\text{M}$ d'atovaquone, un inhibiteur du site Q_0 . La densité optique des cellules en présence d'inhibiteur est mesurée à 600 nm , en début de phase stationnaire, et rapportée à la densité optique sans inhibiteur en %. Seuls quatre mutants de chaque site sont représentés sur ce graphique.

C. Conclusion

D'après les résultats obtenus avec notre modèle, HDQ se lierait au niveau du site Q_i du complexe bc_1 .

La modélisation *in silico* de la liaison de HDQ dans la poche catalytique, faite par nos collaborateurs, confirme l'importance des résidus G33, H204 et M221 dans l'interaction drogue-complexe. Cette modélisation ne permet cependant pas d'expliquer comment la mutation K228M affecte cette interaction.

Cette étude n'exclue pas le fait qu'HDQ pourrait se lier au site Q_o (avec une faible affinité) comme l'ascochlorine (Berry et al. 2010) et le NQNO (Gao et al. 2003) qui sont deux exemples d'inhibiteurs capables de se lier aux deux poches catalytiques.

La comparaison de séquences (Figure 3B de l'article) montre que les résidus du site Q_i qui, d'après cette étude, seraient impliqués dans la liaison de l'inhibiteur à ce site sont bien conservés entre la levure et *Plasmodium*. Il est donc probable qu'HDQ se lie également au site Q_i du parasite ce qui est en accord avec le fait les parasites portant la mutation de résistance à l'atovaquone Y279S dans le site Q_o soient sensibles à l'HDQ.

A l'exception d'antioomycètes tels que le cyazofamide et l'amisulbrom, la majorité des inhibiteurs du complexe bc_1 développés comme antipaludiques ou fongicides ne ciblent pas le site Q_i mais le site Q_o . Le site Q_i est moins bien conservé entre les espèces que le site Q_o ce qui expliquerait pourquoi peu de Q_i Is ont été identifiés à ce jour. Les inhibiteurs de ce site pourraient être de précieux outils dans la lutte contre les pathogènes. Des drogues dérivées d'HDQ pourraient être utilisées en combinaison avec des inhibiteurs du site Q_o ce qui limiterait l'émergence de résistance. L'apparition de mutations dans les deux poches catalytiques, si cela arrivait, conduirait à une sévère perte d'activité du complexe et, par conséquent, du fitness du pathogène ce qui pourrait ne pas être toléré par ce dernier.

Conclusion du chapitre

Notre collection de mutants de résistance à des inhibiteurs du site Q_o ou Q_i , nous a permis d'identifier le site de fixation et de caractériser le mode de liaison dans ce site de HDQ, un puissant inhibiteur de la prolifération de *P. falciparum*. HDQ est un inhibiteur du site Q_i . A l'exception d'antioomycètes, les inhibiteurs du complexe bc_1 développés comme antimicrobiens ne ciblent pas le site Q_i mais le site Q_o . Des drogues dérivées d'HDQ, utilisées en combinaison avec des inhibiteurs du site Q_o , pourraient être de précieux moyens de lutte contre *Plasmodium* car cela limiterait l'apparition de résistance. A l'heure actuelle, le seul Q_o I à être utilisé dans le traitement du paludisme est l'atovaquone, qui présente une forte activité inhibitrice de l'enzyme du parasite et une faible réactivité envers le complexe bc_1 humain et dont des mutations de résistance ont été rapportées. En mimant les poches catalytiques de *Plasmodium* et de l'Homme dans la levure, on a pu mettre en évidence des acteurs de cette sensibilité différentielle. Les mutants construits pourront être utilisés pour le design et le criblage de nouveaux composés mais également pour suivre l'apparition de la résistance à ces nouvelles drogues en recherchant des mutations de résistance. De la même façon, des modifications pourraient être apportées au site Q_i afin d'obtenir un modèle complet.

Chapitre II : Les fongicides et antioomycètes ciblant le complexe bc_1

Il existe deux types d'inhibiteurs ciblant le complexe bc_1 de pathogènes de plantes: les fongicides ciblant le site Q_o (Q_o Is) et les fongicides ciblant le site Q_i (Q_i Is).

Les fongicides Q_o Is commercialisés sont employés dans les cultures céréalières, viticoles, légumières et fruitières. Ces fongicides inhibent la respiration mitochondriale en se liant à la poche catalytique Q_o du complexe bc_1 ce qui induit un arrêt du transfert des électrons et de la translocation de protons à travers la membrane interne entraînant une diminution de la production d'ATP. On trouve parmi ces Q_o Is les strobilurines. Leur découverte a été inspirée par des fongicides naturels dérivés des acides β -methoxyacrylate (MOA) (Becker et al. 1981) comme le strobilurine A produit par le basidiomycète *Strobilurus tenacellus*. Ces strobilurines naturels ne peuvent être utilisés en agriculture car ils sont photochimiquement instables et volatiles. Cependant, des dérivés synthétiques ont pu être commercialisés ; c'est le cas de l'azoxystrobine introduit en agriculture dès 1996. D'autres inhibiteurs ont été ensuite vendus comme le famoxadone et le fenamidone chimiquement distincts des strobilurines mais ayant un mode d'action similaire. Les fongicides Q_o Is sont généralement actifs contre les quatre principaux groupes de phytopathogènes (ascomycètes, basidiomycètes, deutéromycètes et oomycètes). Les pathogènes de plantes ayant une oxydase alternative permettant de contourner le complexe bc_1 inhibé par ces molécules, ces dernières sont principalement utilisées en préventif contre la germination des spores qui est un processus nécessitant un apport important en énergie (Avila-Adame & Köller 2003). Il a été montré que, chez *Botrytis cinerea*, l'azoxystrobine a un effet fongistatique plutôt que fongicide (Inoue et al. 2011). Les strobilurines en champs auraient également un effet bénéfique sur le rendement et la taille des grains des cultures (Bartlett et al. 2002).

Malheureusement, dès 1998 des premiers cas de résistance aux strobilurines ont été découverts chez *Blumeria graminis* f. sp. *tritici*. Depuis ces résistances ont été détectées chez d'autres phytopathogènes (site de la FRAC). On dénombre, à ce jour, trois mutations dans le cytochrome b conférant une résistance aux fongicides Q_o Is utilisés en agriculture.

Il s'agit des mutations F129L, G137R et G143A dont les effets sur la liaison des fongicides au site catalytique ont été décrits dans l'introduction de cette thèse. La mutation G143A, la plus répandue et qui confère le plus fort niveau de résistance aux strobilurines, est apparue rapidement chez certains pathogènes alors que l'évolution de ce changement a été plus lente voire absente chez d'autres espèces. Il serait donc intéressant d'aborder la question de la base moléculaire de cette évolution différentielle. Deux facteurs pouvant affecter l'évolution de cette mutation ont été étudiés : 1) les variations structurales dans le site de liaison des fongicides Q_oIs présentées dans l'introduction générale (Fisher et al. 2004); 2) la structure exon/intron du gène codant pour le cytochrome *b*. Pendant ma thèse, j'ai étudié l'effet délétère de la mutation de résistance aux inhibiteurs du site Q_o, G143A, chez les champignons et oomycètes phytopathogènes possédant un gène, codant pour le cytochrome *b*, avec intron pour vérifier la seconde hypothèse et j'ai recherché des mécanismes permettant de contourner cette résistance. Ce travail a fait l'objet d'une publication ci-jointe et qui est résumée dans la partie A de ce chapitre.

Face au nombre croissant de cas de phytopathogènes résistants aux fongicides Q_oIs ciblant le complexe *bc*₁, il est important d'identifier de nouvelles molécules capables d'inhiber cette enzyme et notamment l'enzyme des pathogènes résistants aux traitements actuels. Pour cela, nous avons développé un test rapide permettant d'identifier au sein d'une chimiothèque des composés capables d'inhiber la fonction respiratoire. Ce test est décrit dans la partie B du chapitre et a fait l'objet d'une publication.

A l'heure actuelle, les Q_iIs disponibles sur le marché, comme le cyazofamide et l'amisulbrom, sont uniquement actifs contre le complexe des oomycètes. Des cas de résistance au cyazofamide ont été reportés (Kousik & Keinath 2008); la mutation conférant cette résistance n'a cependant pas encore été identifiée. Cette différence de sensibilité au cyazofamide et à l'amisulbrom entre les oomycètes et les champignons sera étudiée dans la partie C de ce chapitre.

Chapitre II-A : Effet délétère de la mutation de résistance aux inhibiteurs du site Q_o, G143A, chez les phytopathogènes possédant un gène, codant pour le Cyt *b*, avec intron et mécanismes de contournement

I. Introduction

Grasso et ses collaborateurs ont montré en 2006 qu'il existe une différence dans la structure exon/intron du gène codant pour le cytochrome *b* (*CYTB*) des champignons et oomycètes (Figure 37). Certaines espèces possèdent un intron localisé immédiatement après le codon GGT codant pour le résidu G143 et, ce qui est intéressant, c'est que chez ces espèces la mutation de résistance aux fongicides Q_oIs, G143A, n'a pas été rapportée. *Contrairement*, chez les espèces où elle a été détectée l'intron n'est pas présent (Figure 37).

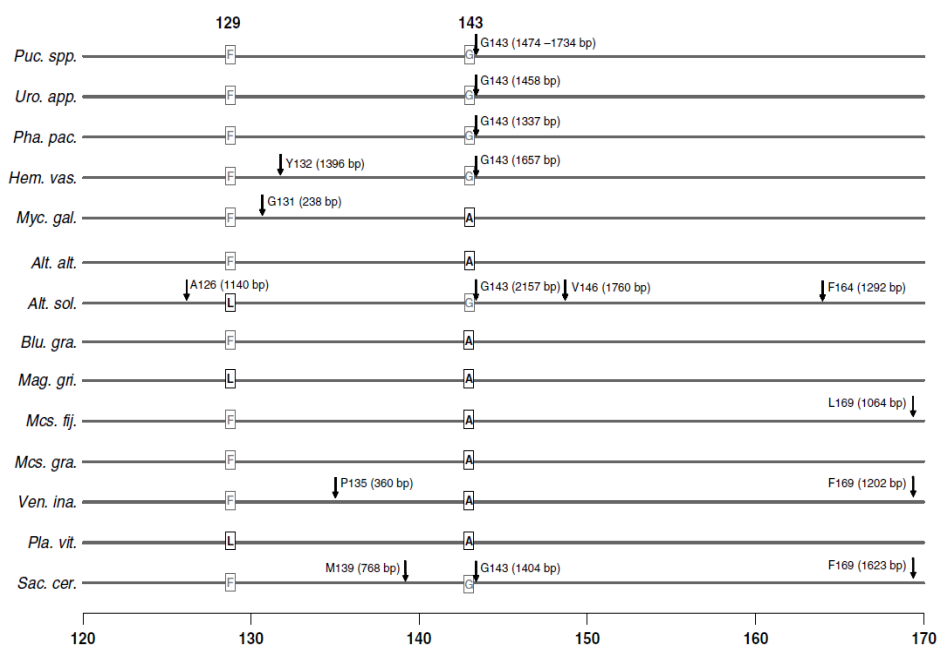


Figure 37: Structure de la région de *CYTB* codant pour les résidus 120 à 170 de différents phytopathogènes. Les mutations F129L et G143A responsables de la résistance aux fongicides Q_oIs sont présentées dans des rectangles. Les flèches indiquent la position des introns. *Puc. spp.*: différentes espèces de *Puccinia*; *Uro. app.*: *Uromyces appendiculatus*; *Pha. pac.*: *Phakopsora pachyrhizi*; *Hem. vas.*: *Hemileia vastatrix*; *Myc. gal.*: *Mycena galopoda*; *Alt. alt.*: *Alternaria alternata*; *Alt. sol.*: *Alternaria solani*; *Blu. gra.*: *Blumeria graminis*; *Mag. gri.*: *Magnaporthe grisea*; *Mcs. fij.*: *Mycosphaerella fijiensis*; *Mcs. gra.*: *Mycosphaerella graminicola*; *Ven. ina.*: *Venturia inaequalis*; *Pla. vit.*: *Plasmopara viticola*; *Sac. cer.*: *Saccharomyces cerevisiae*. Figure extraite de (Grasso et al. 2006).

Les auteurs suggèrent que la présence ou l'absence de cet intron, appelé bi2 chez la levure, pourrait affecter l'apparition de la mutation G143A car celle-ci pourrait empêcher l'épissage de l'intron induisant une baisse du niveau de complexe *bc*₁ provoquant ainsi une diminution de la fonction respiratoire.

L'intron bi2 appartient aux introns du groupe I ; groupe qui catalysent leur propre épissage (Figure 38A) (pour revue, (Saldanha et al. 1993)). La structure secondaire de ces introns est composée d'une série de courts et longs appariements nommés P1-P10 ; les boucles P3-P8 forment le cœur catalytique de l'intron et les boucles P1 et P10 contiennent les sites d'épissage formés par une partie de l'exon en amont (pour P1) ou en aval (pour P10) de l'intron et d'une courte séquence de ce dernier (Figure 38B). Un changement dans la séquence nucléotidique de ces sites pourrait entraver l'appariement et, de ce fait, l'excision de l'intron.

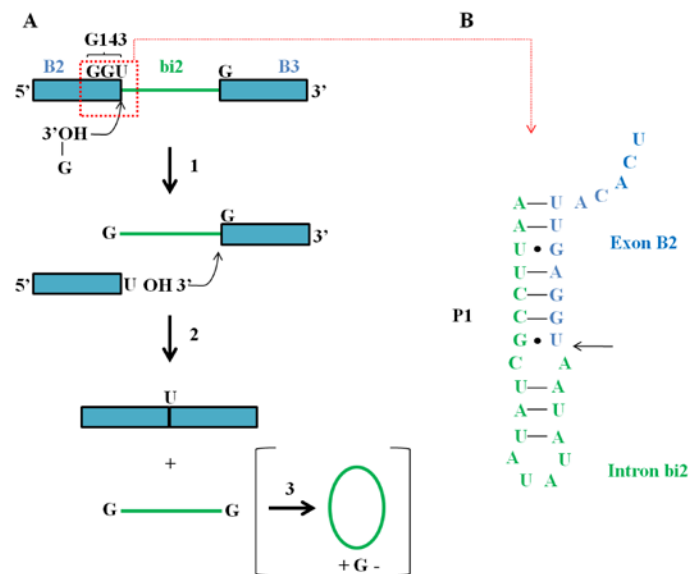


Figure 38: Mécanisme d'épissage de l'intron bi2 chez *S. cerevisiae*. (A) Le mécanisme d'épissage de l'intron bi2 suit celui des autres introns du groupe I : Etape 1, le 3'-OH d'une guanosine entraîne une rupture de la liaison exon B2-intron bi2. Etape 2, une seconde réaction de transestérification a lieu permettant la ligation des deux exons. Etape 3, cyclisation de l'intron. Les exons B2 et B3 sont représentés par des rectangles et l'intron bi2 par une ligne ou un cercle (Adapté de (Lambowitz & Belfort 1993)). (B) Modèle de l'appariement exon B2-intron bi2 (boucle P1) requis pour l'épissage de l'intron. La position de la jonction exon B2 (en bleu) - intron bi2 (en vert) est indiquée par une flèche.

Pour vérifier cette hypothèse, la mutation G143A a été introduite chez une souche de *S. cerevisiae* possédant un intron après le codon GGT par mutagenèse dirigée et transformation mitochondriale. J'ai ensuite analysé l'effet de ce changement sur l'épissage de l'intron bi2 et recherché de possibles voies permettant de contourner le défaut causé par la mutation.

II. Article

Appl Environ Microbiol. 2011 Mar;77(6):2088-93. Epub 2011 Jan 28.

Deleterious effect of the Qo inhibitor compound resistance-conferring mutation G143A in the intron-containing cytochrome *b* gene and mechanisms for bypassing it.

Cindy Vallières¹, Martin Trouillard², Geneviève Dujardin¹ and Brigitte Meunier^{1*}

Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, FRC 3115, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France¹ ; IBPC, 13 rue Pierre et Marie Curie, 75005, Paris, France².

Keywords: yeast mutants; respiratory enzymes; resistance; Qo inhibitors; fungicide

Running title: QoI resistance mutation G143A

**Corresponding author.* Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France. Phone: 33 1 69823156. Fax: 33 1 6982 3160. E-mail: meunier@cgm.cnrs-gif.fr

The mutation G143A, in the inhibitor binding site of cytochrome *b*, confers a high level of resistance towards fungicides targeting the *bc*₁ complex. The mutation, reported in many plant pathogenic fungi, has not evolved in fungi that harbour an intron immediately after the codon for G143 in the cytochrome *b* gene, the intron bi2. Using *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism, we show here that the codon change GGT in GCT, that replaces glycine 143 by alanine, hinders the splicing of bi2 by altering the exon/intron structure needed for efficient intron excision. This lowers the level of cytochrome *b* and the respiratory growth. We then investigated possible by-pass mechanisms that would restore the respiratory fitness of a resistant mutant. Secondary mutations in the mitochondrial genome were found: a point mutation in bi2 restoring the correct exon/intron structure and the deletion of the intron bi2. We also found that the overexpression of the nuclear genes *MRS2* and *MRS3* encoding mitochondrial metal ion carriers partially restores the respiratory growth of the G143A mutant. Interestingly, the *MRS3* gene from the plant pathogenic fungus *Botrytis cinerea*, overexpressed in an *S.*

cerevisae G143A mutant, had a similar compensatory effect. These by-pass mechanisms identified in yeast could potentially arise in pathogenic fungi.

INTRODUCTION

The mitochondrial bc_1 complex is a membrane-bound multi-subunit enzyme that catalyses the transfer of electrons from ubiquinol to cytochrome *c* and couples this electron transfer to the vectorial translocation of protons across the inner mitochondrial membrane. Cytochrome *b* is the central membrane-embedded subunit that forms the ubiquinol binding pockets called, Q_o and Q_i .

A number of quinol antagonists are known that inhibit bc_1 complex activity. These are either specific for the Q_i site, such as antimycin, or for the Q_o site, such as myxothiazol, stigmatellin and the strobilurins. A range of Q_o inhibitor compounds (QoIs) have been developed as anti-microbial agents and are now widely used in agriculture to control fungal and oomycete plant pathogens. Unfortunately, acquired resistance has rapidly emerged in field populations of the plant pathogens. The cytochrome *b* mutation, G143A, plays a central role in the mechanism of resistance. The mutation has been reported in most of the Q_o I resistant pathogens (see (<http://www.frac.info/frac/index.htm>) and references within). G143A causes a high level of resistance (>100x) in pathogens which are, consequently, poorly, or not, controlled by QoIs. In the model organism, *S. cerevisiae*, G143A also dramatically increases resistance to myxothiazol (18,000x) and azoxystrobin (4,000x) (8). G143 is a highly conserved residue located in the Q_o pocket, close to the inhibitor binding site. The replacement of glycine by alanine would prevent inhibitor binding through simple steric hindrance while the Q_o site remains functional, as observed in the yeast model (8).

The cytochrome *b* gene is encoded by the mitochondrial genome in all eukaryotes. In fungi, large introns are usually found in the gene. Analysis of its genomic structure in several fungal plant pathogens revealed variations in the arrangement of exons and introns between species (13), as had been observed in earlier studies, for instance in (4). Of particular interest is the intron present in some species and located immediately after the codon for G143. That intron is similar to the intron bi2 found in the cytochrome *b* gene of most *S. cerevisiae* laboratory strains. In several species of *Puccinia*, in *Alternaria solani* and in other fungi, the intron bi2 is present. Interestingly, in

those species, the resistance mutation G143A has not been detected so far. In contrast, species where G143A have been reported, do not contain the intron bi2 (13, 24), for instance *Blumeria graminis*, *Mycosphaerella fijiensis*, *M. graminicola*, *Venturia inaequalis*, *Plasmopara viticola*, *Alternaria alternata*, etc. *Botrytis cinerea* is particularly interesting since the same species presents two types of cytochrome *b* gene: some field isolates contain the intron bi2, while others do not. The mutation G143A has only been reported in these latter populations (1,17). These observations suggested that the presence or absence of the intron bi2 might affect the occurrence of the G143A mutation. It has been hypothesized that the resistance mutation might impair the correct splicing of the intron bi2, leading to a reduced level of mature cytochrome *b* mRNA, and a lower amount of the *bc*₁ complex and to a decreased respiratory function (13). Therefore G143A, affecting the fitness of the resistant cells, would be counter-selected in field. The mutation would not evolve in the pathogens containing bi2, except if compensation mechanisms can be developed that restore the respiratory efficiency while keeping the resistance mutation.

In this study, we use *S. cerevisiae* as a model organism to analyse the effect of the G143A mutation in an intron containing cytochrome *b* and to investigate possible ways to by-pass the defect caused by the mutation.

MATERIALS AND METHODS

Medium, chemicals and primers. The following media were used for the growth of yeast: Glucose medium (1% yeast extract, 2% peptone, 3% glucose, supplemented with adenine); Glycerol medium (1% yeast extract, 2% peptone, 3% glycerol); Galactose medium (1% yeast extract, 2% peptone, 3% galactose, supplemented with adenine); Uracil-minus medium (0.7 % yeast nitrogen base, 3% glucose and 0.8g/l of a complete supplement mixture minus uracil, supplied by Anachem); Transformation medium (0.7% yeast nitrogen base, 3% glucose, 1 M sorbitol and 0.8g/l of a complete supplement mixture minus uracil). Agar was added at 2% for solid media. Azoxystrobin was a generous gif from Syngenta. The primers used in the study are listed in the supplementary table.

Generation of the plasmids and mutant strain. A 717 bp DNA fragment was amplified by PCR from the intron-containing *CYTB* gene (encoding cytochrome *b*). This fragment containing 281 bp of the 3'-end of the intron bi1, the 14 bp of exon B2 and 422 bp of the 5'-end of the intron bi2 was blunt-end cloned into the pCRscript vector (Stratagene). The mutation G143A (corresponding to the nucleotide change GGT>GCT) was then introduced in the *CYTB* fragment inserted in the pCRscript vector using the Quickchange Site-Directed Mutagenesis Kit (Stratagene) according to the manufacturer's recommendations. The resulting plasmid, carrying the mutated *CYTB* fragment, was called pGA. pGA was used for construction of pGACOX, where the 2.5 kb *Bam*H1-*Hind*III fragment containing the *COX2* gene

from pJM2 (20) was inserted into the *BamHI-HindIII* site of pGA. After verification, pGACOX was used for biolistic transformation. The mitochondrial transformation by microprojectile bombardment was adapted from (3) and described in (19). A mixture of pGACOX carrying the mutated *CYTB* fragment and the *COX2* gene, and YEp352 (which contains the *URA3* gene, allowing the selection of Ura⁺ nuclear transformants) was used for transformation of the *rho*⁰ recipient strain. Ura⁺ transformants were selected on synthetic medium minus uracil. In order to identify the mitochondrial transformants, the colonies were then crossed with a respiratory deficient *cox2* tester strain and replica-plated onto respiratory medium. Since the *cox2* tester deficiency mutation could be corrected by recombination with the plasmid-borne *COX2* gene, mitochondrial transformants were identified by their ability to form respiratory-competent diploids when crossed with the tester strain. The mitochondrial transformants (or synthetic *rho*⁻) were the subcloned and tested again. The introduction of mutation into the intron-plus *CYTB* of a *rho*⁺ genome was achieved by homologous recombination, the synthetic *rho*⁻ was crossed with a *rho*⁺ wild type intron-plus strain, followed by the selection of inhibitor resistant recombinant cells. The sequence of the cytochrome *b* region bi1-B2-bi2 was then verified. The resulting mutants were in the W303-1B nuclear background (*alpha ade2-1 his3- leu2-3,112 trp1-1 ura3-1* (27)). The mutated and wild type mitochondrial genomes were then transferred into the CKU nuclear background (*a leu1 ura3 kar1-1*; this work) by cytoduction. All the strains analyzed in this study were isogenic with the CKU nuclear genome.

Isolation and genetic analysis of the suppressors. The respiratory deficient mutants generated by biolistic transformation were used to select revertants. The mutants were subcloned. Several subclones were grown on glucose medium, and then incubated on respiratory medium (glycerol medium). Alternatively, the cells were first treated overnight with 10 mM MnCl₂, known to induce mitochondrial mutations, and then incubated on respiratory medium. Respiratory competent clones appeared after one or two weeks incubation. Independent suppressors (each issued from different subclones) were then analyzed as described in (5) to determine the mitochondrial or nuclear heredity of the suppressor mutation. Briefly, the respiratory competent clones (*rho*⁺ suppressors) and their *rho*⁰ derivatives obtained by ethidium bromide treatment (*rho*⁺ suppressors) were crossed with a G143A mutant (of the opposite mating type). If the suppressor mutations are mitochondrial, the diploids issued from the cross *rho*⁰ suppressors x G143A mutant, will be respiratory deficient since the suppressor mutations are lost in the *rho*⁰ derivatives; the diploids issued from the the cross *rho*⁺ suppressors x *rho*⁰ will be respiratory competent. Standard methods of yeast mitochondrial genetics are described in (10).

Isolation of multicopy suppressors. The respiratory deficient mutants generated by biolistic transformation were transformed by a high-copy wild type genomic library made in the *URA3* 2 μ vector pFL44L (2). Ura⁺ clones were selected and replica plated onto glycerol medium. Respiratory competent clones appearing after 4-5 days were analysed. Plasmids were isolated from clones that showed a clear co-segregation of respiratory competence and Ura⁺. The chromosomal fragments present on the plasmids were identified by sequencing.

Spectroscopic analysis of cytochromes in whole cells. Spectra were generated by scanning of cell suspensions with a spectrophotometer built in-house operating at room temperature. The optical setup

consisted of an integrating sphere built in a piece of Spectralon (Labsphere, New Hampshire, USA). The light input was provided by a Xenon arc lamp, and the detection was made at 90° from the input, with an Ocean Optics QE65000 (Dunedin, Florida, USA) CCD spectrophotometer. A linear contribution was subtracted from the spectra to compensate for the effects of optical diffusion. The cells were grown for 48 hours on galactose or uracil-minus medium for the cells transformed with the vectors pFL44L or pYeDP 1/10 to maintain the plasmids. The cells were then re-suspended at a concentration of around 10 mg of cells in 100 µl of water and reduced by dithionite.

RNA extraction and RNA hybridization. Cells were grown in galactose medium and harvested at exponential growth phase and total RNAs were purified by the “hot phenol” technique (21). The RNAs were quantified spectrophotometrically at 260 nm. The RNAs were separated on 1.2% agarose formaldehyde gels and transferred onto Hybond-C extra membrane (Amersham, Buckinghamshire, UK). Prehybridization and hybridization were done at 42°C in 50% formamide in the presence of Denhardt solution. PCR-amplified fragments of *CYTB* exon B1 (400bp) and *15S* (364bp) were generated and radiolabeled by random priming (random primer DNA labeling system from Invitrogen, San Diego). These probes were then used to detect the RNAs. The *CYTB* pre-mRNA and mRNA levels were quantified with ImageJ (National Institutes of Health) and normalized to the levels of *15S* rRNA.

Cloning of nuclear *MRS3* gene from *Botrytis cinerea*. The *MRS3*-equivalent gene (accession number: XM_001553578; protein: BC1G_07715) was PCR-amplified from a cDNA library of *Botrytis cinerea* (prepared from strain B05-10 and kindly provided by A-S Walker, BIOGER, INRA, Thiverval-Grignon, France). The PCR fragment was then cloned in a yeast multi-copy expression vector under the control of the PGK promoter, the constitutive promoter of the phosphoglycerate kinase gene (vector pYeDP1/10 provided by B. Guiard, Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, Gif-sur-Yvette, France). This plasmid was used to transform the G143A splicing-deficient mutant.

RESULTS

Effect of G143A on the splicing of the intron bi2 of cytochrome *b*.

The codon GGT, encoding the amino-acid G143 is located at the exon B2/intron bi2 boundary in the mitochondrially-encoded cytochrome *b* gene (FIG.1). In the Q_oI resistant G143A mutants, it has been replaced by codon GCT. It is known that the pairing between the 5' exon (B2) and the so-called internal guide sequence, a short sequence at the 5' end of the intron (bi2) is required for splice site recognition (see (23) for a review on intron splicing mechanisms). Thus it seems likely that the mutation would affect the splicing of intron bi2, leading to a reduced level of mature mRNA, a decreased level of

cytochrome *b*, hence a lower amount of the *bc*₁ complex and a reduced respiratory function.

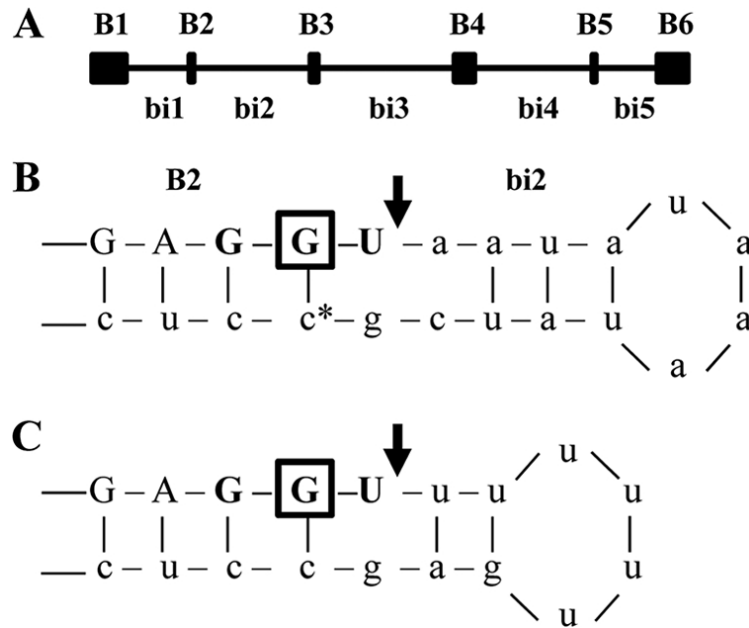


FIG. 1. The intron bi2 in the cytochrome *b* gene. (A) Structure exons (boxes)/introns (lines) of the cytochrome *b* gene in *S. cerevisiae*. (B) Model of the exon B2/intron bi2 pairing in *S. cerevisiae*, which is required for the efficient splicing of bi2. The position of the exon B2 (uppercase)/intron bi2 (lowercase) junction is shown by the large arrow. The triplet GGU encoding amino-acid G143 is in bold and the mutated nucleotide (G>C) resulting in the aminoacid substitution G143A is boxed. The asterisk indicates the position of a second mutation (C>G), present in Sup2, that restores base pairing and splicing. (C) Model of the exon/intron pairing in *B. cinerea*.

In order to test this hypothesis, the G143A (GGT>GCT) mutation was introduced into a wild type *S. cerevisiae* mitochondrial genome by site-directed mutagenesis and mitochondria transformation (Materials and Methods). We then analysed the impact of the mutation on the respiratory growth, the level of the *bc*₁ complex and the amount of *CYTB* mRNA (FIG.2). For comparison, we monitored the effect of the same change in an intron-less cytochrome *b* gene. G143A causes a severe decrease in respiratory growth (panel A) and a significant decrease in the level of cytochrome *b* (panel B): the cytochrome *b* signal, monitored by spectrophotometry in intact cells, was decreased to 40-50% of the wild type level. By contrast, the mutation has no effect on the respiratory growth and on the cytochrome *b* level in the absence of the intron bi2 as previously observed (7).

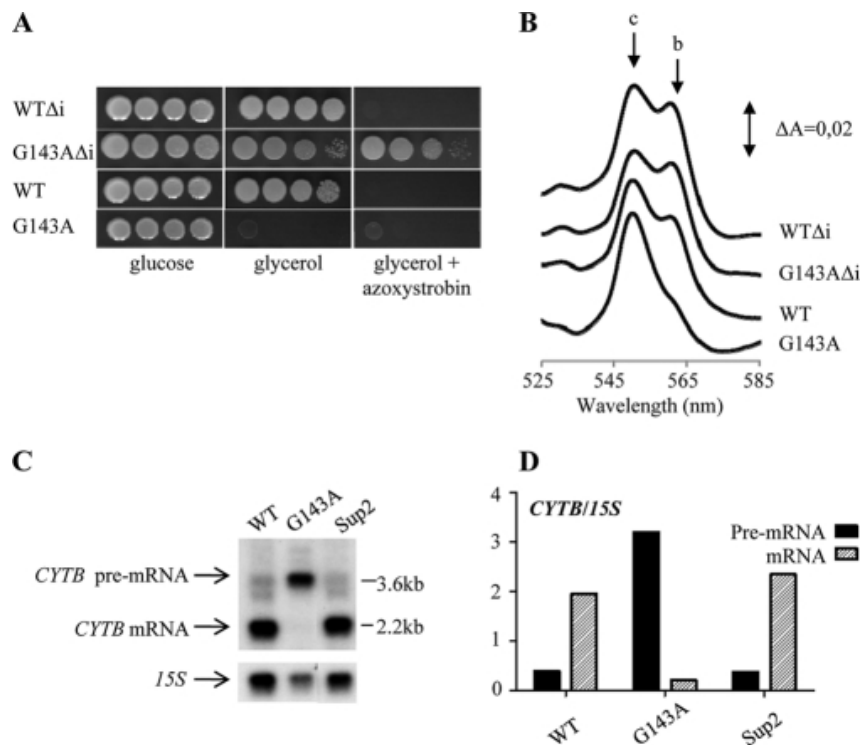


FIG. 2. Impact of mutation G143A on the respiratory growth, the level of cytochrome *b* and the amount of *CYT*B mRNA in *bi2*-containing strains.** (A) Serial dilutions of WT and G143A cells (intron-plus or intron-less, Δi) were spotted onto agar plates containing a fermentable medium (glucose) or a non-fermentable medium (glycerol) with or without 5 μ M azoxystrobin and incubated 5 days at 28°C. (B) Cytochrome absorption spectra of WT and G143A cells (intron-plus or intron-less, Δi). Optical spectra were obtained as described in the Materials and Methods. Absorption maxima are indicated by arrows. *c*, cytochromes *c* and *c*₁; *b*, cytochrome *b*. (C) *CYT*B** pre-mRNA and mRNA levels of the intron-plus strains WT, G143A and Sup2 that combines G143A and a second compensatory mutation in *bi2*. RNAs were analyzed by hybridization carried out with probes specific for *CYT*B** (exon B1) and the 15*S* rRNA as control. The 2.2 kb RNA corresponds to the mature *CYT*B** mRNA; the 3.6 kb RNA correspond to a pre-mRNA containing *bi2*, as previously reported (18). (D) *CYT*B** pre-mRNA and mRNA levels in WT, G143A and Sup2 cells obtained from northern blot (panel C) were quantified with ImageJ (National Institutes of Health) and normalized for the levels of 15*S* rRNA.

Northern blot analysis of *CYT*B** pre-mRNA and mRNA (FIG. 2, panels C and D) shows that the mutation causes a dramatic (\pm 90%) decrease in mature mRNA. In mitochondria, mRNAs are known to be in excess, the control of gene expression being principally at a post-transcriptional level (see for instance (6)). Thus the observation that, in the mutant, *CYT*B** mRNA is present at 10% of the wild type level while cytochrome *b* reaches 40-50 % of wild type signal was not unexpected.

Accumulation of a pre-mRNA of around 3.6kb, which corresponds to the size of a pre-mRNA containing intron *bi2* was observed. Thus it seems most likely that, as previously hypothesized, G143A affects the splicing of *bi2* by hindering the pairing between exon B2 and the *bi2* internal guide sequence. This was confirmed by the analysis of a double mutant strain, called Sup2 (obtained and analysed as described in the Materials and Methods) that combines G143A and a mutation in the *bi2* internal guide sequence (replacement of nucleotide C to a G) (see FIG. 1B). This mutation

restores the correct pairing between B2 and bi2 required for splice site recognition, which results in the correct splicing of bi2 and in consequence, the full amount of *CYTB* mRNA (FIG. 2, panels C and D).

In addition to a correct RNA structure, the excision of bi2 requires a maturase, encoded by bi2 itself. It has been previously reported that mutations in the bi2 maturase result in a splicing defect that could be corrected by secondary mutations in the same positions or at a distant site in the bi2 maturase (15, 18).

By-pass mechanisms of the respiratory defect.

As shown in FIG. 3A, G143A causes a severe respiratory growth defect. It was therefore possible to select suppressors, *i.e.* respiratory competent clones issued from G143A. The analysis of the suppressors provides interesting information on the possible mechanisms by which the respiratory defect could be by-passed. Two approaches were used to identify suppressors: direct selection of respiratory competent clones obtained spontaneously or after mutagen treatment, and the selection of high-copy number suppressors after transformation by a genomic library. Using the first approach, we looked for compensatory mutations in the mitochondrial genome; using the second approach, we hoped to identify nuclear genes whose increased expression level would restore (at least partially) the level of the *bc*₁ complex.

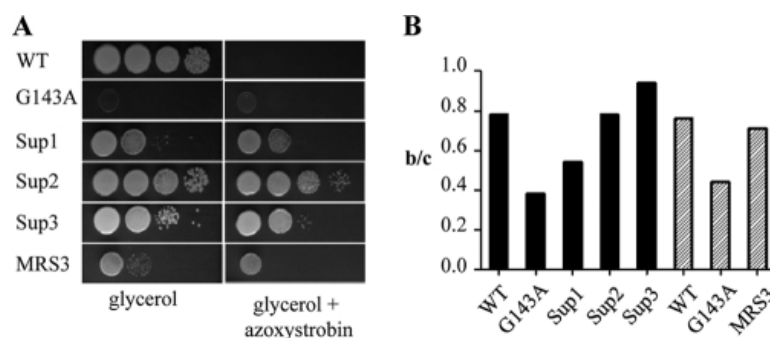


FIG. 3. Effects of suppressors on the respiratory growth and on the level of cytochrome *b*. (A) Serial dilutions of each strain were spotted onto a non-fermentable medium (glycerol) with or without 5 μ M azoxystrobin and incubated for 5 days at 28°C. (B) Cytochrome *b*/cytochrome *c* ratio (b/c) in intact cells obtained from optical spectra (see Materials and Methods). The cells were grown in galactose medium (black bars) or in uracil-minus medium (hatched bars). Sup1, mitochondrial suppressor “outside bi2”; Sup2, mitochondrial suppressor “in bi2”; Sup3, mitochondrial suppressor “loss of bi1 and bi2”; MRS3, high-copy number nuclear suppressor.

Compensatory mutations in the mitochondrial genome.

Independent respiratory competent clones were selected on respiratory medium and the heredity of the suppressor mutation was determined as described in the

Materials and Methods. For five clones, the suppressor mutation was clearly of mitochondrial origin and these were studied further.

In two suppressor clones, the complete restoration of the wild type respiratory growth and cytochrome level was due to the reversion of the G143A to the wild type codon, causing the loss of the Q_oI resistance. One suppressor, Sup1 (FIG.3, panels A and B) partially restored the respiratory growth and the level of cytochrome *b*. The compensatory mutation was located by *rho*⁻ mapping (10) to a region comprising *COX1* and *ENS2* (encoding a putative endonuclease) but excluding *CYTb*. Sequencing of 5'-UTR of *CYTb*, of *COX1* and of *ENS2* did not reveal any change. The analysis of this suppressor was not pursued.

As already mentioned above, in Sup2, a secondary mutation that replaces nucleotide C to G in the bi2 internal guide sequence restores the correct pairing between B2 and bi2 and by consequence, the splicing of the bi2 intron and the full amount of mRNA (FIG. 2, panels C and D). The suppressor results in an amino acid replacement of an alanine by a glycine in the bi2 maturase, which has no deleterious effect on its function: Sup2 showed a wild type level of respiratory growth and cytochrome *b* level and resistance to azoxystrobin (FIG. 3A and B).

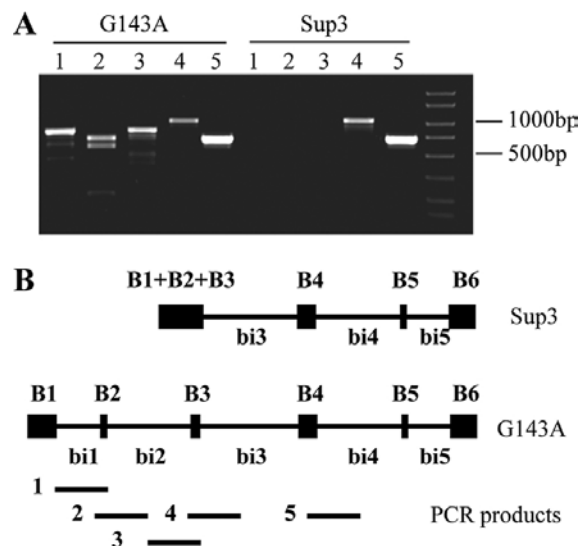


FIG.4. PCR analysis of cytochrome *b* exon/intron structure in the suppressor strain, Sup3. (A) PCR amplification of regions of *CYTb* using genomic DNA extracted from WT and Sup3 strains: lane 1, B1-bi1-B2 (836bp); lane 2, bi1-B2-bi2 (717bp); lane 3, bi2-B3 (850bp); lane 4, B3-bi3 (973bp); lane 5, B4-bi4 (715bp). (B) Structure of *CYTb* gene in Sup3 and in G143A, and PCR products.

In the last type of mitochondrial suppressor, Sup3, the by-pass of the respiratory defect was obtained by the deletion of introns bi1 and bi2, as found by the PCR analysis

of *CYTB*; the introns bi3 and bi4 (and presumably bi5) are retained (FIG. 4). The region B1+B2+B3 of the new *CYTB* gene present in Sup3 was sequenced, this showed the clean excision of bi1 and bi2 and the correct ligation of exons B1, B2 and B3. This was expected since the suppression leads to a functional cytochrome *b*, as judged by the respiratory growth of Sup3 (FIG. 3A). The loss of the first two introns fully restores the level of cytochrome *b* (FIG. 3B).

Compensatory effect of high copy nuclear genes.

In order to identify nuclear genes whose increased expression level would restore (at least partially) the respiratory growth of G143A, we transformed the mutant with a wild type genomic library on a high-copy number plasmid and respiratory competent clones were selected as described in the Materials and Methods. In 18 clones, a clear co-segregation of the plasmid with the respiratory competence was observed. The plasmids were extracted from these clones and the genomic fragments inserted in the plasmids were sequenced. In all but one clone, the inserts came from the same region of the genome that comprises *MRS3*. In one clone, the insert contained *MRS2*. *MRS2* and *MRS3* encode mitochondrial metal ion carriers. Both genes have previously been reported to be involved in the splicing of various mitochondrial introns (11, 16, 25, 31, 32). From our results, it appears that a high copy number of *MRS3* and *MRS2* compensate for the defective splicing of the intron bi2 as judged by the level of cytochrome *b* (illustrated by *MRS3* in FIG.3B). The respiratory growth competence was only partially restored. This could be due to the toxic effect of high dosage of these metal ion transporters, which could disturb the metal homeostasis of the mitochondria. It has been previously reported the over-expression of the *MRS3* and *MRS4* could cause a temperature-dependent respiratory deficient phenotype (32).

Mrs2p and Mrs3p are well conserved, for instance, sequence comparison shows 45% identity between the Mrs3p from *S. cerevisiae* and from *Botrytis cinerea* (the agent of gray mold). It is likely that Mrs3p from *B. cinerea* functions as a mitochondrial metal ion carrier as does its yeast homolog. A higher dosage of this protein might also be able to compensate for the bi2 excision defect caused by G143A. In order to test the hypothesis, *MRS3* was amplified from *B. cinerea* cDNA and cloned into a high copy number plasmid under the control of a yeast constitutive promoter (PGK). For comparison, *MRS3* from *S. cerevisiae* was cloned into the same plasmid (controlled by

the same promoter). The G143A mutant strain was transformed by the plasmids and respiratory growth and the level of cytochrome *b* 1 of the resulting clones were monitored. As shown in FIG.5, *B. cinerea* MRS3, at high copy, has the same compensatory effect as *S. cerevisiae* MRS3 and restored respiratory growth and cytochrome *b* content.

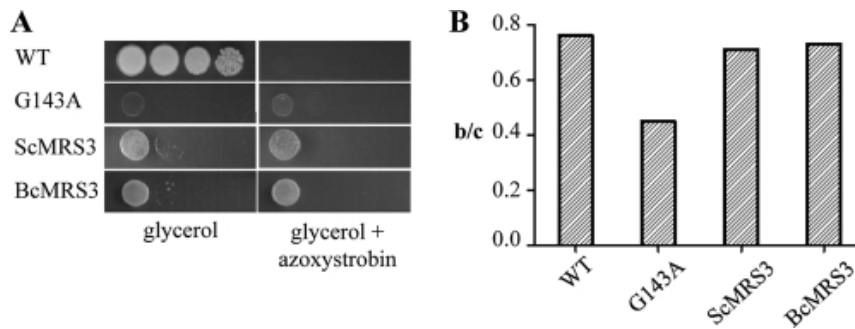


FIG. 5. Compensatory effect of the overexpressed MRS3 gene from *B. cinerea*. (A) Dilution series of WT, G143A and MRS3 suppressor strains were spotted onto glycerol medium with or without 5 μ M azoxystrobin and incubated for 5 days at 28°C. (B) Cytochrome *b*/cytochrome *c* ratio (b/c) in intact WT, G143A and MRS3 suppressor strains obtained from optical spectra (see Materials and methods). The cells were grown in uracil-minus medium. ScMRS3, *S.cerevisiae* MRS3; BcMRS3, *B.cinerea* MRS3.

DISCUSSION

Resistance mutation and impaired intron splicing.

Different factors might affect the evolution of G143A in field pathogenic fungi exposed to QoIs. In a previous study, we characterized the effect of small structural variations in the Q₀ site using *S.cerevisiae* as model organism (7). In this work, we investigated the impact of the exon/intron structure of the cytochrome *b* gene. The codon for G143 is located at the boundary between exon B2 and the intron bi2. Intron bi2 belongs to the group I of intronic RNA structure (see for a review (23)). These introns catalyse their own splicing *via* a series of guanosine-initiated transesterification reactions. Different group I introns have limited sequence identity but share conserved secondary and tertiary structures. The RNA secondary structures consist of a combination of short- and long-range pairing denoted P1 through P10, with elements P3-P8 forming the catalytic core of the intron. The splice-site recognition relies on pairing with exon sequences. An internal guide sequence pairs with exon sequences flanking the 5' and 3' splice sites to form helices P1 and P10, respectively (see (23)). Changes in the nucleotide sequence in these regions would hinder the pairing and the correct excision of the intron.

The change GGT to GCT in B2 that replaces a glycine by an alanine (G143A) causing a high level of resistance to QoIs is located in the pairing region between B2 and bi2 (see (28)) and FIG. 1B in this report). We showed here that the introduction of G143A causes a severe decline in respiratory growth. This is due to the decreased level of mature *CYTB* mRNA, and in consequence, in the *bc1* complex. In field populations of pathogenic fungi, G143A mutants would be counter-selected because of their reduced fitness. So far, the G143A mutation has not been reported in bi2-containing fungi. However, by-pass mechanisms could be developed that would allow an efficient growth combined with the resistance mutation. In order to investigate these possible mechanisms, we used the *S. cerevisiae* G143A mutant, selected respiratory competent clones and identified the secondary event restoring the respiratory function. We found that secondary mutations in the mitochondrial genomes and the over-expression of nuclear genes could by-pass the defect caused by G143A in *S. cerevisiae*. Could similar mechanisms evolve in pathogenic fungi? We examine the possibility of such by-passes in *B. cinerea*.

By-pass mechanisms from the yeast model to the pathogenic fungus *B. cinerea*.

It is likely that G143A would have a similar effect in the model organism *S. cerevisiae* and in other bi2-containing fungi. For instance, analysis of the nucleotide sequence of the region B2-bi2 in *B. cinerea* revealed that a similar model of pairing could be drawn (FIG.1C) and that the change GGT to GCT (G143A) would alter the pairing and by consequence the excision of the intron. Similarly, it can be hypothesized that a secondary mutation in bi2 could occur that restores the pairing.

Suppression by loss of intron bi2 could also be envisaged. We showed in the result section (FIG.5) that, in Sup3, the by-pass of the respiratory defect was due to the deletion of bi2. This type of suppression has been previously described in *S. cerevisiae* (12). Starting from respiratory deficient mutants with bi1, bi2 or bi3 splicing defects caused by mutations in those introns, respiratory competent clones were selected. In several of them, the restoration of the respiratory function was due to the clean deletion of the mutated introns. In addition to the mutated introns, neighbouring introns were also deleted. In our study, we found that the deletion of bi2 (that corrects its RNA splice defect caused by G143A) was associated with the deletion of bi1, as described for mutations in bi2 in (12). In that paper, the author proposed that reverse transcriptases encoded by the introns ai1 and ai2 of *COX1* play a role in the deletion of *CYTB* introns. It

was hypothesized that an RNA intermediate, with correctly spliced bi2 intron, was involved in the process. Note that Sup3 derives from a strain containing the *COX1* introns ai1 and ai2.

The populations of *B. cinerea* are formed of two species (I and II) living in sympatry that can be distinguished by microsatellite markers and gene polymorphisms ((17) and refs within). In both species, two types of *CYTB* that differ by the presence or absence of bi2 were observed. Different lineages within each species harbour the intron that was more frequent in species I than in species II. It was postulated that species II derived from I and that independent events of intron loss in II have occurred after the divergence (17). It could be hypothesized that a reverse transcriptase-like activity would be involved in the intron loss, which facilitates the acquisition of the G143A mutation. Alternatively, in bi2-containing fungi, selective pressure – by the repeated or long exposure to QoIs- might lead to the loss of bi2 and the acquisition of G143A.

Finally, we found that in *S. cerevisiae*, the nuclear genes *MRS2* and *MRS3*, at high dosage, partially compensate the defect induced by G143A. *MRS3* and the closely related *MRS4* (>70% identity) encode mitochondrial carriers involved in the transport of iron (9, 11) and probably of Mg^{2+} (30). The genes are not essential as their deletion has little effect on cell growth and mitochondrial function in standard conditions (31). It has been shown that *MRS3* and *MRS4*, in high-copy number, can suppress splicing defects in mitochondrial group II introns (25,31). *MRS2* encodes an essential component of the mitochondrial Mg^{2+} transport system (16). The gene is required for the splicing of group II introns while not essential for group I introns, such as bi2 (32). At high copy number, *MRS2* also suppresses splicing defect of group II introns. The mechanism of suppression would rely on an increased intramitochondrial concentration of Mg^{2+} caused by the overexpression of *MRS2* (14). Interestingly, the same study reported that the overexpression of *MRS3* or *MRS4* in a $\Delta mrs2$ strain (deletion of *MRS2*) had the same effect: increased Mg^{2+} and restoration of intron splicing (14). In our study, the splicing defect of the group I intron bi2 was found to be partially compensated for by the overexpression of *MRS3* and *MRS2*. Therefore the same mechanism of suppression could be suggested.

The *in-vitro* self-splicing of group I introns has been much studied. It has been shown that the binding of Mg^{2+} in the catalytic core of the intron is required for activity (22), which was further confirmed by the resolution of the atomic structure of group I

introns that revealed metal ions in the active site (see (26, 29) and references therein). It can be postulated that an increased Mg^{2+} in the mitochondria might enhance the catalytic activity of bi2 intron and/or stabilise its structure, thus facilitating the splicing despite an altered exon/intron pairing.

Mrs2p and Mrs3p are well conserved amongst species. We showed that an increased copy number of the *B. cinerea* *MRS3* gene, as its *S. cerevisiae* homolog, restored at least partially the respiratory function impaired by G143A. It might be hypothesized that an increased expression of *MRS3* in the pathogenic fungi might rescue the cell fitness of G143A mutants.

In conclusion, the presence of an intron immediately after the codon G143 seems to hamper the evolution of the QoI resistance mutation G143A in plant pathogenic fungi as the mutation would be associated with a fitness penalty. This would be the current situation in field populations. However, as found in *S. cerevisiae*, by-pass mechanisms might be developed to restore the respiratory function. It could be hypothesized that a long exposure to the inhibitors might lead to the evolution of such mechanisms.

ACKNOWLEDGEMENTS

The work was partly supported by the ANR (Agence Nationale de la Recherche, grant ANR-07-BLAN-0360-02).

REFERENCES

1. **Banno, S., K. Yamashita, F. Fukumori, K. Okada, H. Uekusa, M. Takagaki, M. Kimura, and M. Fujimura.** 2009. Characterisation of QoI resistance in *Botrytis cinerea* and identification of two types of mitochondrial cytochrome *b* gene. *Plant Pathology* **58**:120-129.
2. **Bonneaud, N., O. Ozier-Kalogeropoulos, G. Y. Li, M. Labouesse, L. Minvielle-Sebastia, and F. Lacroute.** 1991. A family of low and high copy replicative, integrative and single-stranded *S. cerevisiae*/*E. coli* shuttle vectors. *Yeast* **7**:609-615.
3. **Bonnefoy, N. and T. D. Fox.** 2001. Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Meth. Cell Biol.* **65**:381-396.
4. **Burke, J. M., C. Breitenberger, J. E. Heckman, B. Dujon, and U. L. RajBhandary.** 1984. Cytochrome *b* gene in *Neurospora crassa* mitochondria: Partial sequence and location at sites different from those in *Saccharomyces cerevisiae* and *Aspergillus nidelans*. *J. Biol. Chem.* **259**:504-511.
5. **Dujardin, G., P. Pajot, O. Groudinsky, and P. P. Slonimski.** 1980. Long range control circuits within mitochondria and between nucleus and mitochondria. I. Methodology and phenomenology of suppressors. *Mol. Gen. Genet.* **179**:469-482.

6. **Dunstan, H. M., N. s. GreenWillms, and T. D. Fox.** 1997. *In vivo* analysis of *Saccharomyces cerevisiae* COX2 mRNA 5'-untranslated leader functions in mitochondrial activation. *Genetics* **147**:87-100.
7. **Fisher, N., A. C. Brown, G. Sexton, A. Cook, J. Windass, and B. Meunier.** 2004. Modelling the Q_o site of crop pathogens in *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *b*. *Eur. J. Biochem.* **271**:2264-2271.
8. **Fisher, N. and B. Meunier.** 2005. Re-examination of inhibitor resistance conferred by Q_o site mutations in cytochrome *b* using yeast as a model system. *Pest Manag Sci.* **61**:973-978.
9. **Foury, F. and T. Roganti.** 2002. Deletion of the mitochondrial carrier genes *MRS3* and *MRS4* suppresses mitochondrial iron accumulation in a yeast frataxin-deficient strain. *J. Biol. Chem.* **277**:24475-24483.
10. **Fox, T. D., L. S. Folley, J. J. Mulero, T. W. McMullin, P. E. Thorsness, L. O. Hedin, and M. C. Costanzo.** 1991. Analysis and manipulation of yeast mitochondrial genes. *Meth. Enzymol.* **194**:149-165.
11. **Froschauer, E. M., R. J. Schweyen, and G. Wiesenberger.** 2009. The yeast mitochondrial carrier proteins Mrs3p/Mrs4p mediate iron transport across the inner mitochondrial membrane. *Biochim. Biophys. Acta* **1788**:1044-1050.
12. **Gargouri, A.** 2005. The reverse transcriptase encoded by ai1 intron is active in trans in the retro-deletion of yeast mitochondrial introns. *FEMS Yeast Res.* **5**:813-822.
13. **Grasso, V., S. Palermo, H. Sierotzki, A. Garibaldi, and U. Gisi.** 2006. Cytochrome *b* gene structure and consequences for resistance to Q_o inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest Manag Sci.* **62**:456-472.
14. **Gregan, J., M. Kolisek, and R. J. Schweyen.** 2001. Mitochondrial Mg²⁺ homeostasis is critical for group II intron splicing *in vivo*. *Genes Developp.* **15**:2229-2237.
15. **Jamoussi, j. and J. Lazowska.** 2000. Intragenic suppressors that restore the splicing and homing activities of the protein encoded by the second intron of the *Saccharomyces capensis* cytochrome *b* gene. *Curr. Genet.* **38**:276-282.
16. **Kolisek, M., G. Zsurka, J. Samaj, J. Weghuber, R. J. Schweyen, and M. Schweigel.** 2003. Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg²⁺ influx system in mitochondria. *EMBO J.* **22**:1235-1244.
17. **Leroux, P., M. Gredt, M. Leroch, and A.-S. Walker.** 2010. Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Appl. Environ. Microbiol.* **76**:6615-6630.
18. **Maciaszczyk, E., S. Ulaszewski, and J. Lazowska.** 2004. Intragenic suppressor that restore the activity of the maturase encoded by the second intron of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *b* gene. *Current Genetics* **46**:67-71.
19. **Meunier, B.** 2001. Site-direct mutations in the mitochondrially-encoded subunits I and III of yeast cytochrome oxidase. *Biochem. J.* **354**:407-412.
20. **Mulero, J. J. and T. D. Fox.** 1993. Alteration of *Saccharomyces cerevisiae* COX2 mRNA 5'-untranslated leader by mitochondrial gene replacement and functional interaction with the translational activator protein Pet111. *Mol. Biol. Cell.* **4**:1327-1335.

21. **Racki, W. J., A. M. Bécam, F. Nasr, and C. J. Herbert.** 2000. Cbk1p, a protein similar to the human myotonic dystrophy kinase, is essential for normal morphogenesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* **19**:4524-4532.
22. **Rangan, P. and S. A. Woodson.** 2003. Structural requirement for Mg²⁺ binding in the group I intron core. *J. Mol. Biol.* **329**:229-238.
23. **Saldanha, R., G. Mohr, M. Belfort, and A. M. Lambowitz.** 1993. Group I and group II introns. *FASEB J.* **7**:15-24.
24. **Sierotzki, H., R. Frey, J. Wullschleger, S. Palermo, S. Karlin, J. Godwin, and U. Gisi.** 2007. Cytochrome *b* gene sequence and structure of *Pyrenophora teres* and *P. tritici-repentis* and implications for QoI resistance. *Pest Manag Sci.* **63**:225-233.
25. **Söllner, T., C. Schmidt, and C. Schmelzer.** 1987. Amplification of the yeast nuclear gene *MRS3* confers suppression of a mitochondrial RNA splice defect. *Curr. Genet.* **12**:497-501.
26. **Stahley, M. R. and S. A. Strobel.** 2006. RNA splicing: group I intron crystal structures reveal the basis of splice selection and metal ion catalysis. *Curr. Op. Struct. Biol* **16**:326.
27. **Thomas, B. J. and R. Rothstein.** 1989. Elevated recombination rates in transcriptionally active DNA. *Cell* **56**:619-630.
28. **Tian, G.-L., F. Michel, C. Macadre, and J. Lazowska.** 1991. Incipient mitochondrial evolution in yeasts. The complete sequence of the gene coding for cytochrome *b* in *Saccharomyces douglasii* reveals the presence of both new and conserved introns and discloses major differences in the fixation of mutations in evolution. *J. Biol. Chem.* **218**:747-760.
29. **Vicens, Q. and T. R. Cech.** 2006. Atomic level architecture of group I introns revealed. *TIBS* **31**:41-51.
30. **Waldherr, M., A. Ragnini, B. Jank, R. Teply, G. Wiesenberger, and R. J. Schweyen.** 1993. A multitude of suppressors of group II intron-splicing defects in yeast. *Curr. Genet.* **24**:301-306.
31. **Wiesenberger, G., T. A. Link, U. von Ahsen, M. Waldherr, and R. J. Schweyen.** 1991. *MRS3* and *MRS4*, two suppressors of mtDNA splicing defects in yeast, are new members of the mitochondrial carrier family. *J. Mol. Biol* **217**:23-37.
32. **Wiesenberger, G., M. Waldherr, and R. J. Schweyen.** 1992. The nuclear gene *MRS2* is essential for the excision of group II introns from yeast mitochondrial transcripts *in vivo*. *J. Biol. Chem.* **267**:6963-6969.

III. Résumé de l'article et résultats supplémentaires

A. Effet de G143A sur l'épissage de l'intron bi2 du cytochrome *b* de la levure

Nous avons analysé l'impact de la mutation sur la croissance respiratoire, le niveau de complexe *bc*₁ et d'ARNm *CYTB*. Les deux premières analyses ont montré que G143A cause une sévère diminution de la croissance respiratoire (Figure 2A de l'article) et du niveau de cytochrome *b* (Figure 2B de l'article); le signal du cytochrome *b*, enregistré par spectrophotométrie sur des cellules intactes, est en effet diminué de 40 à 50% chez le mutant par rapport au sauvage. L'analyse par northern blot des pré-ARNm et ARNm *CYTB* montre que la mutation induit une diminution d'environ 90% du taux d'ARNm *CYTB* par rapport au sauvage (Figure 2C et D de l'article). On observe également une accumulation de pré-ARNm de 3.6kb qui correspond à la taille d'un pré-ARNm contenant l'intron bi2. Ces données confirment l'hypothèse d'un défaut d'épissage de l'intron bi2 lié à la mutation de résistance G143A.

B. Mécanismes de contournement du défaut respiratoire

Comme la mutation G143A cause un sévère défaut de croissance respiratoire, il est possible de sélectionner des supresseurs c'est-à-dire des clones capables de croître sur milieu respiratoire et obtenus à partir du mutant G143A. Ces supresseurs pourraient nous apporter des informations intéressantes sur de possibles mécanismes de contournement du défaut respiratoire. Pour cela, deux approches déjà présentées dans le chapitre I-A partie II-A-3 ont été utilisées. Pour rechercher des supresseurs, nous avons utilisé une souche ayant une faible capacité respiratoire, la souche CK afin d'optimiser nos chances d'avoir des supresseurs spécifiques.

1. Mutations compensatrices dans le génome mitochondrial

Sur 56 clones supresseurs indépendants sélectionnés, 5 sont clairement mitochondriaux. Ces 5 supresseurs ont été obtenus principalement après traitement du mutant G143A au chlorure de manganèse qui est un agent favorisant l'apparition de mutation dans le génome mitochondrial. L'analyse génétique permettant de déterminer

l'origine nucléaire ou mitochondriale de la mutation secondaire est décrite dans l'annexe 3. Pour les suppresseurs nucléaires, le séquençage de gènes impliqués dans l'épissage des introns du groupe I (*CBP2*, *NAM2*, *MSS18*, *MSS116* et *MRS1*) n'a pas révélé de changement dans ces gènes (Gampel et al. 1989; Herbert et al. 1988; Séraphin et al. 1988; Kreike et al. 1986; Halls et al. 2007); nous nous sommes donc concentrés sur l'identification des 5 suppresseurs mitochondriaux. La complète restauration de la croissance respiratoire et du niveau de cytochrome *b* chez deux de ces clones (Sup4 et 5) est due à la réversion de G143A en codon sauvage causant ainsi une perte de la résistance aux Q_oIs. Les trois autres clones présentent des phénotypes différents mais conservent cette résistance (Figure 3 de l'article). Sup1 restaure partiellement la croissance respiratoire et le niveau de cytochrome *b*. La mutation compensatrice est localisée dans la région incluant *COX1*, *ATP6*, *ATP8* et *ENS2* (codant pour une endonucléase). L'analyse génétique permettant de localiser la mutation secondaire est décrite dans l'annexe 4. Le séquençage de ces quatre gènes n'a révélé aucun changement. La mutation secondaire de Sup2 correspond au remplacement d'une cytosine par une guanine dans bi2 (Figure 1 de l'article) permettant de restaurer l'appariement de B2 avec bi2 et, par conséquent, l'épissage de l'intron et la croissance respiratoire. Ce suppresseur valide les résultats obtenus dans la section II-A. Chez Sup3, qui permet une pleine restauration de la fonction respiratoire du mutant, le contournement du défaut d'épissage est obtenu par la délétion des introns bi1 et bi2 (Figure 4 de l'article).

2. Suppresseurs multicopies

Afin d'identifier des gènes nucléaires qui, surexprimés, pourraient restaurer la croissance respiratoire du mutant G143A, celui-ci a été transformé avec une banque génomique sauvage portée par un plasmide avec un promoteur fort. Sur 48 clones sélectionnés capables de croître sur milieu respiratoire, 18 présentaient une co-ségrégation entre le marqueur porté par le plasmide et la croissance respiratoire. 17 des 18 fragments génomiques contenaient le gène *MRS3* et le 18^e, *MRS2*. Ces deux gènes codent pour des transporteurs mitochondriaux d'ions métalliques (fer et/ou magnésium) et sont également impliqués dans l'épissage de nombreux introns (Söllner et al. 1987; Kolisek et al. 2003; Wiesenberger et al. 1991; Froschauer et al. 2009). La surexpression de ces gènes permet effectivement de compenser le défaut d'épissage de

l'intron bi2 car on observe une restauration complète du niveau de cytochrome *b* dans la cellule (Figure 3B de l'article) et partielle de la croissance respiratoire ; ce dernier point pourrait s'expliquer par un effet toxique de la surexpression de *MRS3* et *MRS2*.

Mrs2p et Mrs3p sont bien conservées. Il existe, par exemple, 45% d'identité de séquence entre Mrs3p de *S. cerevisiae* et la protéine de *B. cinerea*. Il est probable que ces deux protéines aient des fonctions homologues et que, par conséquent, celle de *B. cinerea* soit également capable de compenser le défaut d'épissage de bi2 causé par la mutation. Pour vérifier cette hypothèse, le gène codant pour Mrs3p du champignon a été cloné dans un vecteur d'expression multicopie de levure qui a ensuite été utilisé pour transformer le mutant G143A. L'analyse de la croissance respiratoire et du niveau de cytochrome *b* dans la cellule montre que la protéine de *Botrytis* peut, comme celle de *Saccharomyces*, restaurer pleinement le niveau de cytochrome *b* et partiellement la croissance respiratoire (Figure 5 de l'article).

C. Conclusion

Nous avons montré dans cette étude que la mutation G143A introduite dans une souche de levure possédant un intron bi2 cause un défaut de croissance sur milieu respiratoire. Ce phénotype est dû à une diminution de complexe *bc*₁ causée par une diminution sévère du niveau d'ARNm *CYTB*. Chez les champignons phytopathogènes possédant un intron de type bi2, la mutation induirait une perte de fitness et serait donc contre-sélectionnée en champs ce qui pourrait expliquer que la mutation G143A n'est pas été rapportée chez ces pathogènes. Cependant, des mécanismes de contournement pourraient être développés permettant ainsi aux champignons de pousser correctement tout en conservant la résistance aux Q_oIs comme une correction de l'appariement B2-bi2 (Sup2) et une perte des introns bi1 et bi2 (Sup3). L'analyse de la séquence nucléotidique de la région B2-bi2 de *B. cinerea* montre que l'appariement exon-intron chez ce dernier pourrait se faire de la même façon que celui de *S. cerevisiae* (Figure 1C de l'article) et, de ce fait, que la mutation pourrait l'altérer et empêcher ainsi l'excision de l'intron. On peut donc supposer qu'une mutation dans l'intron bi2, telle que celle retrouvée chez la levure, pourrait également permettre de restaurer l'appariement et, par conséquent, le fitness du pathogène. La suppression du défaut d'épissage par la perte de l'intron bi2 pourrait aussi être envisagée. Ce type de modification a déjà été décrit chez *S. cerevisiae* et serait dû à des reverse transcriptases codées par les introns ai1 et ai2 de *COX1*, gène codant

pour une des sous-unités du complexe IV (Gargouri 2005). De manière intéressante, il a été rapporté que les populations de *B. cinerea* étaient constituées de deux espèces (I et II) vivant en sympatrie et que dans chacune de ces espèces, deux types de *CYTB*, différant par la présence ou l'absence de *bi2*, étaient présents (Leroux et al. 2010). Les champignons sans cet intron sont cependant plus fréquents dans l'espèce II que dans l'espèce I (96,3% contre 9,2% dans l'étude menée par Leroux et ses collaborateurs). En se basant sur une étude phylogénétique, les auteurs suggèrent que l'espèce II dériverait de la I et que la perte d'intron serait apparue après la divergence facilitant l'apparition de la mutation de résistance G143A dans cette population de pathogènes. Il se pourrait que *B. cinerea* possède, comme *S. cerevisiae*, une protéine ayant une activité reverse transcriptase et qui serait impliquée dans la perte de l'intron. On peut supposer que, chez les champignons possédant *bi2*, la pression de sélection – par une exposition à long terme ou répétée – conduite à la perte de l'intron et, par conséquent, à l'acquisition de la résistance.

Nous avons également montré que la surexpression de *MRS2* et *MRS3*, codant pour des transporteurs de fer et de Mg^{2+} , pouvait compenser l'effet délétère de la mutation chez la levure avec *bi2*. Le mécanisme de suppression du défaut d'épissage pourrait être dû à une augmentation de la concentration en magnésium à l'intérieur de la mitochondrie (Gregan et al. 2001) ; ion métallique nécessaire à l'épissage des introns du groupe I (Rangan & Woodson 2003). Ainsi l'augmentation de la concentration en Mg^{2+} dans la mitochondrie pourrait améliorer l'activité catalytique de l'intron *bi2* et/ou stabiliser sa structure ce qui faciliterait l'épissage malgré le mauvais appariement exon/intron. Nous avons aussi montré que la surexpression de *MRS3* de *B. cinerea* restaurer également la fonction respiratoire. On peut donc supposer que la surexpression de *MRS3* chez les champignons phytopathogènes possédant la mutation de résistance G143A pourrait permettre à ces derniers de retrouver un fitness normal.

En conclusion, la présence d'un intron immédiatement après le codon codant pour G143 semble empêcher l'évolution de la mutation G143A chez les champignons phytopathogènes car cette mutation serait associée à une perte de fitness. Cependant, nous avons montré que, chez *S. cerevisiae*, des mécanismes de contournement peuvent être développés pour permettre la restauration de la fonction respiratoire et nous avons émis l'hypothèse qu'une exposition prolongée des pathogènes aux Q_oIs pourrait induire de tels mécanismes chez les champignons.

Chapitre II-B : Développement d'un test rapide pour cribler, dans des chimiothèques, des drogues capables d'inhiber la fonction respiratoire

I. Introduction

Il existe, à l'heure actuelle, un grand nombre d'inhibiteurs utilisés dans la lutte contre les phytopathogènes et ciblant différentes voies dont la respiration. On retrouve ainsi des drogues capables d'inhiber le complexe I (pyrimidinamines), le complexe II (dont les carboxamides), le complexe III (dont les strobilurines). Les inhibiteurs développés comme fongicides sont efficaces contre un large spectre de pathogènes. Malheureusement, des mutations de résistance sont rapidement apparues en champs. Des isolats résistants au traitement ont révélé que ces mutations sont souvent localisées dans les sites actifs des complexes (Gisi et al. 2002; Fisher & Meunier 2005; Leroux et al. 2010) comme la mutation G143A (Gisi et al. 2002). Il est donc important d'identifier de nouvelles molécules capables de contourner ses résistances. Nous avons développé, ici, un test pour le criblage de molécules capables d'inhiber la fonction respiratoire. Ce test a fait l'objet d'un article ci-joint.

II. Article

ACS Chem Biol. 2012 Jul 10. [Epub ahead of print]

A rapid *in vivo* colorimetric library screen for inhibitors of microbial respiration

Cindy Vallières,[‡] Nicholas Fisher,[‡] Marc Lemoine,[‡] Olivier Pamlard,[§] Sandra Beaupierre,[§] Catherine Guillou,[§] and Brigitte Meunier^{‡*}

[‡]Centre de Génétique Moléculaire and [§]Institut de Chimie des Substances Naturelles, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France. ^{*}Plant Research Laboratory, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA.

A number of fungicides that target the respiratory chain enzymes complexes II (succinate dehydrogenase) and III (cytochrome *bc*₁ complex) are used in agriculture. They are active against a large range of phytopathogens. Unfortunately, the evolution of fungicide resistance has quickly become a major issue. Resistance is often caused by mutations in the inhibitor binding domains of the complexes, and new molecules are required that are able to bypass such resistance mutations. We report here on a rapid *in vivo* high throughput method, using yeast cells and the redox dye TTC to screen chemical libraries and identify inhibitors of the respiratory function. Using that screening process, followed by a series of tests, we identified a drug (D12) in a diverse library of 4,640 molecules that inhibited the respiratory function without toxic effect on the cell. D12 is a weak inhibitor of complex III. Interestingly, the drug is fully active against the mutant enzyme harbouring the G143A mutation that confers high level of resistance towards most of the fungicides targeting complex III. In addition, the drug is not active against bovine complex III. Using a collection of yeast strains harbouring mutations in the inhibitor binding sites (*Q*_o and *Q*_i sites), we showed that D12 targeted the *Q*_o site and that its inhibitory activity was weakened by the mutation L275F. A phenylalanine is naturally present at position 275 in mammalian complex III, which could explain the differential sensitivity towards D12. The molecule is not structurally related to commercial inhibitors of complex III and could potentially be used as lead compound for the development of antimicrobial agents.

INTRODUCTION

The mitochondrial respiratory chain is an effective target for antimicrobial agents. In medicine, atovaquone, an inhibitor of complex III, is used for drug therapy against different parasitic diseases (malaria, toxoplasmosis and *Pneumocystis pneumonia* caused by the opportunistic pathogen fungus *Pneumocystis jirovecii*). A range of fungicides are used in agriculture that inhibit complex II (succinate dehydrogenase) or complex III (*bc*₁ complex, quinol:cytochrome *c* reductase) of plant pathogenic fungi. Inhibitors of complex III (QIs) and of complex II (SDHIs; most of them carboxamides) interfere with the substrate quinol binding sites. Complex III has two substrate quinol binding pockets called Q_o and Q_i which are provided by the mitochondrially-encoded subunit cytochrome *b*. Most of the fungicides inhibiting complex III target the Q_o site (Q_oIs) and are synthetic analogs of the natural compounds strobilurins (for instance azoxystrobin). They were introduced in the market in the mid-1990s and are active against a wide spectrum of fungal diseases.¹ Only two Q_iIs (fungicides targeting the Q_i site of complex III) are available. They are sulfonamides compounds (cyazofamid² and amisulbrom) and are active only against oomycetes.

The overall structures of these respiratory complexes (especially the electron-transferring catalytic cores) are highly conserved between species. There are, however, some differences in sequence facilitating the search for inhibitors with differential reactivity, active against pathogens with low reactivity towards other organisms. Respiratory inhibitors developed as fungicides are effective against a broad range of important pathogens. Unfortunately, the problem of acquired resistance has rapidly emerged. A growing number of pathogen isolates resistant to inhibitor treatment have been reported, and this resistance is often linked to mutation within the active sites of the complex.³⁻⁵ For instance, the resistance mutation G143A located in the Q_o site of complex III has been reported in an increasing number of phytopathogenic fungi and causes high level of resistance to all Q_o targeted fungicides.³ New molecules targeting complex III are needed that are capable of bypassing such resistance.

Here we describe a rapid test to screen chemical libraries for drug inhibiting the respiratory function. The method uses the redox dye triphenyltetrazolium chloride

(TTC). TTC is a colourless electron acceptor that can be reduced to a red formazan precipitate in microorganisms. It has been used as a means of screening for respiratory deficient mutants of yeast and *Chlamydomonas reinhardtii*^{6,7}: colonies grown on agar plates were overlaid with TTC in soft agar; respiratory competent colonies become red whereas respiratory deficient colonies did not accumulate the red dye. As reported in⁸, TTC is reduced by the dehydrogenases of the respiratory chain (complex I, NADH- and succinate dehydrogenases). The reduction is faster when the mitochondrial membrane is coupled because of the accumulation in the mitochondrial matrix of the positively charged TTC⁺ cations. The accumulation of stable red formazan is only possible in anaerobiosis since the initial product of TTC reduction is rapidly reoxidised by oxygen. Cytochrome oxidase, the terminal enzyme of the respiratory chain, has a very high affinity for oxygen. Colonies of cells with a functioning cytochrome oxidase become anaerobic (inside the colonies) and accumulate the red formazan. Cells with a defective or otherwise inhibited respiratory chain do not reduce oxygen efficiently and therefore do not generate sufficient anaerobiosis for the red dye to form. Thus lack of formazan formation could act as a screen for respiratory deficient mutants, as previously reported⁶⁻⁷ but could also act as a screen to identify drugs that inhibit the respiratory function.

We applied this screening method on a collection of compounds of natural and synthetic origin, using the yeast *Saccharomyces cerevisiae* as a model organism. The screening, followed by biochemical and mutational analysis, identified a new compound inhibiting complex III, which was structurally unrelated to known inhibitors.

RESULTS AND DISCUSSION

Identification of respiratory inhibitors. Our goal was to develop a robust *in vivo* high throughput methodology for the identification of inhibitors of a metabolic choke point, the mitochondrial respiratory complex III (cytochrome *bc*₁ complex). This enzyme is of considerable interest as a fungicidal and chemotherapeutic target. The colorimetric method we used is based on the reduction of the redox dye triphenyltetrazolium chloride (TTC) by the mitochondrial respiratory chain. This methodology is of general

applicability for the identification of inhibitors of other complexes within the respiratory chain of aerobic microbes. The redox dye TTC accumulated inside the cells as a red formazan precipitate when reduced by the dehydrogenases of the respiratory chain under anaerobic conditions.⁸ Compounds that inhibit the respiratory chain block the formation of the red precipitate. As described in Methods and illustrated in Figure 1, after addition of TTC to yeast (*S.cerevisiae*) cells suspensions in microwells, the red dye accumulated in cells with active respiratory chain but not in cells treated with the azoxystrobin, a fungicide targeting complex III. This method can also be used with other organisms, such as the filamentous fungus *Podospora anserina* (Figure 1).

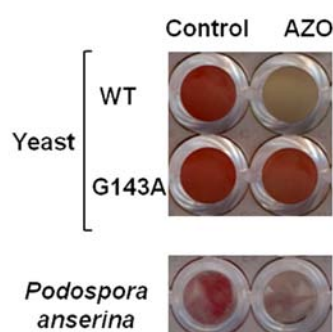


Figure1. TTC test (as described in Methods) applied on yeast cells and on mycelium of a filamentous fungus. DMSO, solvent used as control; AZO, azoxystrobin, a potent inhibitor the respiratory chain.

The chemical library of the ICSN, composed of 4,640 compounds of very large chemical diversity - natural products, molecules derived from natural substances and synthetic compounds - was screened using the TTC test. 20 molecules appeared to inhibit the accumulation of the red formazan, indicating that these drugs could potentially inhibit the respiratory chain enzymes. These 20 molecules then were re-tested manually using the same test (this was done twice). Six molecules were excluded as their inhibitory effect on the TTC reaction was not confirmed or was very weak. The 14 selected molecules were tested for their inhibitory effect on respiratory growth. Six molecules affected the respiratory growth at 1 µg/mL: D5, D6, D9, D10, D11 and D12 (Table 1). The effect of these 6 drugs on the oxygen consumption of cells was monitored (Table 1). D11 has no effect. D5, 6 and 9 show a weak inhibitory effect. A more severe inhibition was observed with D10 and D12. The study of these two drugs was pursued.

We checked their impact on the fermentative growth. For that end, we used a strain depleted of mitochondrial genome (*rho⁰*). In such strain, the respiratory chain

function is completely abolished as the mitochondrial genes encoding the main components of respiratory complexes III and IV, and of complex V or ATP synthase, are absent. The *rho*⁰ mutation (similarly to other mutations causing respiratory deficiency) is not lethal in *S. cerevisiae* as yeast can rely on fermentation to generate energy when grown on a suitable carbon source (such as glucose). The fermentative growth test was done as in Table 1, glucose replacing ethanol (not shown). We found that D10 was toxic to the cell proliferation and inhibited the fermentative growth at low dose (5 µg/mL). In addition the molecule seemed unstable in the culture medium since after >30h incubation, the inhibition was lessened and the cell started to proliferate, both in fermentative and respiratory conditions. Thus D10 was excluded from further *in vivo* experiment. D12, on the contrary, was stable in culture media over 4 days of incubation. The drug had no effect on the *rho*⁰ fermentative growth at 30 µg/mL whereas it inhibited the respiratory growth at lower concentration. The dose-dependent inhibition of the respiratory growth was monitored (performed as in Table 1, with increasing concentration of D12) (not shown). An IC₅₀ of approx. 1 µg/mL was obtained.

Table 1. Effect of drugs on respiratory growth and oxygen uptake by cells

Compound	Respiratory growth (% control) ^a	Oxygen uptake (% control) ^b
D5	61	65-70
D6	75	50
D9	54	70-80
D10	22	25
D11	44	100
D12	55	30

^a WT cells were inoculated in 5 mL of ethanol medium with 1 µg/mL of the drugs and cultivated at 28°C with agitation. Optical density (A_{600 nm}) of the cultures was recorded at the end of the exponential phase and presented as % of the control cell density in absence of drug. The measurements were done twice and average. ^b oxygen uptake by cells was recorded in an oxygraph. Approximately 10⁸ cells grown in ethanol medium were added to 1 mL of water with 3 µM CCCP. After 2-3 minutes recording of the control O₂ uptake rate, drugs were added at 5 µg/mL and the oxygen uptake rates were recorded. The drugs have similar effect in absence and in presence of the uncoupling agent CCCP (not shown).

Thus the target(s) of D12 are likely to be restricted to the respiratory function.

Identification of the target of the respiratory inhibitors D10 and D12. We first tested the inhibitory effect of D10 and D12 on NADH oxidase activity of mitochondria as described in Methods. NADH directly delivers electrons to the NADH dehydrogenases (there is no protonmotive, metazoan-like complex I in yeast) bypassing the Krebs cycle. This was done in presence of the uncoupling agent carbonyl cyanide m-chloro phenyl hydrazone (CCCP). Therefore the electron flux through the respiratory chain enzymes - from the NADH dehydrogenases, *via* complex III and complex IV to oxygen - was not controlled by complex V activity. From the inhibitor titration curve (Figure 2a), an IC₅₀ of 45 nM per µg protein was estimated for D10. D12 has similar inhibitory effect: at 125 nM per mg protein, a 90% inhibition of oxygen uptake was observed. Thus it appears clearly that both drugs target one or more enzymes of the respiratory chain.

In order to determine the enzyme(s) inhibited by D10 and D12, we monitored their effect on the different segments of the respiratory chain. The results are presented in Table 2 and illustrated in Figure 2b, c and d.

Table 2. Effect of D10 and D12 on the respiratory chain activities

Activity ^a	D10	D12
	IC ₅₀ per µg protein	IC ₅₀ per µg protein
Cytochrome <i>c</i> oxydase (complex IV)	> 3000	> 450
NADH:cytochrome <i>c</i> reductase (NADH dehydrogenases + complex III)	50	15
Succinate-cytochrome <i>c</i> reductase (complexes II + III)	> 350	30
NADH :quinone reductase (NADH dehydrogenases)	> 280	> 350
Quinol:cytochrome <i>c</i> reductase (complex III)	170	120

^a Measurements were performed using mitochondria as described in Methods. The activities in absence of drugs were as follows: NADH:cytochrome *c* reductase: 1.4 µmole cytochrome *c* .min⁻¹. mg⁻¹; Succinate-cytochrome *c* reductase: 0.85 µmole cytochrome *c* .min⁻¹. mg⁻¹; NADH-quinone reductase: 0.14 µmole quinol .min⁻¹. mg⁻¹; quinol-cytochrome *c* reductase: 3.2 µmole cytochrome *c* .min⁻¹. mg⁻¹ (TN= 125 s⁻¹); cytochrome *c* oxidase activity: 1.2 µmole cytochrome *c* .min⁻¹. mg⁻¹

D10 and D12 had no effect of cytochrome oxidase activity (complex IV), as expected since the only known inhibitors of mitochondrial complex IV are competitors

of oxygen such as CO, CN and azide. Both drugs inhibited the NADH:cytochrome *c* reductase activity (NADH-dehydrogenase + complex III) with IC₅₀ of 50 and 15 nM per µg protein for D10 and D12, respectively. They had no or little effect on NADH:quinone reductase (NADH dehydrogenase) but inhibited the quinol:cytochrome *c* reductase activity (complex III) with IC₅₀ of 170 and 120 nM per µg protein for D10 and D12, respectively. Their reactivity towards complex III was low compared to commercially available complex III inhibitors such as the fungicide azoxystrobin: the IC₅₀ (estimated as moles drugs/moles complex III) was around 8 for azoxystrobin,⁴ whereas it was around 400 for D10 and 280 for D12. D10 and D12 differed by their effect on the succinate-cytochrome *c* reductase activity (complexes II+III). D10 had little effect on the activity (IC₅₀ >350 nM per µg protein). Thus D10, while inhibiting complex III, had no effect on complex II + III activity, which might appear as a discrepancy. This has been previously explained by Brasseur et al.⁹ Briefly the authors demonstrated that complex III was rate-limiting in the NADH:cytochrome *c* reductase reaction, but was not rate-limiting in the succinate- cytochrome *c* reaction. Therefore a decrease in complex III activity impacted the NADH:cytochrome *c* reductase activity to a greater extent than the succinate- cytochrome *c* activity, which is what we observed: the IC₅₀ for NADH:cytochrome *c* reductase is 10-fold lower than the IC₅₀ for succinate- cytochrome *c* reaction. D12, on the contrary, inhibited the succinate- cytochrome *c* reaction with an IC₅₀ of 30 nM per µg protein. This indicated that D12 had also a weak inhibitory effect on complex II.

We then compared the effect of D10 and D12 on the quinol:cytochrome *c* reductase activity (complex III) of mitochondrial membrane extracted from bovine heart (kindly provided by P. Rich, UCL, London). The activities were measured as for the yeast mitochondria. Interestingly, bovine complex III was not sensitive to D10 or D12. The IC₅₀ values (presented as moles drugs/moles complex III) were >4000 with bovine mitochondria compared to 400 and 280 for D10 and D12, respectively, with yeast mitochondria. Similarly, we found that D12 IC₅₀ for NADH- and succinate- cytochrome *b* reductase activities were >1000 (reported as moles drugs/moles complex III) with the bovine mitochondria compared to 35 and 60 (reported as moles drugs/moles complex III) with the yeast mitochondria.

Finally, we checked the inhibitory effect of D10 and D12 on the NADH:cytochrome *c* reductase activity of mutant complexes III harbouring a mutation in the inhibitor binding pockets: mutation G143A in the Q_o site that causes a high level of resistance towards the Q_o inhibitors myxothiazol (> 5,000-fold) and azoxystrobin (65-fold);¹⁰ and mutation K228M, in the Q_i site that confers moderate level of resistance towards the Q_i inhibitor HQNO¹¹ and was first reported as antimycin-resistant mutation¹². We found that D10 and D12 were fully active against the mutant enzymes: the same IC_{50} were obtained with WT and mutant complexes III. Thus interestingly, mutation G143A causing acquired resistance to all Q_o site fungicides and detected in many plant pathogen fungi does not confer cross-resistance to D10 and D12.

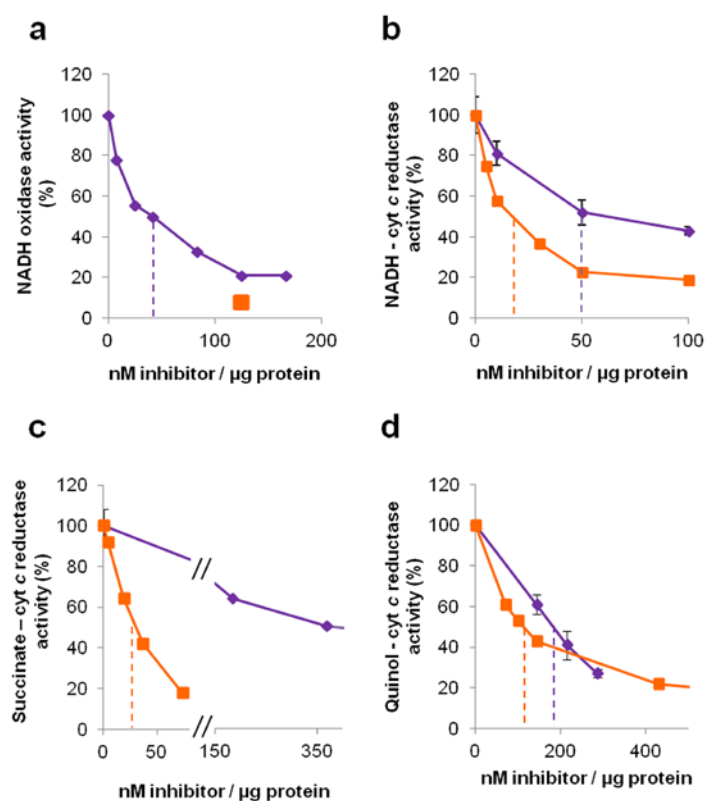


Figure 2. Effect of the compounds D10 and D12 on the respiratory chain activities. The measurements of the various activities were performed using mitochondria as described in Methods. NADH-oxidase activity (Panel a) was monitored in a Clark-type oxygen electrode. Oxygen uptake was initiated by addition of 500 μM NADH. Oxygen uptake rate in absence of drugs was 0.20 μmole O₂ · min⁻¹ · mg protein⁻¹. Measurements of the NADH-, succinate and quinol-cytochrome *c* reductase activities (Panels b, c and d) were done by following the reduction of cytochrome *c* spectrophotometrically. The activities in absence of drugs are presented in Table 2. The measurements were done at least twice and averaged. The error bars are shown in the figures. IC_{50} were estimated from the plot of % activity vs drug concentration per μg protein.

Identifying the binding site of D12 in complex III. As mentioned above, complex III has two inhibitor binding pockets, Q_o and Q_i , formed by the core subunit cytochrome *b*. In order to identify the target site of D12 within complex III, we monitored the effect of a series of Q_o and Q_i site mutations on the inhibitory effect of the drug. The test was performed on the respiratory growth of the mutant strains. The 20 strains tested were identical to control strain, differing only by the amino acid substitutions in cytochrome *b*. D10 was excluded from that test since the molecule was found to be toxic to cells, inhibiting both respiratory and fermentative growth, and unstable upon incubation in the culture medium.

The Q_i site mutations were chosen on the basis of the structure^{13,14} and/or on previous reports of their effect on the sensitivity towards the Q_i inhibitors HQNO and/or antimycin.¹⁵ The Q_o site mutations, T127I, I147V, T148I, L150F, S152A, P226L and L275F were found in the human pathogenic fungus *P. jiroveci*, after atovaquone treatment and introduced into yeast.¹⁶ The mutation F278A conferred resistance to atovaquone (not shown). An alanine at position 278 is naturally present in human cytochrome *b* whereas it is replaced by a phenylalanine in yeast. G143A, as mentioned above, causes high level of resistance towards Q_o site fungicides in plant pathogenic fungi while F129L confers moderate level of resistance to these fungicides (for a review of cytochrome *b* mutations see¹⁰). The positions of the mutated Q_o site residues in the structure of the complex III and in the cytochrome *b* sequence are presented in Figure 3a and c, respectively. None of the ten Q_i mutations tested conferred resistance to D12. Similarly, eight of the ten Q_o site mutants studied were susceptible to the drug: T127I, F129L, G143A, T148I, L150F, S152A, P266L and F278A. The sensitivity of the respiratory growth of G143A was thus in agreement with the enzymatic data.

Two Q_o site mutations, namely I147V and L275F, caused a marked resistance to D12 as shown in Figure 3b. This finding indicates that D12 targets the Q_o site of complex III and that residues I147 and L275 should be involved in the binding of the drug. As this mutational analysis shows a restricted overlap between residues involved in resistance towards atovaquone, azoxystrobin and D12, we could hypothesize that the binding site and/or binding mode of D12 would be different to that of these known inhibitors.

Interestingly, a phenylalanine at position 275 is naturally present in the cytochrome *b* of the majority of organisms (including man). Fungi are unusual in having

a leucine at that position. That variation could explain the differential sensitivity of the bovine and yeast complex III to D12 that we observed. By contrast, the mammalian variant F278A had no effect on the susceptibility to D12.

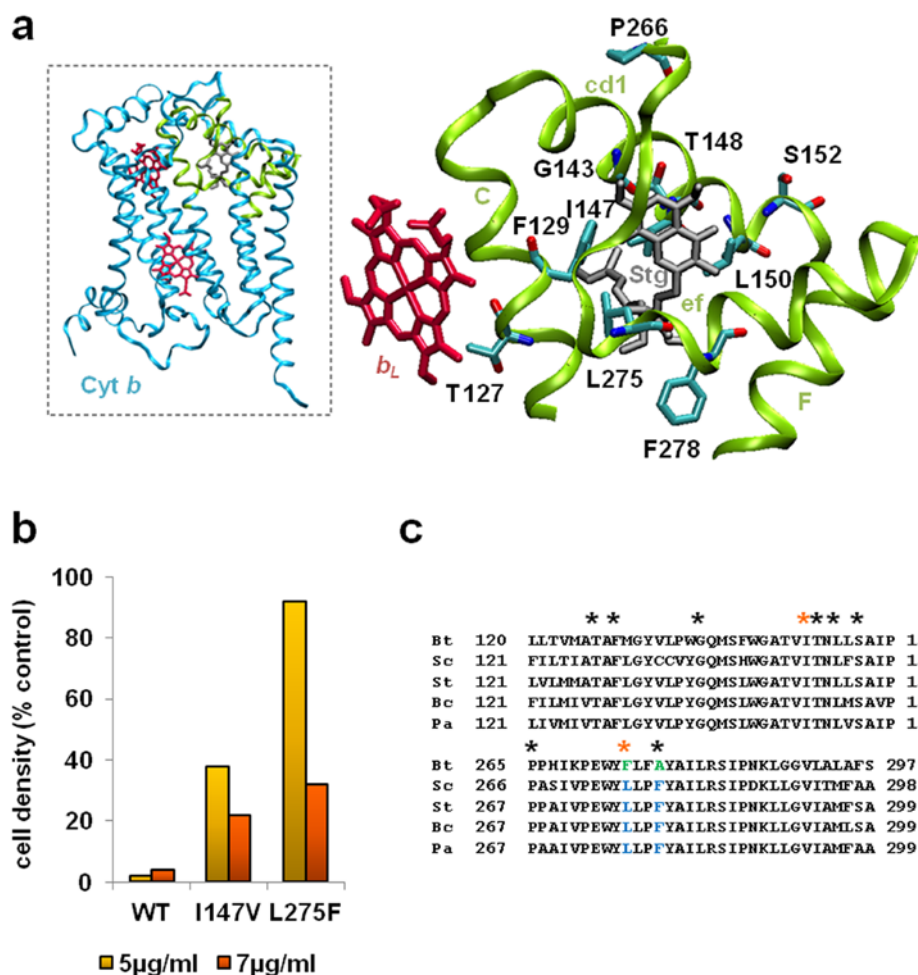


Figure 3. (a) Location of the mutated residues within the Q_o pocket of yeast cytochrome *b*. This figure was prepared using PDB coordinates 3CX5.²³ Regions encompassing the Q_o site (helices C, cd1 and the ef loop) are represented in green. The bound Q_o site inhibitor stigmatellin is labelled as 'Stg'. (b) Effect of Q_o mutations I147V and L275F on drug susceptibility. WT and mutant cells were inoculated in 5 mL of ethanol medium with 5 and 7 μg/mL of the D12 and cultivated at 28°C with agitation. Optical density ($A_{600\text{ nm}}$) of the cultures was recorded after 48h and presented as % of the control cell density in absence of drug. The measurements were done at least twice. (c) Comparison of cytochrome *b* sequences. Only cytochrome *b* sequences that form the Q_o site are shown. Bt, *Bovus taurus*; Sc, *Saccharomyces cerevisiae*; St, *Septoria tritici*; Bc, *Botrytis cinereus*; Pa, *Podospora anserina*. The mutated residues studied here are marked by an asterisk. The variant residues at positions 275 and 278 are in colour.

Chemical structures of D10 and D12. Compounds D10 and D12 were found to be structurally different to the previously known complex III inhibitors. D10 is a carbazole while D12 is a pregnan. The chemical structure of D10, 8-(benzyloxy)-2-methyl-6,11-dihydro-5H-pyrido[3,2-a]carbazole, was determined as described in Methods. The

structure of D12, *3 β ,5 α ,6 β -triacetoxy-5 α -pregnan-20-one ethylene ketal* has been previously reported in.¹⁷

The chemical library screened in this study contained two other compounds structurally close to D12 (Figure 4). In our assay conditions, these molecules were found to be inactive, showing that the test could discriminate between closely related structures in series. From the comparison of molecules 2, 3 and 4, it appears that a dioxolane function in position 20 and no function in position 16 are important for the inhibitory effect of D12. The presence of a ketone function (i.e. in compound 3) or a 2-methylpentane chain (i.e. in compound 4) at position 20 seems detrimental for the inhibitory activity. Modifying the methylene group at position 16 by the introduction of a ketone function leads also to inactive compound (i.e. compound 4). Further work on the structure-activity relationship needs to be performed to determine the active site of the molecule.

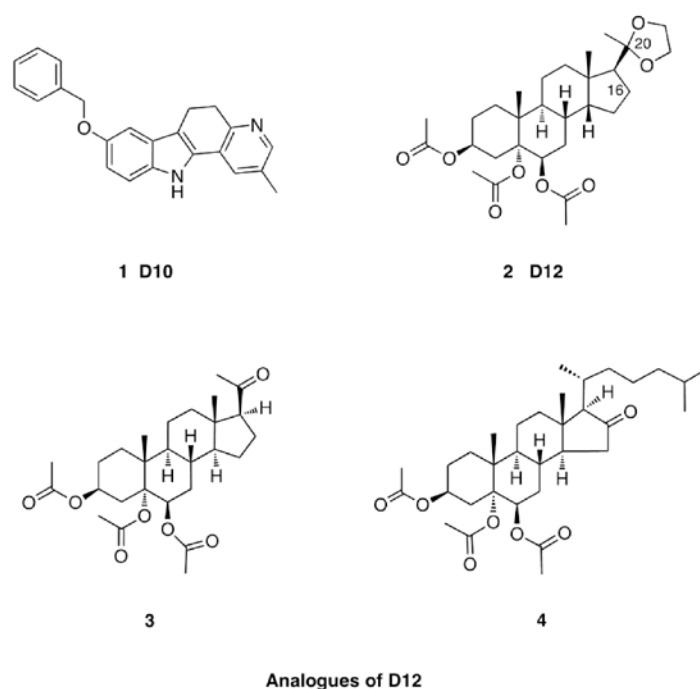


Figure 4. Chemical structures of D10, D12 and analogues of D12.

In Conclusion, we described a rapid and easy-to-use screening method to identify respiratory function inhibitors. In a collection of 4,640 molecules, we identified two new complex III inhibitors: D10, a carbazole and D12, a pregnan. We found that D12, stable in culture medium and non-toxic to cells, targeted the Q_o site of complex III. Many inhibitors bind to the Q_o site. The Q_o pocket forms a large, bifurcated volume that is

'loosely stitched' by inter-sidechain H-bonds between discontinuous stretches of cytochrome *b* (mainly helices C, cd1 and the ef loop (Figure 3a)). This "loose stitching" may allow the expansion of the site upon binding of inhibitors.¹⁸ That property presumably allows the site to accommodate diverse molecules and could explain the development of specific Q_o inhibitors active against pathogens. Interestingly, mammalian complex III was not susceptible to D12. In addition, D12 was unaffected by the Q_o site mutations G143A and F129L, responsible for acquired resistance to fungicides in phytopathogenic fungi. Related compounds with higher reactivity need to be synthesized that would have the same mode of action but tighter binding to complex III. Drugs developed on the scaffold of D12 may be a valuable tool and could circumvent Q_oI resistance caused by cytochrome *b* mutation.

METHODS

Yeast strains and media. The yeast strains used for TTC screening, for growth analysis and oxygen uptake analysis derived from AD1-9 (kindly given by M.Ghislain, UCL, Belgium). That strain harbours multiple deletions of the cell membrane transporter genes, which render the cells more sensitive to drugs than standard yeast strains.¹⁶ AD1-9 [WT] contains a wild type mitochondrial genome. AD1-9 *rho*^o is missing the entire mitochondrial genome (obtained after ethidium bromide treatment of the WT strain). A series of strains derived from AD1-9 [WT] contain point mutations in the cytochrome *b* gene. They have been obtained by random- or by side-directed mutagenesis. The mutants are as follows: Q_i site mutations G33A,¹¹ G37S,¹¹ H204Y,²⁰ S206T/V,²⁰ N208V,¹¹ R218K,¹¹ F225L,¹¹ K228M,¹¹ M221Q²¹; Q_o site mutations T127I,¹⁶ F129F,²² G143A,⁴ I147V,¹⁶ T148I,¹⁶ L150F,¹⁶ S152A,¹⁶ P226L,¹⁶ L275F¹⁶; F278A was constructed for this study by microprojectile bombardment-mediated mitochondrial transformation as described previously.¹⁶ Respiratory medium contains 1% yeast extract, 2% peptone, 0.2% glucose, 2% ethanol. Fermentative medium contains 1% yeast extract, 2% peptone, 3% glucose.

TTC screening. The yeast strain AD1-9 [WT] was cultivated in ethanol medium until mid- to late-log phase (optical density of 2 measured at 600 nm), with vigorous agitation for a good aeration of the cultures. The test was performed in 96 microwell plates using a pipetting robot. 150 μ L culture and 5 μ g of drugs (5 μ L of a DMSO solution) were added: the cell suspensions were aerated by pipetting; 7 mM TTC was then added (55 μ L of TTC in a 2% ethanol solution); the cell suspensions were again aerated by pipetting. The plates were then left at room temperature without agitation for a few minutes. The yeast cells sediment quickly. Cells with an active respiratory chain generate sufficient anaerobiosis in the cuvette for the red formazan precipitate to accumulate inside the cells. The red colour appears after 10 to 15 min. Drugs inhibiting the accumulation of red formazan were identified.

Measurement of the components of the respiratory chain in yeast mitochondria. Mitochondria were prepared as in.¹⁹ Protein concentration was determined by Bradford method (Protein quantification kit-

rapid, Fluka). Complex III concentration was determined from dithionite-reduced optical spectra, using $\epsilon=28.5 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ at 562nm *minus* 575nm. Activity measurements were performed at room temperature. The measurements were repeated at least twice and averaged. IC₅₀ values (inhibitor concentration required to obtain 50% inhibition of the activity) were determined by inhibitor titration.

NADH-oxidase activities were measured using a Clarke-type oxygen electrode. Mitochondria were added at 120 μg of protein to 1 mL 0.7M sorbitol, 50mM Tris-HCl pH7.5, 0.2mM EDTA, 3 μM CCCP. Oxygen uptake activity was initiated by the addition of 0.5 mM NADH. After 2-3 minutes recording, inhibitors were added at various concentrations and the rate of oxygen consumption was recorded.

The quinol and/or cytochrome *c* oxidoreductase activities were measured spectrophotometrically in a Beckmann DU 640 spectrophotometer. Measurements were performed in 1 mL of 10mM potassium phosphate pH 7. For quinol- cytochrome *c* reductase activity (complex III activity), 0.01 % lauryl maltoside was added. Initial rates after addition of the substrate were recorded.

NADH:-, succinate:-, quinol:cytochrome *c* reductase activities was determined by measuring the reduction of cytochrome *c* (20 μM) at 550nm *versus* 540nm over a 1-min time-course and in the presence of 1mM KCN. Mitochondria were added at 10 to 40 μg of protein per mL. Activity was initiated by the addition of 20 μM decylubiquinol, a synthetic analog of ubiquinol, for quinol- cytochrome *c* reductase activity and by the addition of 600 μM NADH for the NADH- cytochrome *c* reductase activity. The succinate- cytochrome *c* reductase activity was initiated by the addition of oxidized cytochrome *c* after 10 min of incubation of mitochondria with 10mM succinate.

Cytochrome *c* oxidase activity: Mitochondria added at 15 μg of protein per mL. Activity was initiated by the addition of 20 μM reduced cytochrome *c*. Cytochrome *c* oxidation was recorded at 550nm *versus* 540nm over a 1-min time-course.

NADH:quinone reductase activity. Mitochondria added at 40 μg of protein per mL and incubated with 200 μM NADH for 10 minutes. Activity was initiated by the addition of 100 μM decylubiquinone. Decylubiquinone reduction was recorded at 280nm *versus* 325nm over a 1-min time-course.

Determination of the structure of compound D10. ¹H NMR and ¹³C NMR spectra were determined on Bruker Avance-500. ¹H NMR spectra are reported in parts per million (δ) relative to residual solvent peak. Data for ¹H are reported as follows: chemical shift (δ ppm), multiplicity (s = singlet, d = doublet, t = triplet, q = quartet, sxt = sextet, dd = double-doublet, m = multiplet), coupling constant in Hz, and integration. ¹³C NMR spectra are reported in parts per million (δ) relative to the residual solvent peak. The purity and the exact mass were determined with a Waters Acquity liquid chromatograph equipped with a Photodiode Array Detector, an Evaporative Light Scattering Detector and a Triple Quadrupole Detector. A reverse-phase HSS T3, 2.6 μm , 4.6 x 100 mm was used for the UPLC work with the solvent system as follow: 98/2 A/B for 7 min followed by 0/100 isocratic for 3 min at a flow rate of 0.6 mL/min, where solvent A was 0.1% formic acid in H₂O and solvent B was 0.1% formic acid in acetonitrile.

^1H NMR : δ (ppm) 3.07 (2H, t, J=10 Hz, H₁₃) ; 3.25 (2H, t, J=10Hz, H₁₄) ; 5.15 (2H, s, H₁₆) ; 6.96 (1H, dd, J₁=2 Hz, J₂= 9 Hz, H₇) ; 7.11 (1H, d, J=1.5 Hz, H₁₀) ; 7.29 (1H, d, J=9 Hz, H₈) ; 7.34-7.37 (1H, m, H₂₀) ; 7.40-7.44 (3H, m, H₁₉ H₂₁ H₁₆) ; 7.50-7.52 (2H, m, H₁₈ H₂₂) ; 8.19 (1H, s, H₁) ; 8.24 (1H, s, NH). ^{13}C NMR : δ (ppm) 18.29 (1C, C₂₃) ; 19.38 (1C, C₁₃) ; 31.62 (1C, C₁₄) ; 70.97 (1C, C₁₆) ; 100.00 (1C, C₆) ; 101.45 (1C, C₁₀) ; 11.95 (1C, C₈) ; 113.16 (1C, C₁₂), 113.79 (1C, C₇) ; 124.35 (1C, C₄) ; 127.19 (1C, C₃) ; 127.59 (2C, C₁₈ C₂₂) ; 127.84 (1C, C₂₀) ; 128.54 (2C, C₁₉ C₂₁) ; 131.11 (1C, C₂) ; 132.27 (1C, C₁₅) ; 133.05 (1C, C₁₁) ; 137.59 (1C, C₁₇) ; 146.60 (1C, C₁) ; 153.72 (1C, C₉) ; 154.53 (1C, C₁₅). m/z : 339.1 [M-H]⁻ ; 341.1 [MH]⁺.

Acknowledgements

Part of the work was supported by funding from the FRC 3115 to BM and CG.

References

- (1) Bartlett, D. W., Clough, J. M., Godwin, J. R., Hall, A. A., Hamer, M., and Parr Dobrzanski, B. (2002) The strobilurin fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58, 649-662.
- (2) Mitani, S., Araki, S., Takii, Y., Ohshima, T., Matsuo, N., and Miyoshi, H. (2001) The biochemical mode of action of the novel selective fungicide Cyazofamid: Specific inhibition of mitochondrial complex III in *Phythium spinosum*. *Pestic. Biochem. Physiol.* 71, 107-115.
- (3) Gisi, U., Sierotzki, H., Cook, A., and McCaffery, A. (2002) Mechanisms influencing the evolution of resistance to Q₀ inhibitor fungicides. *Pest Manag. Sci.* 58, 859-867.
- (4) Fisher, N. and Meunier, B. (2005) Re-examination of inhibitor resistance conferred by Q₀ site mutations in cytochrome *b* using yeast as a model system. *Pest Manag. Sci.* 61, 973-978.
- (5) Leroux, P., Gredt, M., Leroch, M., and Walker, A.-S. (2010) Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Appl. Environ. Microbiol.* 76, 6615-6630.
- (6) Ogur, M., St John, R., and Nagai, S. (1957) Tetrazolium overlay technique for population studies of respiratory deficient yeast. *Science* 125, 928-929.
- (7) Dorthu, M.-P., Remy, S., Michel-Wolwertz, M.-R., Colleaux, L., Breyer, D., Beckers, M.-C., Englebert, S., Duyckaerts, C., Sluse, F. E., and Matagne, R. F. (1992) Biochemical, genetic and molecular characterization of new respiratory-deficient mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant Mol. Biol.* 18, 759-772.
- (8) Rich, P. R., Mischis, L. A., Purton, S., and Wiskich, J. T. (2001) The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains. *FEMS Microbiol. Lett.* 202, 181-187.
- (9) Brasseur, G., Coppee, J.-Y., Colson, A.-M., and Brivet-Chevillotte, P. (1995) Structure-function relationships of the mitochondrial bc₁ complex in temperature-sensitive mutants of the cytochrome *b* gene, impaired in the catalytic center. *N. J. Biol. Chem.* 270, 29356-29364.
- (10) Fisher, N. and Meunier, B. (2008) Molecular basis of resistance to cytochrome bc₁ inhibitors. *FEMS Yeast Res.* 8, 183-192.
- (11) Vallières, C., Fisher, N., Antoine, T., Al-Helal, M., Stocks, P., Berry, N. G., Lawrenson, A. S., Ward, S. A., O'Neill, P. M., Biagini, G., and Meunier, B. (2012) HDQ, a potent inhibitor of *Plasmodium falciparum* proliferation binds to the Q_i site of the bc₁ complex. *Antimicrob. Agents Chemother.* In press.

- (12) di Rago, J.-P. and Colson, A.-M. (1988) Molecular basis for resistance to antimycin and diuron, Q-cycle inhibitors acting at the Q_i site in the mitochondrial ubiquinol-cytochrome *c* reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* *263*, 12564-12570.
- (13) Huang, L.-S., Cobessi, D., Tung, E., and Berry, E. A. (2005) Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial *bc*₁ complex: A new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern. *J. Mol. Biol.* *351*, 573-597.
- (14) Hunte, C., Koepke, J., Lange, C., Rossmann, T., and Michel, H. (2000) Structure at 2.3 angstrom resolution of the cytochrome *bc*₁ complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Struct. Fold. Des.* *8*, 669-684.
- (15) Brasseur, G., Saribas, A. S., and Daldal, F. (1996) A compilation of mutations located in the cytochrome *b* subunit of the bacterial and mitochondrial *bc*₁ complex. *Biochim. Biophys. Acta* *1275*, 61-69.
- (16) Hill, P., Kessl, J., Fisher, N., Meshnick, S., Trumpower, B., and Meunier, B. (2003) Recapitulation in *Saccharomyces cerevisiae* of cytochrome *b* mutations conferring resistance to atovaquone in *Pneumocystis jirovecii*. *Antimicrob. Agents Chemother.* *47*, 2725-2731.
- (17) Barton, D. H. R., Gokturk, A. K., Morzycki, J. W., and Motherwell, W. B. (1985) *J. Chem. Soc. Perkin Trans. 1*, 583-585.
- (18) Crofts, A. R., Barquera, B., Gennis, R. B., Kuras, R., Guergova-Kuras, M., and Berry, E. A. (1999) Mechanism of Ubiquinol Oxidation by the *bc*₁ Complex: Different Domains of the Quinol Binding Pocket and Their Role in the Mechanism and Binding of Inhibitors. *Biochemistry* *38*, 15807-15826.
- (19) Lemaire, C. and Dujardin, G. (2008) Preparation of respiratory chain complexes from *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and mutant mitochondria: activity measurement and subunit composition analysis. *Methods Mol. Biol.* *432*, 65-81.
- (20) Coppee, J.-Y., Brasseur, G., Brivet-Chevillotte, P., and Colson, A.-M. (1994) Non-native intragenic reversions selected from *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *b*-deficient mutants. *J. Biol. Chem.* *269*, 4221-4226.
- (21) Coppée, J.-Y., Tokutake, N., Marc, D., Di Rago, J.-P., Miyoshi, H., and Colson, A.-M. (1994) Analysis of revertants from respiratory deficient mutants within the center N of cytochrome *b* in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett.* *339*, 1-6.
- (22) Fisher, N., Brown, A. C., Sexton, G., Cook, A., Windass, J., and Meunier, B. (2004) Modelling the Q_o site of crop pathogens in *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *b*. *Eur. J. Biochem.* *271*, 2264-2271.
- (23) Solmaz, S. R. and Hunte, C. (2008) Structure of complex III with bound cytochrome *c* in reduced state and definition of a minimal core interface for electron transfer. *J. Biol. Chem.* *283*, 17542-17549.

III. Résumé de l'article et résultats supplémentaires

La méthode de criblage est basée sur l'utilisation du triphényltetrazolium chlorure (TTC). Le TTC est un accepteur d'électron qui peut être réduit en un précipité rouge, le formazan, par les déshydrogénases de la chaîne respiratoire (complexe I, NADH et succinate déshydrogénases) (Rich et al. 2001). Cet indicateur redox est notamment utilisé chez la levure et *Chlamydomonas reinhardtii* pour différencier les cellules capables de respirer de celles qui ne le sont pas (Dorthu et al. 1992; Ogur et al. 1957) L'accumulation de formazan est seulement possible en anaérobiose – lorsque la cytochrome oxydase a transformé tout l'oxygène en eau – car le composé est rapidement réoxydé par l'oxygène. Les cellules avec une chaîne respiratoire non fonctionnelle ne vont pas pouvoir consommer l'oxygène et, de ce fait, générer d'anaérobiose pour permettre la formation du précipité rouge. Ainsi, l'absence de formazan dans les cellules permet de détecter les mutants déficients pour la respiration mais peut, également, permettre d'identifier des drogues capables d'inhiber la fonction respiratoire comme illustré dans la figure 1 de l'article. Ce test fonctionne également sur d'autres champignons comme les champignons filamenteux *Podospora anserina* et *Botrytis cinerea*.

Nous avons appliqué cette méthode de criblage sur la chimiothèque de l'Institut de Chimie des Sciences Naturelles (ICSN) qui est constituée de 4640 composés d'origine naturelle ou synthétique, en utilisant *S. cerevisiae*. Etant donné que la levure possède un système de pompes permettant l'efflux de molécules performant, nous avons utilisé des souches dont des gènes impliqués dans ce processus de résistance aux drogues ont été délétées (Chapitre I-B). Certains composés ont été sélectionnés et soumis à d'autres tests. La stratégie employée est décrite dans figure 39.

Nous avons identifié, parmi les 4640 composés, 14 molécules capables d'inhiber la réduction du TTC. Après une série de tests, deux drogues, que nous avons nommées d10 et d12, étaient réellement capables de bloquer la respiration de la levure. Ces molécules se sont avérées être des inhibiteurs modérés du complexe III (rapport IC_{50}/bc_1 de 400 et 280, respectivement, contre 5 pour l'azoxystrobine) mais également du complexe II pour d12 (Figure 2 et Tableau 2 de l'article). De manière intéressante, d10 et d12 sont structurellement différentes des inhibiteurs du complexe III actuellement connus. Ces résultats montrent que notre méthode permet d'identifier de nouveaux inhibiteurs du

complexe III. Néanmoins, d10 a un effet toxique sur la cellule et est assez instable en milieu liquide et, de ce fait, seule d12 a fait l'objet d'une analyse plus approfondie.

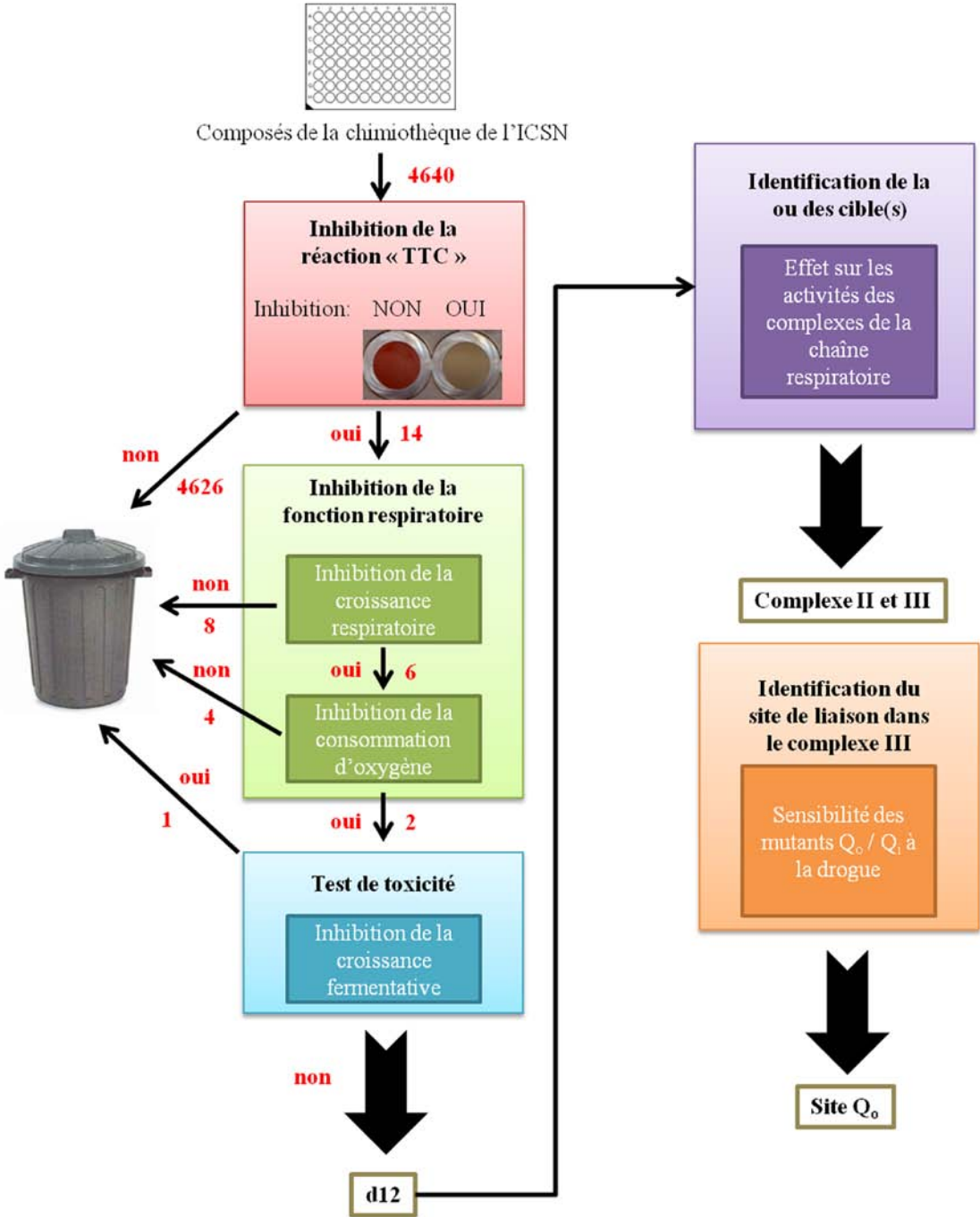


Figure 39: Schéma de la stratégie employée pour identifier de nouveaux composés capables d'inhiber la fonction respiratoire.

Dans le but de déterminer le site de liaison de la molécule dans le complexe III, nous avons employé la même stratégie que celle utilisée pour HDQ (chapitre I-B) c'est-à-dire

suivre l'effet de la drogue sur la sensibilité, en croissance, de mutants portant des mutations dans les deux poches catalytiques du complexe (Figure 3 de l'article). Aucune des mutations du site Q_i ne confèrent de résistance à d12 et parmi les mutants du site Q_o , seuls I147V et L275F sont résistants suggérant que ces deux résidus sont impliqués dans la stabilisation de la drogue dans le complexe III. De manière intéressante, la drogue n'est pas active contre l'enzyme bovine. La présence de la phénylalanine en position 275 dans l'enzyme de mammifère pourrait empêcher la liaison de la drogue, comme observé dans le mutant L275F, et pourrait expliquer la différence de sensibilité à d12 entre l'enzyme de levure et celle du bœuf. Il a également été montré qu'il n'y a de résistance croisée des mutations G143A et F129L, deux mutations de résistance aux fongicides Q_o Is.

IV. Conclusion et Perspectives

En conclusion, la méthode de criblage employée nous a permis d'identifier un inhibiteur du complexe II et III : d12. Les données obtenues montrent que la molécule a une faible réactivité envers le complexe III bovin et est active contre les mutants de résistance aux strobilurines, G143A et F129L. Des dérivés de d12, plus actifs, pourraient être développés comme fongicides afin de contourner ces résistances.

Ce test, rapide et peu coûteux, pourrait être utilisé sur d'autres chimiothèques ou extractothèques afin d'identifier de nouveaux composés capables d'inhiber la fonction respiratoire et qui pourraient être des outils précieux dans la lutte contre les pathogènes. Les mutants mimant les poches catalytiques de pathogènes développés et en cours de développement pourraient être utilisés pour le criblage afin d'identifier des molécules spécifiques de ces organismes.

Chapitre II-C: Etude de la différence de sensibilité de plusieurs organismes aux antioomycètes ciblant le site Q_i du complexe bc₁.

I. Introduction

Les oomycètes sont des protistes qui ressemblent aux champignons notamment par la présence d'hyphes. Il existe environ 500 espèces d'oomycètes. Plusieurs espèces sont des pathogènes majeurs de plantes comme *Pythium*, *Phytophthora* et *Plasmopara*. Certaines espèces peuvent également parasiter des animaux. *Pythium* est l'agent du pythium également appelé fonte des semis ; cette maladie affecte couramment les racines des jeunes plantes. *Phytophthora* infecte un grand nombre de végétaux tels que le pommier (*P. cactorum*), la pomme de terre (*P. infestans*) et le châtaignier (*P. cinnamomi*). *Plasmopara viticola* est connu comme étant l'agent du mildiou de la vigne. De nombreux fongicides sont actifs contre ces oomycètes comme les strobilurines. Par contre des antioomycètes ciblant le complexe bc₁ comme le cyazofamide, l'amisulbrom et l'ametotradine, actuellement commercialisés, sont actifs uniquement sur les oomycètes.

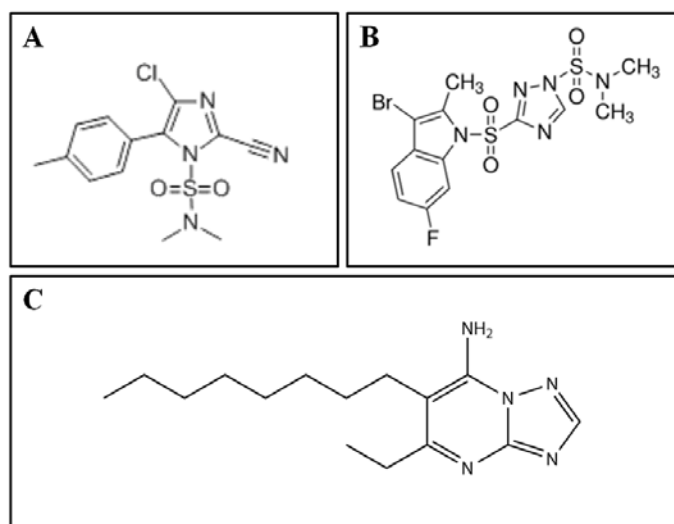


Figure 40: Structure du cyazofamide (A), de l'amisulbrom (B) et de l'ametotradine (C).

Le cyazofamide a été introduit pour la première fois en champs en 2001 au Royaume-Uni. Cet inhibiteur ne présente pas de résistance croisée avec des fongicides Q₀Is commercialisés et contrôle la prolifération de pathogènes résistants aux

strobilurines ce qui suggère que le cyazofamide présente un mode d'action différents des drogues actuellement disponibles en agriculture. Mitani et ses collaborateurs ont examiné l'effet du cyazofamide sur des cinétiques de réduction des hèmes du cytochrome *b* de *Pythium* en utilisant l'antimycine et l'azoxystrobine comme inhibiteurs de référence des sites Q_i et Q_o . Le cyazofamide présente un effet sur la réduction des hèmes du cytochrome *b* similaire à celui observé avec l'antimycine à savoir une réduction immédiate des hèmes après ajout de la drogue. Sur la base de ses résultats, les auteurs suggèrent que le site de liaison du cyazofamide est le site Q_i du complexe bc_1 (Mitani et al. 2001). Des isolats de *Phytophthora capsici* résistants au cyazofamide ont été rapportés en 2008 ; la mutation de résistance n'a cependant pas été identifiée (Kousik & Keinath 2008). L'amisulbrom a également été classifié comme Q_i I. Le site d'action de l'ametoctradine n'a pas été identifié mais comme les oomycètes portant la mutation de résistance G143A sont sensibles à cette drogue, il a été émis comme hypothèse que la molécule ciblerait aussi le site Q_i du complexe bc_1 de ces phytopathogènes.

La levure est naturellement résistante au cyazofamide et à l'amisulbrom. Nous projetons donc d'identifier les résidus impliqués dans la différence de sensibilité à ces drogues entre le complexe bc_1 de la levure et des oomycètes mais également d'identifier le site d'action de l'ametoctradine. La comparaison de séquence du cytochrome *b* de ces organismes révèle que le site Q_i est bien conservé mais qu'il existe des variations dans la poche catalytique qui pourraient être à l'origine de cette sensibilité différentielle. Certaines de ces variations seront introduites dans la levure et leur impact sur la sensibilité aux antioomycètes analysé. Les données ainsi obtenues devraient nous apporter des informations sur les résidus à modifier afin d'obtenir un site Q_i de levure mimant celui des oomycètes et donc sensible aux trois drogues. Je présenterai ici les premiers résultats obtenus sur ce projet.

II. Résultats

A. Détermination du site de liaison de l'ametoctradine

L'ametoctradine inhibe la croissance de la levure sur milieu respiratoire contrairement au cyazofamide et à l'amisulbrom comme illustré figure 41. Nous avons donc testé la sensibilité de mutants du site Q_o et du site Q_i à cette drogue en croissance

afin de déterminer son site de liaison. Les mutations dans ces sites correspondent pour la plupart à des mutations de résistances à des inhibiteurs du complexes bc_1 (souches utilisées dans le chapitre I-B). Aucun des mutants du site Q_i ne présentent de résistance à l'amectrodine contrairement à plusieurs mutants du site Q_o dont G143A ce qui suggère que la molécule se fixe au niveau de ce site. Cependant, comme c'est un faible inhibiteur du complexe bc_1 de la levure (la concentration utilisée est de 100 μ M contre 25nM pour l'azoxystrobine), on ne peut pas exclure que ce composé se lie au site Q_i chez les oomycètes. De plus, à l'inverse du mutant levure G143A, les phytopathogènes portant cette mutation sont sensibles à la drogue.

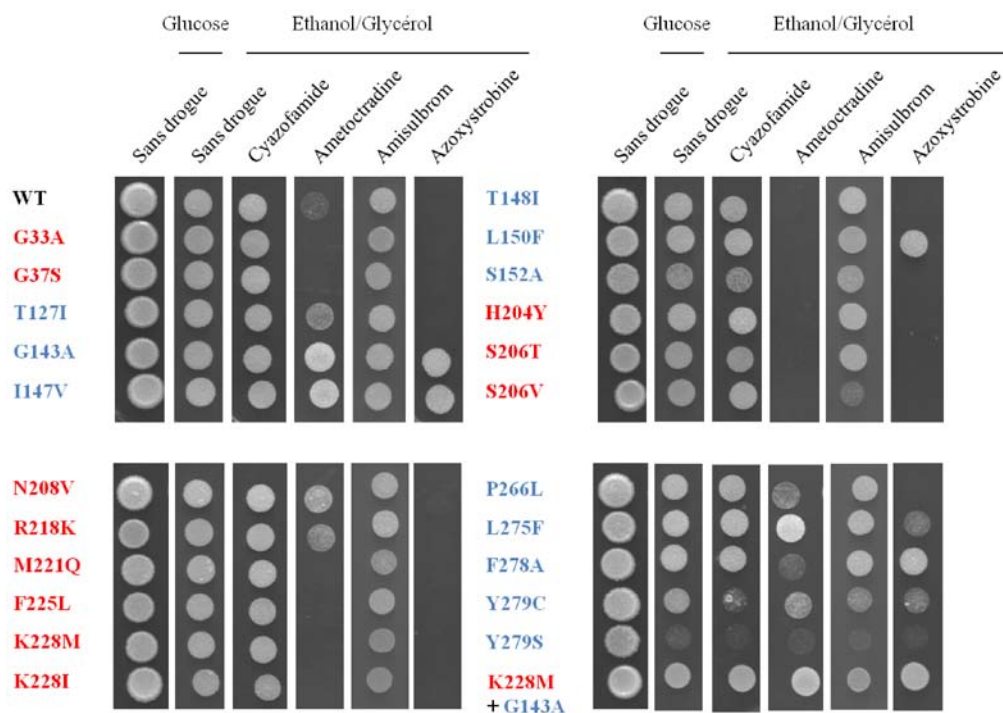


Figure 41: Sensibilité/résistance de la croissance respiratoire de la souche WT et des mutants Q_o et Q_i aux trois antioomycètes et à l'azoxystrobine. Les cellules sont cultivées en milieu respiratoire (éthanol/glycérol) en absence ou en présence de la drogue (100 μ M pour les antioomycètes et 25nM pour l'azoxystrobine) et incubées 3 jours à 28°C. En rouge, les mutants du site Q_i et en bleu, les mutants du site Q_o .

B. Identification des résidus impliqués dans la liaison des antioomycètes au site Q_i

Comme on peut le voir sur la figure 42, le site Q_i de la levure et des oomycètes est bien conservée mais il existe des variations qui pourraient expliquer la résistance de la levure aux antioomycètes.

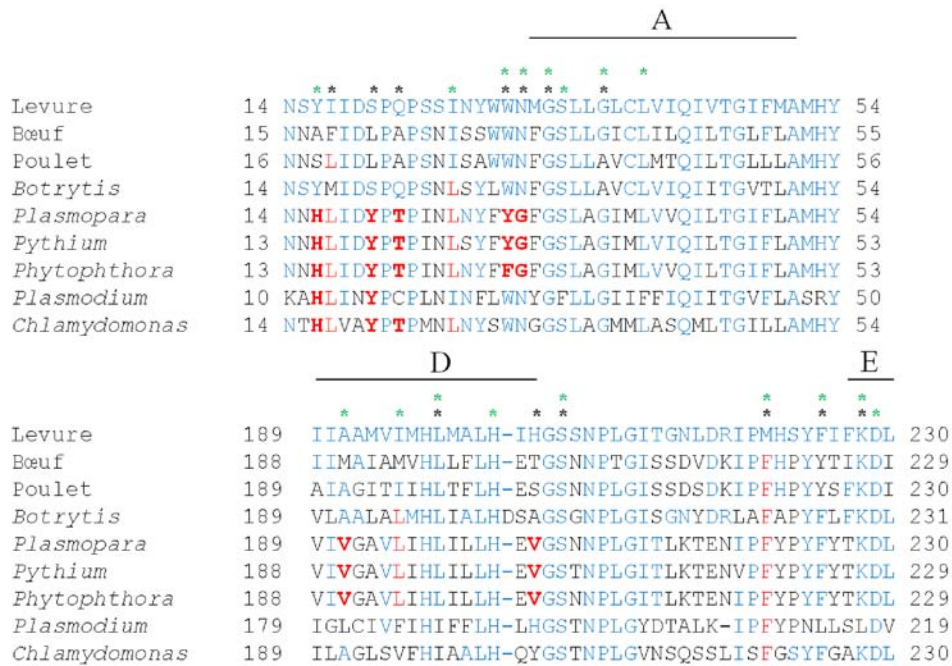


Figure 42: Alignement de séquences de la région Q_i du cytochrome b. En bleu, les résidus conservés entre *S. cerevisiae* et les autres organismes. Les astérisques noirs indiquent la position des résidus impliqués dans la résistance à des Q₀Is (Tableau 1) et les verts indiquent les acides aminés, dans l'enzyme bovine, qui seraient en contact avec l'antimycine (Huang et al. 2005). En rouge, les résidus qui diffèrent entre les trois oomycètes et la levure aux positions indiquées par les astérisques. En gras, les résidus introduits dans la levure.

Nous nous concentrerons principalement sur les résidus impliqués dans la liaison à l'antimycine et à l'ubiquinol (Huang et al. 2005; Hunte et al. 2000) et sur les résidus impliqués dans des résistances aux Q_iIs comme l'HQNO et l'Illicoline H (Tableau 1) pour la construction des premiers mutants. Les résidus des oomycètes signalés en rouge et gras dans la figure 42 seront donc introduits progressivement dans l'enzyme de *S. cerevisiae* afin d'obtenir un site Q_i sensible aux antioomycètes. Les leucines aux positions 17, 27 et 195 ne seront pas introduites car elles sont également présentes chez des organismes résistants aux antioomycètes et n'entraînent pas, *a priori*, un énorme changement. Tout comme les leucines, la phénylalanine en position 221 est retrouvée chez des organismes résistants à ces drogues et ne sera donc pas introduite.

Nous avons étudié aussi l'effet des antioomycètes sur la croissance de deux autres organismes : l'algue *Chlamydomonas reinhardtii* et le parasite *Plasmodium falciparum* qui présente des variations communes avec les oomycètes comme illustré dans la figure 42. Les données obtenues devraient nous indiquer quels résidus pourraient être impliqués dans la sensibilité différentielle et nous guider pour la construction du site Q_i des oomycètes dans la levure.

Stone Doggett, notre collaborateur à l'Université d'Oregon, a testé le cyazofamide et l'amectrodine sur la prolifération du protozoaire. Comme la levure, *Plasmodium* est insensible au cyazofamide avec une $IC_{50} > 25 \mu M$ et a une sensibilité modérée à l'amectrodine avec une IC_{50} d'environ $1 \mu M$; l' IC_{50} pour l'atovaquone est de l'ordre du nanomolaire.

C. reinhardtii étant un organisme photosynthétique. L'étude de l'effet du cyazofamide, de l'amisulbrom et de l'amectrodine sur la croissance de l'algue en milieu TAP (Tris-acétate phosphate ; milieu riche) a été faite dans deux conditions : à la lumière où la cellule va effectuer à la fois la respiration et la photosynthèse et à l'obscurité où l'organisme va uniquement respirer (Figure 43). A la lumière, la croissance de l'algue est inhibée uniquement en présence de cyazofamide. A l'obscurité, on observe également une inhibition de la croissance en présence de cyazofamide et une inhibition plus faible en présence des deux autres inhibiteurs. Nous avons également fait ces tests sur deux mutants : Δbc_1 (complexe III de la chaîne respiratoire) et Δb_6f (complexe III de la chaîne photosynthétique). A la lumière, le mutant bc_1 , qui va uniquement faire de la photosynthèse, n'est pas inhibé par les antioomycètes ce qui suggère que le cyazofamide, qui inhibe la croissance de la souche sauvage à la lumière, se lie au niveau du complexe bc_1 . L'absence de croissance du mutant à l'obscurité est normale car le mutant ne peut pas respirer. Le mutant Δb_6f à la lumière et à l'obscurité est inhibé par le cyazofamide ce qui confirme les résultats obtenus avec le mutant bc_1 à savoir une inhibition du complexe bc_1 de l'algue par le cyazofamide puisque le mutant Δb_6f est uniquement capable de respiration dans les deux conditions expérimentales. L'inhibition de la souche sauvage à l'obscurité par l'amectrodine et l'amisulbrom est probablement un artéfact ou du moins n'a pas de lien avec le complexe bc_1 puisqu'on ne voit pas d'inhibition des mutants par ces drogues. Dans ces expériences, la concentration en cyazofamide utilisée est de $100 \mu M$; des données préliminaires montrent que la croissance de l'algue est inhibée dès $1 \mu M$.

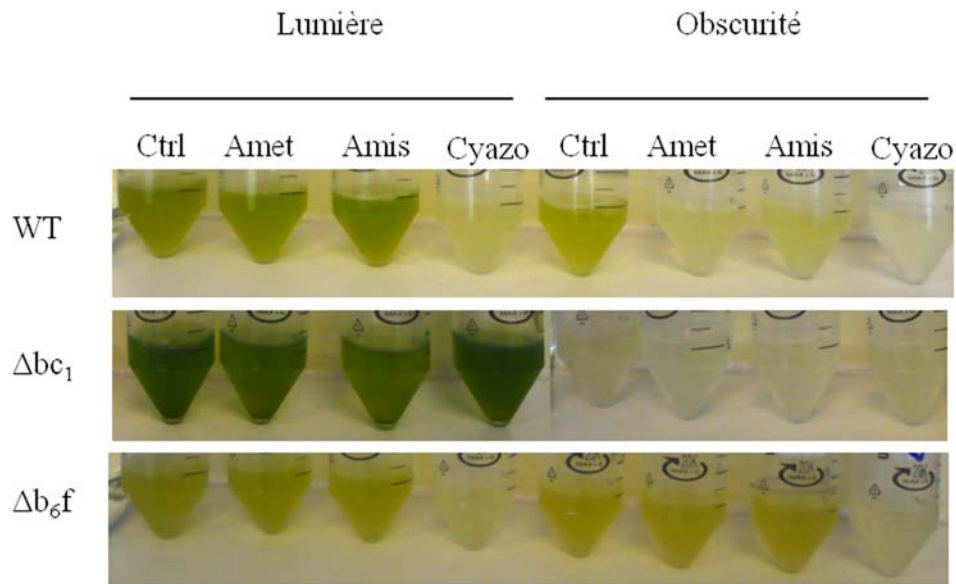


Figure 43: Sensibilité/résistance de la croissance de *C. reinhardtii* (sauvage et mutants Δbc_1 et Δb_6f) aux antioomycètes. Les algues ont été cultivées deux jours, en milieu TAP contenant ou non 100 μ M de la drogue, à la lumière (photosynthèse + respiration) et à l'obscurité (respiration). Ctrl : contrôle sans inhibiteur ; Amet : ametoctradine ; Amis : amisulbrom ; Cyazo : cyazofamide.

Pour résumé, la levure et *Plasmodium* sont modérément sensible à l'ametoctradine et insensible au cyazofamide ainsi qu'à l'amisulbrom dans le cas de la levure (la sensibilité du parasite à l'amisulbrom n'ayant pas été testé) tandis que *Chlamydomonas* est sensible au cyazofamide et insensible à l'ametoctradine et à l'amisulbrom.

Comme illustré figure 42, *P. falciparum* et *C. reinhardtii* présentent des variations communes avec les oomycètes. Ainsi, on retrouve une histidine en position 16 et une tyrosine en position 20 chez ces différents organismes. Or ils ne présentent pas de sensibilité commune à un des antioomycètes ; il semblerait donc que ces deux résidus ne soient pas impliqués dans la sensibilité différentielle à ces drogues. *A contrario*, les résidus Y/F30, G31, V91 et V204, seulement présents chez les oomycètes, pourraient expliquer la différence de sensibilité à l'amisulbrom entre les enzymes des phytopathogènes et celles de la levure, de l'algue et de *Plasmodium*. De manière intéressante, on retrouve une thréonine en position 22 uniquement chez les oomycètes et *Chlamydomonas* qui sont sensibles au cyazofamide suggérant une implication de ce résidu dans la liaison du cyazofamide au site Q_i . L'ensemble de ces variations pourraient être introduites dans la levure afin d'obtenir un site Q_i sensible aux antioomycètes.

III. Conclusion et perspectives

Nous avons entrepris d'identifier les résidus impliqués dans la différence de sensibilité aux antioomycètes observée entre ces phytopathogènes et la levure. Pour cela, nous avons commencé à remplacer, pas à pas, des résidus de la levure par leur équivalent chez les oomycètes en ce concentrant dans un premier temps sur les résidus qui ont été décrits comme étant impliqués dans la liaison de l'antimycine (Huang et al. 2005) ou dans des résistances à des Q_iIs (Tableau 1). L'algue verte *Chlamydomonas reinhardtii* et le parasite *Plasmodium falciparum* partageant certaines variations avec les oomycètes, des tests de sensibilité de ces organismes aux drogues ont été effectués dans le but d'identifier certains des facteurs de la sensibilité différentielle. D'autres variations, en dehors des résidus sur lesquels nous nous sommes concentrés, pourraient également jouer un rôle dans ce processus. Par exemple, le résidu M29 qui est commun aux oomycètes et à *Chlamydomonas* pourrait être impliqué dans la liaison du cyazofamide. De ce fait, il sera peut-être nécessaire d'effectuer de nombreux changements afin d'obtenir un site Q_i sensible aux trois antioomycètes. La construction *in silico* d'un modèle de l'enzyme des oomycètes par homologie avec des structures du complexe *bc*₁ disponibles suivie d'une simulation de la liaison des drogues dans la poche catalytique Q_i pourrait également permettre d'identifier les changements à effectuer dans le cytochrome *b* ; tout comme la recherche d'algues résistantes au cyazofamide.

Les données obtenues apporteront des informations importantes pour la conception de nouvelles molécules capables d'inhiber spécifiquement le site Q_i des oomycètes. Une fois le modèle obtenu, celui-ci pourra être utilisé pour cribler de nouveaux antioomycètes mais également pour suivre l'apparition de mutations de résistance. Ces expérimentations n'étant pas chose aisée chez les oomycètes.

Conclusion du chapitre

A l'heure actuelle de nombreux fongicides du site Q_o sont utilisés en agriculture pour lutter contre les phytopathogènes. Malheureusement, des mutations de résistance à ces drogues sont apparues assez rapidement après l'introduction des composés sur le marché ; parmi ces mutations, on trouve G143A qui confère un fort niveau de résistance. La mutation s'est propagée rapidement chez certains pathogènes tandis que chez d'autres espèces, elle n'a pas encore été détectée. Des études ont montré qu'il existe une différence dans la structure exon/intron du *CYTB* des champignons et oomycètes (Grasso et al. 2006). En effet, les espèces où la mutation n'a pas été détectée possèdent un intron après le codon G143. A l'aide de notre modèle « levure », nous avons pu montrer que la modification de ce codon empêche l'épissage de l'intron et que cela avait pour effet une diminution du niveau de cytochrome *b* et donc de la croissance respiratoire. Nous avons également montré que des mécanismes de « by-pass » qui pourraient permettre une restauration de la croissance sont possibles : restauration de l'appariement exon/intron nécessaire à l'épissage, perte de l'intron, augmentation de la concentration intramitochondriale en magnésium requis pour l'épissage. Ces données apportent des informations intéressantes sur la possible apparition de la mutation G143A chez les pathogènes possédant un intron. Face à l'émergence de mutations de résistance, il est nécessaire de rechercher de nouveaux composés capables d'inhiber la croissance de ces organismes résistants. Nous avons donc développé un test permettant d'identifier, au sein de chimiothèques, des molécules capables d'inhiber la fonction respiratoire. Nous avons ainsi pu identifier un nouvel inhibiteur du complexe bc_1 , d12, qui pourrait être développé comme fongicide car possédant des caractéristiques intéressantes: pas d'effet sur l'enzyme de mammifère et inhibe la croissance du mutant G143A et F129L. Un autre moyen de lutter contre les phytopathogènes résistants serait de développer des inhibiteurs du site Q_i . Actuellement, les seuls fongicides Q_i commercialisés sont le cyazofamide, l'amisulbrom (et l'ametoctradine ?) mais ces drogues sont spécifiques des oomycètes. Nous avons cherché ici à identifier les résidus impliqués dans la sensibilité différentielle afin de créer, dans la levure, un site Q_i mimant celui des oomycètes. Ce mutant pourra également servir à suivre l'évolution de la résistance aux Q_i s.

DISCUSSION

DISCUSSION GENERALE

Je discuterai ici de l'apport du modèle « levure » dans l'identification et la caractérisation de nouveaux inhibiteurs du complexe bc_1 de la chaîne respiratoire mitochondriale et l'étude du développement de la résistance à ces antimicrobiens.

Les molécules capables d'inhiber le complexe bc_1 sont des armes redoutables dans la lutte contre les pathogènes de l'Homme ou des plantes car cette enzyme occupe une place centrale dans la bioénergétique mitochondriale en catalysant le transfert des électrons de la quinol vers le cytochrome c et en couplant ce transfert à la translocation de protons à travers la membrane mitochondriale interne ; protons qui seront utilisés par l'ATP synthase pour produire l'ATP, source d'énergie de la cellule. A l'heure actuelle, plusieurs inhibiteurs ciblant le complexe bc_1 sont commercialisés pour lutter contre ces pathogènes. L'atovaquone est employé en médecine dans le traitement du paludisme, de la toxoplasmose, des babésioses et de la pneumocystose causé par *Pneumocystis jirovecii*. Les strobilurines ou encore le cyazofamide et l'amisulbrom sont utilisés en agriculture contre les phytopathogènes. L'atovaquone et les strobilurines sont des inhibiteurs de la poche catalytique Q_o tandis que le cyazofamide et l'amisulbrom sont des inhibiteurs ciblant la poche Q_i .

Malheureusement, un nombre croissant de cas de résistance à ces drogues ont été rapportés et ont pour origine des mutations dans le cytochrome b , sous-unité qui forme les poches catalytiques du complexe et qui est codée par le génome mitochondrial (pour revue, (Fisher & Meunier 2008)). Face à l'apparition de résistance aux inhibiteurs du complexe bc_1 et aux autres composés, il est devenu urgent de développer de nouvelles molécules capables de contourner ses résistances mais également de nouvelles stratégies de traitement. Par exemple, en agriculture, afin de limiter l'apparition de résistance, une stratégie de rotation des drogues a été développée. Cependant, ce type d'approche en médecine et plus précisément dans la lutte contre *Plasmodium*, l'agent du paludisme, est difficilement applicable; le secteur pharmaceutique de certains pays endémiques n'étant pas régulé. Néanmoins, afin de limiter l'émergence de ces résistances, l'OMS a appelé à cesser l'utilisation des monothérapies au profit des combinaisons médicamenteuses (ACT). La combinaison d'un inhibiteur ciblant le site Q_o et d'un inhibiteur ciblant le site Q_i pourrait donc être utilisée.

A l'exception du cyazofamide et de l'amisulbrom, les inhibiteurs du complexe bc_1 développés comme antimicrobiens sont des inhibiteurs de la poche catalytique Q_o . Le site Q_i est moins bien conservé que le site Q_o , ce qui favoriserait le développement de molécules spécifiques (actives contre le complexe III de pathogènes mais inactives contre le complexe III de mammifères). Par contre le site Q_i semble être structuralement plus rigide que le site Q_o . Il n'a effectivement pas été observé, comme pour le site Q_o , de flexibilité au niveau de la liaison des inhibiteurs (Gao et al. 2003; Huang et al. 2005; Esser et al. 2004). Le fait que le site Q_i s'accommode moins bien à diverses molécules pourrait donc expliquer pourquoi peu de Q_i Is sont disponibles à ce jour, et donc peu de Q_i Is à activité antimicrobienne.

Ce type d'étude, chez les organismes pathogènes, est difficile voire impossible actuellement. En effet, certains pathogènes ne sont pas cultivables en laboratoire ; c'est le cas, par exemple, de *P. jirovecii* et de certains phytopathogènes. Les oomycètes peuvent être cultivés en laboratoire sur des plantes ou des fragments de plantes mais le passage sur des milieux synthétiques est uniquement possible, à l'heure actuelle, pour les *Phytophthora*. Dans le cas de *Plasmodium falciparum*, l'agent du paludisme, identifier des molécules ciblant le complexe bc_1 ou rechercher *in vitro* des mutations de résistance est possible (pour exemple, (Dong et al. 2011; Nam et al. 2011)). Par contre, l'analyse biochimique n'est pas chose aisée car il est difficile d'obtenir des mitochondries en quantité suffisante pour une telle analyse et les préparations de membranes mitochondriales sont contaminées par de l'hémozoïne – molécules d'hèmes polymérisées à la suite de la dégradation de l'hémoglobine par le parasite – qui gêne les mesures spectrophotométriques. La levure *S. cerevisiae* présente de nombreux avantages pour l'étude des inhibiteurs du complexe bc_1 : facile à cultiver, croissance sur milieu fermentescible en l'absence du chaîne respiratoire fonctionnelle, nombreux outils biochimiques et génétiques disponibles dont la transformation du génome mitochondrial par balistique (uniquement possible chez la levure et chez l'algue *Chlamydomonas reinhardtii*), séquence du cytochrome *b* bien conservée entre la levure et les pathogènes, structure du complexe bc_1 résolue. A l'aide de ce modèle, nous allons pouvoir (I) rechercher de nouvelles molécules capables d'inhiber le complexe bc_1 , (II) caractériser ces nouveaux composés en déterminant notamment leur mode de liaison, (III) étudier l'évolution de la résistance à ces drogues.

I. Rechercher de nouvelles molécules capables d'inhiber le complexe *bc*₁

A. Etude des sensibilités différentielles aux inhibiteurs

L'enzyme des oomycètes est sensible au cyazofamide et à l'amisulbrom, deux Q_iIs, tandis que l'enzyme de la levure et celle de l'Homme sont fortement résistantes à ces molécules. De la même façon, l'atovaquone est très efficace contre l'enzyme de *Plasmodium* et de la levure mais a une faible réactivité envers l'enzyme de mammifère. C'est grâce à ces différences de sensibilité que ces drogues peuvent être utilisées en traitement. Lorsqu'on compare la séquence du cytochrome *b* de ces différents organismes (pathogènes, levure et Homme), on s'aperçoit qu'il existe, au niveau des poches catalytiques, des variations qui pourraient expliquer ce phénomène. Afin d'étudier ces différences de sensibilité, nous avons introduit progressivement les variations dans l'enzyme de levure et analysé la sensibilité des mutants aux inhibiteurs. Nous avons ainsi pu montrer que le résidu en position 275 joue un rôle clé dans la sensibilité différentielle à l'atovaquone. En effet, la présence d'une phénylalanine à cette position induit une résistance à l'atovaquone chez l'Homme qui est diminuée par la combinaison d'autres variations chez le parasite. Les données apportées par l'étude des sensibilités différentielles pourraient aider à la conception de nouvelles molécules à réactivité spécifique.

B. Identifier des nouveaux composés dans des chimiothèques

Nous avons développé, au cours de ma thèse, un test de criblage de molécules capables d'inhiber la fonction respiratoire. Ce test est basé sur l'utilisation de la levure et du TTC, un accepteur d'électron qui peut être réduit en un précipité rouge par les déshydrogénases lorsque la chaîne respiratoire est fonctionnelle. L'absence de ce précipité dans les cellules permet donc d'identifier des drogues capables d'inhiber la fonction respiratoire. Nous avons ainsi pu identifier dans la chimiothèque de l'ICSN un nouvel inhibiteur du complexe II et III : la molécule d12. Cet inhibiteur est un analogue des stérols et est donc différent des autres inhibiteurs du complexe III ce qui ouvre des voies intéressantes dans la conception de nouvelles molécules.

Ce test, rapide et peu coûteux, pourrait être utilisé pour identifier des molécules spécifiques du complexe bc_1 de pathogènes. Pour cela, les mutants mimant l'enzyme d'organismes pathogènes et de l'Homme pourraient être utilisés. Comme le cytochrome b de *S. cerevisiae* interagit avec d'autres sous-unités du complexe, catalytiques ou surnuméraires, l'introduction de la protéine humaine ou des pathogènes dans l'enzyme de levure risquerait de perturber ces interactions et, par conséquent, de conduire à un complexe non assemblé c'est pourquoi il est préférable de se limiter aux poches catalytiques. Les mutants construits pour l'étude des sensibilités différentielles pourraient donc servir de base à la construction de tels mutants. Sont actuellement disponibles des mutants mimant le site Q_o de plusieurs phytopathogènes (Fisher et al. 2004), le site Q_o de l'Homme et le site Q_o de *Plasmodium falciparum* ; le site Q_i des oomycètes est en cours de construction. Malheureusement, le mutant « *Plasmodiumisée* » portant le plus de variations (PF7) n'est pas capable de croître sur milieu respiratoire et est donc inutilisable pour le criblage. Ce mutant présente une perte de près de 85% de l'activité du complexe bc_1 due à l'introduction d'une délétion de quatre résidus au niveau de l'hélice cd_2 . La recherche de suppresseurs, à partir du mutant portant seulement la délétion (PF3), a permis d'identifier des mutations compensatoires dans la région de liaison flexible de Rip1 suggérant que la délétion perturbe le transfert des électrons du cytochrome b vers les cytochromes c/c_1 rendu possible grâce au mouvement de Rip1. Néanmoins, ces mutations secondaires ne permettent pas de restaurer la croissance du mutant PF7. Un seul changement n'étant pas suffisant, la construction *in silico* d'un modèle de l'enzyme modifiée par homologie avec des structures du complexe bc_1 disponibles pourrait permettre d'identifier les changements à effectuer dans les sous-unités qui permettraient de restaurer l'activité du complexe. Si cela n'est pas le cas, la construction d'un mutant sans la délétion pourrait être envisagée ; la délétion n'est pas la seule variation permettant de diminuer la résistance à l'atovaquone liée à F275 et de ce fait, d'obtenir un site Q_o mimant celui du parasite. L'introduction du deuxième site catalytique dans ces mutants reste à faire afin d'obtenir des mutants complets. Cependant, le remplacement de la poche catalytique dans son ensemble peut s'avérer problématique car la modification de certains résidus peut conduire à l'obtention d'une enzyme non fonctionnelle. Par exemple, le remplacement de la proline en position 277 chez la levure par son équivalent chez l'Homme à savoir une phénylalanine entraîne une diminution importante de l'activité se

traduisant par une absence de croissance sur milieu respiratoire. C'est pourquoi il est préférable de se concentrer d'abord sur les résidus impliqués dans la liaison aux inhibiteurs (comme cela a été fait dans l'étude des sensibilités différentielles) avant d'élargir à d'autres résidus. Ces données nous apportent cependant des informations sur la plasticité des poches catalytiques.

II. Caractérisation des nouveaux inhibiteurs du complexe bc_1

La levure est un bon outil pour déterminer le mode de liaison de la drogue mais également identifier des résistances croisées. Cependant, certains inhibiteurs se lient peu (ex : acridinediones (Biagini et al. 2008) et ametoctradine) voire pas à l'enzyme de levure (ex : cyazofamide, amisulbrom, RCQ06).

A. Cas des molécules inhibant l'enzyme de *S. cerevisiae*

L'analyse de mutants de résistance à l'atovaquone a permis à Kessl et ses collaborateurs d'établir le mode de liaison de cette drogue dans le site Q_o (Kessl et al. 2003). De la même manière, nous avons pu identifier le site et le mode de liaison d'HDQ, un inhibiteur ciblant le complexe bc_1 de *P. falciparum*. Pour cela, la sensibilité à l'HDQ d'une collection de mutants présentant des mutations de résistance à des Q_o Is ou à des Q_i Is a été analysée et nous a permis d'identifier la drogue comme étant un inhibiteur du site Q_i . Quatre mutants du site Q_i – G33A, H204Y, M221Q et K228M – sont résistants à la molécule suggérant une implication de ces résidus dans la liaison de l'inhibiteur au sein de la poche catalytique.

B. Cas des molécules se liant peu voire pas au complexe bc_1 de la levure

Certaines molécules ne se lient pas bien voire pas du tout à l'enzyme de levure; c'est le cas notamment de l'ametoctradine, un antioomycète, et de RCQ06, un antipaludique. Afin d'identifier leur site de liaison, il est nécessaire d'utiliser des mutants mimant les poches catalytiques des pathogènes. Nous avons montré que la levure est fortement résistante à RCQ06 mais lorsque nous introduisons des résidus du parasite

dans l'enzyme de levure (surtout F275), cette dernière devient fortement sensible à l'inhibiteur indiquant que cette molécule est un Q_oI. Afin d'identifier d'éventuelles résistances croisées avec des inhibiteurs actuellement disponibles sur le marché, il serait intéressant d'introduire ces résistances dans la version « *Plasmodiumisée* » de l'enzyme. De plus ces mutations pourraient nous apporter des informations sur le mode de liaison de la drogue dans la poche catalytique comme cela a été le cas pour HDQ. Pour l'ametoctradine, une faible sensibilité de la levure a été observée. L'analyse de la sensibilité en croissance de la collection de mutants Q_o et Q_i à cet antioomycète a révélé que plusieurs mutants du site Q_o sont résistants à la drogue suggérant une fixation de cette dernière à ce site or, comme c'est un très faible inhibiteur, on ne peut pas exclure qu'il agisse, chez les phytopathogènes, au niveau du site Q_i comme cela a été proposé. Les mutants mimant les poches catalytiques des oomycètes devraient donc permettre d'identifier la cible de l'ametoctradine.

III. Etude de l'évolution de la résistance aux molécules capables de bloquer l'activité du complexe *bc*₁

La levure comme les mutants mimant les poches catalytiques d'organismes pathogènes peuvent servir pour l'étude de l'évolution des résistances aux inhibiteurs du complexe *bc*₁.

Des mutations de résistance aux différentes drogues étudiées peuvent être recherchées à l'aide de ces modèles. Il suffit, pour cela, de rechercher des clones capables de croître sur milieu respiratoire contenant la drogue et de séquencer le cytochrome *b* comme cela a été fait, par exemple, pour le diuron, un Q_iI (di Rago et al. 1986).

La levure peut également servir à étudier l'évolution des mutations de résistance. Par exemple, la mutation de résistance aux strobilurines G143A est apparue rapidement chez certains phytopathogènes alors que l'évolution de cette mutation a été plus lente voire absente chez d'autres. Le modèle levure a permis d'étudier la base moléculaire de cette évolution différentielle. En 2004, Fisher et ses collaborateurs ont modifié le site Q_o de la levure afin de mimer celui de plusieurs phytopathogènes (*Blumeria graminis*, *Venturia inaequalis*, *Sphaerotheca fuliginea* et *Phytophthora megasparma*) et ont introduit dans ces différentes versions de l'enzyme la mutation G143A. Ils ont ainsi pu

observer que certaines variations introduites semblaient affecter l'impact de la mutation sur l'activité du complexe bc_1 . En se basant sur ces observations, les auteurs ont suggéré que la mutation de résistance peut affecter différemment le fitness des phytopathogènes ce qui peut expliquer, en partie, les différences d'évolution de la mutation observées sur le terrain (Fisher et al. 2004). La mutation G143A rapportée chez de nombreux phytopathogènes n'a cependant pas été trouvée chez les pathogènes arborant un intron juste après le codon G143. En utilisant la levure comme modèle, nous avons pu montrer que la mutation introduite chez une souche possédant un intron affecte l'épissage de ce dernier et conduit, de ce fait, à une déficience respiratoire. Nous avons également pu identifier des mécanismes de contournement de l'effet délétère de la mutation qui pourrait apparaître en champs.

La levure pourrait donc servir pour l'étude de l'évolution de d'autres mutations. Par exemple, ce modèle pourrait nous permettre de comprendre pourquoi la mutation Y279S est la mutation de résistance à l'atovaquone la plus répandue chez *Plasmodium* (Musset et al. 2006) alors que celle-ci affecte le fitness du pathogène (Fisher et al. 2012) et pourquoi on ne la retrouve pas chez d'autres organismes traités à l'atovaquone. Dans le premier cas, il se pourrait que le niveau de résistance à l'atovaquone soit plus élevé avec la mutation Y279S qu'avec une autre mutation isolée *in vitro* (Kessl et al. 2004, 2005) et que, de ce fait, la mutation confèrerait un avantage important pour la survie du parasite. Dans le seconde cas, des variations dans la poche catalytique Q_o entre les différents organismes pourraient expliquer l'absence de la mutation Y279S chez *T. gondii* ou *P. jirovecii*. En effet, la mutation Y279S pourraient avoir un effet délétère sur l'activité du complexe III de ces deux pathogènes plus important que sur celui de *Plasmodium*.

IV. Autres applications : étude des mutations et polymorphismes humains

La levure possédant des poches catalytiques humanisées pourrait servir à l'étude de mutations pathologiques retrouvées chez des patients mais également à l'étude de polymorphismes du cytochrome *b* humain. Les polymorphismes sont, *a priori*, silencieux mais certaines de ces variations, localisées dans les régions catalytiques, pourraient avoir des effets sur le complexe bc_1 (sensibilité aux inhibiteurs, couplage...). Par

exemple, le polymorphisme D171N (S172 chez la levure) pourrait être introduit dans notre modèle et son impact sur le complexe analysé. Cette variation est associée à un lignage de l'ADN mitochondrial spécifique du continent européen, l'haplogroupe J. Le remplacement de l'aspartate par l'asparagine induirait un léger découplage. Ce polymorphisme aurait conféré un avantage durant les périodes de grands froids aux porteurs de cette variation car le découplage permet d'augmenter la production de chaleur au dépend de la production d'ATP (Wallace et al. 1999). De manière paradoxale, ce polymorphisme aurait des effets positifs comme l'adaptation au froid et la diminution de la production d'espèces réactives d'oxygène comme des effets négatifs lorsqu'il est associé à des mutations liées à des maladies mitochondriales (LHON, syndrome de MELAS...) (Pierron et al. 2008). La diminution de la production d'ERO, responsables de dommages cellulaires au cours du vieillissement, pourrait expliquer la surreprésentation de l'haplogroupe J parmi les populations de centenaires (Rose et al. 2001). L'effet du polymorphisme D171N sur l'activité du complexe pourra être étudié à l'aide du modèle levure : activité de l'enzyme, découplage, production d'ERO, etc. D'autres polymorphismes pourraient être ainsi étudiés et les données obtenues devraient nous indiquer si ces changements sont des variations silencieuses ou de possibles facteurs de risque.

S. cerevisiae semble être un outil utile pour le développement et la caractérisation détaillée de composés ciblant le complexe bc_1 des pathogènes ainsi que pour la prédiction et la surveillance de la résistance à ces antimicrobiens. Une analyse *in silico* basée sur les résultats obtenus au cours de ma thèse ou les structures cristallographiques des mutants construits en présence de composés chimiques devraient nous permettre de comparer la structure des poches catalytiques des différents organismes et le mode de liaison des inhibiteurs dans ces sites ce qui pourraient fournir des informations importantes pour la conception de nouvelles drogues aux propriétés antimicrobiennes.

ANNEXES

Annexe 1 : Article en préparation

Exploring the differential sensitivity of *Plasmodium falciparum*, yeast and mammalian enzymes towards anti-malaria compounds targeting the *bc*₁ complex Q_o site.

Cindy Vallières[‡], Nicholas Fisher[‡] and Brigitte Meunier^{‡*}

[‡]Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, Avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France; [‡]Plant Research Laboratory, Michigan State University, East Lansing, MI 48824, USA.

* corresponding author

The *bc*₁ complex is a validated target for antimicrobial agents used to control human and plant pathogens (for instance anti-malaria and fungicides). Most of these drugs bind to Q_o pocket that is provided by the mitochondrially-encoded cytochrome *b*, the main subunit of the complex. Comparison of the cytochrome *b* sequences shows that the Q_o domain is well conserved between organisms. There are however variations that could explain the differential sensitivity towards inhibitors, which is required for the development of therapeutic drugs.

In this work, we are studying two compounds with anti-malaria activity: Atovaquone, a hydroxynaphthoquinone used in medicine to treat *Plasmodium falciparum* malaria and other infections and that targets the Q_o site; and RQC06, a quinolone compound shown to have a potent inhibitory activity against the plasmodial *bc*₁ complex. The yeast (*S. cerevisiae*) and *P. falciparum* *bc*₁ complexes are highly sensitive towards atovaquone, whereas the mammalian enzyme, as expected for a therapeutic molecule, is 20-25 fold less susceptible. RQC06 is potentially an interesting drug since the mammalian *bc*₁ complex is also 20-30 fold less sensitive than the plasmodial enzyme. By contrast, the yeast *bc*₁ complex is naturally highly resistant to RQC06.

In order to investigate the determinants of resistance and sensitivity towards these two drugs, we used the yeast *bc₁* complex as model. We constructed and analysed a series of yeast mutants harbouring variants of the Q_o site where yeast residues have been replaced by *P. falciparum* or human equivalents. We showed that residue 275 plays a central role in the differential sensitivity and that other variants in the Q_o site modulate the impact of the mutation introduced in position 275. By modifying the yeast enzyme, we are creating useful tools that could be used for the discovery and the analysis of new drugs with potential anti-malaria activity and for the study of the development of resistance mutations.

INTRODUCTION

The *bc₁* complex or complex III is central to mitochondrial bioenergetics and the target of antimicrobial agents used to control human and plant pathogens (for instance anti-malaria and fungicides). It is a multimeric complex. Three subunits form the catalytic core and contain the redox-active groups haems and FeS namely cytochrome *b*, cytochrome *c₁* and the Iron Sulphur Protein (ISP). The structures of several complexes have been solved. They share the same catalytic core. The central and largest subunit is cytochrome *b*, a predominantly hydrophobic protein consisting of eight transmembrane helices. Cytochrome *b* is mitochondrially encoded in all eukaryotes while the other subunits are nuclearly encoded.

The *bc₁* complex catalyses the transfer of electrons from ubiquinol to cytochrome *c* and couples this electron transfer to the vectorial translocation of protons across the inner mitochondrial membrane. The catalytic mechanism, called the Q-cycle, requires two distinct quinone-binding sites (Q_o, quinol oxidation site, and Q_i, quinone reduction site), which are located on opposite sides of the membrane and linked by a transmembrane electron-transfer pathway. Cytochrome *b* provides both the Q_o and Q_i pockets and the transmembrane electron pathway (*via* haems *b_l* and *b_h*). The Q_o site is a relatively large domain formed from components encompassing amino acid residues 120-150 and 260-280. Hydrogen bonds form a 'loose stitching' that allow a degree of expansion of the site on occupant binding [5]. Some sidechains within the Q_o site, such as

components of the 'PEWY' motif (residues 271-274), demonstrate considerable conformational flexibility on inhibitor binding [6].

A number of Q_o-specific inhibitors (Q_oIs) are known, such as the natural compounds myxothiazol, stigmatellin, and strobilurin A, and a number of synthetic molecules. The Q_o site forms a bifurcated volume. On the basis of structural and mutational analysis, Q_oIs can be separated into two classes by their mode of binding [5], [6]. Myxothiazol and MOA-type inhibitors bind in the b_l 'proximal' domain of the Q_o site. Stigmatellin and 2-hydroxy-quinone analogues bind in the haem b_l 'distal' domain, occupying the region of the Q_o site close to the docking interface of the iron-sulphur protein.

Comparison of the cytochrome *b* sequences shows that the Q_o domain is well conserved between organisms. There are however variations that could explain the differential efficacy of inhibitors, which is required for the development of therapeutic drugs. In this work, we are studying the determinants of the differential sensitivity of the yeast (*Saccharomyces cerevisiae*), *Plasmodium falciparum* and mammalian bc₁ complexes towards two compounds with anti-malaria activity: atovaquone and RCQ06, a quinolone ester recently reported [4].

Atovaquone, a hydroxynaphthoquinone is used therapeutically to treat *Plasmodium falciparum* malaria, *Pneumocystis jirovecii* pneumonia, *Toxoplasma gondii* toxoplasmosis and other infections. It targets the bc₁ complex and binds in the Q_o pocket of the complex. The drug is likely to be a 'distal' binding inhibitor due to its effect on the EPR spectrum of the ISP [10]. A crystal structure for atovaquone-inhibited bc₁ complex is not available.

RCQ06 has been synthesised during the study of quinolones compounds with anti-malaria activity. The compound was shown to have a potent inhibitory activity against the parasite bc₁ complex [4] with an IC₅₀ of around 1.3 nM, which is in the same range than the atovaquone IC₅₀ (around 3 nM) [1]. Modelling analysis of the binding of RCQ06 and other compounds of the series in the bc₁ complex Q_o site suggested that the compounds would bind in a position distal to haem b_l and proximal to the ISP docking site, like atovaquone. The potent inhibitory activity of RCQ06 *in vivo* (parasite

proliferation) and *in vitro* seemed promising. However, the differential efficacy of RCQ06 had not been studied.

Previous work showed that the yeast (*S. cerevisiae*) *bc*₁ complex is more sensitive towards atovaquone than the bovine enzyme. A computed energy-minimised structure for atovaquone liganded to the yeast *bc*₁ complex suggested that residue 275 plays a key role in the differential sensitivity. The presence of a phenylalanine at position 275 in the bovine enzyme would hinder the drug binding. F275 being replaced by L in the yeast enzyme, the steric constraint is lessened and the sensitivity to atovaquone increases [11]. Like *S. cerevisiae*, the pathogenic fungus *P. jirovecii* cytochrome *b* has a leucine residue at position 275. The mutation L275F has been reported in the pathogenic fungus cytochrome *b* after atovaquone treatment, in association with acquired atovaquone resistance. When the mutation L275F is genetically introduced in the yeast *bc*₁ complex, its sensitivity is significantly decreased [8,11]. In the cytochrome *b* of *P. falciparum* (and of other *Plasmodium* and of *Toxoplasma*), the F275 variant is naturally present. However the parasite *bc*₁ complex is highly sensitive to atovaquone. Thus other structural variations would explain the differential sensitivity between the parasite and the mammalian enzymes.

In order to explore further the determinants of resistance and sensitivity towards atovaquone and RCQ06, we have constructed and analysed a series of yeast mutants harbouring variants of the Q_o site where yeast residues have been replaced by *P. falciparum* or human equivalent.

MATERIALS AND METHODS

Materials: Equine cytochrome *c*, decylubiquinone and azoxystrobin are from sigma. Atovaquone was provided by Dr Paul Stocks (Liverpool); RCQ06 was supplied by Prof. Paul O'Neil (Liverpool).

Yeast mutants: The mutants have been generated by site-directed mutagenesis and mitochondrial transformation as described in [8]. They have identical mitochondrial genomes with the exception of the mutations introduced in the cytochrome *b* gene. The two series differed by the nuclear genetic background: the human-like mutants were haploids in the W303-1B nuclear genetic background; the

Plasmodium-like mutants were diploids (W303-1B x JC8). W303-1B derived from W303 (Thomas, B. J. & Rothstein, R. (1989) *Cell* **56**, 619-630) JC8 derived from [2].

Measurement of quinol cytochrome *c* reductase activity in yeast mitochondria: Mitochondria were prepared as in ([12]). Quinol cytochrome *c* reductase activity measurements were performed in 10mM potassium phosphate pH 7, 0.01% (w/v) lauryl maltoside, 1mM KCN and 20 μ M equine cytochrome *c* at room temperature. Mitochondria were diluted to 2-25 nM *bc*₁ complex. Concentrations were determined from reduced optical spectra, using $\epsilon=28.5 \text{ mM}^{-1}\cdot\text{cm}^{-1}$ at 562nm *minus* 575nm. Activity was initiated by the addition of decylubiquinol (1-20 μ M). Cytochrome *c* reduction was recorded at 550nm *versus* 540nm over a 1-min time-course in a Beckmann DU 640 spectrophotometer. Initial rates were measured. V_m and K_m values derived from Eadie-Hofstee (v vs $v/[S]$) plots [3]. IC_{50} values were determined by inhibitor titration. The measurements were repeated at least twice and averaged.

Spectroscopic analysis of cytochromes in whole cells: Cytochrome absorption spectra of whole cells were recorded at liquid nitrogen temperature after reduction by dithionite using a Cary 400 spectrophotometer (Varian, San Fernando, CA). The cytochrome concentration was estimated from the reduced spectra as described in [9].

Western blot analysis: The concentration of mitochondrial proteins was determined using the Protein Quantification Kit-Rapid (Fluka). Mitochondrial proteins were analyzed on denaturing 12% SDS-polyacrylamide gels. SDS-PAGE was electrotransferred and immunodetection was carried out using the chemiluminescent method from Pierce. Polyclonal antibodies against Cyt *c*₁, Cyt *b* and Nam1 were raised in the laboratory and were used at 1/30000 for Cyt *c*₁ and 1/5000 for the two others. The polyclonal Anti-Rip1 (1/3000) is from G. Biagini (Liverpool, UK).

Ligand docking and molecular modelling: Atovaquone was docked into the Q_o site of yeast cytochrome *b* (3CX5.PDB) as described in [7]. RCQ06 was docked into a 9 \AA radius sphere centred on the δ -oxygen atoms of cytochrome *b* residue E272 in the Q_o site of 3CX5.PDB using EADock DSS via SWISSDOCK.

RESULTS AND DISCUSSION

1. *Plasmodium*-like and human-like variations in yeast Q_o site: effect on the *bc*₁ complex activity

Comparison of the cytochrome *b* sequences (Fig.1A) shows that the Q_o domain is well conserved between organisms. There are however variations between the yeast, *P.falciparum* and human cytochrome *b*. We constructed yeast strains harbouring *Plasmodium*-like variations and human-like variations. The effect of the changes on *bc*₁ complex assembly and activity was first monitored (Table 1).

mutations (PF4) (Table 1): severe decrease in cytochrome *c* reductase activity, slight decrease in cytochrome *b* level and no or slight (< 30%) decrease in ISP level. As expected, PF3 and PF4 were respiratory growth deficient. It is likely that the loss of four amino-acid residues in helix cd2 would induce a distortion of the yeast Q_o site, affecting the positioning of the quinone and resulting in an impairment of the electron transfer activity. This suggestion is consistent with the observed decrease in k_{\min} (the second-order 'affinity constant' between substrate and enzyme) in the mutants harbouring the $\Delta 158-161$ deletion, with relatively unchanged K_m values. The combined amino-acid substitutions in the region 275 – 299 (PF8) had no effect on the cytochrome *c* reductase activity. Introduction of the combined changes in the region 133-141 caused a two-fold decrease in the *bc*₁ complex activity (PF1). Interestingly, the activity was restored to wild type level by the introduction of L275F (PF2). These three mutants showed wild type respiratory growth, cytochrome *b* and ISP level.

Five yeast mutants with human-like variants at positions 275, 278 and 295 were analysed. None of the changes, alone or combined, caused major activity defect (Table 1). F278A had a slightly deleterious effect (61% activity); the activity was restored to 80-90% when combined with L275F and to both L275F and M295L.

2. Sensitivity towards atovaquone

The sensitivity of the cytochrome *c* reductase activity towards atovaquone was then monitored (Table 2). As previously reported, *P. falciparum* and yeast *bc*₁ complexes were highly sensitive to atovaquone while the bovine enzyme was less reactive. The introduction of the mammalian variant L275F in the yeast enzyme rendered the yeast *bc*₁ complex resistant to atovaquone (ratio IC₅₀ L275F/ IC₅₀ WT of 40). However when L275F mutation was combined to other *P. falciparum* variations, the impact of L275F was weakened.

PF7 that combined all the Q_o site variants was highly sensitive to atovaquone. The substitution of residues CCVY₁₃₃₋₁₃₆ VLPW / H141Y, written VLPWY in Table 1 (PF1), slightly increased atovaquone sensitivity. Introduction of L275F in PF1 (PF2) resulted in a 5-fold decrease in its sensitivity. However PF2 was 16-fold more sensitive than L275F (L275F mutation in the unmodified yeast Q_o site). The deletion $\Delta 158-161$ alone (PF3) caused a 3-fold decrease in atovaquone sensitivity (IC₅₀ value of 12). When that

mutation was combined with the PF2 change to obtain PF4 (VLPWY/ Δ 158-161/L275F), a wild type sensitivity was restored. Finally, when combined with mutations of residues 283 – 299 (PF8), L275F conferred a moderate resistance to atovaquone that was 10-fold weaker than the resistance caused by L275F in the unmodified yeast Q_o site.

From these data, it appears that the atovaquone sensitivity of *P.falciparum* bc₁ complex could be explained by a combination of variations (variations from the yeast Q_o site) that cancel the resistance effect of F275. We could hypothesise that the *Plasmodium*-like Q_o site has a larger volume that could accommodate atovaquone despite a phenylalanine in position 275.

The three human-like mutations conferred resistance towards atovaquone. The IC₅₀ increased 35-, 9- and 2.5-fold in L275F, F278A and M295L, respectively. The combination of these mutations caused a further increase in the resistance. When combined with amino-acid changes at positions 133 to 141 (CCVY₁₃₃₋₁₃₆VLPW/H₁₄₁F/L₂₇₅F/F₂₇₈A/M₂₉₅L), the resistance towards atovaquone was decreased, as observed with *Plasmodium*-like mutants. However, the modified human-like bc₁ complex remained 10-fold more resistant than the WT enzyme, with an IC₅₀ value of 40, not far from the IC₅₀ of 75 obtained with the bovine enzyme. It could be suggested that the combination of F275, A278 and L295 in human bc₁ complex are responsible for the differential sensitivity towards atovaquone.

For comparison, the azoxystrobin sensitivity/resistance of the two series of yeast mutants was monitored (Table 2). While atovaquone is likely to bind at a position distal to haem b_l, azoxystrobin has been shown to bind at a position proximal to the haem (ref structure). Mutations L275F, F278A and M295L, alone and combined conferred resistance to azoxystrobin. The triple mutant L275F/F278A/M295L had a marked resistance (18-fold). Additional human-like changes in the 133-141 region (slightly) decreased the resistance conferred by the triple change. The modified enzyme still remained less susceptible to the drug. The 10-fold resistance of the mammalian enzyme to azoxystrobin could thus be explained by the combination of F275, A278 and L295 in the binding site.

PF8 that combined mutations in the region 275-299 showed an increased resistance (13-fold). However the resistance was lost when the mutations in the region

275-299 were combined with changes in region 133-141 and the short deletion 158-161 (PF7). The other *Plasmodium*-like variants increased the sensitivity toward azoxystrobin (PF3, PF1) and masked the slight resistance conferred by L275F (PF4, PF2). It is likely that structural changes induced by VLPW/H141Y, and amplified by the 4-residue deletion, stabilised azoxystrobin in the Q_o pocket.

3. Sensitivity towards RCQ06 and analysis of the molecular model for RCQ06 docking

As shown in Table 2, RCQ06 is a potent inhibitor of the plasmodial *bc*₁ complex. The bovine enzyme is inhibited at higher concentration with an IC₅₀ of 40 (molar ratio). The differential sensitivities towards RCQ06 and atovaquone between the *Plasmodium* and mammalian enzymes are similar. The yeast enzyme was highly resistance to the RCQ06 (IC₅₀ >500). In order to determine the molecular basis of that resistance, we monitored the effect of the mutations in the Q_o site on the sensitivity towards RCQ06. Strikingly mutant L275F was over 50-fold more sensitive than WT. Thus RCQ06 binding is likely to be stabilised by an aromatic residue at position 275, whereas the binding of atovaquone was hindered by the bulkier residue. In the absence of L275F, none of the other changes resulted in an increased sensitivity (IC₅₀ >500), with the exception of M295L that had a weaker effect (IC₅₀ of 110). All the mutants carrying L275F in combination with other modifications were sensitive towards RCQ06 (with IC₅₀ ranging from 5 to 50).

By comparing the *Plasmodium*-like variants, it appears that modifications of the residues in the region 133-141 had no impact on the stabilisation effect of L275F (PF2). The introduction of the deletion Δ158-161 weakened the effect of L275F (PF4). Similarly mutations in the 283-299 region (PF8) and the combined modifications of PF7 slightly decreased the effect of L275F.

The human-like mutants gave similar results. The double and triple mutants that combined L275F with M295L and/or F278A were as sensitive as L275F alone. The additional modification in the region 133-141 has little effect on the sensitivity.

A molecular model of RCQ06 docked into the Q_o site of the yeast *bc*₁ complex is presented in Fig.2. The model suggests that RCQ06 will bind relatively weakly to the yeast Q_o site (compared to i.e stigmatellin or myxothiazol) due to lack of significant H-

bond associations with the ISP or cytochrome *b*. A very weak hydrogen bond (3.2 Å) may form between the slightly polar ester ether oxygen atom of RCQ06 and the imidazole sidechain of ISP residue H181 (which would require that the [2Fe2S] cluster of the ISP is reduced prior to binding). A more significant hydrogen bond may exist between the sidechain of cytochrome *b* residue E272 and the heterocyclic carbonyl of RCQ06. Our model predicts a separation of 4.1 Å between these groups, and so the hypothesised hydrogen bond would require the presence of a bridging water molecule, as has been observed in crystal structures for other Q_o site inhibitors. A stabilising aliphatic/aromatic interaction (3.2Å, is predicted to occur between the sidechain of L275 and the quinolone moiety of RCQ06. The data indicate that the determinant of the sensitivity towards RCQ06 is a phenylalanine in position 275, which is naturally present in plasmodial and mammalian cytochrome *b*. Inspection of the model presented in Fig.2 suggests that a favourable aromatic/aromatic interaction may be formed between F275 and the RCQ06 quinolone group, with a larger van der Waals contact area than that observed for the proposed L275/RCQ06 interaction.

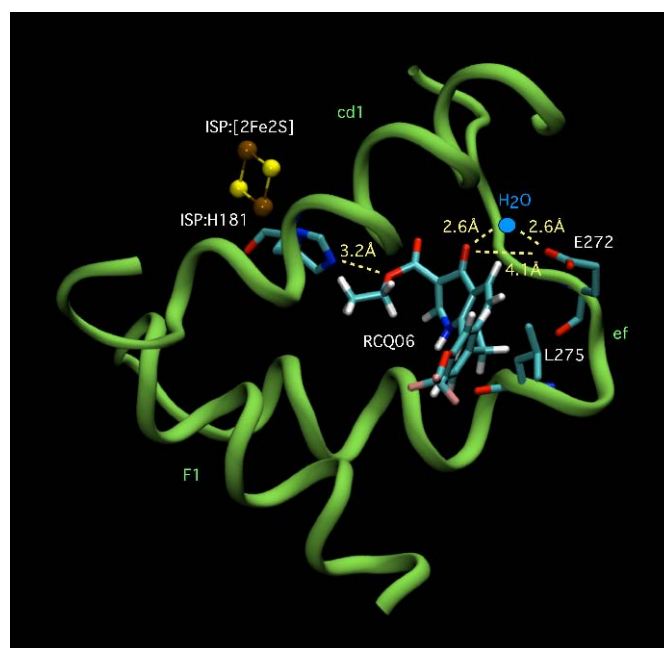


Figure 2. Model of docking of RCQ06 into the *bc*₁ complex Q_o site

The molecular basis of the differential sensitivity between the plasmodial and the mammalian enzyme is still to be explained. More remodelling of the yeast Q_o site will be required to obtain models with the same profile of inhibitor sensitivity than the human and *P. falciparum* enzyme. The yeast mutants already available and to be constructed

will be useful tools for the discovery and the analysis of new drugs with potential anti-malaria activity and for the study of the development of resistance mutations.

REFERENCES

1. G.Biagini, N.Fisher, N.Berry, P.Stocks, B.Meunier, D.Williams, R.Bonar-Law, P.Bray, A.Owen, P.O'Neill, and S.Ward, Acridinediones: Selective and potent inhibitors of the malaria parasite mitochondrial bc₁ complex, *Mol. Pharmacol.* 73 (2008) 1347.
2. J.Conde and G.R.Fink, A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective for nuclear fusion, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 73 (1976) 3651.
3. A.Cornish-Bowden, *Fundamentals of Enzyme Kinetics*, Portland Press, London, 1995.
4. R.Cowley, S.Leung, N.Fisher, M.Al-Helal, N.G.Berry, A.S.Lawrenson, R.Sharma, A.E.Shone, S.A.Ward, G.Biagini, and P.M.O'Neill, The development of quinolone esters as novel antimalarial agents targeting the *Plasmodium falciparum* bc₁ protein complex., *Med. Chem. Comm.* 3 (2012) 39.
5. A.R.Crofts, B.Barquera, R.B.Gennis, R.Kuras, M.Guergova-Kuras, and E.A.Berry, Mechanism of Ubiquinol Oxidation by the bc₁ Complex: Different Domains of the Quinol Binding Pocket and Their Role in the Mechanism and Binding of Inhibitors, *Biochemistry* 38 (1999) 15807.
6. L.Esser, B.Quinn, Y.-F.Li, M.Zhang, M.Elberry, L.Yu, C.-A.Yu, and D.Xia, Crystallographic studies of quinol oxidation site inhibitors: A modified classification of inhibitors for cytochrome bc₁ complex, *J. Mol. Biol.* 341 (2004) 281.
7. N.Fisher, R.Abd Majid, T.Antoine, M.Al-Helal, A.J.Warman, D.J.Johnson, A.S.Lawrenson, H.Ranson, P.M.O'Neill, S.A.Ward, and G.A.Biagini, Cytochrome *b* mutation Y268S conferring atovaquone resistance phenotype in malaria parasite results in reduced parasitic bc₁ catalytic turnover and protein expression., *J. Biol. Chem.* 287 (2012) 9731.
8. P.Hill, J.Kessler, N.Fisher, S.Meshnick, B.Trumpower, and B.Meunier, Recapitulation in *Saccharomyces cerevisiae* of cytochrome *b* mutations conferring resistance to atovaquone in *Pneumocystis jirovecii* 118, *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 47 (2003) 2725.
9. P.Hill, J.Kessler, S.R.Meshnick, B.L.Trumpower, and B.Meunier, Recapitulation in *Saccharomyces cerevisiae* of cytochrome *b* mutations conferring resistance to atovaquone in *Pneumocystis jirovecii*, *Antimicrob. Agents Chemother.* (2003).

10. J.J.Kessl, P.Hill, B.B.Lange, S.R.Meshnick, B.Meunier, and B.L.Trumpower, Molecular basis for atovaquone resistance in *Pneumocystis carinii* modeled in the cytochrome *bc*₁ complex of *Saccharomyces cerevisiae*, J. Biol. Chem. 279 (2004) 2817.
11. J.J.Kessl, B.B.Lange, T.Merbitz-Zahradnik, K.Zwicker, P.Hill, B.Meunier, H.Palsdottir, C.Hunte, S.Meshnick, and B.L.Trumpower, Molecular basis for atovaquone binding to cytochrome *bc*₁ complex, J. Biol. Chem. 278 (2003) 31312.
12. C.Lemaire and G.Dujardin, Preparation of respiratory chain complexes from *Saccharomyces cerevisiae* wild-type and mutant mitochondria : activity measurement and subunit composition analysis., Methods Mol Biol 432 (2008) 65.
13. M.P.Yaffe, Analysis of mitochondrial function and assembly., Methods Enzymol. 194 (1991) 627.

Table 1. *Plasmodium*- and human-like variations in yeast Qo site: activity and level of *bc*₁ complex.

strain		TN (%) (a)	K _m (DQH ₂ μM)	k _{min} (b)
	<i>Plasmodium</i>-like variants			
WT1	WT	100	2.7	59
PF7	VLPWY,Δ158-161,L275F, R283K,M295V,F296L,I299L	8	2.8	5
PF3	Δ158-161	14	2.9	8
PF4	VLPWY,Δ158-161,L275F	12	1.6	11
PF1	VLPWY	52	4.5	22
PF2	VLPWY,L275F	105	3.7	46
PF8	L275F,R283K,M295V,F296L,I299L	107	4.3	38
	human-like variants			
WT2	WT	100	3.4	29
	L275F	111	3.3	32
	F278A	61	3.1	20
	M295L	123	3.2	37
	L275F,F278A	81	3.3	23
	L275F,F278A,M295L	47	3.2	13
	VLPWF,L275F,F278A,M295L	89	4.2	23

The multiple substitution CCVY₁₃₃₋₁₃₆VLPW, H141Y/F is written as VLPWY/F

(a) TN : turnover number, cytochrome *c* reduced per *bc*₁ complex per second using 20 μM decylubiquinol (Materials and Methods). The measurements have been repeated at least twice. The errors did not exceed 10% of the presented values (20%, for PF3, PF4 and PF8, with low activity). The values are presented as % of the WT activity. TN were 147 and 88 s⁻¹ for WT1 and WT2, respectively. The two series of strains-*Plasmodium*-like and human-like- had the same mitochondrial genome (with the exception of the variations introduced in this study) but differed by the nuclear genetic background: the *Plasmodium*-like mutants were diploids while the human-like mutants were haploids. The cytochrome *c* reductase activity of samples prepared from yeast strains with different background varied significantly. The resistance/sensitivity to the inhibitors were unaffected by the genetic background.

(b) V_{max} / K_m

Table 2. *Plasmodium*- and human-like variations in yeast Q_o site: sensitivity to atovaquone, RCQ06 and azoxystrobin

enzyme source/ mutations		IC ₅₀ inhibitor/[bc ₁] (a)		
		atovaquone	azoxystrobin	RCQ06
<i>Plasmodium</i>		3 nM (b)	nd	1.3 nM (c)
Bovine (d)		75	180	40
yeast				
strain	<u>yeast <i>Plasmodium</i>-like variants</u>			
	WT	4	17	>500
PF7	VLPWY,Δ158-161, L275F ,R283K/ M295V,F296L,I299L	1	10	30
PF3	Δ158-161	12	6	>500
PF4	VLPWY,Δ158-161, L275F	4	8	50
PF1	VLPWY	2	5	>500
PF2	VLPWY, L275F	10	16	10
PF8	L275F ,R283K,M295V,F296L,I299L	16	220	40
<u>yeast human-like variants</u>				
	WT	4	17	>500
	L275F	150 (x35)	30	10
	F278A	35 (x9)	120	>500
	M295L	10 (x2.5)	44	90
	L275F ,F278A	200 (x50)	130	6
	L275F ,F278A,M295L	170 (x40)	160	10
	VLPWF, L275F ,F278A,M295L	60 (x15)	140	10

The multiple substitution CCVY₁₃₃₋₁₃₆VLPW is written as VLPW

a) Values are presented as ratio of IC₅₀ on the concentration of monomeric bc₁ complex (estimated using cytochrome optical signal as in Materials and Methods). For example, 4 molecules of atovaquone were added per yeast WT monomeric bc₁ complex to inhibit the quinol cytochrome c reductase activity by 50%.

b) from [1]. In the same assay, IC₅₀ for bovine and human enzyme were approx 70 nM

c) from [2]

d) bovine mitochondria were kindly given by P. Rich, UCL, London.

Annexe 2: Transfert du génome mitochondrial d'un fond génétique à un autre par cytoduction

Cette méthode est basée sur la propriété du mutant *kar1-1* à retarder la fusion nucléaire lors du croisement d'une souche Mat a avec une souche Mat α . En conséquent, après bourgeonnement des zygotes, une fraction des cellules est haploïde avec le noyau d'un parent et le cytoplasme de l'autre. La combinaison de la mutation *kar1-1* avec la mutation *rho*⁰ offre, de ce fait, une méthode simple de transfert du génome mitochondrial dans un nouveau fond génétique.

Exemple 1: Transfert du génome mitochondriale WT de la souche CK dans la souche CW

La souche CK[WT] (Mat a, *leu1*, *kar1-1*) est croisée avec la souche CW[*rho*⁰] (Mat α , *ade2-1*, *his3*, *leu2-3*, *112 trp1-1*, *ura3-1*) sur milieu non fermentescible (glucose). Après 24h à 28°C, les levures sont isolées par étalements successifs de façon à obtenir des colonies isolées sur un milieu glucose pauvre en adénine. 48h après, on distingue deux populations de colonies: des blanches et des rouges. Les colonies blanches correspondent aux souches CK ou diploïdes tandis que les colonies rouges correspondent aux souches CW. Elles sont rouges car elles accumulent, à cause de la mutation *ade2-1*, un produit de la biosynthèse de l'adénine qui après oxydation devient rouge. Les souches CW peuvent être soit [WT] soit [*rho*⁰]. Pour les différencier, les colonies sont répliquées à l'aide d'un velour sur un milieu respiratoire ; les clones qui poussent sur ce type de milieu sont les [WT].

Exemple 2: Transfert du génome mitochondriale WT de la souche CK dans la souche AD1-9 (Mat α , *ura3*, *his1*, *yor1Δ::hisG*, *snq2Δ::hisG*, *pdr5Δ::hisG*, *pdr10Δ::hisG*, *pdr11Δ::hisG*, *ycf1Δ::hisG*, *pdr3Δ::hisG*, *pdr15Δ::hisG*, *pdr1Δ::hisG*)

Dans ce cas-ci, on ne peut pas distinguer deux types de colonies sur milieu glucose pauvre en adénine. Les colonies sont donc répliquer sur milieu minimum, milieu minimum complémenté avec de la leucine et milieu respiratoire.

Tableau : Croissance des souches sur différents milieux

Milieu	CK[WT]	CK[rho ⁰]	CW[WT]	CW[rho ⁰]	Diploïde
minimum	-	-	-	-	+
minimum+leucine	+	+	-	-	+
respiratoire	+	-	+	-	+

Exemple 3: Cas des mutants respiratoires *mit-*

Dans le cas des mutants respiratoires *mit-*, on ne peut pas distinguer ces mutants des *rho⁰* sur un milieu non fermentescible. Pour les différencier, il est nécessaire de croiser les clones avec une souche testrice c'est-à-dire une souche possédant également une mutation conférant un phénotype respiratoire. La souche issue du croisement des deux mutants *mit-* est capable de croître sur milieu respiratoire.

Annexe 3: Détermination de la nature d'une mutation « supresseur » d'un mutant *mit-*

Afin de déterminer si la mutation « supresseur » est d'origine nucléaire (récessive ou dominante) ou mitochondriale, on doit procéder à plusieurs croisements qui seront ensuite répliqués sur milieu minimum afin de sélectionner les souches diploïdes puis sur milieu respiratoire pour contrôler le phénotype.

Tableau : Détermination de la nature du supresseur

Diploïde provenant de :	Croissance sur milieu respiratoire si le supresseur est :		
	Nucléaire dominant	Nucléaire récessif	Mitochondrial
Sup <i>rho⁰</i> x WT <i>mit-</i>	+	-	-
Sup <i>mit-</i> x WT <i>rho⁰</i>	+	-	+

Les *rho⁰* ont été obtenues après traitement au BET

Annexe 4: Cartographie d'une mutation mitochondriale par croisement avec des souches testrices

Exemple : Sup1 du Chapitre II-A

Dans le but d'identifier le Sup1, nous avons traité la souche portant la mutation au BET. Les souches *rho*⁻ obtenues sont croisées avec la souche G143A avec intron afin d'identifier la souche *rho*⁻ ayant conservée la mutation « suppresseur ». Cette souche est ensuite croisée avec une collection de souches testrices *mit*⁻ (ici, des souches ayant une mutation soit dans les gènes codant pour des sous-unités de la cytochrome oxydase soit dans *CYT8*) afin d'identifier la région où est localisée Sup1. La mutation compensatrice a été localisée dans la région incluant *COX1*, *ATP6*, *ATP8* et *ENS2*.

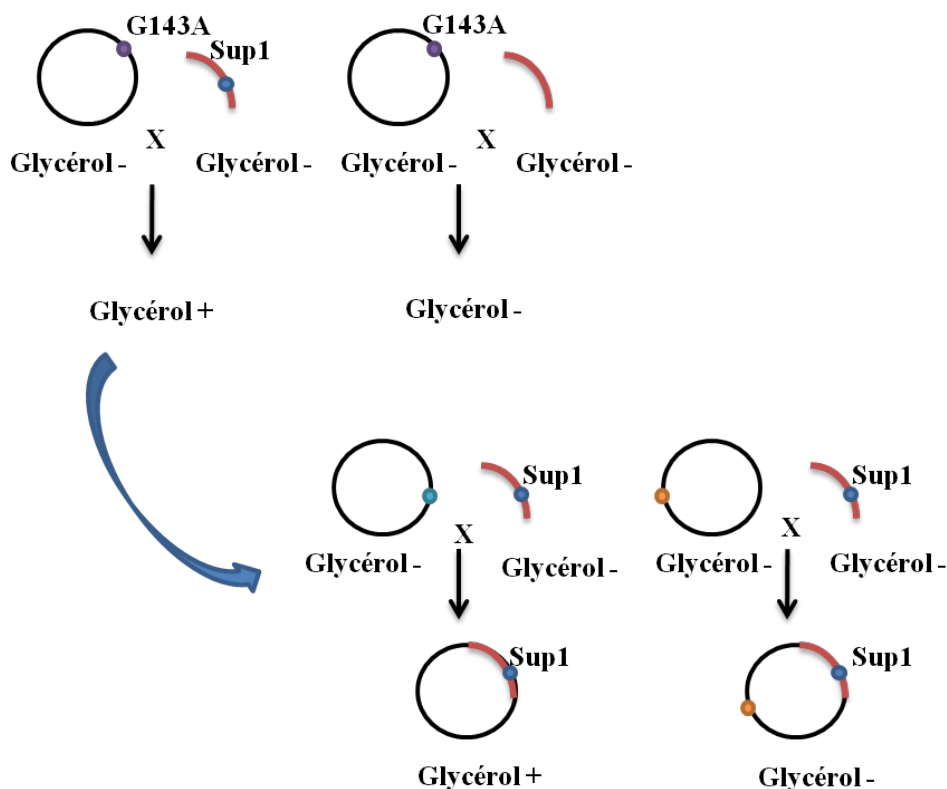


Figure : Localisation de la mutation « suppresseur ».

BIBLIOGRAPHIE

Bibliographie

- Acín-Pérez R, Bayona-Bafaluy MP, Fernández-Silva P, Moreno-Loshuertos R, Pérez-Martos A, Bruno C, Moraes CT & Enríquez JA (2004) Respiratory complex III is required to maintain complex I in mammalian mitochondria. *Molecular cell* 13: 805–815.
- Arnold I, Fölsch H, Neupert W & Stuart RA (1998) Two distinct and independent mitochondrial targeting signals function in the sorting of an inner membrane protein, cytochrome c_1 . *The Journal of biological chemistry* 273: 1469–1476.
- Atkinson A, Smith P, Fox JL, Cui T-Z, Khalimonchuk O & Winge DR (2011) The LYR protein Mzm1 functions in the insertion of the Rieske Fe/S protein in yeast mitochondria. *Molecular and cellular biology* 31: 3988–3996.
- Avila-Adame C & Köller W (2003) Impact of alternative respiration and target-site mutations on responses of germinating conidia of *Magnaporthe grisea* to Q_o-inhibiting fungicides. *Pest management science* 59: 303–309.
- Azevedo D, Nascimento L, Labarre J, Toledano MB & Rodrigues-Pousada C (2007) The *S. cerevisiae* Yap1 and Yap2 transcription factors share a common cadmium-sensing domain. *FEBS letters* 581: 187–195.
- Bartlett D, Clough J, Godwin J, Hall A, Hamer M & Parr-Dobrzanski B (2002) The strobilurin fungicides. *Pest management science* 58: 649–662.
- Barton V, Fisher N, Biagini GA, Ward SA & O'Neill PM (2010) Inhibiting *Plasmodium* cytochrome bc_1 : a complex issue. *Current opinion in chemical biology* 14: 440–446.
- Basselin M, Hunt SM, Abdala-valencia H & Kaneshiro ES (2005) Ubiquinone Synthesis in Mitochondrial and Microsomal Subcellular Fractions of *Pneumocystis spp.* *Eukaryotic cell* 4: 1485–1492.
- Beattie DS, Wang Y & Obungu VH (1999) The role of various domains of the iron-sulfur protein in the assembly and activity of the cytochrome bc_1 complex of yeast mitochondria. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 31: 215–224.
- Beauvoit B, Rigoulet M, Guerin B & Canioni P (1989) Polyphosphates as a source of high energy phosphates in yeast mitochondria: a ³¹P NMR study. *Biochimie* 252: 17–21.
- Becker W, von Jagow G, Anke T & Steglich W (1981) Oudemansin, strobilurin A, strobilurin B and myxothiazol: new inhibitors of the bc_1 segment of the respiratory chain with an E-beta-methoxyacrylate system as common structural element. *FEBS Letters* 132: 329–333.
- Berry EA, Huang LS, Zhang Z & Kim SH (1999) Structure of the avian mitochondrial cytochrome bc_1 complex. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 31: 177–190.

- Berry EA & Huang LS (2011) Conformationally linked interaction in the cytochrome *bc*₁ complex between inhibitors of the Q_o site and the Rieske iron-sulfur protein. *Biochimica et biophysica acta* 1807: 1349–1363.
- Berry EA, Huang LS, Lee DW, Daldal F, Nagai K & Minagawa N (2010) Ascochlorin is a novel specific inhibitor of the mitochondrial cytochrome *bc*₁ complex. *Biochimica et biophysica acta* 1797: 360–370.
- Biagini GA et al. (2012) Generation of quinolone antimalarials targeting the *Plasmodium falciparum* mitochondrial respiratory chain for the treatment and prophylaxis of malaria. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109:8298-303
- Biagini GA et al. (2008) Acridinediones: Selective and Potent Inhibitors of the Malaria Parasite Mitochondrial *bc*₁ Complex. *Molecular Pharmacology* 73: 1347–1355.
- Boekema EJ & Braun HP (2007) Supramolecular structure of the mitochondrial oxidative phosphorylation system. *The Journal of biological chemistry* 282: 1–4.
- Bonnefoy N, Remacle C, Fox TD (2007) Genetic Transformation of *Saccharomyces cerevisiae* and *Chlamydomonas reinhardtii* Mitochondria. *Methods in Cell Biology* 80: 525-48.
- Boysen KE & Matuschewski K (2011) Arrested oocyst maturation in *Plasmodium* parasites lacking type II NADH:ubiquinone dehydrogenase. *The Journal of biological chemistry* 286: 32661–32671.
- Brandt U & Trumpower BL (1994) The protonmotive Q cycle in mitochondria and bacteria. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 29: 165–197.
- Brandt U, Uribe S, Schägger H & Trumpower BL (1994) Isolation and characterization of QCR10, the nuclear gene encoding the 8.5-kDa subunit 10 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *bc*₁ complex. *Journal of Biological Chemistry* 269: 12947–12953.
- Brandt U, Yu L, Yu CA & Trumpower BL (1993) The mitochondrial targeting presequence of the Rieske iron-sulfur protein is processed in a single step after insertion into the cytochrome *bc*₁ complex in mammals and retained as a subunit in the complex. *The Journal of biological chemistry* 268: 8387–8390.
- Le Bras J, Musset L & Clain J (2006) Antimalarial drug resistance. *Médecine et maladies infectieuses* 36: 401–405.
- Brasseur G, Saribas A & Daldal F (1996) A compilation of mutations located in the cytochrome *b* subunit of the bacterial and mitochondrial *bc*₁ complex. *Biochimica et biophysica acta* 1275: 61–69.
- Brasseur G & Brivet-Chevillotte P (1995) Characterization of mutations in the mitochondrial cytochrome *b* gene of *Saccharomyces cerevisiae* affecting the quinone reductase site Q_N. *European journal of biochemistry* 230: 1118–1124.

- Brasseur G, Lemesle-Meunier D, Reinaud F & Meunier B (2004) Q_o site deficiency can be compensated by extragenic mutations in the hinge region of the iron-sulfur protein in the *bc₁* complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 279: 24203–24211.
- Bryan AC, Rodeheffer Matthew S, Wearn CM & Shadel Gerald S (2002) Sls1p is a membrane-bound regulator of transcription-coupled processes involved in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial gene expression. *Genetics* 160: 75–82.
- Bueno JM et al. (2011) Potent antimalarial 4-pyridones with improved physico-chemical properties. *Bioorganic & medicinal chemistry letters* 21: 5214–5218.
- Butow RA & Avadhani NG (2004) Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Molecular cell* 14: 1–15.
- Carrington H, Crowther A, Davey D, Levi A & Rose F (1951) A metabolite of paludrine with high antimalarial activity. *Nature* 168: 1080.
- Chacinska A, Koehler CM, Milenkovic D, Lithgow T & Pfanner N (2009) Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* 138: 628–644.
- Chaudhuri M, Ott RD & Hill GC (2006) Trypanosome alternative oxidase: from molecule to function. *Trends in parasitology* 22: 484–491.
- Chen XJ & Butow RA (2005) The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nature reviews. Genetics* 6: 815–825.
- Clarkson AB, Bienen EJ, Pollakis G & Grady RW (1989) Respiration of bloodstream forms of the parasite *Trypanosoma brucei brucei* is dependent on a plant-like alternative oxidase. *The Journal of biological chemistry* 264: 17770–17776.
- Claros MG, Perea J, Shu Y, Samatey FA, Popot JL & Jacq C (1995) Limitations to *in vivo* import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome *b*. *European journal of biochemistry* 228: 762–771.
- Clough J & Godfrey C (1995) Growing hopes. *Chem Brit* 31: 466–469.
- Coelho PSR, Bryan AC, Kumar A, Shadel GS & Snyder M (2002) A novel mitochondrial protein, Tar1p, is encoded on the antisense strand of the nuclear 25S rDNA. *Genes & development* 16: 2755–2760.
- Colson A (1993) Random mutant generation and its utility in uncovering structural and functional features of cytochrome *b* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Journal of bioenergetics and biomembranes* 25: 211–220.
- Cowley R et al. (2012) The developpement of quinolone esters as novel antimalarial agents tarfeting the *Plasmodium falciparum* *bc₁* protein complex. *MedChemComm* 3: 39–44.

- Crivellone MD, Wu M & Tzagoloff A (1988) Assembly of the mitochondrial membrane system. Analysis of structural mutants of the yeast coenzyme QH₂-cytochrome *c* reductase complex. *The Journal of biological chemistry* 263: 14323–14333. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/gate1.inist.fr/pubmed/2844766>.
- Crofts AR, Hong S, Ugulava N, Barquera B, Gennis R, Guergova-Kuras M & Berry EA (1999) Pathways for proton release during ubihydroquinone oxidation by the *bc*₁ complex. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 10021–10026.
- Crofts AR, Guergova-Kuras M, Kuras R, Ugulava N, Li J & Hong S (2000) Proton-coupled electron transfer at the Q₀ site: what type of mechanism can account for the high activation barrier? *Biochimica et biophysica acta* 1459: 456–466.
- Crofts AR (2004) The cytochrome *bc*₁ complex: function in the context of structure. *Annual review of physiology* 66: 689–733.
- Crowley KS & Payne RM (1998) Ribosome binding to mitochondria is regulated by GTP and the transit peptide. *The Journal of biological chemistry* 273: 17278–17285.
- Cruciat CM, Hell K, Fölsch H, Neupert W & Stuart RA (1999) Bcs1p, an AAA-family member, is a chaperone for the assembly of the cytochrome *bc*₁ complex. *The EMBO journal* 18: 5226–5233.
- Darrouzet E, Moser CC, Dutton PL & Daldal F (2001) Large scale domain movement in cytochrome *bc*₁: a new device for electron transfer in proteins. *Trends in biochemical sciences* 26: 445–451.
- Delves M, Plouffe D, Scheurer C, Meister S, Wittlin S, Winzeler Elizabeth a, Sinden RE & Leroy D (2012) The activities of current antimalarial drugs on the life cycle stages of *Plasmodium*: a comparative study with human and rodent parasites. *PLoS medicine* 9: e1001169.
- Denke E, Merbitz-Zahradnik T, Hatzfeld OM, Snyder CH, Link T a & Trumpower BL (1998) Alteration of the midpoint potential and catalytic activity of the rieske iron-sulfur protein by changes of amino acids forming hydrogen bonds to the iron-sulfur cluster. *The Journal of biological chemistry* 273: 9085–9093.
- Ding MG, di Rago JP & Trumpower BL (2006) Investigating the Q_n site of the cytochrome *bc*₁ complex in *Saccharomyces cerevisiae* with mutants resistant to ilicicolin H, a novel Q_n site inhibitor. *The Journal of biological chemistry* 281: 36036–36043.
- Dong CK et al. (2011) Identification and validation of tetracyclic benzothiazepines as *Plasmodium falciparum* cytochrome *bc*₁ inhibitors. *Chemistry & biology* 18: 1602–1610.
- Dorn A, Vippagunta SR, Matile H, Jaquet C, Vennerstrom JL & Ridley RG (1998) An assessment of drug-haematin binding as a mechanism for inhibition of haematin polymerisation by quinoline antimalarials. *Biochemical pharmacology* 55: 727–736.

- Dorthu M et al. (1992) Biochemical, genetic and molecular characterization of new respiratory-deficient mutants in *Chlamydomonas reinhardtii*. *Plant molecular biology* 18: 759–772.
- Dumoulin R, Sagnol I, Ferlin T, Bozon D, Stepien G & Mousson B (1996) A novel gly290asp mitochondrial cytochrome *b* mutation linked to a complex III deficiency in progressive exercise intolerance. *Molecular and cellular probes* 10: 389–391.
- Van Dyke K, Tremblay G, Lantz C & Szustkiewicz C (1970) The source of purines and pyrimidines in *Plasmodium berghei*. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 19: 202–208.
- Eschemann A, Galkin A, Oettmeier W, Brandt U & Kerscher S (2005) HDQ (1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone), a high affinity inhibitor for mitochondrial alternative NADH dehydrogenase: evidence for a ping-pong mechanism. *The Journal of biological chemistry* 280: 3138–3142.
- Esser L, Quinn B, Li YF, Zhang M, Elberry M, Yu L, Yu CA & Xia Di (2004) Crystallographic studies of quinol oxidation site inhibitors: a modified classification of inhibitors for the cytochrome *bc*₁ complex. *Journal of molecular biology* 341: 281–302.
- Ferone R, Burchall J & Hitchings G (1969) *Plasmodium berghei* dihydrofolate reductase. Isolation, properties, and inhibition by antifolates. *Molecular Pharmacology* 5: 49–59.
- Fisher N et al. (2012) Cytochrome *b* mutation Y268S conferring the atovaquone resistance phenotype in the malaria parasite results in reduced parasite *bc*₁ catalytic turnover and protein expression. *The Journal of biological chemistry* 287: 9731–9741.
- Fisher N, Bourges I, Hill P, Brasseur G & Meunier B (2004) Disruption of the interaction between the Rieske iron-sulfur protein and cytochrome *b* in the yeast *bc*₁ complex owing to a human disease-associated mutation within cytochrome *b*. *European journal of biochemistry* 271: 1292–1298.
- Fisher N, Brown AC, Sexton G, Cook A, Windass J & Meunier B (2004) Modeling the Q_o site of crop pathogens in *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *b*. *European journal of biochemistry* 271: 2264–2271.
- Fisher N, Castleden CK, Bourges I, Brasseur G, Dujardin G & Meunier B (2004) Human disease-related mutations in cytochrome *b* studied in yeast. *The Journal of biological chemistry* 279: 12951–12958.
- Fisher N & Meunier B (2001) Effects of mutations in mitochondrial cytochrome *b* in yeast and man. Deficiency, compensation and disease. *European journal of biochemistry* 268: 1155–1162.
- Fisher N & Meunier B (2008) Molecular basis of resistance to cytochrome *bc*₁ inhibitors. *FEMS yeast research* 8: 183–192.

- Fisher N & Meunier B (2005) Re-examination of inhibitor resistance conferred by Q_o-site mutations in cytochrome *b* using yeast as a model system. *Pest management science* 61: 973–978.
- Fivelman QL, Butcher GA, Adagu IS, Warhurst DC & Pasvol G (2002) *Plasmodium falciparum* isolate from Lagos, Nigeria. *Malaria journal* 1: 1–4.
- FRAC (Fungicide Resistance Action Committee): www.frac.info/frac/index.htm
- Froschauer EM, Schweyen RJ & Wiesenberger G (2009) The yeast mitochondrial carrier proteins Mrs3p/Mrs4p mediate iron transport across the inner mitochondrial membrane. *Biochimica et biophysica acta* 1788: 1044–1050.
- Fry M & Pudney M (1992) Site of action of the antimalarial hydroxynaphthoquinone, 2-[trans-4-(4'-chlorophenyl) cyclohexyl]-3-hydroxy-1,4-naphthoquinone (566C80). *Biochemical pharmacology* 43: 1545–1553.
- Gampel A, Nishikimi M & Tzagoloff A (1989) CBP2 protein promotes in vitro excision of a yeast mitochondrial group I intron. *Molecular and cellular biology* 9: 5424–5433.
- Gao X, Wen X, Esser L, Quinn B, Yu L, Yu CA & Xia Di (2003) Structural basis for the quinone reduction in the bc₁ complex: a comparative analysis of crystal structures of mitochondrial cytochrome bc₁ with bound substrate and inhibitors at the Q_i site. *Biochemistry* 42: 9067–9080.
- Gargouri A (2005) The reverse transcriptase encoded by ai1 intron is active in trans in the retro-deletion of yeast mitochondrial introns. *FEMS yeast research* 5: 813–822.
- Ghezzi D et al. (2011) Mutations in TTC19 cause mitochondrial complex III deficiency and neurological impairment in humans and flies. *Nature genetics* 43: 259–263.
- Gisi U, Sierotzki H, Cook A & McCaffery A (2002) Mechanisms influencing the evolution of resistance to Q_o inhibitor fungicides. *Pest management science* 58: 859–867.
- Grasso V, Palermo S, Sierotzki H, Garibaldi A & Gisi U (2006) Cytochrome *b* gene structure and consequences for resistance to Q_o inhibitor fungicides in plant pathogens. *Pest management science* 62: 465–472.
- Greenwood BM, Fidock DA, Kyle DE, Kappe SHI, Alonso PL, Collins FH & Duffy PE (2008) Review series Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *Journal of Clinical Investigation* 118: 1266–1276.
- Gregan J, Kolisek M & Schweyen RJ (2001) Mitochondrial Mg²⁺ homeostasis is critical for group II intron splicing *in vivo*. *Genes & development* 15: 2229–2237.
- Gregson A & Plowe CV (2005) Mechanisms of Resistance of Malaria Parasites to Antifolates. *Pharmacological reviews* 57: 117–145.

- Gruschke S, Kehrein K, Römpler K, Gröne K, Israel L, Imhof A, Herrmann JM & Ott M (2011) Cbp3-Cbp6 interacts with the yeast mitochondrial ribosomal tunnel exit and promotes cytochrome *b* synthesis and assembly. *The Journal of cell biology* 193: 1101–1114.
- Halls C, Mohr S, Del Campo M, Yang Q, Jankowsky E & AM L (2007) Involvement of DEAD-box Proteins in Group I and Group II Intron Splicing. Biochemical Characterization of Mss116p, ATP Hydrolysis-dependent and -independent Mechanisms, and General RNA Chaperone Activity. *Journal of molecular biology* 365: 835–855.
- Hansen M, Nours JLE, Johansson EVA, Antal T, Ullrich A & Löffler M (2004) Inhibitor binding in a class 2 dihydroorotate dehydrogenase causes variations in the membrane-associated N-terminal domain. *Protein Science* 13: 1031–1042.
- Herbert CJ, Labouesse M, Dujardin G & Slonimski PP (1988) The NAM2 proteins from *S.cerevisiae* and *S.douglasii* are mitochondrial leucyl-tRNA synthetases, and are involved in mRNA splicing. *The EMBO journal* 7: 473–483.
- Hill P, Kessl J, Fisher N, Meshnick S, Trumpower BL & Meunier B (2003) Recapitulation in *Saccharomyces cerevisiae* of Cytochrome *b* Mutations Conferring Resistance to Atovaquone in *Pneumocystis jiroveci*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 47: 2725–2731.
- Huang LS, Cobessi D, Tung EY & Berry EA (2005) Binding of the respiratory chain inhibitor antimycin to the mitochondrial *bc*₁ complex: a new crystal structure reveals an altered intramolecular hydrogen-bonding pattern. *Journal of molecular biology* 351: 573–597.
- Hughes LM, Lanteri CA, Neil MTO, Johnson JD, Gribble GW & Trumpower BL (2011) Molecular & Biochemical Parasitology Design of anti-parasitic and anti-fungal hydroxy-naphthoquinones that are less susceptible to drug resistance. *Molecular & Biochemical Parasitology* 177: 12–19.
- Hunte C, Koepke J, Lange C, Rossmannith T & Michel H (2000) Structure at 2.3 Å resolution of the cytochrome *bc*₁ complex from the yeast *Saccharomyces cerevisiae* co-crystallized with an antibody Fv fragment. *Structure* 8: 669–684.
- Hunte C, Palsdottir H & Trumpower BL (2003) Protonmotive pathways and mechanisms in the cytochrome *bc*₁ complex. *FEBS Letters* 545: 39–46.
- Hunte C, Solmaz S, Palsdottir H & Wenz T (2008) A Structural Perspective on Mechanism and Function of the Cytochrome *bc*₁ Complex. *Results & Problems in Cell Differentiation* 45: 253–278.
- Inoue K, Tsurumi T, Ishii H, Park P & Ikeda K (2011) Cytological evaluation of the effect of azoxystrobin and alternative oxidase inhibitors in *Botrytis cinerea*. *FEMS microbiology letters* 326: 83–90.

- Ittarat I, Asawamahasakda W & Meshnick SR (1994) The effects of antimalarials on the *Plasmodium falciparum* dihydroorotate dehydrogenase. *Experimental parasitology* 79: 50–56.
- Iwata S, Lee JW, Okada K, Lee JK, Iwata M, Rasmussen B, Link TA, Ramaswamy S & Jap B (1998) Complete Structure of the 11-Subunit Bovine Mitochondrial Cytochrome *bc*₁ Complex. *Science* 281: 64–71.
- Juszczuk IM & Rychter AM (2003) Alternative oxidase in higher plants. *Acta biochimica Polonica* 50: 1257–1271.
- Kazanjian P et al. (2001) *Pneumocystis carinii* cytochrome *b* mutations are associated with atovaquone exposure in patients with AIDS. *The Journal of infectious diseases* 183: 819–822.
- Kellems RE, Allison VF & Butow RA (1974) Cytoplasmic type 80 S ribosomes associated with yeast mitochondria. II. Evidence for the association of cytoplasmic ribosomes with the outer mitochondrial membrane *in situ*. *Journal of Biological Chemistry* 249: 3297–3303.
- Kellems RE, Allison VF & Butow RA (1975) Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. IV. Attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria. *The Journal of cell biology* 65: 1–14.
- Kellems RE & Butow RA (1974) Cytoplasmic type 80 S ribosomes associated with yeast mitochondria. III. Changes in the amount of bound ribosomes in response to changes in metabolic state. *Journal of Biological Chemistry* 249: 3304–3306.
- Kerscher S, Dröse S, Zickermann V & Brandt U (2008) The Three Families of Respiratory NADH Dehydrogenases. *Results & Problems in Cell Differentiation* 45: 185–222.
- Kessl JJ et al. (2003) Molecular basis for atovaquone binding to the cytochrome *bc*₁ complex. *The Journal of biological chemistry* 278: 31312–31318.
- Kessl JJ, Ha KH, Merritt AK, Lange BB, Hill P, Meunier B, Meshnick SR & Trumpower BL (2005) Cytochrome *b* mutations that modify the ubiquinol-binding pocket of the cytochrome *bc*₁ complex and confer anti-malarial drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 280: 17142–17148.
- Kessl JJ, Hill P, Lange BB, Meshnick SR, Meunier B & Trumpower BL (2004) Molecular basis for atovaquone resistance in *Pneumocystis jirovecii* modeled in the cytochrome *bc*₁ complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 279: 2817–2824.
- Klingen AR, Palsdottir H, Hunte C & Ullmann GM (2007) Redox-linked protonation state changes in cytochrome *bc*₁ identified by Poisson-Boltzmann electrostatics calculations. *Biochimica et biophysica acta* 1767: 204–221.

- Kolisek M, Zsurka G, Samaj J, Weghuber J, Schweyen RJ & Schweigel M (2003) Mrs2p is an essential component of the major electrophoretic Mg²⁺ influx system in mitochondria. *The EMBO journal* 22: 1235–1244.
- Korsinczky M, Chen N, Kotecka B, Saul A, Rieckmann K & Cheng Q (2000) Mutations in *Plasmodium falciparum* cytochrome *b* that are associated with atovaquone resistance are located at a putative drug-binding site. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 44: 2100–2108.
- Kousik C & Keinath AP (2008) First Report of Insensitivity to Cyazofamid Among Isolates of *Phytophthora capsici* from the Southeastern United States. *Plant disease* 92: 979.
- Kraiczky P, Haase U, Gencic S, Flindt S, Anke T, Brandt U & Von Jagow G (1996) The molecular basis for the natural resistance of the cytochrome *bc*₁ complex from strobilurin-producing basidiomycetes to center Q_p inhibitors. *European journal of biochemistry* 235: 54–63.
- Kramer D, Roberts A, Muller F, Cape J & Bowman M (2004) Q-cycle bypass reactions at the Q_o site of the cytochrome *bc*₁ (and related) complexes. *Methods Enzymol* 382: 21–45.
- Kreike J, Schulze M, Pillar T, Körte A & Rödel G (1986) Cloning of a nuclear gene *MRS1* involved in the excision of a single group I intron (bI3) from the mitochondrial *COB* transcript in *S. cerevisiae*. *Current genetics* 11: 185–191.
- Kronekova Z & Rödel G (2005) Organization of assembly factors Cbp3p and Cbp4p and their effect on *bc*₁ complex assembly in *Saccharomyces cerevisiae*. *Current genetics* 47: 203–212.
- Lambowitz A & Belfort M (1993) Introns as mobile genetic elements. *Annual review of biochemistry* 62: 587–22.
- Lange C, Nett JH, Trumpower BL & Hunte C (2001) Specific roles of protein-phospholipid interactions in the yeast cytochrome *bc*₁ complex structure. *The EMBO journal* 20: 6591–6600.
- Lange C & Hunte C (2002) Crystal structure of the yeast cytochrome *bc*₁ complex with its bound substrate cytochrome *c*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99: 2800–2805.
- Lee DW, Selamoglu N, Lanciano P, Cooley JW, Forquer I, Kramer DM & Daldal F (2011) Loss of a conserved tyrosine residue of cytochrome *b* induces reactive oxygen species production by cytochrome *bc*₁. *The Journal of biological chemistry* 286: 18139–18148.
- Lee SY, Hunte C, Malaney S & Robinson BH (2001) The N-terminus of the Qcr7 protein of the cytochrome *bc*₁ complex in *S. cerevisiae* may be involved in facilitating stability

- of the subcomplex with the Qcr8 protein and cytochrome *b*. *Archives of biochemistry and biophysics* 393: 215–221.
- Lee SY, Raha S, Nagar B & Robinson BH (2001) The functional role of conserved acidic residues of the Qcr7 protein of the cytochrome *bc*₁ complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *Archives of biochemistry and biophysics* 393: 207–214.
- Legros F, Chatzoglou E, Frachon P, Ogier De Baulny H, Laforêt P, Jardel C, Godinot C & Lombès A (2001) Functional characterization of novel mutations in the human cytochrome *b* gene. *European journal of human genetics* 9: 510–518.
- Lemaire C & Dujardin G (2008) Preparation of Respiratory Chain Complexes from *Saccharomyces cerevisiae* Wild-Type. *Methods Mol Biol* 432: 65–81.
- Leroux P, Gredt M, Leroch M & Walker A (2010) Exploring mechanisms of resistance to respiratory inhibitors in field strains of *Botrytis cinerea*, the causal agent of gray mold. *Applied and environmental microbiology* 76: 6615–6630.
- Li Y, Bjorklund S, Jiang YW, Kim YJ, Lane WS, Stillman DJ & Kornberg RD (1995) Yeast global transcriptional regulators Sin4 and Rgr1 are components of mediator complex/RNA polymerase II holoenzyme. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92: 10864–10868.
- Lin SS, Gross U & Bohne W (2009) Type II NADH dehydrogenase inhibitor 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone leads to collapse of mitochondrial inner-membrane potential and ATP depletion in *Toxoplasma gondii*. *Eukaryotic cell* 8: 877–887.
- Lin SS, Kerscher S, Saleh A, Brandt U, Gross U & Bohne W (2008) The *Toxoplasma gondii* type-II NADH dehydrogenase *TgNDH2-I* is inhibited by 1-hydroxy-2-alkyl-4(1H)quinolones. *Biochimica et biophysica acta* 1777: 1455–1462.
- Luo W, Fang H & Green N (2006) Substrate specificity of inner membrane peptidase in yeast mitochondria. *Molecular genetics and genomics* 275: 431–436.
- Malaney S, Trumpower BL, Deber CM & Robinson BH (1997) The N terminus of the Qcr7 protein of the cytochrome *bc*₁ complex is not essential for import into mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae* but is essential for assembly of the complex. *The Journal of biological chemistry* 272: 17495–17501.
- Malka F, Lombes A & Rojo M (2004) Organisation et dynamique du compartiment mitochondrial. *Morphologie* 88: 13–18.
- Mathieu L, Marsy S, Saint-Georges Y, Jacq C & Dujardin G (2011) A transcriptome screen in yeast identifies a novel assembly factor for the mitochondrial complex III. *Mitochondrion* 11: 391–396.
- Mazat JP & Ransac S (2010) Le complexe *bc*₁ de la chaîne respiratoire mitochondriale fonctionne selon l' hypothèse du cycle Q de Mitchell: La preuve par une approche stochastique? *Medecine/Sciences* 26: 1079–1086.

- McFadden DC, Tomavo S, Berry EA & Boothroyd JC (2000) Characterization of cytochrome *b* from *Toxoplasma gondii* and Q_o domain mutations as a mechanism of atovaquone-resistance. *Molecular & Biochemical Parasitology* 108: 1–12.
- Miguez M, Reeve C, Wood P & Hollomon D (2004) Alternative oxidase reduces the sensitivity of *Mycosphaerella graminicola* to Q_oI fungicides. *Pest management science* 60: 3–7.
- Mitani S, Araki S, Takii Y, Ohshima T, Matsuo N & Miyoshi H (2001) The Biochemical Mode of Action of the Novel Selective Fungicide Cyazofamid: Specific Inhibition of Mitochondrial Complex III in *Phythium spinosum*. *Pesticide Biochemistry and Physiology* 71: 107–115.
- Mitchell P (1975) The protonmotive Q cycle: a general formulation. *FEBS Letters* 59: 137–139.
- Muller F, Crofts AR & Kramer DM (2002) Multiple Q-Cycle Bypass Reactions at the Q_o Site of the Cytochrome *bc*₁ Complex. *Biochemistry* 41: 7866–7874.
- Murphy AD & Lang-unnasch N (1999) Alternative Oxidase Inhibitors Potentiate the Activity of Atovaquone against *Plasmodium falciparum* Alternative Oxidase Inhibitors Potentiate the Activity of Atovaquone against *Plasmodium falciparum*. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43: 651–654.
- Musset L, Bouchaud O, Matheron S, Massias L & Le Bras J (2006) Clinical atovaquone-proguanil resistance of *Plasmodium falciparum* associated with cytochrome *b* codon 268 mutations. *Microbes and Infection* 8: 2599–2604.
- Myers LC & Kornberg RD (2000) Mediator of transcriptional regulation. *Annual review of biochemistry* 69: 729–749.
- Nam T-gyu et al. (2011) A Chemical Genomic Analysis of Decoquinatone, a *Plasmodium falciparum* Cytochrome *b* Inhibitor. *ACS chemical biology* 6: 1214–1222.
- Nett JH, Hunte C & Trumpower BL (2000) Changes to the length of the flexible linker region of the Rieske protein impair the interaction of ubiquinol with the cytochrome *bc*₁ complex. *European journal of biochemistry* 267: 5777–5782.
- Nett JH & Trumpower BL (1999) Intermediate length Rieske iron-sulfur protein is present and functionally active in the cytochrome *bc*₁ complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 274: 9253–9257.
- Neupert W & Herrmann JM (2007) Translocation of proteins into mitochondria. *Annual review of biochemistry* 76: 723–749.
- Nobrega FG, Nobrega MP & Tzagoloff A (1992) *BCS1*, a novel gene required for the expression of functional Rieske iron-sulfur protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *The EMBO journal* 11: 3821–3829.

- Nunnari J, Fox TD & Walter P (1993) A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. *Science* 262: 1997–2004.
- Ogur M, St John R & Nagai S (1957) Tetrazolium overlay technique for population studies of respiration deficiency in yeast. *Science* 125: 928–929.
- Organisation mondiale de la Santé (2011) World Malaria Report 2011.
- Osyczka A, Moser CC & Dutton PL (2005) Fixing the Q cycle. *Trends in biochemical sciences* 30: 176–182.
- Osyczka A, Zhang H, Mathé C, Rich PR, Moser CC & Dutton PL (2006) Role of the PEWY glutamate in hydroquinone-quinone oxidation-reduction catalysis in the Q_o Site of cytochrome *bc*₁. *Biochemistry* 45: 10492–10503.
- Painter HJ, Morrisey JM, Mather MW & Vaidya AB (2007) Specific role of mitochondrial electron transport in blood-stage *Plasmodium falciparum*. *Nature* 446: 88–91.
- Peel S (2001) The ABC transporter genes of *Plasmodium falciparum* and drug resistance. *Drug resistance updates* 4: 66–74.
- Phillips J, Graham L & Trumpower BL (1993) Subunit 9 of the *Saccharomyces cerevisiae* cytochrome *bc*₁ complex is required for insertion of EPR-detectable iron-sulfur cluster into the Rieske iron-sulfur protein. *Journal of Biological Chemistry* 268: 11727–11736.
- Pierron D et al. (2008) New evidence of a mitochondrial genetic background paradox: impact of the J haplogroup on the A3243G mutation. *BMC Medical Genetics* 9: 41.
- Pradines B, Dormoi J, Briolant S, Bogreau H & Rogier C (2010) La résistance aux antipaludiques. *Revue Francophone des Laboratoires* 2010: 51–62.
- di Rago JP, Perea X & Colson A (1986) DNA sequence analysis of diuron-resistant mutations in the mitochondrial cytochrome *b* gene of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* 208: 208–210.
- di Rago JP & Colson AM (1988) Molecular basis for resistance to antimycin and diuron, Q-cycle inhibitors acting at the Q_i site in the mitochondrial ubiquinol-cytochrome *c* reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 263: 12564–12570.
- di Rago JP, Coppée JY & Colson AM (1989) Molecular basis for resistance to myxothiazol, mucidin (strobilurin A), and stigmatellin. *The Journal of biological chemistry* 264: 14543–14548.
- di Rago JP, Perea J & Colson AM (1990) Isolation and RNA sequence analysis of cytochrome *b* mutants resistant to funiculosin, a center i inhibitor of the mitochondrial ubiquinol-cytochrome *c* reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS letters* 263: 93–98.

- di Rago JP, Sohm F, Boccia C, Dujardin G, Trumpower BL & Slonimski PP (1997) A point mutation in the mitochondrial cytochrome *b* gene obviates the requirement for the nuclear encoded core protein 2 subunit in the cytochrome *bc*₁ complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 272: 4699–4704.
- Rangan P & Woodson SA (2003) Structural Requirement for Mg²⁺ Binding in the Group I Intron Core. *Journal of Molecular Biology* 329: 229–238.
- Rawlings ND & Barrett AJ (1991) Homologues of insulinase, a new superfamily of metalloendopeptidases. *The Biochemical journal* 275: 389–391.
- Rich P, Mischis L, Purton S & Wiskich J (2001) The sites of interaction of triphenyltetrazolium chloride with mitochondrial respiratory chains. *FEMS microbiology letters* 202: 181–187.
- Rodeheffer MS, Boone BE, Bryan a C & Shadel GS (2001) Nam1p, a protein involved in RNA processing and translation, is coupled to transcription through an interaction with yeast mitochondrial RNA polymerase. *The Journal of biological chemistry* 276: 8616–8622.
- Rose G, Passarino G, Carrieri G, Altomare K, Franceschi C, Greco V, Bertolini S, Bonafe M & Benedictis GD (2001) Paradoxes in longevity: sequence analysis of mtDNA haplogroup J in centenarians. *European Journal of Human Genetics* 9: 701–707.
- Rotsaert FA, Ding MG & Trumpower BL (2008) Differential efficacy of inhibition of mitochondrial and bacterial cytochrome *bc*₁ complexes by center N inhibitors antimycin, ilicicolin H and funiculosin. *Biochimica et biophysica acta* 1777: 211–219.
- Rottenberg H, Covian R & Trumpower BL (2009) Membrane potential greatly enhances superoxide generation by the cytochrome *bc*₁ complex reconstituted into phospholipid vesicles. *The Journal of biological chemistry* 284: 19203–19210.
- Saint-Georges Y, Bonnefoy N, di Rago JP, Chiron S & Dujardin G (2002) A pathogenic cytochrome *b* mutation reveals new interactions between subunits of the mitochondrial *bc*₁ complex. *The Journal of biological chemistry* 277: 49397–49402.
- Saldanha R, Mohr G, Belfort M & Lambowitz A (1993) Group I and group II introns. *FASEB journal* 7: 15–24.
- Saleh A, Friesen J, Baumeister S, Gross U & Bohne W (2007) Growth inhibition of *Toxoplasma gondii* and *Plasmodium falciparum* by nanomolar concentrations of 1-hydroxy-2-dodecyl-4(1H)quinolone, a high-affinity inhibitor of alternative (type II) NADH dehydrogenases. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 51: 1217–1222.
- Scheibel L, Ashton S & Trager W (1979) *Plasmodium falciparum*: microaerophilic requirements in human red blood cells. *Experimental parasitology* 47: 410–418.
- Schmitt ME & Trumpower BL (1991) The petite phenotype resulting from a truncated copy of subunit 6 results from loss of assembly of the cytochrome *bc*₁ complex and

- can be suppressed by overexpression of subunit 9. *The Journal of biological chemistry* 266: 14958–14963.
- Schnauffer A, Sbicego S & Blum B (2000) Antimycin A resistance in a mutant *Leishmania tarentolae* strain is correlated to a point mutation in the mitochondrial apocytochrome *b* gene. *Current genetics* 37: 234–241.
- Schägger H & Pfeiffer K (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *The EMBO journal* 19: 1777–1783.
- Schütz M et al. (2000) Early evolution of cytochrome *bc* complexes. *Journal of molecular biology* 300: 663–675.
- Sherman IW (1979) Biochemistry of *Plasmodium* (malarial parasites). *Microbiological reviews* 43: 453–495.
- Sluse FE & Jarmuszkievicz W (1998) Alternative oxidase in the branched mitochondrial respiratory network: an overview on structure, function, regulation, and role. *Brazilian journal of medical and biological research* 31: 733–747.
- Smith PM, Fox JL & Winge DR (2012) Biogenesis of the cytochrome *bc*₁ complex and role of assembly factors. *Biochimica et biophysica acta* 1817: 276–286.
- Srivastava IK, Rottenberg H & Vaidya A (1997) Atovaquone, a broad spectrum antiparasitic drug, collapses mitochondrial membrane potential in a malarial parasite. *The Journal of biological chemistry* 272: 3961–3966.
- Srivastava IK, Morrissey JM, Darrouzet E, Daldal F & Vaidya AB (1999) Resistance mutations reveal the atovaquone-binding domain of cytochrome *b* in malaria parasites. *Molecular microbiology* 33: 704–711.
- Srivastava IK & Vaidya AB (1999) A Mechanism for the Synergistic Antimalarial Action of Atovaquone and Proguanil. *Antimicrobial agents and chemotherapy* 43: 1334–1339.
- Syafruddin D, Siregar JE & Marzuki S (1999) Mutations in the cytochrome *b* gene of *Plasmodium berghei* conferring resistance to atovaquone. *Molecular and biochemical parasitology* 104: 185–194.
- Séraphin B, Simon M & Faye G (1988) *MSS18*, a yeast nuclear gene involved in the splicing of intron aI5 beta of the mitochondrial *cox1* transcript. *The EMBO journal* 7: 1455–1464.
- Söllner T, Schmidt C & Schmelzer C (1987) Amplification of the yeast nuclear gene *MRS3* confers suppression of a mitochondrial RNA splice defect. *Current genetics* 12: 497–501.

- Tian H, Yu L, Mather MW & Yu CA (1998) Flexibility of the neck region of the rieske iron-sulfur protein is functionally important in the cytochrome *bc*₁ complex. *The Journal of biological chemistry* 273: 27953–27959.
- Trape J (2001) The public health impact of chloroquine resistance in Africa. *The American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 64: 12–17.
- Triglia T, Menting JG, Wilson C & Cowman AF (1997) Mutations in dihydropteroate synthase are responsible for sulfone and sulfonamide resistance in *Plasmodium falciparum*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94: 13944–13949.
- Trouillard M, Meunier B & Rappaport F (2011) Questioning the functional relevance of mitochondrial supercomplexes by time-resolved analysis of the respiratory chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 108: 1027–1034.
- Tzagoloff A, Wu M & Crivellone M (1986) Assembly of the Mitochondrial Membrane System. *The Journal of biological chemistry* 261: 17163–17169.
- Valnot I, Kassis J, Chretien D, de Lonlay P, Parfait P, Munnich A, Kachaner J, Rustin P & Rötig A (1999) A mitochondrial cytochrome *b* mutation but no mutations of nuclearly encoded subunits in ubiquinol cytochrome *c* reductase (complex III) deficiency. *Hum Genet.* 104: 460–466.
- Vanden Bossche H, Dromer F, Improvisi I, Lozano-Chiu M, Rex J & Sanglard D (1998) Antifungal drug resistance in pathogenic fungi. *Medical Mycology* 36: 199–28.
- Vilela C, Ramirez CV, Linz B, Rodrigues-Pousada C & McCarthy JE (1999) Post-termination ribosome interactions with the 5'UTR modulate yeast mRNA stability. *The EMBO journal* 18: 3139–3152.
- Wagener N, Ackermann M, Funes S & Neupert W (2011) A pathway of protein translocation in mitochondria mediated by the AAA-ATPase Bcs1. *Molecular cell* 44: 191–202.
- Walker DJ et al. (1998) Sequence polymorphisms in the *Pneumocystis carinii* cytochrome *b* gene and their association with atovaquone prophylaxis failure. *The Journal of infectious diseases* 178: 1767–1775.
- Wallace DC, Brown MD & Lott MT (1999) Mitochondrial DNA variation in human evolution and disease. *Gene* 238: 211–230.
- Wang Y & Shadel GS (1999) Stability of the mitochondrial genome requires an amino-terminal domain of yeast mitochondrial RNA polymerase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96: 8046–8051.

- Wenz T, Covian R, Hellwig P, Macmillan F, Meunier B, Trumpower BL & Hunte C (2007) Mutational analysis of cytochrome b at the ubiquinol oxidation site of yeast complex III. *The Journal of biological chemistry* 282: 3977–3988.
- Wenz T, Hellwig P, MacMillan F, Meunier B & Hunte C (2006) Probing the role of E272 in quinol oxidation of mitochondrial complex III. *Biochemistry* 45: 9042–9052.
- Wenz T, Hielscher R, Hellwig P, Schägger H, Richers S & Hunte C (2009) Role of phospholipids in respiratory cytochrome *bc*₁ complex catalysis and supercomplex formation. *Biochimica et biophysica acta* 1787: 609–616.
- Wibrand F, Ravn K, Schwartz M, Rosenberg T, Horn N & Vissing J (2001) Multisystem disorder associated with a missense mutation in the mitochondrial cytochrome *b* gene. *Ann Neurol* 50: 540–543.
- Wiesenberger G, Link TA, von Ahsen U, Waldherr M & Schweyen R (1991) *MRS3* and *MRS4*, two suppressors of mtRNA splicing defects in yeast, are new members of the mitochondrial carrier family. *Journal of molecular biology* 217: 23–37.
- Winzeler EA et al. (1999) Functional Characterization of the *S. cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis. *Science* 285: 901–906.
- Wolfger H, Mamnun Y & Kuchler K (2001) Fungal ABC proteins: pleiotropic drug resistance, stress response and cellular detoxification. *Research in Microbiology* 152: 375–389.
- Xia D, Yu CA, Kim H, Xia J, Kachurin A, Zhang L, Yu L & Deisenhofer J (1997) Crystal Structure of the Cytochrome *bc*₁ Complex from Bovine Heart Mitochondria. *Science* 277: 60–66.
- Yang M, Jensen RE, Yaffe MP, Oppliger W & Schatz G (1988) Import of proteins into yeast mitochondria: the purified matrix processing protease contains two subunits which are encoded by the nuclear *MAS1* and *MAS2* genes. *The EMBO journal* 7: 3857–3862.
- Yang M & Trumpower BL (1994) Deletion of *QCR6*, the gene encoding subunit six of the mitochondrial cytochrome *bc*₁ complex, blocks maturation of cytochrome *c*₁, and causes temperature-sensitive petite growth in *Saccharomyces cerevisiae*. *The Journal of biological chemistry* 269: 1270–1275.
- Zara V, Conte L & Trumpower BL (2009) Biogenesis of the yeast cytochrome *bc*₁ complex. *Biochimica et biophysica acta* 1793: 89–96.
- Zhang Z, Huang L, Shulmeister VM, Chi YI, Kim KK, Hung LW, Crofts AR, Berry EA & Kim SH (1998) Electron transfer by domain movement in cytochrome *bc*₁. *Nature* 392: 677–684.