



HAL
open science

ATP synthase mitochondriale : fonction de la sous-unité ϵ et biogenèse du F0

Francois Godard

► **To cite this version:**

Francois Godard. ATP synthase mitochondriale : fonction de la sous-unité ϵ et biogenèse du F0. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0092 . tel-01895889

HAL Id: tel-01895889

<https://theses.hal.science/tel-01895889>

Submitted on 15 Oct 2018

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.

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPÉCIALITÉ GÉNÉTIQUE

Par François GODARD

**ATP synthase mitochondriale : fonction de la sous-unité ϵ
et biogenèse du F_0**

Soutenue le 25 juin 2014

Membres du jury :

Mme CAMOUGRAND Nadine	Directeur de Recherche CNRS	Président
Mme DUJARDIN Geneviève	Directeur de Recherche CNRS	Rapporteur
M. HARAUX Francis	Directeur de Recherche CNRS	Rapporteur
M. MAZAT Jean-Pierre	Professeur émérite Université de Bordeaux	Examineur
Mme DELAHODDE Agnès	Directeur de Recherche CNRS	Examineur
M. di Rago Jean-Paul	Directeur de Recherche CNRS	Directeur de thèse

THÈSE PRÉSENTÉE
POUR OBTENIR LE GRADE DE
DOCTEUR DE
L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ECOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE
SPÉCIALITÉ GÉNÉTIQUE

Par François GODARD

**ATP synthase mitochondriale : fonction de la sous-unité ϵ
et biogenèse du F_0**

Soutenue le 25 juin 2014

Membres du jury :

Mme CAMOUGRAND Nadine	Directeur de Recherche CNRS	Président
Mme DUJARDIN Geneviève	Directeur de Recherche CNRS	Rapporteur
M. HARAUX Francis	Directeur de Recherche CNRS	Rapporteur
M. MAZAT Jean-Pierre	Professeur émérite Université de Bordeaux	Examineur
Mme DELAHODDE Agnès	Directeur de Recherche CNRS	Examineur
M. di Rago Jean-Paul	Directeur de Recherche CNRS	Directeur de thèse

Sommaire

Abréviations	11
1 Introduction	14
1.1 La mitochondrie	14
1.1.1 L'origine des mitochondries.....	14
1.1.1.1 Un organite à origine unique.....	14
1.1.1.2 Les scénarios d'apparition de la mitochondrie.....	15
1.1.1.3 Evolution du génome mitochondrial.....	16
1.1.2 Structure des mitochondries	17
1.1.3 Dynamique et transmission des mitochondries.....	19
1.1.4 L'ADN mitochondrial de <i>S. cerevisiae</i>	21
1.1.5 Les protéines mitochondriales.....	22
1.1.5.1 Acheminement des protéines d'origine nucléaire à la mitochondrie	22
1.1.5.2 Insertion dans la membrane interne des protéines synthétisées dans la matrice mitochondriale.....	25
1.1.6 Fonctions mitochondriales	27
1.1.7 Les oxydations phosphorylantes	28
1.2 L'ATP synthase mitochondriale.....	30
1.2.1 Structure et fonctionnement de l'ATP synthase.....	30
1.2.1.1 Le secteur F_1	31
1.2.1.2 Le secteur F_0	35
1.2.1.2.1 Le canal à protons	35
1.2.1.2.1.1 Modèle de translocations des protons selon Fillingame.....	37

1.2.1.2.1.1.1	Le demi-canal périplasmique est situé au centre d'un faisceau de 4 hélices transmembranaires de la sous-unité a.....	37
1.2.1.2.1.1.2	Les rotations des hélices transmembranaires et la canalisation des H ⁺ du demi-canal de l'espace périplasmique à c-Asp61.....	39
1.2.1.2.1.1.3	Libération des H ⁺ de c-Asp61 dans le demi-canal cytoplasmique.....	40
1.2.1.2.1.1.4	Canalisation des H ⁺ au cytoplasme via des interactions avec les boucles extra-membranaires des sous-unités a et c.....	42
1.2.1.2.1.1.5	Comment les mouvements des hélices provoqués par le transport d'H ⁺ dans la sous-unité a conduisent à la rotation de l'anneau de c ?	43
1.2.1.2.2	La partie stator.....	44
1.2.1.2.2.1	Le pied périphérique.....	44
1.2.1.2.3	Autres sous-unités constituant le F _O	46
1.2.1.2.3.1	Sous-unité f.....	46
1.2.1.2.3.2	Atp8p.....	46
1.2.1.3	Sous-unités non essentielles à la respiration.....	48
1.2.1.4	Les protéines d'inhibition.....	49
1.2.2	Biogenèse de l'ATP synthase.....	50
1.2.2.1	Synthèse des sous-unités codées par le génome mitochondrial.....	50
1.2.2.1.1	Expression des ARNm.....	50
1.2.2.1.1.1	Transcription.....	51
1.2.2.1.1.2	Maturation et dégradation des ARN mitochondriaux.....	52
1.2.2.1.2	Traduction mitochondriale.....	54

1.2.2.1.3	Facteurs intervenant dans l'expression des sous-unités de l'ATP synthase codées par le génome mitochondrial	56
1.2.2.1.3.1	Facteurs intervenant dans la synthèse de la sous-unité Atp9p	56
1.2.2.1.3.2	Facteurs intervenant dans la synthèse des sous-unités Atp6p et Atp8p	58
1.2.2.2	Assemblage des sous-unités de l'ATP synthase	62
1.2.2.2.1	Assemblage du secteur F ₁	62
1.2.2.2.2	Formation de l'anneau Atp9p.....	64
1.2.2.2.3	Maturation et assemblage d'Atp6p	65
1.2.2.2.3.1	Maturation du précurseur de la sous-unité 6	65
1.2.2.2.3.2	Assemblage de la sous-unité Atp6p	66
1.2.2.2.4	Etapes finales d'assemblage de l'ATP synthase	67
1.2.2.3	Contrôle traductionnel par le F ₁ des sous-unités Atp6p et Atp8p.....	70
2	Matériels et méthodes.....	72
2.1	Souches et conditions de culture	72
2.1.1	Souches bactériennes.....	72
2.1.2	Souches de levures	72
2.1.3	Conditions de culture et conservation	82
2.1.3.1	Milieu de culture pour bactérie	82
2.1.3.2	Milieux de culture pour levure	82
2.1.3.3	Culture et conservation des souches.....	83
2.2	Techniques de génétique	83
2.2.1	Croisement de souches	83

2.2.2	Cytoconduction de mitochondries	84
2.2.3	Tableau des plasmides.....	84
2.2.4	Transformation de bactéries par choc thermique	85
2.2.5	Transformation plasmidique de levures	86
2.2.6	Transformation des mitochondries par biolistique.....	86
2.2.7	Génération d'une population de cellules $\rho^{-/0}$	87
2.2.8	Estimation de la proportion de cellules $\rho^{-/0}$ dans une culture.....	87
2.2.9	Echange de marqueur de sélection	88
2.2.10	Délétion d'un gène nucléaire chez la levure	88
2.2.11	Détermination de la ploïdie par cytométrie de flux sur levures	89
2.3	Techniques de biologie moléculaire.....	89
2.3.1	Extraction des acides nucléiques.....	89
2.3.1.1	Extraction plasmidique à partir de bactéries	89
2.3.1.2	Extraction d'ADN génomique de levure pour séquençage de gène.....	89
2.3.1.3	Extraction d'ADN génomique de levure pour séquençage génomique	90
2.3.1.4	Extraction des ADNmt de levures.....	90
2.3.1.5	Extraction et vérification des ARN totaux de levures.....	91
2.3.2	Dosage des acides nucléiques	91
2.3.3	Détermination de la séquence nucléotidique.....	91
2.3.3.1	Séquençage d'un gène.....	91
2.3.3.2	Séquençage global d'un génome.....	91
2.3.4	Amplification par PCR.....	92
2.3.5	Clonage d'un fragment d'ADN dans un plasmide.....	94

2.3.6	Southern-blot.....	95
2.3.7	Quantification d'ARN mitochondriaux par RT-PCR quantitative.....	95
2.4	Techniques de biochimie.....	96
2.4.1	Extraits protéiques de levures	96
2.4.2	Préparation de mitochondries.....	97
2.4.3	Quantification des protéines par colorimétrie	98
2.4.4	Séparation des complexes membranaires mitochondriaux par BN-PAGE.....	99
2.4.5	Visualisation de l'activité ATPasique sur gel	100
2.4.6	Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes	101
2.4.6.1	Electrophorèse selon la méthode de Laemmli.....	101
2.4.6.2	Electrophorèse selon la méthode de Schägger	101
2.4.7	Transfert semi-sec des protéines après électrophorèse à une membrane.....	102
2.4.7.1	Transfert classique.....	102
2.4.7.2	Transfert par iblot.....	102
2.4.8	Immunodétection des protéines séparées par électrophorèse.....	102
2.4.9	Mesure de la respiration mitochondriale	104
2.4.10	Mesure du potentiel mitochondrial $\Delta\psi$	105
2.4.11	Mesure de l'ATP synthétisé par l'ATP synthase	106
2.4.12	Détermination de l'activité ATPasique de l'ATP synthase	107
2.4.13	Marquage <i>in vivo</i> au ^{35}S des produits de la traduction mitochondriale.....	108
3	Résultats	110
3.1	Fonction de la sous-unité de l'ATP synthase de <i>S. cerevisiae</i>	110
3.1.1	Résumé.....	110

3.1.1.1	La délétion du gène de la sous-unité ϵ de l'ATP synthase de <i>S. cerevisiae</i> aboutit à un phénotype pléiotropique.	110
3.1.1.2	Une déplétion de 25 % en sous-unité ϵ conduit à un découplage total de la mitochondrie.	111
3.1.1.3	Les mutants $\Delta\gamma$, $\Delta\delta$ et $\Delta\epsilon$ présentent des différences de stabilité de l'ADNmt.	112
3.1.1.4	Des mutations dans les gènes codant pour les sous-unités Atp6p et Atp9p du F_0 permettent de maintenir l'ADNmt en absence de F_1	113
3.1.2	Article 1.	114
3.2	Recherche de nouveaux facteurs impliqués dans la biogenèse du secteur F_0 de l'ATP synthase.	124
3.2.1	Un crible génétique pour la sélection de mutations inactivant spécifiquement le secteur F_0 de l'ATP synthase.	124
3.2.1.1	Caractérisation des mutants F_0^i	127
3.2.1.1.1	Localisation des mutations F_0^i	127
3.2.1.1.1.1	Les mutations F_0^i de SDC25/1 et SDC25/5 sont localisées respectivement dans les gènes AEP1 et AEP2.	127
3.2.1.1.1.2	Localisation des mutations F_0^i dans l'ADNmt.	128
3.2.1.1.2	Caractérisation moléculaire des mutants F_0^i	129
3.2.1.1.2.1	Les isolats F_0^i SDC25/1 et SDC25/5 sont mutés respectivement dans AEP1 et AEP2, deux gènes impliqués dans l'expression de la sous-unité c/Atp9p de l'ATP synthase.	129
3.2.1.1.2.2	Caractérisation des mutants F_0^i mitochondriaux.	130
3.2.1.1.2.2.1	La mutation F_0^i de SDC25/26.	130
3.2.1.1.2.2.2	La mutation F_0^i de SDC25/4 et SDC25/6.	131

3.2.1.1.2.3	Caractérisation des mutations dans la sous-unité c/Atp9p de SDC25/2 et SDC25/14	132
3.2.1.2	Les mutations des isolats F_O^i aboutissent comme attendu à une inactivation du secteur F_O	133
3.2.1.3	Conclusion sur les mutations F_O^i	134
3.2.2	Article 2	136
3.2.3	Recherche de nouveaux facteurs intervenant dans la biogenèse du secteur F_O de l'ATP synthase	149
3.2.3.1	Procédure d'obtention des clones F_O^i	149
3.2.3.2	Détermination de l'origine génomique des mutations F_O^i	150
3.2.3.3	Caractérisation génétique des isolats F_O^i	151
3.2.3.3.1	Mutants de l'ADN mitochondrial	151
3.2.3.3.1.1	Cartographie génétique	151
3.2.3.3.1.2	Séquencage	152
3.2.3.3.2	Mutants de l'ADN nucléaire	153
3.2.3.3.2.1	Cartographie génétique	153
3.2.3.3.2.1	Séquencage	155
3.2.3.3.2.1.1	Sélection de clones pour le séquençage génomique	155
3.2.3.3.2.1.2	Certains mutants F_O^i présentent des variations dans la quantité de certains chromosomes.	155
3.2.3.3.2.1.3	Hétérozygotie des isolats F_O^i	159
3.2.3.3.2.1.4	Détermination de la ploïdie des clones F_O^i par cytométrie de flux	162
3.2.3.3.2.1.5	Mutations n'intervenant pas dans le phénotype F_O^i	166

3.2.3.3.2.1.6	Mutations pouvant intervenir dans le phénotype de survie....	169
4	Discussion Générale.....	177
4.1	Un crible génétique ciblant le secteur F_O de l'ATP synthase.....	177
4.1.1	Validation du crible.....	177
4.1.2	Nouvelle chasse de mutants F_O^i	178
4.1.2.1	Plusieurs des clones F_O^i présentent des variations de ploïdie.....	178
4.1.2.2	Mutations ponctuelles.....	180
4.1.2.2.1	Une mutation F_O^i dans le gène <i>PET127</i>	180
4.1.2.2.2	Les autres mutations ponctuelles F_O^i	182
4.1.2.2.2.1	Gènes affectés.....	183
4.1.2.2.2.1.1	Gènes à fonction mitochondriale reconnue ou possiblement impliqués dans une fonction mitochondriale.....	183
4.1.2.2.2.1.2	Gènes sans fonction mitochondriale connue.....	184
4.2	Fonction de la sous-unité surnuméraire ϵ de l'ATP synthase mitochondriale.....	187
	Bibliographie.....	190

Abréviations

$\Delta\psi$: potentiel de membrane mitochondrial

ADNc : Acide DésoxyriboNucléique complémentaire

ADNg : ADN génomique

ADNmt : ADN mitochondrial

ADP : Adénosine DiPhosphate

APS : Ammonium PerSulfate

ARN : Acide RiboNucléique

ARNm : ARN messenger

ARNr : ARN ribosomique

ARNt : ARN de transfert

ATP : Adénosine TriPhosphate

BET : Bromure d'Éthidium

BN-PAGE : *Blue Native–PolyAcrylamide Gel Electrophoresis*, Electrophorèse en gel de polyacrylamide en condition native et en bleu de Coomassie

BSA : *Bovin Serum Albumin*, Albumine de sérum bovin

CCCP : Carbonyl Cyanide m-ChloroPhényl hydrazone

D.O. : Densité Optique

DAPIT : *Diabetes-Associated Protein in Insulin-sensitive Tissue*, Protéine associée aux diabètes dans les tissus sensible à l'insuline

dNTP : désoxyNucléotide TriPhosphate

DTT : DiThioThrétol

ECL : *Electrogenerated ChemiLuminescence*, chemiluminescence électrogénérée

EDTA : *Ethylene Diamine Tetraacetic Acid*, acide éthylène diamine tétraacétique

EGTA : *Ethylene Glycol Tetraacetic Acid*, éthylène glycol acide tétraacétique

EMBL : *European Molecular Biology Laboratory*, Laboratoire de Biologie Moléculaire Européen

FAD/FADH₂ : Flavine adénine dinucléotide/hydrogénée

HEPES : acide 4-(2-HydroxyÉthyl)-1- Pipérazine Éthane Sulfonique

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

m/v : masse par volume

MOPS : acide 3-(N-Morpholino) Propane- Sulfonique

NAD⁺/NADH : Nicotinamine Adénine Dinucléotide/hydrogénée

ORF : Open Reading Frame, cadre ouvert de lecture

OSCP : Oligomycin Sensitivity-Conferring Protein

Pb : paire de bases

PBS : Phosphate buffered saline, tampon phosphate salé

PCR : *Polymerase Chain Reaction*, Réaction de Polymérisation en Chaîne

PDB : Protein Data Bank

PEG : PolyÉthylène Glycol

Pi : Phosphate inorganique

PMSF : PhénylMéthaneSulfonylFluoride

Qsp : quantité suffisante pour

Rpm : rotation par minute

RT-PCR : *Reverse-Transcription-Polymerase Chain Reaction*, Transcription inverse-Réaction de Polymérisation en Chaîne

SDS : Sodium DodécylSulfate

TCA : *TriChloroacetic Acid*, acide trichloroacétique

TE : Tris-EDTA

TEMED : N,N,N',N'-tétraméthyléthylènediamine

Tm : Température de fusion

TMPD : N,N,N',N'-tétraméthyl-1,4-phénylènediamine

Tris : Trishydroxyméthylaminométhane

UTR : *UnTranslated Region*, région non traduite

UV : Ultra Violet

v/v : volume par volume

1 Introduction

Une caractéristique des eucaryotes est la présence d'un noyau, un compartiment membranaire isolant le génome du reste de la cellule. La plupart des eucaryotes se distinguent également par différentes structures comme le réticulum endoplasmique, l'appareil de Golgi, le chloroplaste en charge de la photosynthèse, la mitochondrie en charge de la production d'énergie (Dyall et Johnson 2000; van der Giezen 2009).

1.1 La mitochondrie

La première mention décrivant cet organite comme ubiquitaire est due à Altman en 1890. Le nom de mitochondrie, du grec *mitos*, fils et *chondros*, grains, lui est donné du fait de l'apparence de ces structures durant la spermatogénèse (pour revue : Ernster et Schatz 1981).

1.1.1 L'origine des mitochondries

Dès 1890, Altman postule que les formes qu'il observe sont vivantes et remplissent des fonctions vitales à l'intérieur de la cellule. En 1970, Margulis formule l'hypothèse de l'endosymbiose : des bactéries incluses dans une cellule proto-eucaryote auraient évolué pour aboutir aux mitochondries et chloroplastes actuels (Margulis 1970).

1.1.1.1 Un organite à origine unique

Au fil des années plusieurs arguments sont venus étayer cette théorie. Tout d'abord ces organites possèdent un génome distinct du génome nucléaire. De plus, le système de traduction du génome des mitochondries et des chloroplastes est différent de celui du cytosol. Par ailleurs, bien qu'à travers les espèces les ADNmt actuellement séquencés soient très variables en taille et en nombre de gènes, tous possèdent les gènes codant pour les ARN ribosomaux. La construction d'arbres phylogénétiques à partir des séquences d'ARNr mitochondriaux montrent leur filiation avec le domaine des bactéries (Gray *et al.* 1984; Cedergren *et al.* 1988; Gray *et al.* 1989). Une phylogénie sur les ARNr mitochondriaux des plantes établirait que la bactérie à l'origine des mitochondries est apparentée à la classe des α -protéobactéries (Yang *et al.* 1985) et plus précisément dans l'ordre des Rickettsiales (Williams *et al.* 2007), dont la plupart des membres ne survivent qu'en endosymbiose avec une cellule hôte (Andersson *et al.* 1998). *Rickettsia prowazekii* serait l' α -protéobactérie la

plus proche de l'ancêtre commun des mitochondries (Andersson *et al.* 1998). C'est l'agent pathogène du typhus, un parasite intracellulaire obligatoire qui a la capacité de se multiplier dans le cytoplasme des cellules parasitées (Hackstadt 1996). *R. prowazekii* produit de l'ATP par le cycle de Krebs et les oxydations phosphorylantes, comme dans les mitochondries. Les analyses phylogénétiques soutiennent un regroupement monophylétique des mitochondries correspondant à une origine unique du fait d'un seul événement de capture d' α -protéobactéries (Gray 1999).

Des mitochondries capables de produire de l'ATP par la voie des oxydations phosphorylantes ne sont pas présentes chez tous les eucaryotes. Toutefois, on distingue chez ceux-ci des organites apparentés à la mitochondrie, comme les hydrogénosomes et mitosomes (Dyall et Johnson 2000). Ces organites sont dépourvus d'ADN. Ils participent à la synthèse des centres fer-soufre, ont un système d'import de protéines similaire à celui des mitochondries (van der Giezen 2009). Ces organites sont donc généralement considérés comme des produits de l'évolution de mitochondries ayant perdu la capacité de produire de l'ATP par la voie des oxydations phosphorylantes. La mitochondrie et les organites apparentés sont une caractéristique générale des cellules eucaryotes.

1.1.1.2 Les scénarios d'apparition de la mitochondrie

A partir de la théorie de l'endosymbiose, deux scénarios évolutifs des mitochondries ont été proposés. Dans les deux cas, il est admis que l'hôte ancêtre est une archée. Dans le scénario « archézoaire », l'ancêtre des eucaryotes actuels est une hypothétique cellule primitive déjà pourvue d'un noyau.. Ces proto-eucaryotes se diversifient au fil de l'évolution, certains devenant des hôtes recevant les α -protéobactéries aboutissant aux mitochondries (Figure 1, page 16). A ce jour, le scénario « archézoaire » n'est étayé par aucune preuve, car aucun eucaryote dépourvu de mitochondries ou d'organites dérivant des mitochondries n'a été identifié. Dans le scénario « symbiogenèse », un événement unique d'endosymbiose implique l'endocytose de l' α -protéobactérie par une archée qui a conduit à la génération des mitochondries, suivi ensuite par l'apparition du noyau des cellules eucaryotes (Koonin 2010). Dans ce scénario, la complexité cellulaire des eucaryotes serait apparue après la symbiose. Les eucaryotes, du fait de la complexité de leur génome et du plus grand nombre de protéines qu'ils expriment par rapport aux procaryotes ont un besoin énergétique élevé. Il a été proposé que l'acquisition de mitochondries serait le seul moyen permettant de satisfaire la demande énergétique de la cellule eucaryote (Lane et Martin 2010). L'acquisition de mitochondrie ne

serait pas seulement une caractéristique des eucaryotes mais la condition indispensable à leur complexité structurale et fonctionnelle.

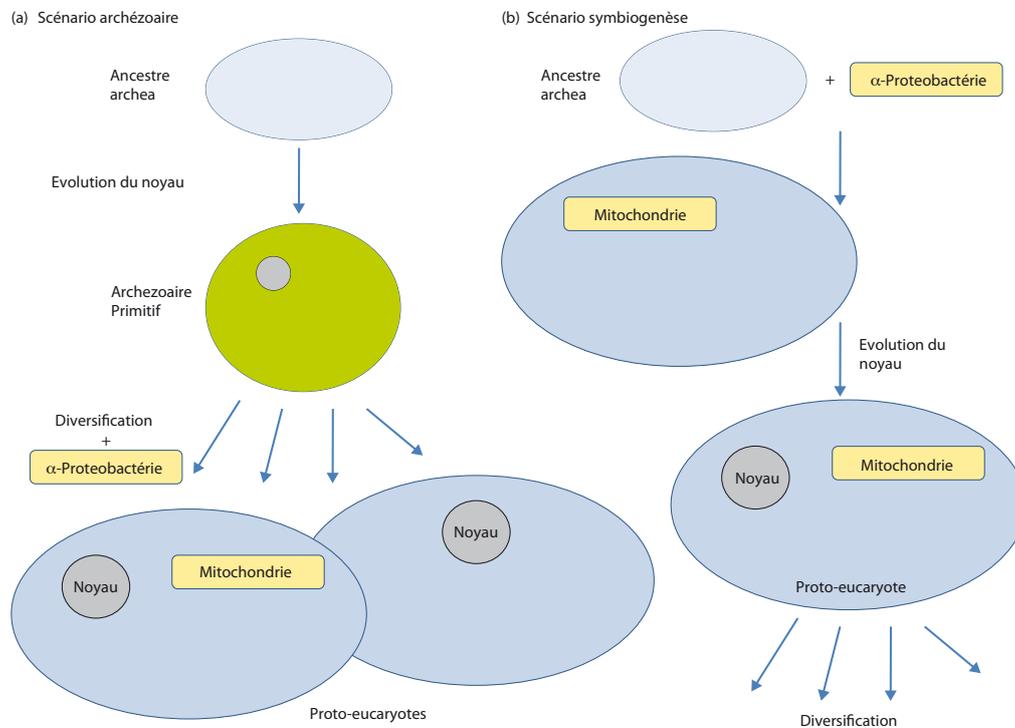


Figure 1

Deux scénarios d'apparition de la mitochondrie. (a) : le scénario « archézoaire » ; (b) : le scénario « symbiogenèse » (Koonin 2010).

1.1.1.3 Evolution du génome mitochondrial

La grande majorité des protéines mitochondriales est codée par le noyau, synthétisée dans le cytosol puis importée dans l'organite. Le génome mitochondrial ne code qu'une toute petite fraction des protéines de la mitochondrie. La taille et le nombre de gènes présents dans les mitochondries sont variables selon les espèces, de 85 gènes chez les plantes contre 15 à 20 chez les animaux (Gray *et al.* 1999; Burger *et al.* 2003). Le nombre de gènes présents est très réduit par rapport à l'ancêtre procaryotique des mitochondries. Cette quantité restreinte de gènes mitochondriaux par rapport au génome ancestral est le fait de deux mécanismes conjoints : la perte d'information génétique et le transfert de gènes vers le génome nucléaire. Après l'endocytose, et au cours de l'évolution, le génome nucléaire aurait peu à peu repris à

son compte la majeure partie des fonctions supportées par le génome mitochondrial. Le génome de l'organite se serait appauvri en perdant peu à peu ses gènes, soit du fait de transfert des gènes au noyau, soit par le fait que leurs fonctions étaient déjà assurées par le génome nucléaire (Figure 2, page 17).

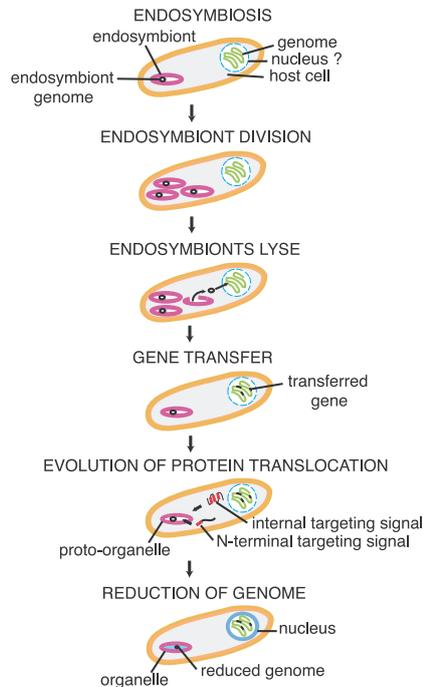


Figure 2

Transfert de gènes au noyau. Les endosymbiotes bactériens (en rose) ont probablement existés en populations se répliquant à l'intérieur de leur hôte, comme ce qui est observé dans les endosymbioses actuelles. La lyse du symbiote et/ou l'échappement de l'ADN pendant les divisions pourraient avoir fourni une source d'information génétique pour les transferts au noyau. La redondance génétique en résultant, après évolution de la machinerie de translocation de protéines et la perte de gènes ont aboutit à la réduction du génome de l'organite (Dyall *et al.* 2004).

1.1.2 Structure des mitochondries

Les mitochondries sont délimitées par deux membranes, les membranes externe et interne, délimitant l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale (Figure 3, page 18).

La membrane externe forme l'enveloppe de la mitochondrie. Elle est formée de 60 % de protéines et de 40 % de lipides polaires. Elle constitue une barrière vis-à-vis des macromolécules et contient des pores protéiques comme la porine, permettant le passage de solutés de moins de 5 kDa, et le système d'import de protéines. Il existe des points de contact

entre les membranes interne et externe. Ils sont transitoires et dépendent des conditions physiologiques (Fritz *et al.* 2001).

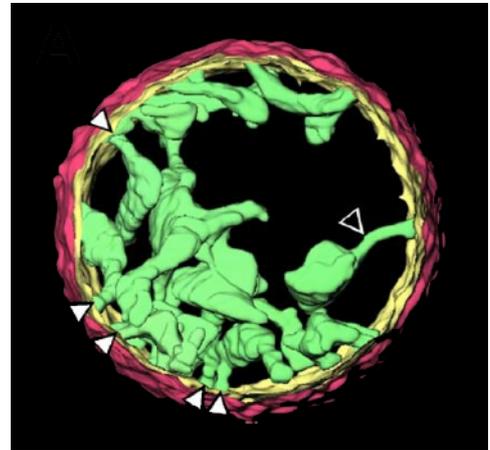
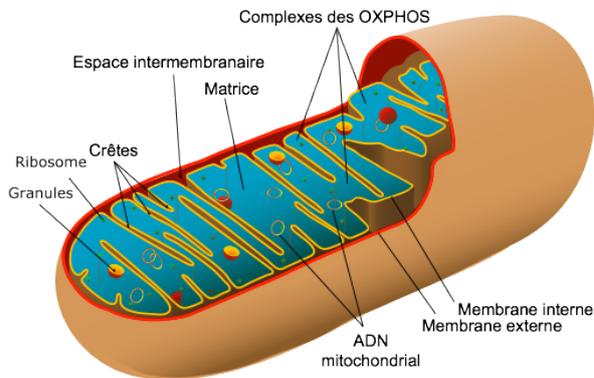


Figure 3

Structure générale d'une mitochondrie. A gauche : diagramme de la structure générale d'une mitochondrie (adapté de M. Ruiz). A droite : reconstruction par tomographie d'une mitochondrie de foie de rat. La membrane externe est en rouge, la membrane interne en jaune, les crêtes sont en vert. Les flèches blanches pointent des jonctions de crêtes. Le diamètre de cette mitochondrie est de 1,5 μm (Mannella *et al.* 1997).

La membrane mitochondriale interne est une barrière *stricto sensu*, les ions et les substrats métaboliques ne peuvent la traverser que grâce à l'intervention des transporteurs protéiques (Becker *et al.* 2012). Elle est composée de 75 % de protéines et de 25 % de lipides (Callen, 2003) et contient une quantité importante de cardiolipides (glycérol bisphosphatidyle). Sa superficie est supérieure à celle de la membrane externe et elle forme de nombreux replis dans la matrice mitochondriale qui sont appelées crêtes mitochondriales. Cette membrane contient les complexes de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase impliqués dans les oxydations phosphorylantes.

La membrane interne délimite la matrice mitochondriale, qui contient l'ADNmt, les ribosomes mitochondriaux et des enzymes impliquées dans le métabolisme énergétique (comme les enzymes du cycle de Krebs).

1.1.3 Dynamique et transmission des mitochondries

Chez *S. cerevisiae* ainsi que dans de nombreux types cellulaires, les mitochondries apparaissent sous la forme d'un réseau de tubules interconnectés (Egner et al. 2002) (Figure 4, page 19).



Figure 4

Visualisation du réseau mitochondrial. Le réseau mitochondrial d'une levure vivante à une résolution d'environ 100 nm. La matrice mitochondriale est révélée à la GFP (*Green Fluorescent Protein*) et visualisée par une reconstitution 3D. La paroi cellulaire est colorée par du calcofluore blanc. La taille des flèches correspond à 1 µm (Jakobs 2006).

Les mitochondries sont des organites dynamiques se déplaçant continuellement au sein de la cellule le long du cytosquelette d'actine. La morphologie du réseau mitochondrial est le résultat de deux processus dynamiques antagonistes : les réactions de fusion et de fission mitochondriales. L'équilibre entre les deux processus aboutit à une structure majoritairement tubulaire (Okamoto et Shaw 2005). Un excès de fusion génère des mitochondries interconnectées, alors qu'un excès de fission produit des mitochondries isolées, fragmentées (Figure 5, page 20). Chez la levure, les mitochondries changent de taille et de forme en moyenne une fois toutes les deux minutes. Elles se divisent et fusionnent lors de la croissance de la cellule, changent de forme et de nombre en fonction des conditions de croissance. De larges réseaux sont observables lorsque la cellule est active au niveau du métabolisme mitochondrial, au contraire lorsque ce métabolisme est réduit le réseau se fragmente (Westermann 2010).

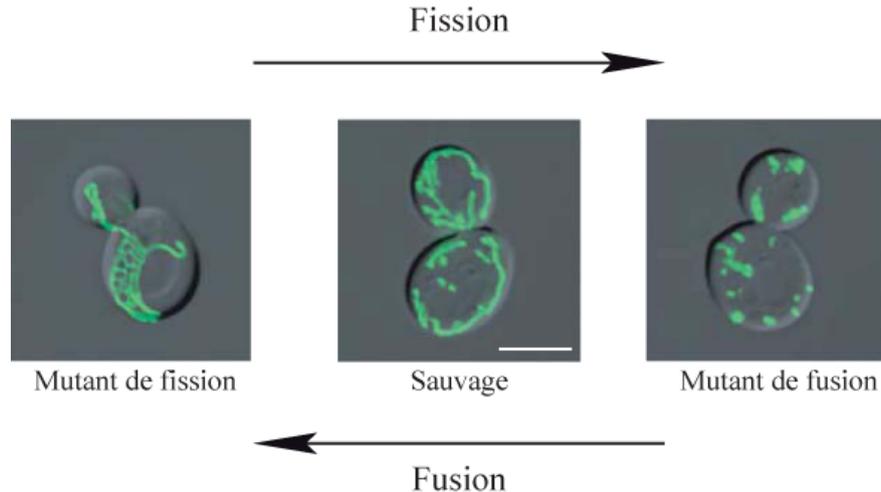


Figure 5

Morphologie et dynamique mitochondriale. Les mitochondries de levure sont visualisées par une GFP adressée à la matrice mitochondriale. Les images générées par contraste d'interférence différentiel et fluorescence de la GFP sont superposées pour chaque cellule. Le mutant de fission est une souche $\Delta dnm1$ qui présente une réticulation des tubules exacerbée, le mutant de fusion est une souche $\Delta fzo1$ qui présente des mitochondries fragmentées. L'équilibre entre la fusion et la fission maintient le réseau sous une forme majoritairement tubulaire chez les cellules sauvages. La barre blanche représente 5 μm (Okamoto et Shaw 2005).

Il n'est pas possible de générer des mitochondries *de novo*. Elles doivent être engendrées à partir des mitochondries existantes. Durant la division cellulaire, la fission des mitochondries permet la partition et la transmission des mitochondries à la cellule fille. Des déséquilibres de ce mécanisme peuvent conduire à un défaut dans la transmission, et éventuellement à des maladies d'origine mitochondriale (Westermann 2010). Le cycle continu de fusion et de fission des mitochondries conduit à un brassage et à une homogénéisation de ses constituants. Chez la plupart des organismes l'ADNmt se présente sous une forme hétéroplasmique, c'est à dire avec des ADNmt de séquences différentes (Chinnery *et al.* 2000). Chez *S. cerevisiae*, sauf cas particuliers, l'hétéroplasmie est instable (Berger et Yaffe 2000) ; après une dizaine de divisions mitotiques, toutes les cellules filles seront homoplasmiques.

1.1.4 L'ADN mitochondrial de *S. cerevisiae*

De 50 à 100 copies d'ADNmt sont présents par cellule de levure. Ils sont présents dans des structures particulières, les nucléoïdes, dont le nombre et la taille varient en fonction des conditions physiologiques.

Chez *S. cerevisiae*, le génome mitochondrial code pour les sous-unités Atp6p, Atp8p et Atp9p de l'ATP synthase, pour les sous-unités Cox1p, Cox2p et Cox3p du complexe IV et pour la sous-unité cytochrome *b* du complexe III de la chaîne respiratoire (Figure 6, page 21). Certains génomes contiennent aussi le gène *ENS2* codant pour une sous-unité d'une endonucléase mitochondriale. Par ailleurs, l'ADNmt code l'ensemble des 24 ARNt nécessaires à la traduction mitochondriale, deux ARNr (21S et 15S), la protéine Var1p de la petite sous-unité du ribosome, la composante ARN 9S de la RNaseP qui intervient dans la maturation des ARNt et des introns dont certains spécifient des protéines qui participent à leur excision (Foury *et al.* 1998).

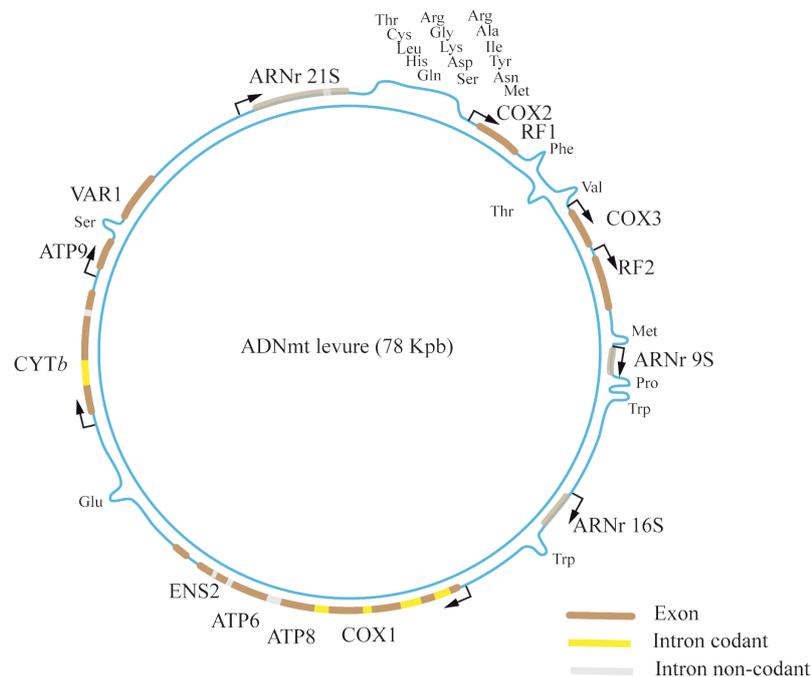


Figure 6

Diagramme de l'ADNmt de *S. cerevisiae*. Les flèches représentent les sites d'initiation de la transcription.

En absence d'expression du génome mitochondrial, indispensable à la respiration, *S. cerevisiae* peut vivre en utilisant la fermentation mais pour des raisons qui ne sont pas comprises le génome mitochondrial est instable. On nomme « petites cytoplasmiques » les cellules qui ont perdu tout ou partie de leur ADNmt. On distingue les cellules ρ^0 qui ont perdu l'intégralité de leur ADNmt, des cellules ρ^- qui ont perdu au moins 50 % de leur ADNmt. Ces deux types cellulaires sont incapables de croître en milieu respiratoire, et présentent une croissance plus faible en milieu fermentescible car elles sont incapables de métaboliser l'éthanol qu'elles produisent pendant la fermentation. Dans les levures ρ^- le génome restreint est répété régulièrement jusqu'à atteindre la taille du génome ρ^+ (Contamine et Picard 2000).

1.1.5 Les protéines mitochondriales

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, le nombre de protéines associées à la mitochondrie est estimé entre 550 (Prokisch *et al.* 2004) et 750 (Sickmann *et al.* 2003). Sur cet ensemble, seule une dizaine est spécifiée par l'ADNmt. La plus grande majorité des protéines doit donc être importée du cytosol. Les protéines mitochondriales se répartissent dans les différents compartiments de la mitochondrie : la membrane externe, l'espace intermembranaire, la membrane interne et la matrice mitochondriale.

1.1.5.1 Acheminement des protéines d'origine nucléaire à la mitochondrie

Du fait de la barrière que constituent les membranes mitochondriales, les protéines sont acheminées à leur compartiment grâce à un système complexe de transporteurs (Figure 7, page 24). Les protéines mitochondriales d'origine nucléaire sont souvent synthétisées sous forme de précurseurs contenant des signaux d'adressages qui les dirigent vers la membrane externe mitochondriale puis vers leur destination finale. Le signal d'adressage le plus classique correspond à une pré-séquence peptidique d'environ 10 à 60 résidus d'acides aminés en position N-terminale de la protéine. Les pré-séquences d'adressage mitochondrial contiennent beaucoup d'acides aminés chargés positivement, et ont tendance à former des hélices α amphiphiles.

La pré-séquence dirige la protéine aux récepteurs Tom20p et Tom22p du complexe TOM (*Translocase of the Outer Membrane*) (Brix *et al.* 1999; Yamano *et al.* 2008). Après passage à travers le canal hydrophile de Tom40p, le précurseur interagit avec le complexe

TIM23, qui est la translocase des protéines à pré-séquence de la membrane interne (Geissler *et al.* 2002; Yamamoto *et al.* 2002; Chacinska *et al.* 2005). L'insertion de la protéine est dépendante du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\psi$) qui permet la translocation des charges positives de la pré-séquence à travers le complexe. De là, deux voies sont possibles. La première est un transport latéral dans la membrane interne. La pré-séquence est clivée par la protéase matricielle MPP. Elle peut éventuellement être clivée aussi par l'IMP (*Internal Membrane Peptidase*) pour être relâchée dans l'espace intermembranaire.

Pour la deuxième voie, le complexe PAM (*Présequence translocase Associated Motor*) ATP-dépendant, qui contient la chaperonne mtHsp70p comme composant central (Prakash et Matouschek 2004; Neupert et Herrmann 2007; Chacinska *et al.* 2009) tire la protéine dans la matrice mitochondriale. La maturation de la protéine est effectuée par clivage de la pré-séquence signal par la MPP (*Mitochondrial Processing Peptidase*) (Vogtle *et al.* 2009).

Parmi les protéines à pré-séquence de la membrane interne, beaucoup sont relâchées à partir du complexe TIM23, d'autres sont d'abord transportées dans le compartiment matriciel puis insérées dans la membrane interne via Oxa1p (Dolezal *et al.* 2006; Neupert et Herrmann 2007; Chacinska *et al.* 2009).

L'autre voie principale d'import concerne les protéines de la membrane interne comme les transporteurs de métabolite qui sont synthétisés sans pré-séquence mais avec des signaux internes d'adressage. Ils sont liés à des chaperonnes cytosoliques et sont reconnues par Tom70p. Tom40p est utilisée pour la translocation dans l'espace intermembranaire, puis des complexes de chaperonnes Tim9p et Tim10p guident le précurseur de transporteur au complexe TIM22. Il est alors inséré dans la membrane interne par le complexe TIM22 en utilisant le $\Delta\psi$ comme source d'énergie.

Les précurseurs des protéines en tonneaux β destinées à la membrane externe, comme par exemple la porine, après passage par le canal de Tom40p sont ensuite prises en charge par les petites chaperonnes TIM (*Translocase of the Inner Membrane*) puis amenées au complexe SAM (*Sorting and Assembling Machinery*) pour permettre leur insertion dans la membrane externe (Paschen *et al.* 2003; Wiedemann *et al.* 2003).

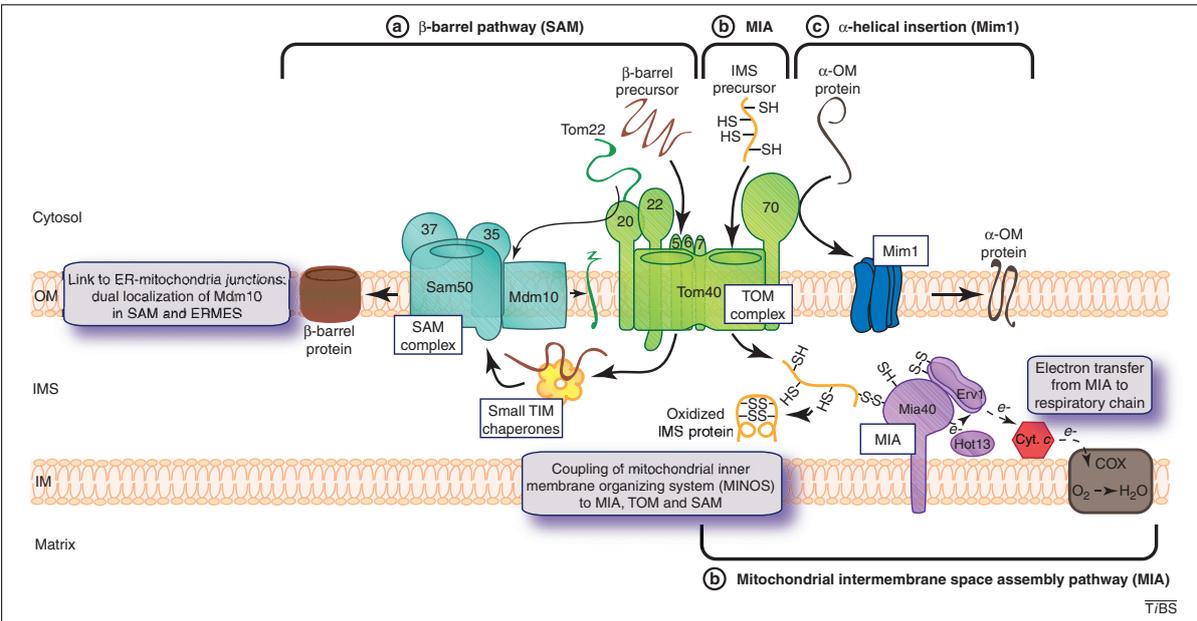
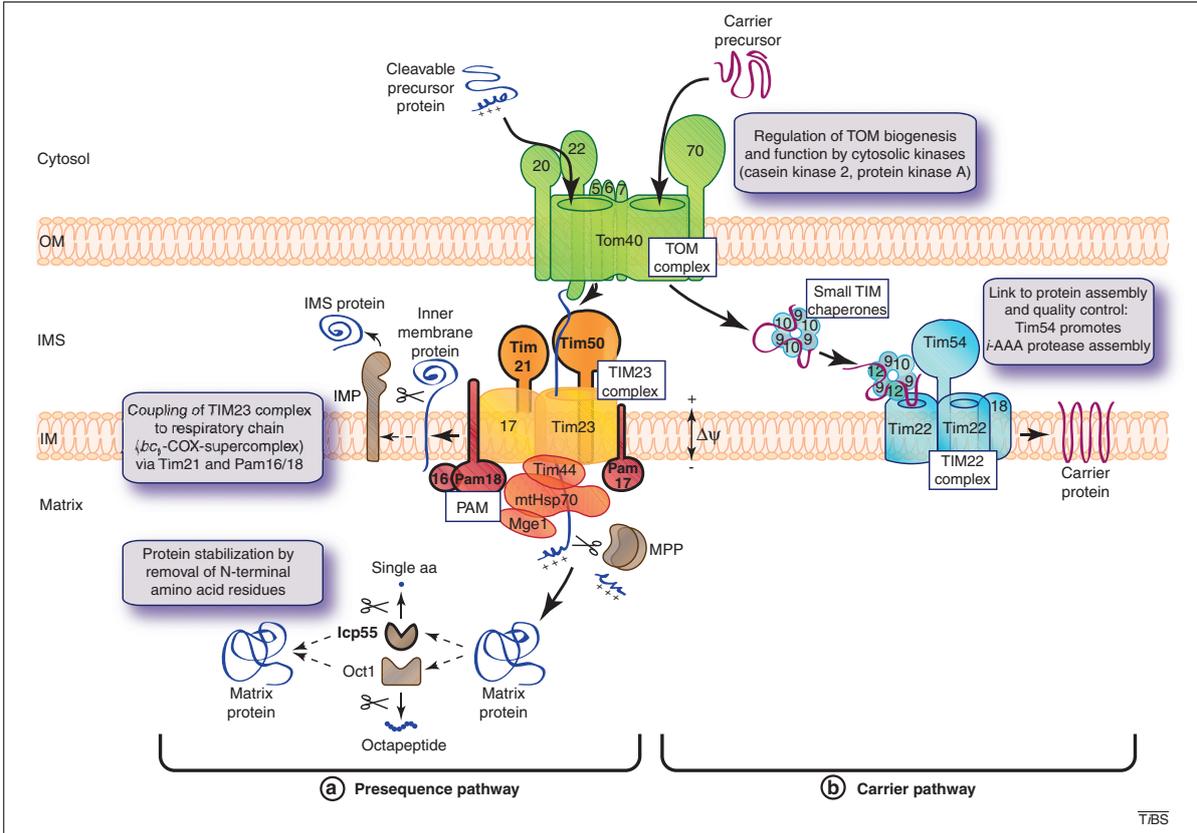


Figure 7

Voies d'import des protéines mitochondriales. Panneau supérieur : les voies classiques d'import, (a) : voie d'import des protéines à pré-séquence en N-terminale ; (b) : voie d'import de précurseur protéique avec signal d'adressage interne. Panneau inférieur : les voies d'import additionnelles. (a) : voie des protéines à tonneau β ; (b) : voie des protéines de l'espace intermembranaire passant par MIA ; (c) : voie des protéines à hélice α . (Becker *et al.* 2012)

Comme vu plus haut, quelques protéines de l'espace intermembranaire sont importées par la voie à pré-séquence impliquant TIM23, suivi d'un clivage par la peptidase IMP. Cependant, la majorité des protéines de l'espace intermembranaire emprunte la voie MIA (*Mitochondrial Intermembrane space Assembly*). Après passage au travers du complexe TOM, les précurseurs sont pris en charge par Mia40p dans l'espace intermembranaire (Milenkovic *et al.* 2009; Sideris *et al.* 2009). Cette protéine Mia40p interagit avec les protéines précurseurs via des liaisons disulfures (Chacinska *et al.* 2004; Mesecke *et al.* 2005) et catalyse le repliement oxydatif des protéines.

Dans le cas des protéines destinées à la membrane externe et portant des segments transmembranaires multiples ou simples en hélice α (par exemple les petites protéines Tom), après reconnaissance par Tom70p elles sont transférées à Mim1p qui réalise l'insertion dans la membrane externe (Becker *et al.* 2011).

1.1.5.2 Insertion dans la membrane interne des protéines synthétisées dans la matrice mitochondriale

Les protéines codées par le génome mitochondrial sont destinées à la membrane interne mitochondriale, à l'exception de Var1p. L'insertion des protéines encodées par le génome mitochondrial dans la membrane interne ne semble pas dépendre du potentiel de membrane car même en présence de découplant, ces protéines atteignent leurs destinations (Ott et Herrmann 2010). Le mécanisme n'est pas encore très connu, le plus détaillé à l'heure actuelle est celui de l'insertion de Cox2p.

Dans la mitochondrie Oxa1p semble avoir un rôle central dans l'insertion dans la membrane des produits de la traduction mitochondriale (Hell *et al.* 2001). Oxa1p a d'abord été identifié comme un composant nécessaire à l'insertion de Cox2p (Bauer *et al.* 1994; Bonnefoy *et al.* 1994b) (Figure 8, page 26). Dans les mitochondries, Oxa1p est en contact avec les polypeptides en synthèse, émergeant des ribosomes (Hell *et al.* 2001; Preuss *et al.* 2001). Dans la levure, les ribosomes mitochondriaux ont la particularité d'être associés à la membrane interne (Ott *et al.* 2006). Oxa1p contient une extension C-terminale qui est nécessaire et suffisante pour la liaison au ribosome (Jia *et al.* 2003; Szyrach *et al.* 2003). Des expériences de pontage ont montré que Oxa1p se lie à proximité de la sortie du tunnel polypeptidique du ribosome. Les protéines nouvellement synthétisées peuvent directement s'engager avec Oxa1p dès qu'elles émergent du ribosome. Oxa1p est assistée par Mba1p

(Preuss *et al.* 2001; Ott *et al.* 2006). Comme Oxa1p, Mba1p se lie au ribosome mitochondrial et est proche du tunnel de sortie des polypeptides naissants. Il fonctionnerait comme un récepteur qui aide à aligner le tunnel de sortie du ribosome au site d'insertion de la membrane interne.

Un crible génétique a permis d'identifier les protéines Cox18p, Pnt1p, Mss2p comme étant aussi nécessaires à l'insertion des protéines d'origine mitochondriale dans la membrane interne mais leurs rôles restent peu définis (He et Fox 1999; Broadley *et al.* 2001; Saracco et Fox 2002). Deux autres composants lieraient les ribosomes à la membrane, Mdm38p et Cox11p, par un mécanisme pas encore connu.

En plus de son activité insertase, Oxa1p pourrait jouer un autre rôle. En effet Oxa1p interagit directement avec les sous-unités Atp9p du secteur F_O et permet son assemblage au complexe ATP synthase (Jia *et al.* 2007).

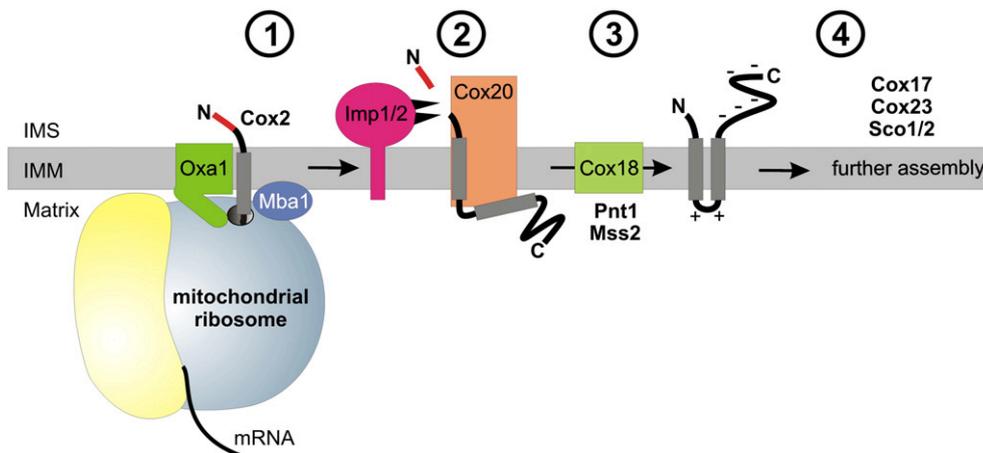


Figure 8

Insertion de Cox2 dans la membrane interne mitochondriale. (1) Cox2p est à la fois traduite et insérée dans la membrane interne avec l'aide de Oxa1p et Mba1p. (2) Le peptide guide en N-terminale (en rouge) est clivé par la peptidase de l'espace intermembranaire Imp1/Imp2. (3) La protéine de la membrane interne Cox20p se lie à Cox2p et facilite sa maturation protéolytique. Le second segment transmembranaire et la grande partie hydrophile C-terminale sont insérés et transloqués par l'action de Cox18p, Mss2p et Pnt1p. (4) Durant la translocation de la partie C-terminale de Cox2p le fer est inséré dans son domaine, une réaction dépendant de Cox17p, Cox19p, Cox23p, Sco1p et Sco2p. Cox2p s'assemble avec d'autres sous-unités pour former le complexe cytochrome *c* oxydase fonctionnel (Ott et Herrmann 2010).

En plus de leurs interactions avec le ribosome mitochondrial, les ARNm sont également liés à la membrane interne. Dans les mitochondries de levure, des activateurs traductionnels essentiels pour la traduction et/ou la stabilité de l'ARNm ont été identifiés. Ces

facteurs sont des protéines ou des complexes de protéines assemblées à la membrane qui se lient aux ARNm probablement par des interactions avec leurs régions 5' UTR (Rodel 1986; Costanzo et Fox 1988; Michaelis *et al.* 1991; Costanzo et Fox 1993; McMullin et Fox 1993; Naithani *et al.* 2003). Ainsi, chaque gène mitochondrial semble avoir un jeu spécifique de régulateurs de la traduction. Ces activateurs contribueraient à une expression des protéines au plus proche de la membrane interne de la mitochondrie.

1.1.6 Fonctions mitochondriales

La mitochondrie assure de nombreuses fonctions indispensables à la vie de la cellule. Une des principales fonctions de la mitochondrie est la synthèse d'ATP *via* la phosphorylation oxydative et la réoxydation du NADH nécessaire au maintien du pouvoir oxydant de la cellule. La mitochondrie possède d'autres fonctions, comme la biogenèse des centres fer-soufre qui sont ensuite utilisés dans toute la cellule. Les centres fer-soufre interviennent entre autres au sein des complexes mitochondriaux de la chaîne respiratoire dans les réactions d'oxydoréduction liées au transport d'électrons. La mitochondrie intervient dans de nombreuses réactions métaboliques incluant la β -oxydation des acides gras, le cycle de Krebs, la biosynthèse de l'hème, le métabolisme de certains acides aminés et de lipides. De plus, la mitochondrie a un rôle clé dans l'apoptose. Durant l'apoptose la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie libère le cytochrome *c* et des facteurs pro-apoptotiques qui engagent le programme de mort cellulaire (Jiang et Wang 2004). Les mitochondries des mammifères sont aussi impliquées dans la biosynthèse des hormones stéroïdes et dans l'homéostasie du Ca^{2+} où la mitochondrie participe (avec le réticulum endoplasmique) au stockage du calcium. Enfin, elles sont capables de thermogenèse dans le tissu adipeux brun en découplant la phosphorylation oxydative *via* les UCP (*Uncoupling Protein*). La mitochondrie est également la cible du processus de mitophagie (Bhatia-Kissova et Camougrand 2010). L'ensemble de ces réactions métaboliques est rendu possible grâce à de nombreux transporteurs dans les membranes de l'organite assurant les échanges entre le cytosol et la mitochondrie (Figure 9, page 28).

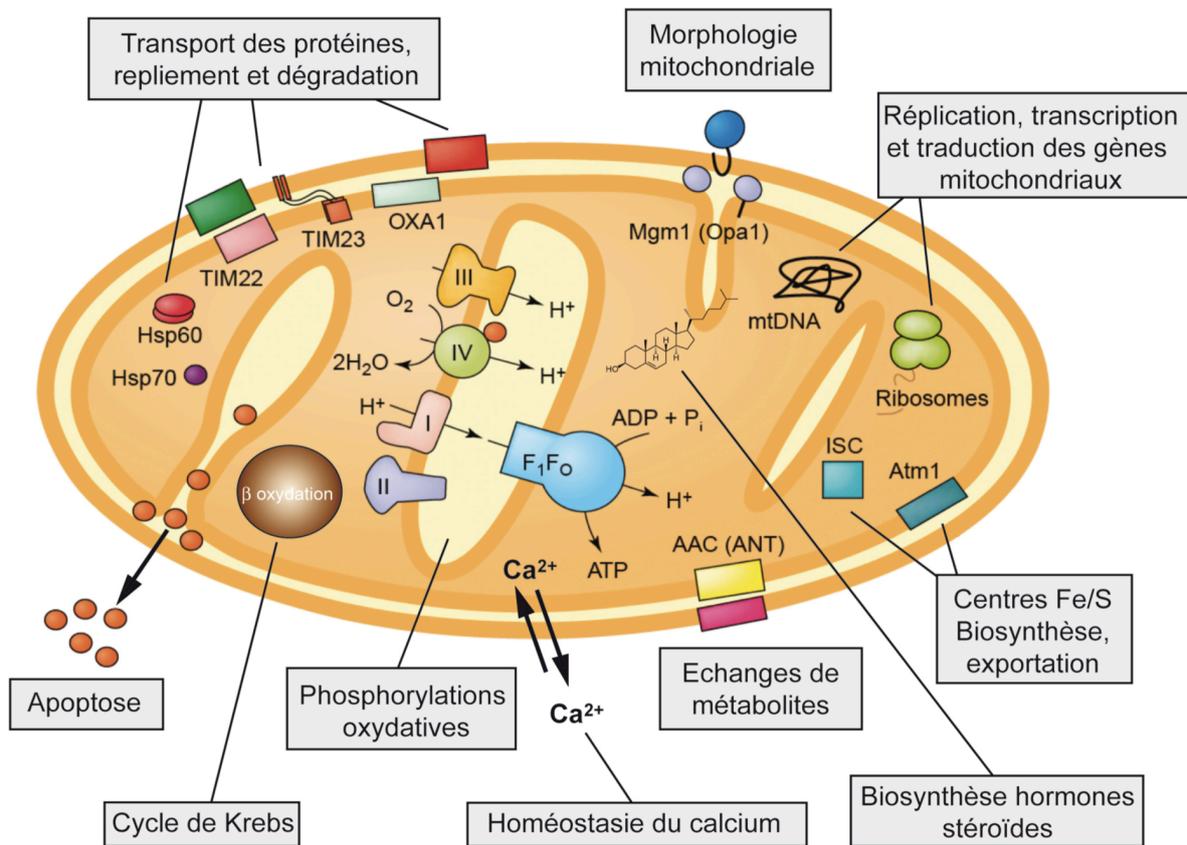


Figure 9

Fonctions mitochondriales. Schéma d'une mitochondrie montrant quelques protéines impliquées dans les différentes fonctions mitochondriales. Les processus mitochondriaux comme le métabolisme des acides aminés, le métabolisme des lipides, et la synthèse de l'hème ne sont pas indiqués (Reichert et Neupert 2004).

1.1.7 Les oxydations phosphorylantes

Une des fonctions principales de la mitochondrie est la production d'ATP par la phosphorylation oxydative et la réoxydation du NADH nécessaire au maintien du pouvoir oxydant de la cellule.

Les voies métaboliques comme la glycolyse, la β -oxydation des acides gras et le cycle de Krebs génèrent de l'énergie sous la forme de molécules réduites comme le NADH et FADH_2 . Cette énergie est utilisée par la mitochondrie pour générer de l'ATP par la voie des oxydations phosphorylantes. Elle est définie comme l'ensemble des réactions permettant le couplage de l'oxydation des métabolites et coenzymes à la synthèse d'ATP au niveau de la membrane interne mitochondriale.

Mitchell développa la théorie chimio-osmotique permettant de relier l'oxydation à la phosphorylation (Mitchell 1961). L'énergie libérée par l'oxydation des substrats réduits est utilisée pour excréter des protons hors de la matrice mitochondriale, générant ainsi un gradient électrochimique de protons de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne. L'ATP synthase utilise l'énergie du gradient de protons pour permettre la phosphorylation de l'ADP en ATP. C'est la théorie de la transduction chimio-osmotique. Cette théorie s'est vue confirmée expérimentalement au fil des années.

Cette voie repose sur des réactions d'oxydoréduction qui se déroulent au niveau d'une série de complexes multiprotéiques insérés dans la membrane interne de l'organite : la chaîne respiratoire. Elle est constituée des complexes I à IV, de l'ubiquinone et du cytochrome *c*. Le rôle de la chaîne respiratoire est de transférer à l'oxygène les équivalents réducteurs des substrats oxydés tout en y couplant un transport de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire. Le gradient de protons ainsi formé est utilisé pour synthétiser de l'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique par l'ATP synthase. Un transporteur spécifique de la membrane interne, l'ADP/ATP translocase, permet à l'ATP néosynthétisé de rejoindre le cytosol (Figure 10, page 16).

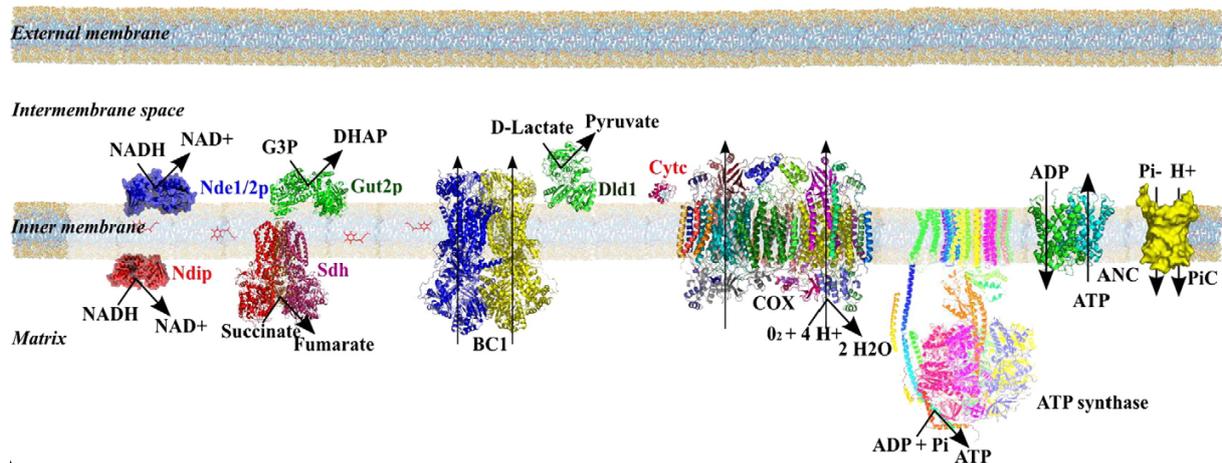


Figure 10

Complexes des oxydations phosphorylantes. Schéma des mécanismes et des acteurs des oxydations phosphorylantes chez *S. cerevisiae*. Nde1/2p : NADH déshydrogénase externe, Ndi1 : NADH déshydrogénase interne, Gut2p : Glycérol-3-phosphate déshydrogénase, Sdh : Succinate déshydrogénase, BC1 : Cytochrome *bc1*, Dld1 : D-lactate déshydrogénase 1, Cyt *c* : Cytochrome *c*, COX : Cytochrome *c* Oxydase, ANC : Adénine Nucléotide Translocase, PiC : transporteur de phosphate inorganique (Rigoulet *et al.* 2010).

Le complexe I est absent chez *S. cerevisiae*, il y est remplacé par des NADH déshydrogénases sur les faces interne et externe de la membrane interne, monomériques et non-translocatrices de protons. Elles oxydent le NADH, et transfèrent deux électrons vers l'ubiquinone (ubiquinol une fois réduite). La succinate déshydrogénase (complexe II) participe également à la réduction de l'ubiquinone, en présence de son substrat le succinate. L'ubiquinol diffuse dans la membrane vers le complexe cytochrome bc_1 (complexe III). Le cytochrome bc_1 va oxyder l'ubiquinol et transférer ses électrons au cytochrome c . Ce transfert est couplé à une translocation de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Les électrons portés par le cytochrome c sont ensuite transférés au complexe cytochrome c oxydase (complexe IV). Ce complexe va finalement transférer les électrons à l' O_2 , et couple ce transfert à la translocation de protons vers l'espace intermembranaire. L' O_2 réduit formera avec des protons une molécule d'eau. L'ATP synthase va utiliser le gradient de protons ainsi formé de part et d'autre de la membrane interne pour la synthèse d'ATP.

1.2 L'ATP synthase mitochondriale

1.2.1 Structure et fonctionnement de l'ATP synthase

L'ATP synthase mitochondriale est un complexe multi-protéique ancré dans la membrane interne de la mitochondrie (Figure 11, page 31). Deux secteurs ont été définis suivant leur solubilité. Le secteur F_1 situé en dehors de la membrane interne est soluble, le secteur F_0 est pour sa part fermement associé à la membrane. Ces deux secteurs sont reliés entre eux d'une part par la tige centrale appartenant au secteur F_1 et d'autre part par le pied périphérique appartenant au secteur F_0 . L'ATP synthase fonctionne comme un moteur moléculaire formé d'un rotor et d'un stator. Le rotor est constitué par un anneau d'oligomère de sous-unités $c/Atp9p$ situé dans la partie F_0 et par la tige centrale de la partie F_1 . Le stator est constitué par la partie $\alpha_3\beta_3$ du F_1 , par le pied périphérique, par la sous-unité $a/Atp6p$ du secteur F_0 et par d'autres sous-unités dont le nombre et la nature varient selon les espèces. Le rotor utilise la force proton motrice pour générer son mouvement de rotation. La tige centrale va induire des changements de conformation au sein de la partie catalytique de l'enzyme $\alpha_3\beta_3$ qui permet la formation d'ATP à partir d'ADP et de Pi (Boyer 1997; Walker et Dickson 2006).

Cette organisation est commune à toutes les F_1F_0 -ATP synthases. L'enzyme mitochondriale se distingue des ATP synthases bactériennes et chloroplastiques par plusieurs sous-unités additionnelles ou « surnuméraires ».

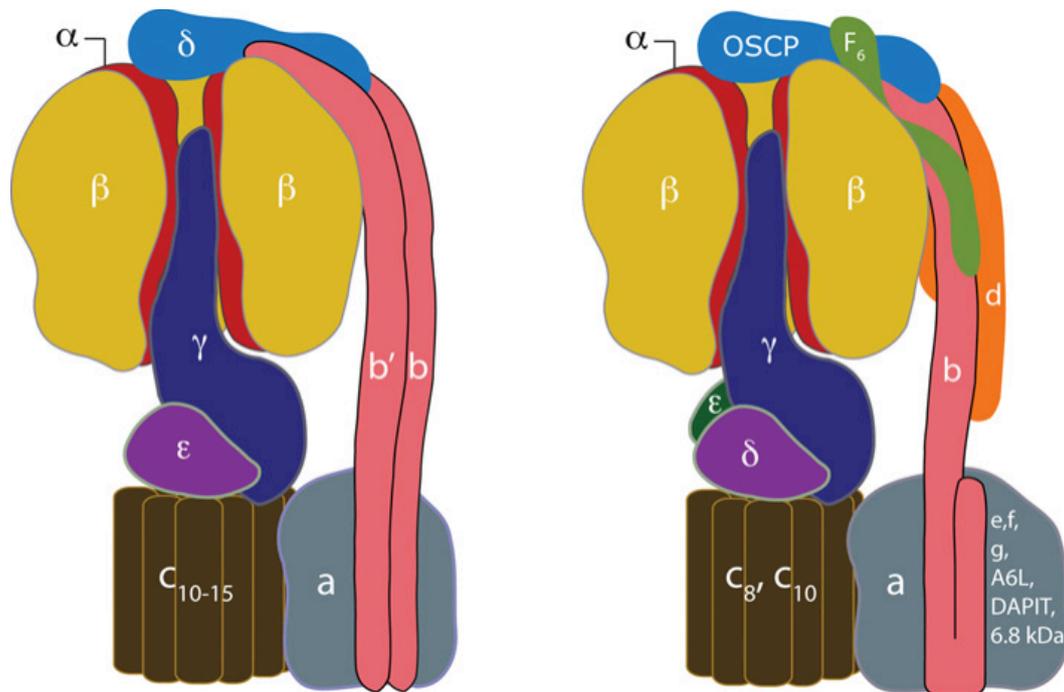


Figure 11

Organisation des sous-unités protéiques dans les ATP synthases. Les ATP synthases bactériennes et chloroplastiques sont décrites à gauche, l'ATP synthase mitochondriale de bœuf est montrée à droite. Une des trois sous-unités α (en rouge) est omise pour exposer la sous-unité γ (en bleu sombre) qui se déploie approximativement le long de l'axe central du domaine sphérique $\alpha_3\beta_3$. Le rotor de l'enzyme consiste en une association de l'anneau de c (en marron), avec la sous-unité γ et ses sous-unités associées (ϵ pour la bactérienne et la chloroplastique, ϵ et δ pour la mitochondriale). Le passage des protons à travers le secteur F_0 est situé à l'interface entre la sous-unité a (en gris) et l'anneau de c . Le nombre de sous-unité c de l'anneau dépend de l'espèce considérée. Le pied périphérique est situé à droite de chaque modèle. Pour quelques enzymes bactériennes il consiste en une sous-unité δ (en bleu clair) et deux sous-unités identiques b (en rose). Dans d'autres enzymes bactériennes et pour l'enzyme chloroplastique, les deux sous-unités b sont remplacés par des copies uniques homologues mais non identiques, les sous-unités b et b' . La sous-unité δ se lie à l'une des trois sous-unités α et les sous-unités b et b' interagissent avec la sous-unité a par leur extrémité N-terminale. Dans l'enzyme mitochondriale, le pied périphérique consiste en des copies uniques de sous-unités OSCP, b , d , et F_6 . OSCP est l'homologue de la sous-unité δ bactérienne. Les séquences des sous-unités mitochondriales b , d et F_6 n'ont pas d'homologie évidente avec celles des sous-unités bactériennes b et b' . Le domaine membranaire de l'enzyme mitochondriale contient des sous-unités à hélices α transmembranaires simples qui ne sont pas retrouvées dans les enzymes chloroplastiques et bactériennes. Ces sous-unités surnuméraires n'ont pas de rôle connu dans la génération d'ATP. Les sous-unités e , f , g , A6L et DAPIT et le protéolipide à 6,8 kDa, qui sont trouvés dans le complexe quand les phospholipides sont maintenus durant la purification du complexe sont montrés (Walker 2013).

1.2.1.1 Le secteur F_1

Le secteur F_1 est constitué de 5 sous-unités : α , β , γ , δ et ϵ avec une stœchiométrie $\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1$ (Figure 12, page 32) (Walker *et al.* 1985). Fonctionnellement, on peut distinguer l'hexamère $\alpha_3\beta_3$ de la tige centrale constitué de $\gamma_1\delta_1\epsilon_1$. Dans l'hexamère $\alpha_3\beta_3$, les sous-unités α et β sont positionnées alternativement autour d'un axe central formé par les hélices α des

extrémités N et C-terminales de γ (Abrahams *et al.* 1994). La partie de γ non enveloppée par l'hexamère $\alpha_3\beta_3$ est en interaction avec la sous-unité δ (nommée sous-unité ϵ dans le chloroplaste et chez la bactérie). Dans le cas de l'ATP synthase mitochondriale, la tige centrale est complétée d'une protéine dite surnuméraire, la sous-unité ϵ . Cette protéine n'a pas d'équivalent dans l'ATP synthase bactérienne ou chloroplastique (Walker *et al.* 1982). Elle est située à l'interface des sous-unités γ et δ . La partie de la tige centrale où sont situées δ et ϵ forment un « pied » qui établit des contacts avec l'anneau de sous-unités c /Atp9p du secteur F_0 (Stock *et al.* 1999). Ces contacts sont majoritairement le fait de la sous-unité δ .

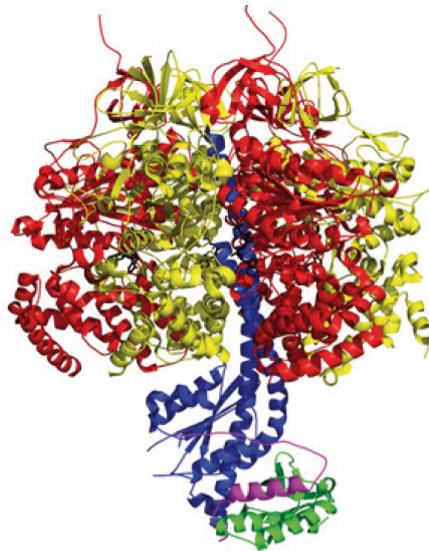


Figure 12

Structure de la F_1 -ATP synthase bovine. Les sous-unités α (en rouge) et β (en jaune) sont disposées en alternance autour de la sous-unité γ (en bleu) laquelle forme avec les sous-unités δ (en vert) et ϵ (en violet) la tige centrale ; référence PDB : 1E79 (Stock *et al.* 2000).

En liant un filament d'actine aux sous-unités γ ou ϵ , la rotation de la tige centrale menée par l'hydrolyse d'ATP a été observée en microscopie sur le complexe $\alpha_3\beta_3\gamma$ (Noji *et al.* 1997) et sur le complexe F_1 (Kato-Yamada *et al.* 1998; Noji *et al.* 1999) (Figure 13, page 33). La rotation s'effectue par pas de 120° dans le sens inverse des aiguilles d'une montre vue depuis la partie en extrusion de la tige centrale (Yasuda *et al.* 1998). La rotation a également été visualisée dans des préparations de F_1F_0 ATP synthase où le filament d'actine est relié à l'anneau de c (Sambongi *et al.* 1999).

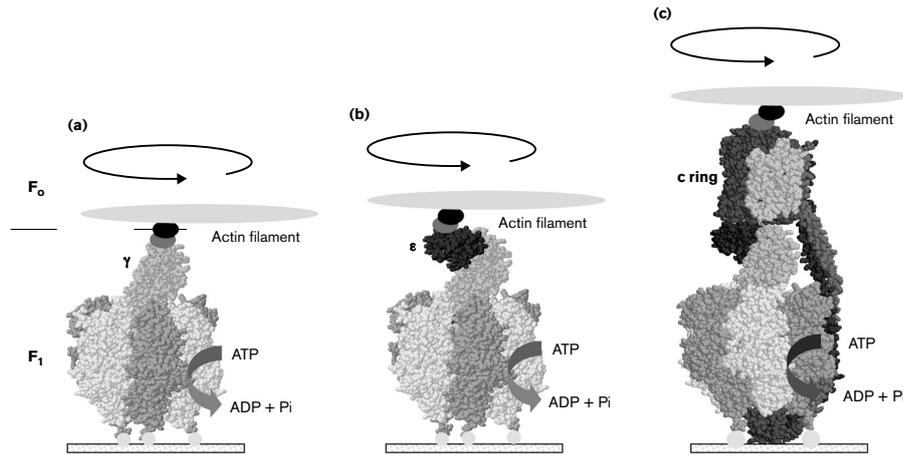


Figure 13

Observation de la rotation dans l'ATP synthase bactérienne. Observation directe de la rotation en utilisant des filaments d'actine fluorescents reliés à (a) la sous-unité γ dans le complexe $\alpha_3\beta_3\gamma$; (b) F_1 et (c) F_1F_0 ATP synthase. L'extrémité N-terminale de la sous-unité α est reliée à une surface en verre recouverte de nickel (Stock *et al.* 2000).

Paul Boyer proposa un mécanisme pour la synthèse d'ATP dit « mécanisme par changements d'affinité ». La translocation des protons aboutit à des changements de conformation des sites catalytiques qui s'opèrent de manière coopérative. Ils permettent la liaison de l'ADP au P_i , leur condensation pour former l'ATP et la libération de l'ATP de ces sites (Boyer 1993). Seule la libération de l'ATP requiert de l'énergie. Les extrémités N- et C-terminales de la sous-unité γ forment une structure allongée et asymétrique insérée au cœur de l'hexamère $\alpha_3\beta_3$, qui déterminent la conformation des sous-unités β qui portent les sites catalytiques. Les différentes conformations des sous-unités β possèdent des affinités distinctes servant à la liaison du substrat et la libération du produit pendant la synthèse et l'hydrolyse de l'ATP. Les données structurales obtenues sur la F_1 -ATPase mitochondriale de cœur de bœuf ont identifié 4 conformations : β_E (site vide), β_{HC} (mi-fermé, lie l'ADP et le P_i), β_{DP} (fermé, lie l'ADP et le P_i), et β_{TP} (lie l'ATP) (Abrahams *et al.* 1994; Menz *et al.* 2001). Gao *et al.* proposent un modèle où l'ATP synthase fonctionne selon un schéma dit tri-site où chaque sous-unité β intervient dans la réaction de manière coopérative (Gao *et al.* 2005). A partir de la conformation β_E , γ effectue une rotation de 30° , la conformation du site devient β_{HC} (Figure 14, page 34). L'affinité du site β_{HC} va permettre de lier le P_i et l'ADP. Après la liaison de l'ADP et du P_i , γ effectue une rotation de 90° , la conformation du site se transforme en β_{DP} . Ce changement conformationnel n'induit pas de synthèse d'ATP car la réaction est en faveur de la liaison ADP/ P_i . Une rotation de 120°

change la conformation du site de β_{DP} à β_{TP} , qui est le site de haute affinité pour l'ATP, la synthèse s'effectue. Une rotation supplémentaire de 120° de γ transforme le site β_{TP} en β_E qui permet de libérer l'ATP. Le site est de nouveau disponible pour effectuer un nouveau cycle de synthèse. Une rotation de 360° de la tige centrale aboutit à la formation de trois molécules d'ATP. Dans le cas de l'hydrolyse, la tige centrale tourne dans le sens inverse et aboutit à l'hydrolyse de 3 ATP. Dans ce sens, l'ATP synthase permet de créer un potentiel de membrane mitochondrial.

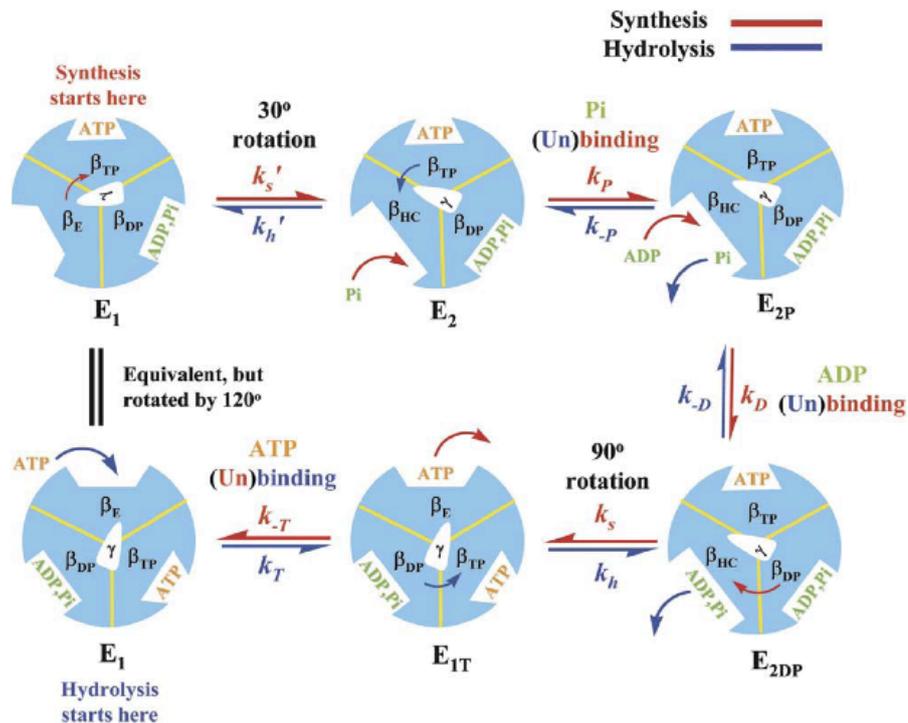


Figure 14

Diagramme illustrant le modèle trisite E_1E_2 pour la synthèse et l'hydrolyse d'ATP par le F_1 (Gao *et al.* 2005). La figure montre un cycle de rotation de 120° de la sous-unité γ qui correspond à la synthèse et à l'hydrolyse d'un ATP. Le cycle de synthèse d'ATP est annoté en rouge, le cycle d'hydrolyse en bleu. Les sites catalytiques sont annotés suivant leur description structural (b_E , b_{HC} , b_{DP} , et b_{TP}). (Abrahams *et al.* 1994; Menz *et al.* 2001) et leur forme est similaire à celle utilisée dans la littérature (Braig *et al.* 2000). k_x correspond à la constante d'association d'une espèce x sur un site donné et k_{-x} la constante de dissociation correspondante. k_s' , k_h' , k_s , et k_h sont les constantes de vitesses des rotations correspondantes. Pour l'hydrolyse, le schéma est généralement en accord avec les hypothèses de Senior *et al.* et Kagawa *et al.* (Senior *et al.* 2002; Kagawa *et al.* 2004).

1.2.1.2 Le secteur F_O

Le secteur F_O remplit plusieurs fonctions. Il permet la rotation du rotor *via* le canal à protons, forme le stator de l'enzyme et permet la structuration de l'ATP synthase en oligomères.

1.2.1.2.1 Le canal à protons

Le secteur F_O utilise la force proton motrice pour générer la rotation de l'anneau de sous-unités *c*/Atp9p et de la tige centrale. La rotation est la conséquence du passage des protons du compartiment intermembranaire à la matrice *via* le canal à protons de l'enzyme. Les protéolipides *c*/Atp9p et *a*/Atp6p, enchâssés dans la membrane mitochondriale sont les constituants de ce canal (Figure 15, page 35).

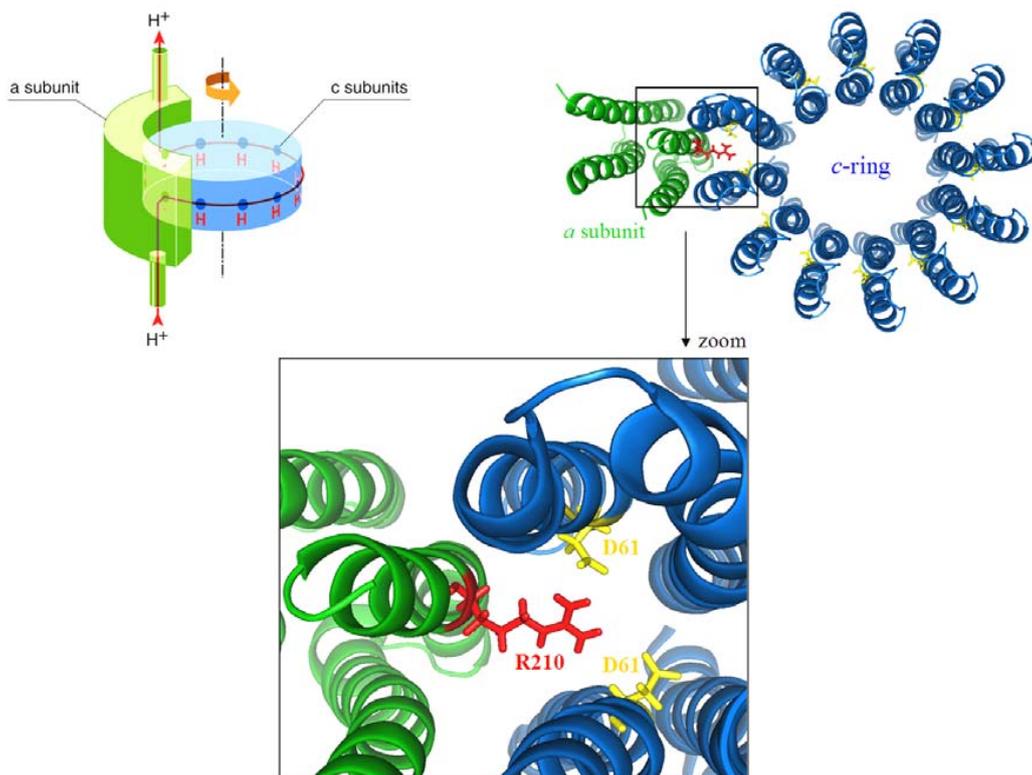


Figure 15

Modèle d'organisation des sous-unités *a* et *c* du canal à protons d'*E. coli*. Le canal à protons est constitué par un anneau de 12 sous-unités *c* (10 sous-unités Atp9p chez *S. cerevisiae*) en interaction avec la sous-unité *a* (Atp6p chez *S. cerevisiae*). La sous-unité *a* facilite le transport des protons à la périphérie de l'anneau de *c*. Les résidus *a*-Arg210 (Arg186 chez la levure) et *c*-Asp61 (Glu59 chez la levure) essentiels au fonctionnement du canal sont représentés (Rastogi et Girvin 1999; Stock *et al.* 1999).

Le nombre de monomères de *c* constituant l'anneau est variable selon les espèces, 8 chez le bovin, 10 chez *S. cerevisiae*, et jusqu'à 15 sous-unités chez *Spirulina platensis* (Figure 16, page 36).

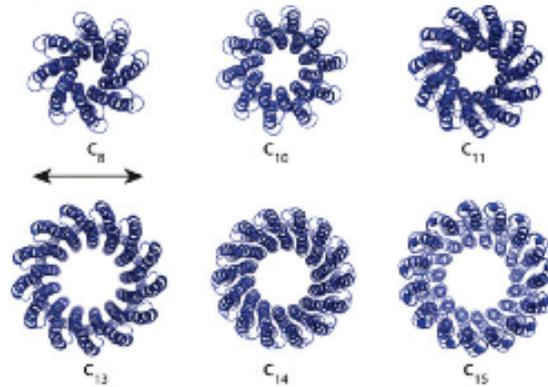


Figure 16

Structures de l'anneau de *c* de l'ATP synthase. Sections transversales vues depuis le secteur F₁ de l'enzyme intacte, de l'anneau de sous-unités *c* d'ATP synthase de différentes origines. Les anneaux proviennent des espèces suivantes : C₈ : mitochondrie de bœuf (Watt *et al.* 2010) ; C₁₀ mitochondrie de *S. cerevisiae* (Stock *et al.* 1999) ; C₁₁ *Ilyobacter tartaricus* (Meier *et al.* 2005) ; C₁₃ *Caldalkalibacillus thermarum* (Matthies *et al.* 2009) ; C₁₄ chloroplaste de l'épinard (Vollmar *et al.* 2009) ; C₁₅ *Spirulina platensis* (Pogoryelov *et al.* 2009; Walker 2013).

Le monomère de *c*/Atp9p a une structure en épingle à cheveux formée par deux hélices α transmembranaires reliées par une boucle extramembranaire de résidus polaires situés à la face matricielle de la membrane interne (Dmitriev *et al.* 1999; Fillingame *et al.* 2002). Ces boucles interagissent avec la tige centrale. L'anneau de sous-unité *c*/Atp9p est en interaction avec la sous-unité *a*/Atp6p. En l'absence d'une structure complète de l'ATP synthase à haute résolution, l'organisation du canal à protons n'est pas connue. La structure de la sous-unité Atp6p chez *S. cerevisiae* serait organisée en cinq hélices α transmembranaires. Deux des traverses seraient positionnées en face d'une sous-unité *c*/Atp9p. Chez *E. coli*, deux résidus sont considérés comme essentiels au fonctionnement du canal à protons : Arg210 de la sous-unité *a* (Arg186 de la sous-unité Atp6p de levure) et Asp61 de la sous-unité *c* (Glu59 de la sous-unité Atp9p de levure) (Fillingame 1997; Valiyaveetil et Fillingame 1997; Cain 2000; Fillingame *et al.* 2002). Ces deux résidus sont situés à proximité l'un de l'autre (Jiang et Fillingame 1998). La rotation de l'anneau de sous-unités *c* serait le fait de protonations et déprotonations successives du résidu *c*-Asp61 (Fillingame *et al.* 2003). Deux demi-canaux permettent l'accessibilité des protons à Asp61 qui est situé au centre de la membrane. L'un

acheminant les protons du périplasme à Asp61, l'autre les conduisant de Asp61 vers le cytosol (Vik et Antonio 1994; Rastogi et Girvin 1999; Angevine *et al.* 2003).

En l'absence d'une structure précise de l'enzyme contenant la sous-unité *a*, le mécanisme de transport des protons et son couplage à la rotation de l'anneau de *c* est difficile à établir. Plusieurs modèles ont été proposés. Je me limite à présenter ici le modèle établi par le groupe de Fillingame.

1.2.1.2.1.1 Modèle de translocations des protons selon Fillingame

Récemment, le groupe de Fillingame a proposé un modèle du fonctionnement du canal à protons de l'ATP synthase (Fillingame et Steed 2014). Selon ce modèle, les protons seraient acheminés du côté périplasmique à *c*-Asp61 par un demi-canal formé d'un faisceau de 4 hélices transmembranaires de la sous-unité *a*. Les auteurs proposent un mécanisme où la liaison et la libération du proton à *c*-Asp61 auraient lieu grâce à des mouvements conformationnels de l'hélice transmembranaire portant *a*-Arg210. Le demi-canal cytoplasmique serait constitué quant à lui de résidus situés à l'interface des sous-unités *a* et *c* ainsi que dans les boucles extramembranaires de ces sous-unités.

1.2.1.2.1.1.1 Le demi-canal périplasmique est situé au centre d'un faisceau de 4 hélices transmembranaires de la sous-unité a.

La conformation et les interactions entre les hélices transmembranaires (TMH) de la sous-unité *a* ont été définies par pontage entre des résidus cystéines substitués aux résidus de la séquence sauvage (Schwem et Fillingame 2006) (Figure 17, page 38). L'emploi d'ions Ag^+ et Cd^{2+} permet de mimer l'accessibilité d'un compartiment à l'ion H_3O^+ et de définir le canal hydrophile. La sensibilité à ces métaux des résidus cystéines substitués est ensuite déterminée en suivant l'inhibition de l'activité de l'ATP synthase. Une inhibition de cette activité permet d'extrapoler les résidus exposés au passage des ions H_3O^+ . Par cette approche, les auteurs ont localisé le demi-canal périplasmique au centre d'un faisceau formé par 4 hélices transmembranaires de la sous-unité *a*, impliquant les résidus (pour les plus sensibles) 119, 120, 215, 214, 249 et 252 (Figure 17, page 38 et Figure 18, page 38). Par ailleurs, la substitution *a*-Asn214Cys accroît également l'accessibilité aux Cd^{2+} (Dong et Fillingame 2010), mais seulement à partir du périplasme, ce qui met en évidence le rôle de ce résidu dans la canalisation des H^+ provenant du demi-canal périplasmique vers *c*-Asp61.

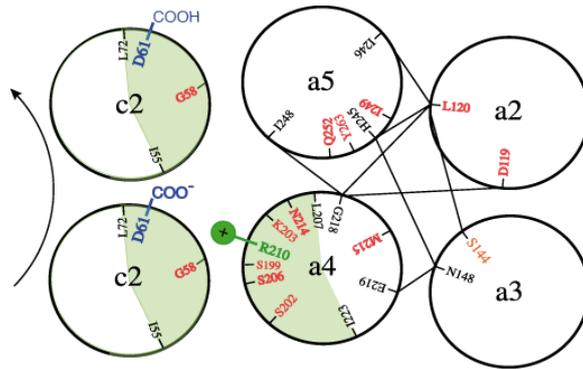


Figure 17

Positions des résidus sensibles à l'Ag⁺ dans les régions transmembranaires de la sous-unité *a* et des interactions possibles avec les hélices périphériques de l'anneau de *c* vue depuis le cytoplasme. *c*-Asp61 est représenté en bleu, *a*-Arg210 en vert. Les résidus cystéines substitués montrant une inhibition de 90 % de l'activité ATP synthase en présence d'Ag⁺ sont montrés en rouge. Les aires vertes représentent les faces réticulables de *a*-TMH4 avec *c*-TMH2. Les huit pontages qui se forment à un rendement élevé entre les paires de cystéines introduites dans les différentes hélices transmembranaires de la sous-unité *a* sont indiqués par des lignes entre les résidus (Schwem et Fillingame 2006). La prédiction de repliement de l'hélice transmembranaire de la sous-unité *c* avec les hélices transmembranaires 4 et 5 de la sous-unité *a* est également basée sur des pontages (Jiang et Fillingame 1998; Moore et Fillingame 2008). La flèche indique la direction de rotation de l'anneau de *c* durant la synthèse d'ATP (Dong et Fillingame 2010).

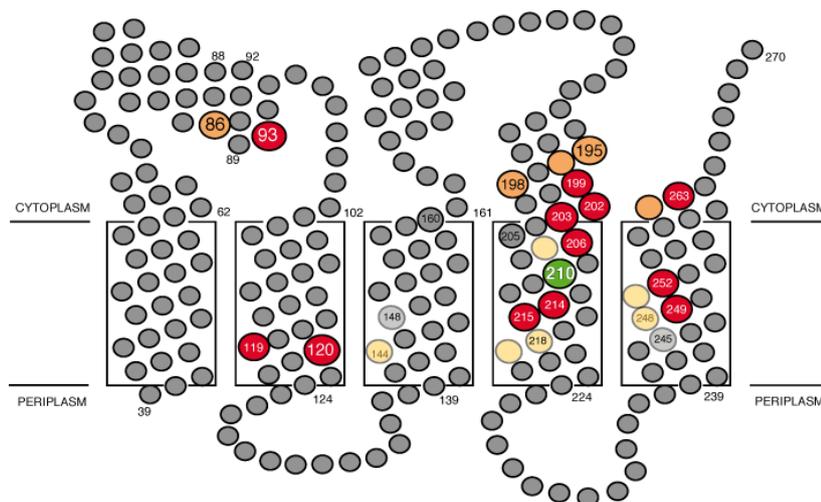


Figure 18

Topologie prédite de la sous-unité *a* dans la membrane interne de *E. coli*. L'emplacement de la plupart des substitutions cystéine sensibles à l'Ag⁺ est coloré en rouge (inhibition supérieur à 85 %) et certains des résidus plus modérément sensibles sont colorés en orange (de 66 à 85 % d'inhibition). Le résidu Arg210 est coloré en vert. Les hélices transmembranaires 1 à 5 (de gauche à droite) sont représentées par des encarts à l'intérieur de la bicouche lipidique. Les boucles périplasmiques 1-2 et 3-4 s'étendent à partir de l'extrémité C-terminale de TMH1 à l'extrémité N-terminale de TMH2, et à partir de l'extrémité C-terminale de TMH3 à l'extrémité N-terminale de TMH4, respectivement. Cette figure est modifiée à partir de celle montrée dans la référence suivante (Moore *et al.* 2008).

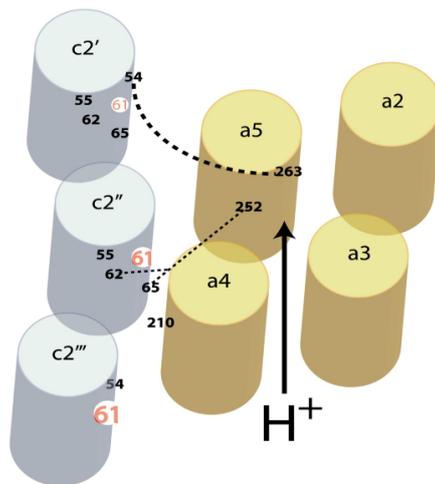


Figure 19

Topologie des résidus des sous-unités *a* et *c* dont la réticulation est promu par l'acidification du demi-canal périplasmique. Le faisceau formé par les 4 hélices transmembranaires de la sous-unité *a* est en jaune, la deuxième hélice transmembranaire de la sous-unité *c* sont en bleu. Le résidu Asp61 est représenté en rouge. L'acidification du demi-canal périplasmique formé par le faisceau de quatre hélices de la sous-unité *a* promeut le pivotement des hélices transmembranaires 4 et 5 et facilite le pontage des résidus Cys252 et Cys263 de *a*-TMH5 avec les substitutions cystéines de la face périphérique de l'anneau de *c*. Les liaisons transversales *a*-Cys263/*c*-Cys54, *a*-Cys252/*c*-Cys62 et *a*-Cys252/*c*-Cys65 sont indiquées par des lignes discontinues (Moore et Fillingame 2008).

1.2.1.2.1.1.2 Les rotations des hélices transmembranaires et la canalisation des H^+ du demi-canal de l'espace périplasmique à *c*-Asp61.

Le pontage entre trois paires de substitution cystéine dans *a*-TMH4 et *c*-TMH2 est favorisé par une baisse du pH (Figure 19, page 39). L'utilisation de 10 autres paires cystéine entre *a*-TMH5 et *c*-TMH2 ne montre pas de pontage activé par l'acidification du milieu. Le pontage serait rendu possible par la rotation dans le sens horaire de *a*-TMH5 ce qui amène les résidus *a*-Cys263 et *a*-Cys252 à proximité des résidus cystéine de *c*-TMH2 auxquels ils se lient. Les auteurs proposent que les hélices transmembranaires 4 et 5 de la sous-unité *a* pivotent sur leur axe en réponse à une acidification du demi-canal périplasmique formé par le faisceau des hélices de la sous-unité *a*. Cela crée un « sas » à l' H^+ venant du demi-canal périplasmique qui permet ensuite la protonation de *c*-Asp61 (Moore et Fillingame 2008). Pour déterminer la nécessité de ce mouvement de pivot des hélices transmembranaires pour le fonctionnement de l'ATP synthase, les auteurs ont réalisé des pontages *a*-TMH2 ou *a*-TMH4

à *a*-TMH5 grâce à des substitutions cystéine localisées au milieu de la bicouche lipidique et ont ensuite testé la fonctionnalité de l'enzyme. En l'absence de réticulation, la fonction de pompage des H⁺ est peu affectée par la modification des résidus en cystéine. Le pontage des paires *a*-Gly218Cys (TMH4) et *a*-Ile248Cys (TMH5), ou *a*-Leu120Cys (TMH2) et *a*-His245Cys (TMH5), inhibe de 85 à 90 % le pompage d'H⁺ (Figure 17, page 38) (Moore et Fillingame 2013). L'inhibition d'activité observée après pontage est compatible avec l'hypothèse de rotation des hélices transmembranaires de la sous-unité *a* lors de la canalisation des H⁺ du périplasma à *c*-Asp61. Ce mouvement provoque l'éloignement de *a*-Arg210 par rapport à *c*-Asp61 pour permettre la protonation de *c*-Asp61 par un H⁺ venant du demi-canal périplasmique. Les auteurs suggèrent que les rotations de *a*-TMH4 dans le sens anti-horaire et de *a*-TMH5 dans le sens horaire déplacent les résidus Asn215 de TMH4 et Gln252 de TMH5 à proximité de *c*-Asp61. Cela fournit un accès à un H⁺ provenant du demi-canal périplasmique lui permettant de protoner le résidu *c*-Asp61. La protonation de *c*-Asp61 serait facilitée par la rupture du pont salin avec *a*-Arg210, du fait du pivotement de *a*-TMH4 dans le sens antihoraire entraînée par la présence de l'H⁺ (Figure 20, page 41).

1.2.1.2.1.1.3 Libération des H⁺ de *c*-Asp61 dans le demi-canal cytoplasmique.

Les protons libérés dans le demi-canal cytoplasmique s'écouleraient grâce à une voie aqueuse située principalement à l'interface entre les sous-unités *a* et *c*. Une voie putative a été définie par les résidus sensibles à l'Ag⁺ et au Cd²⁺ (Figure 18, page 38 et Figure 21, page 42). Les résidus sensibles à l'Ag⁺ entourant Asp61 comprennent des résidus qui sont orientés vers *c*-TMH1. Une structure récente de l'anneau de *c* de levure a révélé la présence de molécules d'eau entre hélices à cette interface (Symersky *et al.* 2012). Cette présence aqueuse peut expliquer la sensibilité à l'Ag⁺. Lorsque le site de liaison est à l'état ouvert, l'Ag⁺ y trouve probablement un accès (Angevine *et al.* 2003). L'emploi de Cd²⁺, un composé ne pénétrant pas la membrane, montre un accès plus limité à ces résidus. Les seules cystéine transmembranaires sensibles au Cd²⁺ sont situées aux positions 28 dans *c*-TMH1 et 57-59 et 63 dans *c*-TMH2 (Steed et Fillingame 2009).

Le demi-canal cytoplasmique implique trois résidus dont les substitutions cystéine sont uniquement sensibles à l'inhibition par un composé s'y fixant : le N-éthylmaléimide (NEM). Il s'agit de Gly58Cys dans la sous-unité *c* et Ser206Cys et Asn214Cys dans la sous-unité *a* (Angevine et Fillingame 2003; Steed et Fillingame 2008; Steed et Fillingame 2009). Ce sont

les seules substitutions cystéine sensibles au NEM dans les sous-unités *a* et *c*, ce qui suggère qu'elles se trouvent dans une même cavité entourant le carboxylate de *c*-Asp61.

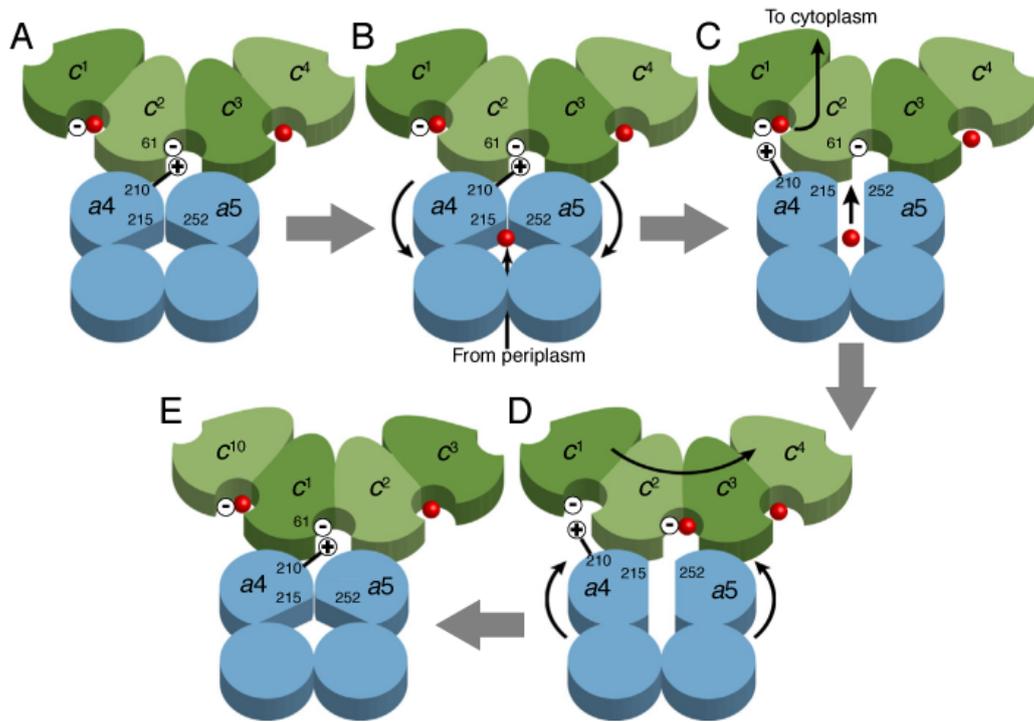


Figure 20

Fonctionnement du canal à protons selon le modèle de Fillingame et Steed. Ce modèle montre comment les changements dans les interactions transmembranaires à l'interface des sous-unité *a*-*c* favorisent la translocation d'un H^+ avec le mouvement de rotation par pas de 36° de l'anneau de *c*. L'anneau périphérique de *c*-TMH2 (en vert), numérotées de 1 à 4, est représenté dans une conformation proche des TMH4 et TMH5 de la sous-unité *a* (en bleu). A : état initial avec *a*-Arg210 en liaison ionique avec *c*-Asp61 suivant la sortie de H^+ vers le cytoplasme et le mouvement couplé du rotor de l'anneau de *c* dans le cycle précédent. B : entrée d'un H^+ dans le demi-canal périplasmique suivie par le pivotement hélicoïdale de *a*-TMH4 et *a*-TMH5 ouvrent l'accès à H^+ à *c*-Asp61. C : le pivotement de *a*-TMH4 conduit à la formation d'une liaison ionique entre *a*-Arg210 et *c*-Asp61 (en *c*1) et la libération de l' H^+ lié vers le demi-canal cytoplasmique, alors que simultanément, *c*-Asp61 (en *c*2) est protoné à partir du périplasm. D : le pivotement de *a*-TMH4 et *a*-TMH5 à leurs positions d'origine conduit à la rotation de l'anneau de *c* dans le sens anti-horaire de sorte que *c*-TMH2 (en *c*1) prend la position de *c*-TMH2 (en *c*2) à l'état initial. E : état final, équivalent à l'état A, après une translocation d'un H^+ et un mouvement de rotation de 36° de l'anneau de *c* (Fillingame et Steed 2014).

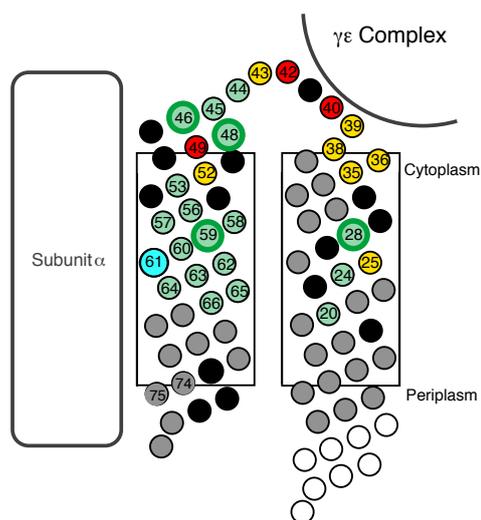


Figure 21

Représentation des résidus sensibles au métal de la sous-unité c. Les TMH des sous-unités c sont représentées dans des encarts s'étendant du côté périplasmique à la face cytoplasmique de la bicouche lipidique. Les résidus cystéines sensibles à l'Ag⁺ montrés comme accessibles à l'eau sont de couleur verte. Dans ces cas, l'inhibition par l'Ag⁺ est annulée par le traitement au DTT au moins à 75 %. Les résidus entourés par des cercles de couleur vert foncé interviennent directement dans la translocation passive des H⁺ par le F_O. Les résidus cystéines en rouge sont considérés comme étant impliqués dans le couplage entre le F₁ et le F_O, et dans ce cas, le traitement à l'Ag⁺ provoque la dissociation de F₁ du complexe et l'inhibition de l'activité n'est pas supprimée par le traitement au DTT. Les résidus cystéines de couleur jaune ont un mécanisme d'inhibition par Ag⁺ incertain, compatibles avec un décrochage du F₁ et l'inhibition par l'Ag⁺ n'est que partiellement inversée par le DTT. Les substitutions cystéines colorées en noir ne sont pas actives, comme c'est le cas pour la substitution Asp61Cys (en bleu). Les substitutions cystéines colorées en gris sont relativement insensibles au traitement à l'Ag⁺, et les substitutions cystéines non réalisées sont représentées en blanc. Les substitutions cystéines en positions 74 et 75 sont pensées comme formant des liaisons transversales avec les cystéines de la sous-unité c voisines en réponse au traitement à l'Ag⁺, conduisant à une perte de fonction (Steed et Fillingame 2014).

1.2.1.2.1.1.4 Canalisation des H⁺ au cytoplasme via des interactions avec les boucles extra-membranaires des sous-unités a et c.

La voie de sortie de la membrane interne des H⁺ se poursuit dans des domaines cytoplasmiques s'étendant au-delà de la surface de la bicouche lipidique. Sur la base de la réversibilité par traitement au DTT de l'inhibition à l'Ag⁺ de résidus substituée par la cystéine, les résidus 44, 45, 46 et 48 de la boucle polaire de la sous-unité c semblent impliqués dans la translocation des protons (Figure 21, page 42). Les résidus 46 et 48 sont également sensibles à l'inhibition par le Cd²⁺ (Steed et Fillingame 2014).

Les parties cytoplasmiques de la sous-unité a semblent également participer à la canalisation des protons vers le cytoplasme. L'inhibition par le Cd²⁺ de la translocation des H⁺ à travers le F_O a été montrée pour les résidus cystéine 199 et 202 de la boucle 3-4 et la cystéine en 263 du domaine cytoplasmique de a-TMH5 (Figure 18, page 38). Les substitutions cystéine sensibles à l'Ag⁺ aux positions 93, 195, 196 et 203 sont également

considérées comme participant directement à la translocation des protons. Dans chacun de ces cas, les effets inhibiteurs de l'Ag⁺ ou du Cd²⁺ ont pu être annulés par le DTT. La substitution *a*-M93C dans la boucle cytoplasmique 1-2 a été montrée comme pouvant ponter avec *a*-L195C dans la région cytoplasmique de la boucle 3-4. Ces résidus sensibles à l'Ag⁺ semblent interagir dans un domaine unique pour le transport de protons au niveau du cytoplasme (Moore *et al.* 2008). Des expériences antérieures avec des agents de pontage photo-activables indiquent une proximité de la boucle 3-4 de la sous-unité *a* aux régions cytoplasmiques de la sous-unité *c* (Zhang et Vik 2003).

1.2.1.2.1.1.5 Comment les mouvements des hélices provoqués par le transport d'H⁺ dans la sous-unité a conduisent à la rotation de l'anneau de c ?

Le modèle de Fillingame propose que les mouvements de pivotement à l'interface *a*/anneau de *c* peuvent être couplés à une rotation de l'anneau de *c* par pas de 36° pour chaque proton transféré (Figure 20, page 41). La force protomotrice entraînerait le pivotement initial des hélices *a*-TMH4 et *a*-TMH5 avec en conséquence la translocation de protons dans le cytoplasme. A l'étape suivante, *a*-TMH4 et *a*-TMH5 reviennent à leur position initiale, ce qui générerait un couple suffisant pour déplacer l'anneau de *c* de 36° et permettrait une nouvelle série d'interactions avec la prochaine sous-unité *c* dans l'anneau et la sous-unité *a* dans une conformation identique à celles du départ. La question de la génération du couple permettant la rotation n'est pas résolue.

Récemment, la première détermination de la structure entière de l'ATP synthase de *Thermus thermophilus* à moyenne résolution a été réalisée par cryomicroscopie (Lau et Rubinstein 2012). La résolution est suffisante pour distinguer les hélices α des parties membranaires des sous-unités homologues à *a* et *c*. L'homologue de la sous-unité *c* est ici plus complexe que chez *E. coli* avec ce qui s'apparente à une organisation en 2 faisceaux de 4 hélices transmembranaires. Malgré cette divergence et en accord avec le modèle de Fillingame, la structure obtenue montre une proximité entre 2 hélices transmembranaires de l'homologue de la sous-unité *a* et l'hélice transmembranaire externe de l'homologue de la sous-unité *c* (Figure 22 panneaux c et d, page 44).

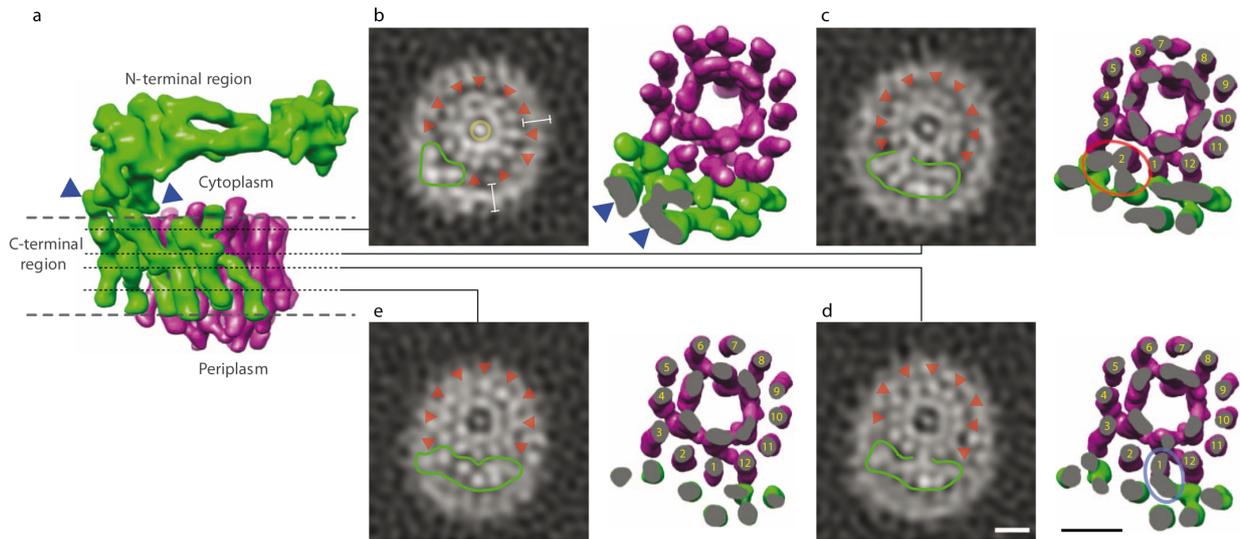


Figure 22

Structure de la région membranaire de l'ATP synthase de *T. thermophilus*. (a) Les sections de l'anneau L₁₂, homologue de *c*, (en magenta) et sous-unité I, homologue de *a*, (en vert) montrent de multiples contacts entre les régions N- et C-terminales de la sous-unité I (flèches bleues). (b) Sections transversales à travers la reconstitution (panneau de gauche) et carte segmentaire correspondante (panneau de droite) montre la sous-unité I séparée de l'anneau L₁₂ près du cytoplasme. Les hélices externes de l'anneau L₁₂ sont indiquées (flèches rouges) et les hélices transmembranaires de la sous-unité I sont entourées en vert. Les sections montrent les micelles du détergent (barre blanche), le détergent ou des lipides dans le centre de l'anneau L₁₂ (cercle jaune). (c) Près du milieu de la membrane, la sous-unité I est en contact avec une sous-unité L, probablement formant l'extrémité du demi-canal cytoplasmique (encerclé en rouge dans le panneau de droite). (d) A environ 6 Å de distance le périplasm la sous-unité I est en contact avec une autre sous-unité L, formant probablement l'extrémité membranaire du demi-canal périplasmique (encerclé de bleu dans le panneau droit). (e) La sous-unité I est séparée de l'anneau L₁₂ près du cytoplasme. Barre d'échelle : 25 Å (Lau et Rubinstein 2012).

1.2.1.2.2 La partie stator

Les sous-unités de la partie stator du F₀ mitochondrial de levure qui sont essentielles à la synthèse d'ATP sont Atp6p, Atp8p, OCSP, Atp4p, *d*, *h*, et *f* (Rubinstein *et al.* 2003). Je décris ci-après ce que l'on sait de leur organisation (voir Tableau 1, page 47 pour les sous-unités des différentes ATP synthases).

1.2.1.2.2.1 Le pied périphérique

Comme son nom l'indique le pied périphérique se trouve en périphérie de l'ensemble formé par le F₁, et rejoint la sous-unité Atp6p (Figure 23, page 45) (Collinson *et al.* 1994).

Sa fonction serait d'empêcher l'hexamère $\alpha_3\beta_3$ d'être entraîné par la rotation de γ lors de la catalyse (Collinson *et al.* 1996). Il pourrait également permettre de maintenir la sous-unité Atp6p en contact avec l'anneau d'Atp9p.

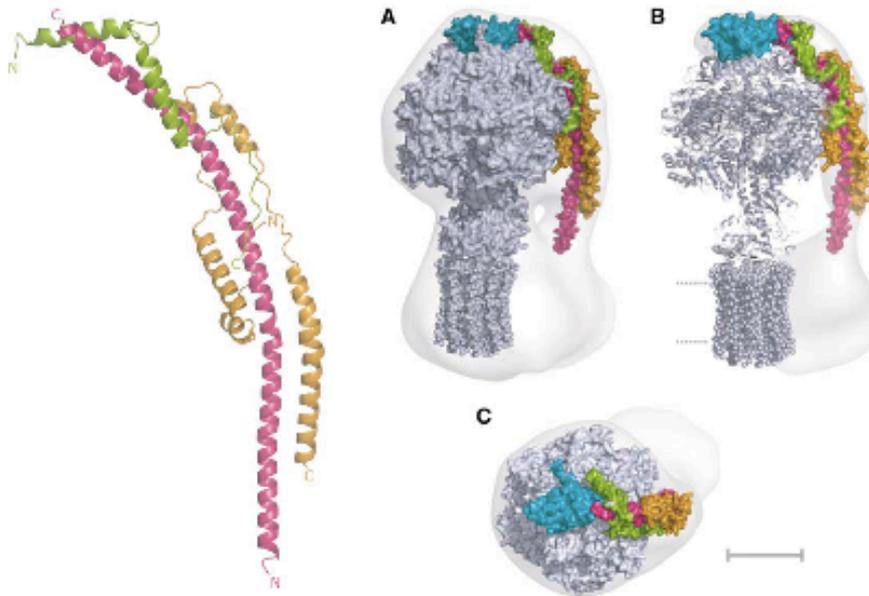


Figure 23

Modèle du pied périphérique bovin. A gauche : modèle de structure du sous-complexe du pied périphérique de l'ATP synthase mitochondriale de bovin. La structure est ici partielle et est composée des résidus 79-183 de la sous-unité *b* (en magenta), des résidus 3-123 de la sous-unité Atp4p (en orange) et des résidus 5-70 de F6 (en vert). A droite : structure composite de l'ATP synthase mitochondriale de bovin. La structure détaillée du complexe F_1c_{10} est en gris. Le domaine N-terminale d'OSCP (en cyan) et le pied périphérique (magenta, orange et vert) sont ajustés manuellement dans une carte de densité électronique obtenue par cryomicroscopie. (A) Vue de côté (B) La densité résiduelle non couverte par une structure correspond à la partie membranaire du pied périphérique et aux sous-unités complétant le stator (Rubinstein *et al.* 2003). Les lignes en pointillés représentent la bicouche lipidique. (C) vue de dessus du domaine catalytique du F_1 . La barre d'échelle représente 50 Å (Dickson *et al.* 2006).

Dans l'ATP synthase mitochondriale de bœuf, le pied périphérique est constitué de copies uniques de OSCP (*Oligomycin Sensitivity Conferral Protein*), Atp4p (ou *b*), Atp7p (ou *d*) et *F6* (*Coupling Factor 6* ou sous-unité *h* chez la levure) (Collinson *et al.* 1994; Collinson *et al.* 1996; Walker et Dickson 2006). Dans l'ATP synthase de levure, la sous-unité OSCP et l'extrémité C-terminale de la sous-unité *b*/Atp4p sont en contact direct avec la tête catalytique F_1 via la région N-terminale de la sous-unité α . OSCP interagit via son domaine C-terminal

avec le domaine N-terminal de la sous-unité *b*/Atp4p laquelle interagit avec les sous-unités *d* et F6 (*h* chez la levure) (Collinson *et al.* 1994). L'extrémité de la sous-unité Atp4p comporte deux hélices α ancrant le pied périphérique dans la membrane interne de la mitochondrie. Des études de pontage suggèrent que le coté C-terminal d'Atp4p est en contact avec les sous-unités *d*, *h* et OSCP (Soubannier *et al.* 1999).

La composition protéique de l'ATP synthase diffère chez les chloroplastes et les bactéries où OSCP est présent sous la forme de son homologue δ , et la sous-unité Atp4p est présente en deux copies identiques ou homologues, *b* et *b'* (Dickson *et al.* 2006). Les sous-unités « surnuméraires » *d* et *h* mitochondriales sont supposées remplir le rôle du domaine extramembranaire d'une de ces sous-unités (Collinson *et al.* 1994; Fillingame et Dmitriev 2002).

1.2.1.2.3 Autres sous-unités constituant le F_O

D'autres sous-unités du secteur F_O ne faisant pas partie du canal à proton ou du pied périphérique de l'enzyme sont décrites ici.

1.2.1.2.3.1 Sous-unité *f*

La sous-unité *f* (Spannagel *et al.* 1997) comporte un segment transmembranaire et est essentielle à l'activité ATP synthase de l'enzyme (Velours *et al.* 2000).

1.2.1.2.3.2 Atp8p

La sous-unité Atp8p est dotée d'un seul segment transmembranaire et est présente en une seule copie au sein de l'enzyme. Des expériences de pontage chimique indiquent une proximité avec la sous-unité Atp6p, et les sous-unités Atp4p, *d* et *f* du pied périphérique (Stephens *et al.* 2003). Son rôle exact n'est pas connu mais sa présence est essentielle à l'activité et à l'assemblage de l'ATP synthase.

Secteur	Fonction	<i>E. coli</i>	Chloroplaste	<i>B. taurus</i>	<i>S. cerevisiae</i>	
					Protéine	Gène
F ₁	Stator	α	α	α	α	<i>ATP1</i>
		β	β	β	β	<i>ATP2</i>
	Rotor	γ	γ	γ	γ	<i>ATP3</i>
		ε	ε	δ	δ	<i>ATP16</i>
		-	-	ε	ε	<i>ATP15</i>
F ₀	Pied périphérique	<i>d</i>	<i>d</i>	OSCP	OSCP	<i>ATP5</i>
	Stator/canal à protons	<i>a</i>	<i>a</i>	Atp6p	Atp6p	<i>ATP6</i>
	Stator	-	-	Atp8p	Atp8p	<i>ATP8</i>
	Rotor/canal à protons	<i>c</i>	<i>c</i>	Atp9p	Atp9p	<i>ATP9</i>
	Pied périphérique	<i>b</i>	<i>b b'</i>	Atp4 /b	Atp4p	<i>ATP4</i>
	Pied périphérique	-	-	<i>d</i>	<i>d</i>	<i>ATP7</i>
	Pied périphérique	-	-	<i>F6</i>	<i>h</i>	<i>ATP14</i>
	Stator	-	-	<i>f</i>	<i>f</i>	<i>ATP17</i>
Protéines associées	Dimérisation	-	-	<i>e</i>	<i>e</i>	<i>ATP21/TIM11</i>
	Dimérisation	-	-	<i>g</i>	<i>g</i>	<i>ATP20</i>
	Dimérisation			<i>s</i>	-	-
	Dimérisation	-	-	-	<i>i/j</i>	<i>ATP18</i>
	Associée à la dimérisation	-	-	-	<i>k</i>	<i>ATP19</i>
	Inhibition de l'activité ATPasique	-	-	IF1	Inh1p	<i>INH1</i>
					Stf1p	<i>STF1</i>
		-	-		Stf2p	<i>STF2</i>
-		-		Stf3p	<i>STF3</i>	

Tableau 1

Liste des sous-unités de l'ATP synthase présentes chez *E. coli*, le chloroplaste, *B. taurus* et *S. cerevisiae*. Chez *E. coli* 2 sous-unités *b* identiques sont présentes dans l'ATP synthase, chez le chloroplaste et certains types bactériens, 2 sous-unités homologues mais non identiques *b* et *b'* sont présentes (Ackerman et Tzagoloff 2005; Devenish *et al.* 2008; Habersetzer *et al.* 2013).

1.2.1.3 Sous-unités non essentielles à la respiration

Alors que l'ATP synthase bactérienne est exclusivement sous forme monomérique, les ATP synthases mitochondriales de plusieurs espèces sont retrouvées sous formes dimérique et oligomérique (Figure 24, page 48). Allen a fait l'hypothèse que la forme en cône des dimères de l'ATP synthase est responsable de la courbure de la membrane interne conduisant à la formation des crêtes (Allen 1995). Une relation forte entre la présence d'oligomères d'ATP synthase et la formation des crêtes est maintenant acceptée. Le secteur F_0 de *S. cerevisiae* comporte plusieurs protéines non-essentiels à la croissance respiratoire : *e*, *g*, *i/j* et *k* (Arnold *et al.* 1998; Arnold *et al.* 1999; Vaillier *et al.* 1999). A l'exception de la sous-unités *k*, localisée dans l'espace intermembranaire, ces sous-unités ont chacune une traverse transmembranaire. La sous-unités *k* est associée aux dimères d'ATP synthase mais n'a pas de fonction connue. Les sous-unités *i/j*, *e* et *g*, avec les sous-unités du pied périphérique Atp4p et *h* (Fronzes *et al.* 2006), sont impliquées dans la formation des dimères et des oligomères d'ATP synthase (Arnold *et al.* 1998) (Figure 25, page 49). Les traverses intramembranaires de ces protéines sont considérées comme des interfaces hydrophobes permettant la connexion entre monomères. La délétion des sous-unités *e* et *g* aboutit à une désorganisation de la membrane mitochondriale interne (Paumard *et al.* 2002).

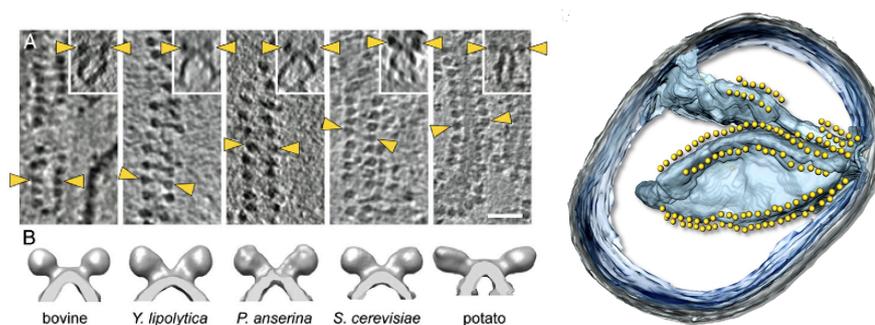


Figure 24

Visualisation des dimères et oligomères d'ATP synthase *in situ*. A gauche : Alignement de 5 espèces différentes. A : coupes tomographiques montrant l'arrangement linéaire d'ATP synthase dans des membranes mitochondriales de cœur de bœuf, de *Yarrowia lipolytica*, de *Podospora anserina*, de *Saccharomyces cerevisiae* et de pommes de terre. Encadré : vus de coté de chaque réseau montrant les dimères en relation avec la membrane. Les flèches jaunes indiquent le secteur F_1 d'un dimère. La barre d'échelle représente 50 nm. B : représentations de la surface obtenues par la moyenne des acquisitions. A droite : reconstruction tomographique d'une mitochondrie entière de *P. anserina* montrant un réseau d'ATP synthase dimérique (sphère jaune) au niveau des crêtes. En gris : membrane externe, en bleu : crête, en bleu transparent : membrane interne, en jaune : ATP synthase. La barre d'échelle représente 200 nm. Les dimères sont confinés aux extrémités les plus courbées des crêtes (Davies *et al.* 2011).

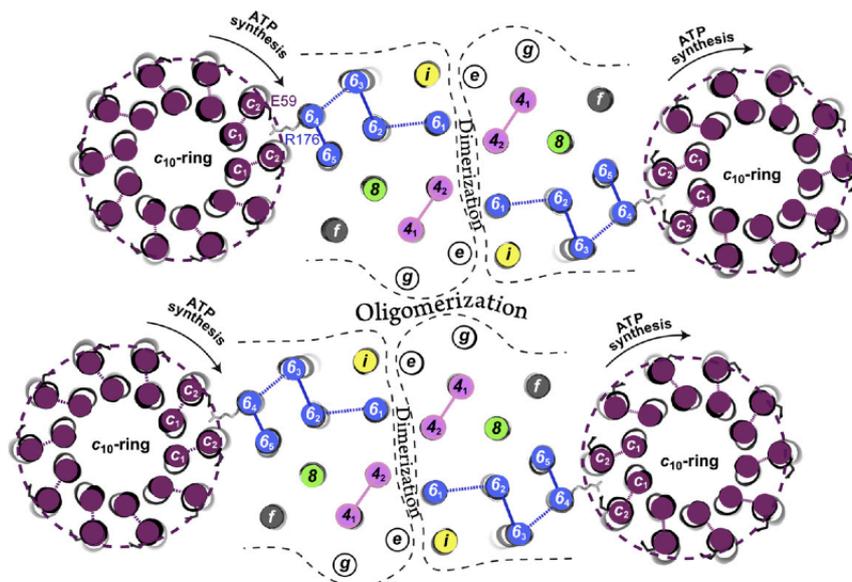


Figure 25

Modèle topologique des segments transmembranaires prédits et des interfaces dans un tétramère d'ATP synthase chez *S. cerevisiae*. L'anneau de sous-unités *c* est représenté avec la chaîne latérale du résidu Glu59. Les 5 traverses transmembranaires de la sous-unités *a* représentés ont été modélisés sur la base du modèle *ac*₁₂ d'*E. coli* (PDB : 1C17). Le modèle est complété par les deux traverses transmembranaires de la sous-unité Atp4p (*b*) et avec les traverses transmembranaires uniques des sous-unités *e*, *g*, *f*, *i*, et Atp8p. La position des sous-unités constituant le stator du F_O est basée sur les résultats de pontage entre sous-unités. La coupe est vue depuis l'espace intermembranaire. Les résidus conservés c-Glu59 et a-Arg176 impliqués dans la translocation des protons sont indiqués (Habersetzer *et al.* 2013).

1.2.1.4 Les protéines d'inhibition

L'ATP synthase est un système réversible capable d'hydrolyser de l'ATP et de coupler cette activité à un transport de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Lorsque la chaîne respiratoire n'est plus capable de générer un gradient de protons (en absence d'oxygène ou par perméabilisation de la membrane interne aux protons), une protéine vient inhiber l'activité d'hydrolyse de l'ATP synthase pour prévenir une consommation inutile d'ATP. Chez *E. coli* l'inhibition de l'activité ATPasique est assurée grâce à un changement de conformation de la sous-unité ϵ (Iino *et al.* 2009; Cingolani et Duncan 2011). Dans les mitochondries de bœuf cette fonction est assurée par un peptide, IF1 (Pullman et Monroy). Deux inhibiteurs existent chez *S. cerevisiae* : IF1 (Inh1p) et Stf1p (Matsubara *et al.* 1981; Hashimoto *et al.* 1983; Matsubara *et al.* 1983; Hashimoto *et al.* 1984). L'IF1 inhibe l'hydrolyse d'ATP en se liant au secteur catalytique de l'ATP synthase (Schwerzmann et Pedersen 1986). Les données de structure montrent que l'IF1 interagit avec les sous-unités α ,

β et γ (Robinson *et al.* 2013). IF1 et Stf1p sont des inhibiteurs réversibles, lorsque le potentiel de membrane est rétabli, ils sont tout deux libérés de l'ATP synthase (Venard *et al.* 2003).

De plus, l'IF1 bovin pourrait intervenir dans la dimérisation de l'ATP synthase. *In vitro*, IF1 est capable de se dimériser et de relier entre eux deux secteurs F_1 (Cabezón *et al.* 2000; Cabezón *et al.* 2003). Cette propriété ne semble pas être présente chez *S. cerevisiae*, car des mutants déficients en Inh1p ou Stf1p présentent des ATP synthases dimérisées (Dienhart *et al.* 2002).

Par ailleurs, les protéines Stf2p et Stf3p semblent faciliter la liaison de Inh1p et Stf1p au secteur F_1 (Hashimoto *et al.* 1990a; Hashimoto *et al.* 1990b; Yoshida *et al.* 1990; Hong et Pedersen 2002).

1.2.2 Biogenèse de l'ATP synthase

L'ATP synthase mitochondriale possède une origine génétique double, nucléaire et mitochondriale, chez la plupart des espèces. La biogenèse de l'ATP synthase nécessite l'action de protéines spécifiques, soit intervenant dans la synthèse des protéines codées par le génome mitochondrial soit ayant une action de chaperonnes pour la maturation et l'assemblage des sous-unités (Tableau 2, page 47).

1.2.2.1 Synthèse des sous-unités codées par le génome mitochondrial.

1.2.2.1.1 Expression des ARNm

Il ne semble pas exister de régulation transcriptionnelle gène-spécifique dans les mitochondries. Le contrôle de l'expression des gènes est essentiellement le fait de processus post-transcriptionnels et implique des facteurs soit généraux soit spécifiques régulant l'épissage, la maturation, la stabilité et la traduction des ARNm (Figure 26, page 52).

Facteurs	Fonction	Cible
Atp11p	Chaperonne	β
Atp12p	Chaperonne	α
Fmc1p	Chaperonne	Atp12p / α
Aep1p/Nca1p	Traduction	Atp9p
Aep2p/Atp13p	Traduction	Atp9p
Atp25p	Stabilisation ARNm et oligomérisation	Atp9p
Oxa1p	Assemblage	Atp9p
Atp10p	Assemblage	Atp6p
Atp23p	Maturation/Assemblage	Atp6p
Atp22p	Traduction	Atp6p
Nca2p	Stabilisation transcrit/traduction	Atp6p et Atp8p
Nca3p	Stabilisation transcrit/traduction	Atp6p et Atp8p
Ae3p	Stabilisation transcrit	Atp6p et Atp8p
Nam1p	Stabilisation transcrit	Atp6p et Atp8p
F ₁	Traduction	Atp6p et Atp8p
YJL147c	Putatif inhibiteur de traduction	Atp6p et Atp8p

Tableau 2

Liste de facteurs impliqués dans la biogenèse de l'ATP synthase de *S. cerevisiae*. L'action des facteurs Nam1p et Oxa1 n'est pas limitée à l'ATP synthase. YJL147c a été identifié comme un suppresseur du phénotype de diminution de synthèse d'Atp6p et d'Atp8p lors de l'absence de F₁ (Rak et al. 2011).

1.2.2.1.1.1 Transcription

Les sites d'initiation de la transcription dans les mitochondries de levure font intervenir une séquence spécifique de 9 nucléotides hautement conservés (Foury *et al.* 1998). (Christianson et Rabinowitz 1983) (Figure 26, page 52). Ces promoteurs nonanucléotidiques recrutent le cœur de l'ARN polymérase (Rpo41p) et les facteurs supplémentaires comme Mtf1p pour l'initiation de la synthèse de l'ARN (Jang et Jaehning 1991; Karlok *et al.* 2002).

(Biswas et Getz 1986). Le mécanisme de terminaison de la transcription dans les mitochondries de levure demeure mal connu.

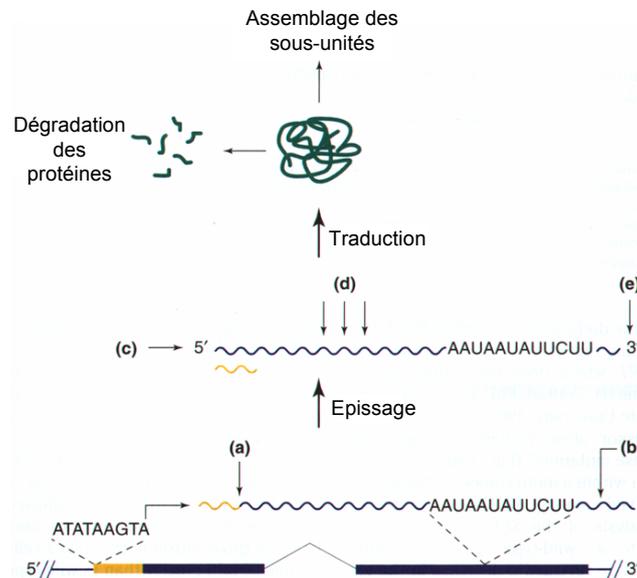


Figure 26

Points de contrôle de l'expression des gènes mitochondriaux chez *S. cerevisiae*. Les différents processus post-transcriptionnel qui affectent le niveau des ARN mitochondriaux et des protéines sont indiqués. La transcription s'initie de manière constitutive après la séquence nonancléotidique conservée. La figure montre un transcrit polycistronique contenant un intron (en bleu) et un gène en amont (en jaune), par exemple un gène codant un ARNt. (a) Un clivage endonucléolytique 3'-5' libère le gène en amont. (b) Une maturation en 3' près du dodécamère génère l'extrémité 3' de l'ARNm. L'épissage et le renouvellement déterminent l'abondance des ARNm mature. (c) Une séquence à l'extrémité 5' est requise pour la stabilité/traduction (d) La dégradation des ARN, et (e) l'extrémité 3' est nécessaire pour la stabilité/traduction. Des contrôles traductionnels, par exemple (c) par liaison des protéines au 5' UTR, (e) par reconnaissance de l'extrémité 3' de l'ARNm ou le renouvellement des protéines (dégradation), dicte l'abondance finale de la protéine assemblée dans des complexes fonctionnels (Margossian et Butow 1996).

1.2.2.1.1.2 Maturation et dégradation des ARN mitochondriaux

La plupart des transcrits mitochondriaux de *S. cerevisiae* sont synthétisés sous la forme d'unités polycistroniques, composée de combinaisons variables d'ARNr, ARNt et ARNm (Tzagoloff et Myers 1986), qui sont maturées pour libérer les ARN individuels correspondants à chaque gène.

Les introns sont épissés avec l'assistance de protéines maturases codées par les introns mitochondriaux et des gènes nucléaires qui interviennent soit spécifiquement dans l'épissage

d'un ARNm particulier soit comme facteurs généraux à l'épissage de multiples introns (Lipinski *et al.* 2010).

Les ARNt sont excisés à partir des ARNm polycistroniques précurseurs, puis maturés en 5' et 3'. Deux ribonucléases participent à ce processus : la RNase P (Rpm2p et ARN 9S) qui mature en 5' les ARNt (Hollingsworth et Martin 1986; Stribinskis *et al.* 1996), et probablement la RNase Z qui les mature en 3' (Chen *et al.* 2005).

La stabilité et la traduction des ARNm nécessitent des extrémités 5' et 3' correctement définies. L'ARNm d'*ATP6* dans le bicistron *ATP8-ATP6* est le seul ARNm dont l'extrémité 5' n'est pas maturée. Pour les autres ARNm la libération en 5' peut avoir lieu par le clivage d'un ARNt. La maturation en 3' des ARNm se fait en aval d'une séquence « dodécamère ». L'abondance des transcrits est contrôlée par 2 ribonucléases, le complexe mtEXO qui agit dans les sens 3'-5' et l'exonucléase Pet127p dans le sens 5'-3'.

Le complexe MtEXO est composé de l'hélicase ARN Suv3p et par la ribonucléase Dss1p (Dziembowski *et al.* 1998). L'inactivation de l'une ou l'autre de ces sous-unités conduit à une diminution de la dégradation des ARN, une accumulation des séquences introniques excisées, une augmentation des précurseurs non maturés. En conséquence, les transcrits matures sont moins abondants, et le génome mitochondrial est instable (Stepien *et al.* 1992; Dmochowska *et al.* 1995; Golik *et al.* 1995; Dziembowski *et al.* 2003; Rogowska *et al.* 2006). La libération et la maturation en 3' des transcrits codants pour des protéines est réalisée par clivage à proximité d'une séquence dodécamérique conservée : 5' AAUAA(U/C)AUUCUU 3' (Osinga *et al.* 1984; Zhu *et al.* 1987). L'extrémité 3' est située deux nucléotides après la fin de ce dodécamère (Hofmann *et al.* 1993). La présence d'un dodécamère intact semble être essentielle pour la stabilité et la traduction des ARNm (Butow *et al.* 1989). La protéine DBP (*Dodecamer Binding Protein*) se lie spécifiquement à l'ARN de la séquence dodécamérique (Li et Zassenhaus 1999; Li et Zassenhaus 2000). Il a été proposé que cette protéine (ou un complexe (Min et Zassenhaus 1993)) en interagissant avec le dodécamère protégerait le transcrit d'une dégradation rapide par le dégradosome mitochondrial (Li et Zassenhaus 1999; Li et Zassenhaus 2000).

Pet127p est associée à la membrane mitochondriale interne (Wiesenberger et Fox 1997). Sa délétion conduit à des défauts pléiotropes dans l'expression des gènes mitochondriaux (Wiesenberger et Fox 1997; Fekete *et al.* 2008). Sa surexpression abolit la

croissance respiratoire et aboutit à une perte de l'ADNmt (Wiesenberger et Fox 1997). Pet127 a tout d'abord été identifié comme un suppresseur de mutant de troncation de la partie C-terminale de Pet122p, requise pour la traduction de l'ARNm de *COX3* (Haffter et Fox 1992). De plus, des mutations dans *PET127* stabilisent les ARNm mitochondriaux de *COX3* dépourvus d'une région 5' terminale nécessaire à leur stabilité (Wiesenberger et Fox 1997).. Les protéines de stabilisation des ARNm et les activateurs traductionnels sont connus comme se liant aux 5' UTR des ARNm mitochondriaux (Wiesenberger et Fox 1997). Un exemple bien étudié concerne le gène *COB* du cytochrome *b* dont les transcrits sont stabilisés et traduits grâce à l'action de Cbp1p (Chen *et al.* 2005). Par ailleurs l'activité de Pet127p contribue à l'expression différentielle des gènes encodés au sein d'une unité polycistronique (gènes ARNt^{glu} et *COB*) (Krause et Dieckmann 2004), révélant l'importance de la dégradation des ARN dans le contrôle de l'expression des gènes mitochondriaux (Fekete *et al.* 2008).

1.2.2.1.2 Traduction mitochondriale

La transcription s'effectuerait à proximité de la membrane mitochondriale interne (Figure 27, page 55). Les ARNm seraient ensuite guidés vers la machinerie de traduction liée à la membrane interne. Rpo41p interagit avec la protéine Nam1p/Mtf2p qui aurait un rôle dans la maturation des transcrits primaires et dans l'adressage des ARNm à la surface de la membrane interne, conjointement avec deux autres protéines associées à la membrane, Sls1p et Rmd9p. Des mutations de l'ARN polymérase mitochondriale qui empêchent l'interaction avec Nam1p réduisent sévèrement la traduction, mais n'empêchent pas la synthèse et l'accumulation des ARNm (Rodeheffer et Shadel 2003). Les ARN néo-synthétisés semblent être directement transférés à Nam1p/Mtf2p à partir de l'ARN polymérase pour faciliter leur traduction (Fox 2012).

L'expression des ARNm mitochondriaux nécessite l'intervention d'activateurs traductionnels gène-spécifique (Figure 28, page 55). Ils reconnaissent spécifiquement le 5' UTR d'un ARNm mitochondrial, ils interagissent avec des protéines du ribosome, probablement pour initier la traduction, ils se lient à la membrane interne et de ce fait confine la traduction au voisinage de la membrane, ils sont généralement présents en quantités limitées et sont donc contrôlant, dans certains cas, ils peuvent rester liés aux chaînes polypeptidiques naissantes pour faciliter leur assemblage (Herrmann *et al.* 2013).

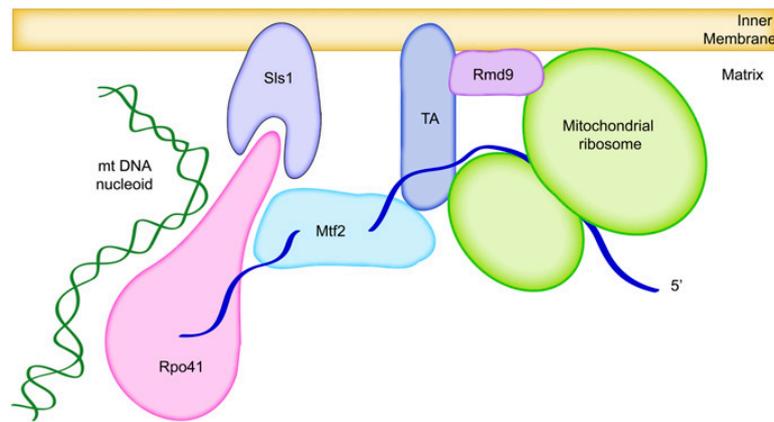


Figure 27

La traduction mitochondriale est effectuée à proximité de la membrane mitochondriale interne. Les ARNm codés par l'ADNmt sont conduits de l'ARN polymérase (Rpo41p) aux ribosomes liés à la membrane par Sls1p, Mtf2p, Rmd9p et les activateurs traductionnels spécifiques des ARN (TA). La figure ne suggère pas que les ARNm sont traduits dès qu'il émerge de l'ARN polymérase (Fox 2012).

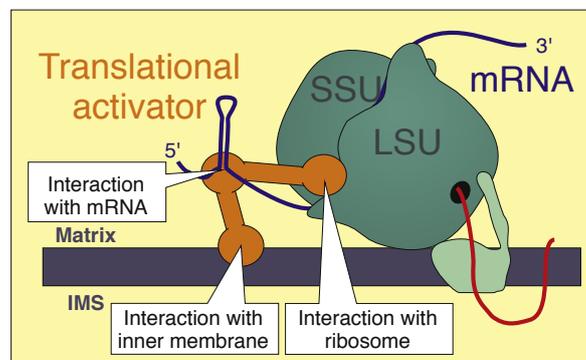


Figure 28

Les activateurs traductionnels interagissent avec différents composants. Les activateurs traductionnels interagissent généralement avec le 5' UTR des ARNm. Des interactions avec le ribosome, en particulier avec les protéines de la petite sous-unité ont été montrées. Les activateurs traductionnels sont souvent associés à la membrane, probablement pour restreindre leur activité à une région proche de la membrane interne. Le ribosome est lié à la membrane par interaction avec de nombreux facteurs proche du tunnel de sortie du polypeptide. (Herrmann *et al.* 2013).

1.2.2.1.3 Facteurs intervenant dans l'expression des sous-unités de l'ATP synthase codées par le génome mitochondrial

La biogenèse de l'ATP synthase dépend de l'action de protéines spécifiquement impliquées dans la synthèse des sous-unités Atp6p et Atp9p codées par le génome mitochondrial. Ces facteurs interviennent soit sur la stabilité et/ou la traduction de l'ARNm (activateur traductionnel), soit sur l'assemblage de leurs produits protéiques (Figure 29, page 56).

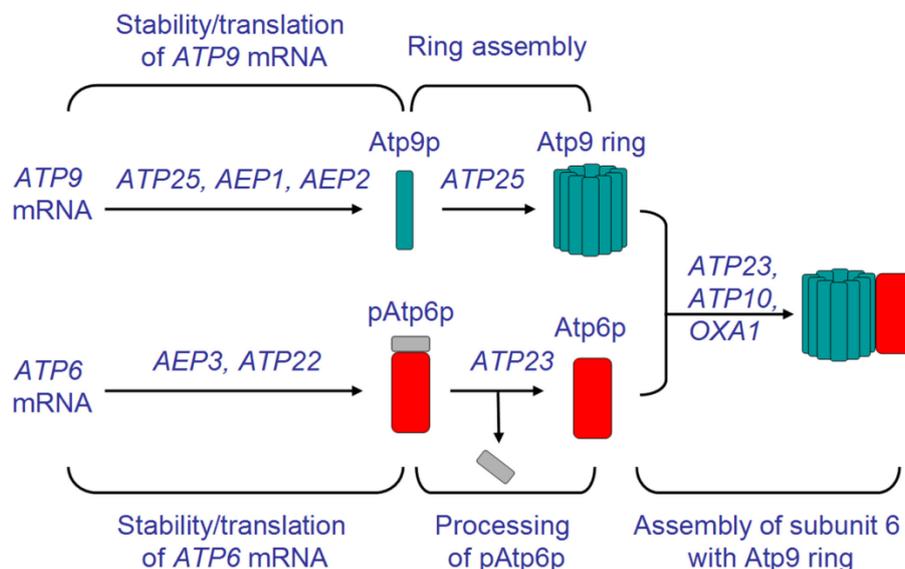


Figure 29

L'expression des sous-unités de l'ATP synthase codées par le génome mitochondrial dépend de nombreux facteurs nucléaires (Rak *et al.* 2009).

1.2.2.1.3.1 Facteurs intervenant dans la synthèse de la sous-unité Atp9p

Le gène *ATP9* est co-transcrit avec un gène d'ARNt^{ser} et *VARI*, à partir de 2 sites d'initiation localisés à 630 et 550 nucléotides de l'ATG initiateur d'*ATP9* (Figure 30, page 59). Le transcrit polycistronique est mûré en plusieurs étapes par des clivages endonucléotidiques pour produire l'ARNt^{ser} et les ARNm de *VARI* et d'*ATP9*. L'ARN

messager le plus abondant d'*ATP9* est long de 0,9 kb avec une séquence non traduite en 5' de 630 bases (Christianson et Rabinowitz 1983; Zassenhaus *et al.* 1984; Finnegan *et al.* 1991).

Trois protéines ont une action spécifique sur la synthèse d'Atp9p : Atp25p, Aep1p/Nca1p et Aep2p/Atp13p.

Atp25p est une protéine mitochondriale qui subit un clivage protéolytique, sans doute après son importation dans la mitochondrie. La partie N-terminale est nécessaire à l'oligomérisation d'Atp9p (voir plus loin), la partie C-terminale est nécessaire à la stabilisation de l'ARNm d'Atp9p. Dans un mutant thermosensible d'Atp25p, à température non permissive, alors que l'ARN à 1,5 kb contenant *ATP9* et l'ARNt^{ser} est présent en quantité normale, l'ARNm d'*ATP9* à 0,9 kb est indétectable (Zeng *et al.* 2008) (Figure 30, page 59). Il est possible qu'une abolition de la traduction d'Atp9p entraîne une déstabilisation de son ARNm. Cependant le mutant thermosensible montre une perte rapide de l'ARNm d'*ATP9* (1,5 à 4 h après le changement de température) et en parallèle, une diminution concomitante de la synthèse d'Atp9p. Les auteurs proposent donc que la partie C-terminale d'Atp25p soit nécessaire à la stabilisation de l'ARNm d'*ATP9*.

AEP2/ATP13 (ATPase ExPression 2) code pour une protéine mitochondriale (Finnegan *et al.* 1995) intervenant dans l'expression d'*ATP9* (Ackerman *et al.* 1991; Finnegan *et al.* 1991; Payne *et al.* 1991; Finnegan *et al.* 1995). Dans un mutant thermosensible (ts379), la synthèse d'Atp9p et d'Atp8p est pratiquement abolie ou absente, et la synthèse d'Atp6p est diminuée (Finnegan *et al.* 1991; Payne *et al.* 1991). Le mutant thermosensible *aep2* à température non permissive présente au cours du temps une diminution de la quantité d'ARNm *ATP9* à 0,9 kb ; le précurseur à 2,2 kb comportant l'ARNt^{ser} étant stable (Payne *et al.* 1991). Cela est aussi observé pour le cas d'un mutant null *aep2* où le transcrit *ATP9* à 0,9 kb est 2 à 3 fois moins abondant, alors que les transcrits précurseurs d'*ATP9* sont présents. La quantité des transcrits d'*ATP6* est identique à celle du sauvage (Ackerman *et al.* 1991). Malgré la présence résiduelle de 30 % d'ARNm mature d'*ATP9*, il n'y a pas de synthèse traductionnelle (Ackerman *et al.* 1991). L'effet sur la synthèse d'Atp6p et d'Atp8p serait un effet secondaire dû à une diminution de la quantité d'ARN *ATP6-ATP8* au cours du temps (Payne *et al.* 1991). Cette baisse spécifique du transcrit *ATP9* de 0,9 kb dans les mutants *aep2* peut être le fait d'une instabilité de ce transcrit, d'un blocage dans l'étape de maturation de l'ARN qui libère le transcrit de 0,9 kb ou d'une dégradation de l'ARN du fait d'une absence de traduction. Les auteurs proposent un rôle d'Aep2p dans la traduction, la baisse d'ARNm

serait un effet secondaire (Ackerman *et al.* 1991). Des révertants du mutant thermosensible *aep2* présentent une mutation ponctuelle t>c en -16 du codon d'initiation d'*ATP9* (Ellis *et al.* 1999). La présence de cette mutation à proximité de la zone traduite du gène suggère qu'*Aep2p* active la traduction et interagit directement avec le 5' UTR de l'ARNm d'*ATP9*.

Aep1p/Nca1p (*ATPase ExPression 1/Nuclear Control of ATPase 1*) est une protéine prédite comme étant mitochondriale (Payne *et al.* 1993; Ziaja *et al.* 1993). Son action sur *ATP9* est controversée. Une étude d'un premier mutant thermosensible (ts1305) montre une absence d'ARNm d'*ATP9* après 16 h à température restrictive alors que sa transcription *de novo* n'est pas affectée. Les auteurs proposent qu'*Aep1p/Nca1p* stabilise le messager d'*ATP9* (Ziaja *et al.* 1993). Dans une deuxième étude employant un autre mutant thermosensible (ts1860), après 14 h d'incubation à température restrictive, la synthèse d'*Atp8p* et d'*Atp9p* est absente et celle d'*Atp6p* est diminuée. La diminution de synthèse d'*Atp8p* et d'*Atp9p* n'est pas discernable avant 3 h et est complète à 5 h, la synthèse d'*Atp6p* n'est pas significativement touchée avant 7 h. La quantité de transcrit mature d'*ATP9* n'est que légèrement diminuée au bout de 7 h alors que sa traduction est absente. Les auteurs proposent qu'*AEPI/NCAI* ait un rôle dans la traduction d'*ATP9* (Payne *et al.* 1991). Les différences d'interprétation peuvent provenir des conditions expérimentales. Dans la première étude, la diminution de l'ARNm d'*ATP9* est observée au bout de 16 h. La seconde étude montre une absence de synthèse d'*Atp9p* au bout de 5 h. *AEPI/NCAI* serait un facteur traductionnel de l'ARNm d'*ATP9*. En absence de sa traduction, l'ARNm d'*ATP9* serait consécutivement dégradé.

1.2.2.1.3.2 Facteurs intervenant dans la synthèse des sous-unités *Atp6p* et *Atp8p*

ATP6 et *ATP8* sont co-transcrits avec *COX1* à partir d'un site situé 500 nucléotides en amont du codon d'initiation de *COX1* (de Zamaroczy et Bernardi 1986; Foury *et al.* 1998) (Figure 30, page 59). Selon les souches, l'unité polycistronique peut comprendre également *ENS2*, un gène codant pour une sous-unité d'une ADN endonucléase, en aval du gène *ATP6* (Nakagawa *et al.* 1991). Le transcrit primaire est clivé deux fois entre *COX1* et *ATP8*, libérant l'ARNm de *COX1* et deux ARN contenant *ATP8* et *ATP6*. Le premier site de clivage situé à proximité de l'extrémité 3' de l'ARNm de *COX1* produit un co-transcrit *ATP8-ATP6* de 5,2 kb. Le deuxième site de clivage situé 600 nucléotides en aval de l'extrémité 3' de *COX1* produit un ARNm de 4,6 kb (Beilharz *et al.* 1982; Christianson et Rabinowitz 1983; Simon et Faye 1984). Ces deux ARNm sont produits en quantités approximativement équivalentes.

Lorsque l'ARNm d'*ENS2* est présent, il fait partie du polycistron *ATP8-ATP6* (Simon et Faye 1984).

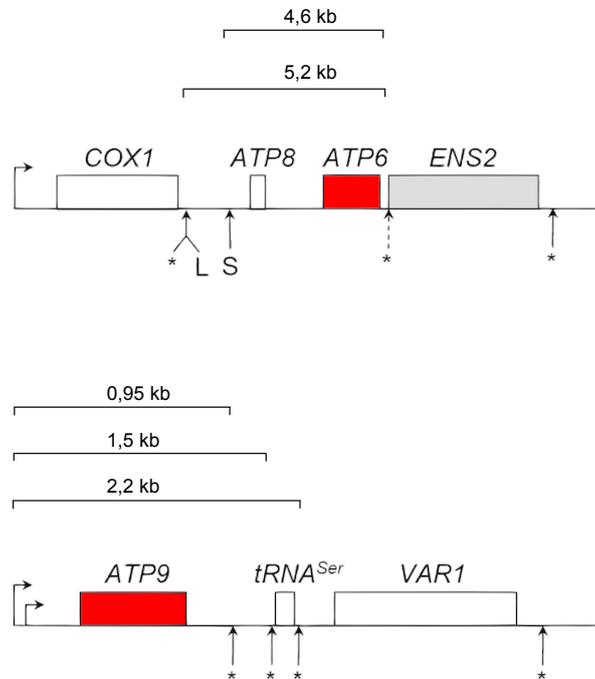


Figure 30

Transcrits polycistroniques des gènes de l'ATP synthase de *S. cerevisiae*. *ATP6* et *ATP8* sont co-transcrits avec *COX1*, encodant la sous-unité 1 de la cytochrome *c* oxydase, et dans quelques souches, avec *ENS2* qui code pour une endonucléase. Les ARNm de 5,2 et 4,6 kb résultent de la coupure aux sites L et S, respectivement. *ATP9* est co-transcrit avec l'ARNt^{Ser} et *VAR1*, encodant une sous-unité protéique des ribosomes mitochondriaux. Les sites d'initiation de la transcription sont indiqués par des flèches horizontales. Les sites de clivages des transcrits polycistroniques qui produisent les messagers matures sont indiqués par des astérisques. La flèche discontinue indique le site de clivage du transcrit polycistronique d'*ATP6* quand *ENS2* est absent. Les gènes codant pour les sous-unités du canal à protons sont en rouge (Zeng *et al.* 2008; Rak *et al.* 2009).

Quatre protéines ont une action spécifique sur la synthèse d'Atp6p et d'Atp8p : Nca2p, Nca3p, Aep3p, et Atp22p. Par ailleurs, Nam1p qui agit sur plusieurs ARNm stabilise les transcrits *ATP6-ATP8*.

La présence simultanée de mutations dans les gènes *NCA2* et *NCA3* conduit à un phénotype de cryosensibilité de la croissance en milieu respiratoire, une surexpression du transcrit primaire *COX1-ATP6-ATP8*, une diminution de l'accumulation de la forme longue de 5,2 kb de l'ARNm *ATP6-ATP8* par rapport à la forme courte de 4,6 kb (Pelissier *et al.* 1992; Camougrand *et al.* 1995; Pelissier *et al.* 1995). Cette baisse corrèle avec une diminution

de synthèse d'Atp6p et d'Atp8p. Nca2p et Nca3p sont prédites comme des protéines mitochondriales. Deux hypothèses peuvent expliquer le défaut d'accumulation de la forme longue. La première est que les mutations dans les gènes *NCA2* et *NCA3* affectent la traduction du transcrit *ATP6-ATP8* et en conséquence la cellule tente de compenser en augmentant la quantité de la forme courte du transcrit *ATP6-ATP8* qui serait la forme préférentiellement utilisée. Une deuxième hypothèse est que les mutations dans *NCA2* et *NCA3* conduisent à une augmentation de la maturation de la forme courte de 4,6 kb du transcrit. Dans ce cas, la forme longue à 5,2 kb serait préférentiellement utilisée.

Aep3p est une protéine mitochondriale matricielle associée à la membrane interne qui stabilise le transcrit *ATP8-ATP6*. En son absence, le transcrit primaire *COX1-ATP8-ATP6* s'accumule, la quantité de la forme longue est diminuée au tiers par rapport au type sauvage et le transcrit court *ATP8-ATP6* est indétectable. Cependant, la quantité du transcrit *COX1* est normale, ce qui exclut un défaut dans la transcription du polycistron. La synthèse d'Atp6p et d'Atp8p est diminuée. Le phénotype du mutant de délétion d'*AEP3* peut s'expliquer par son intervention dans la stabilisation du transcrit *ATP8-ATP6*. Ces données indiquent que le transcrit long d'*ATP6-ATP8* n'est pas qu'un précurseur du transcrit court mais est traduit. Par ailleurs, les auteurs ont identifié 2 motifs PPR (*Pentatrigo-Peptide Repeat*) dans Aep3p. Ces motifs protéiques sont typiques de facteurs agissant sur l'ARN. Il est ainsi supposé qu' Aep3p interagit avec le transcrit *ATP6-ATP8* (Ellis *et al.* 2004).

Par ailleurs, Aep3p est considérée comme un facteur de l'initiation de la synthèse protéique mitochondriale (Lee *et al.* 2009). L'initiation de la synthèse des protéines dans la mitochondrie utilise normalement un ARNt méthionine formylé initiateur. Cependant *S. cerevisiae* peut initier la traduction avec un ARNt méthionine non-formylé même en absence du gène codant la méthionyl-ARNt formyltransférase mitochondriale (*FMT1*). Une mutation ponctuelle Aep3p dans un contexte Δ fmt1 (gène codant la méthionyl-tRNA formyltransférase mitochondriale) aboutit à un défaut respiratoire du fait d'un défaut général de synthèse des protéines mitochondriales. La mutation ponctuelle d'Aep3p seule ne montrant pas de défaut respiratoire. Aep3p interagit avec ymIF2 (*yeast mitochondrial translation Initiation Factor 2*) et stimule la liaison de l'ARNt initiateur non formylé à ymIF2. Aep3p agit spécifiquement dans l'initiation de la synthèse protéique mitochondriale en absence de l'ARNt formylé initiateur. Les auteurs proposent qu'Aep3p fassent partie du complexe de traduction mitochondriale. Cette proposition est compatible avec le rôle proposé par Ellis *et al.*

(Ellis *et al.* 2004) qui propose qu'Aep3p interagisse avec l'ARNm *ATP6-ATP8* du côté matriciel de la membrane interne mitochondriale, stabilisant le transcrite et facilitant l'insertion d'Atp6p et d'Atp8p dans la membrane pour ensuite être assemblées dans la partie F_O de l'ATP synthase.

La traduction d'*ATP6* nécessite l'action d'Atp22p, une protéine de la membrane interne dirigée du côté de la matrice. En son absence, le transcrite long *ATP8-ATP6* s'accumule normalement et la quantité de transcrite court est diminuée de 50 % (Helfenbein *et al.* 2003). Dans des mutants *atp22*, la synthèse protéique d'Atp6p est diminuée mais pas celle d'Atp8p. Dans un révertant du mutant nul *atp22*, l'ADNmt est hétéroplasmique. Coexistent dans la mitochondrie un génome sauvage et un ADNmt où la partie 5' UTR, le premier exon, et le premier intron de *COX1* sont joints en phase à la séquence codante d'*ATP6* (Zeng *et al.* 2007a) (Figure 31, page 61). Ce gène de fusion produit un ARN hybride, qui perd après épissage l'intron de *COX1*. La protéine traduite est clivée au site de maturation d'Atp6p produisant un Atp6p mature et un polypeptide correspondant au premier exon de *COX1* et aux 6 résidus de la pré-séquence de la sous-unité Atp6p. Dans ce cas, l'ARNm est traduit par les activateurs traductionnels de *COX1*. Les autres gènes de l'ADNmt sont exprimés à partir de l'ADNmt sauvage. La suppression du phénotype d'*atp22* par le gène de fusion indique que la fonction d'Atp22p est circonscrite à la traduction d'*ATP6* (Zeng *et al.* 2007a).

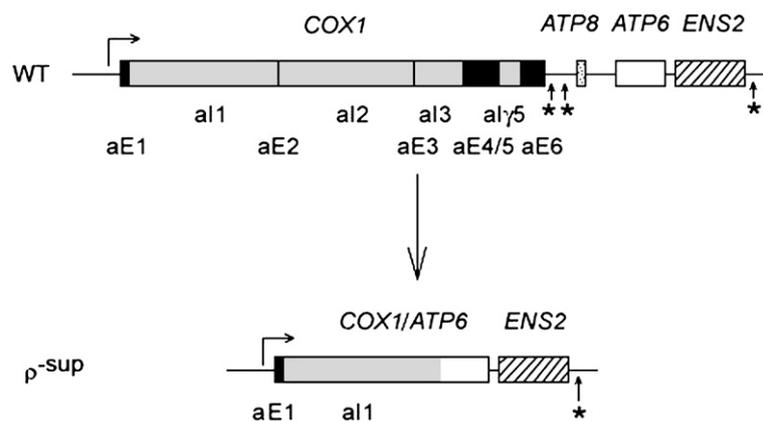


Figure 31

Structure du suppresser *ATP6* d'*atp22*. Le diagramme du haut montre le gène *COX1* de la souche W303. Les exons aE1-aE6 sont indiqués par des cases et des lignes noires, les introns aI1-aI5 par des cases grisées. Les gènes *ATP8*, *ATP6*, et *ENS2* sont représentés respectivement par des cases en pointillé, blanches, et hachurées. Le début de la transcription est indiqué par une flèche horizontale et les sites de clivage de la transcription primaire par des astérisques. Le diagramme du bas montre la région du suppresser ρ comprenant le gène *ATP6* hybride et le gène *ENS2*.

NAM1/MTF2 (*Nuclear Accomodation of Mitochondria 1/Mitochondrial Transcription Factor 2*) est une protéine de la matrice mitochondriale faiblement associée à la membrane interne (Wallis *et al.* 1994). Elle a été identifiée comme un suppresseur multicopie de mutants déficients pour l'épissage de certains introns (Asher *et al.* 1989). Les mutants *nam1* ont des concentrations plus faibles en ARNm de *COB*, *COX1* et *ATP8-ATP6* qui n'est pas le fait d'un défaut de transcription. De plus, dans un génome mitochondrial dépourvu d'introns, l'effet de la mutation *nam1* est restreint à l'ARNm *ATP8-ATP6* (Groudinsky *et al.* 1993). Cela suggère que Nam1p possède une double fonction. D'une part, elle agirait sur les transcrits contenant des introns soit sur leur maturation en 5' ou en 3' soit sur leur stabilité. D'autre part, elle serait un facteur de maturation ou de stabilisation spécifique du transcrit *ATP8-ATP6* (Groudinsky *et al.* 1993).

1.2.2.2 Assemblage des sous-unités de l'ATP synthase

L'assemblage de l'ATP synthase est un phénomène modulaire et assisté : modulaire car les sous-unités la composant forment des pré-complexes définis avant l'assemblage final et assisté car elle requiert l'intervention de protéines chaperonnes.

1.2.2.2.1 Assemblage du secteur F₁

Trois protéines (Atp11p, Atp12p, Fmc1p) interviennent dans l'assemblage du secteur F₁ de l'ATP synthase, plus précisément dans la constitution de l'hexamère $\alpha_3\beta_3$. En l'absence d'Atp11p ou d'Atp12p, α et β forment des agrégats de hauts poids moléculaire à l'intérieur de la matrice mitochondriale. Des agrégats de β se forment aussi dans un mutant de délétion de la sous-unité α , comme des agrégats de α se forment dans un mutant de délétion de la sous-unité β (Ackerman et Tzagoloff 1990). La formation d'agrégats de α et β n'a pas lieu dans des souches délétées pour les sous-unités γ , δ et ϵ (Guelin *et al.* 1993; Giraud et Velours 1994; Paul *et al.* 1994) (Figure 32, page 64).

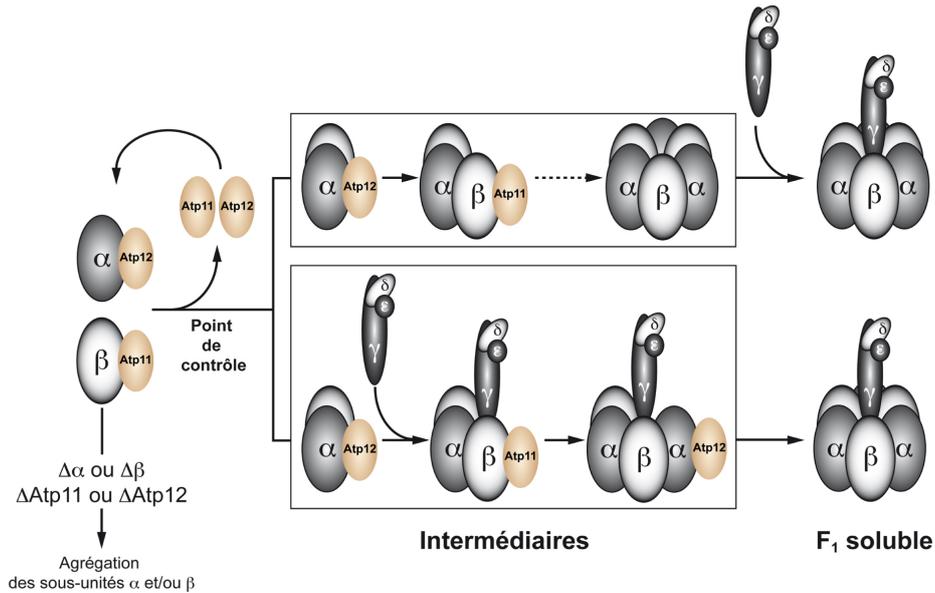


Figure 32

Modèle d'assemblage du F₁. Associations fructueuses ou non-fructueuses lors de l'assemblage de l'hexamère α₃β₃ (Ackerman et Tzagoloff 2005).

Après le repliement de α et β dans la matrice mitochondriale, des expériences de précipitation par affinité et de double-hybride montrent que Atp11p se fixe à β (Wang et Ackerman 2000) et Atp12p se fixe à α (Wang *et al.* 2000). Un modèle propose que ces chaperonnes se lient aux formes repliées d'α et de β non oligomérisées, Atp11p imiterait structurellement la surface du site catalytique de la sous-unité α et Atp12p la surface non catalytique de β (Figure 33, page 64). Cette fixation préviendrait l'agrégation des sous-unités en masquant les domaines hydrophobes de leur site de liaison aux nucléotides jusqu'à leur incorporation au sein de l'hétérodimère αβ puis de l'hexamère α₃β₃ par un échange entre la chaperonne et la sous-unité adjacente présente dans le complexe en cours de constitution (Ackerman et Tzagoloff 2005).

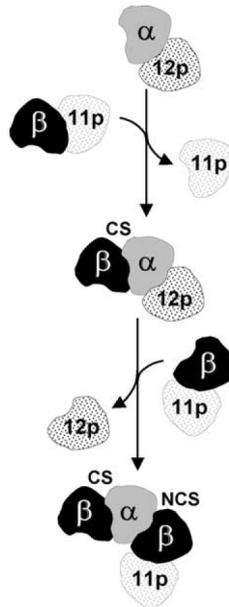


Figure 33

Modèle du mécanisme d'action des chaperonnes Atp11p et Atp12p sur l'assemblage de l'hexamère $\alpha_3\beta_3$. Atp11p et Atp12p imitent respectivement les sous-unités α et β et sont remplacées au fur et à mesure de la constitution de l'hexamère $\alpha_3\beta_3$. CS : site catalytique ; NCS : site non catalytique (Ackerman et Tzagoloff 2005).

Un troisième gène, *FMCI* (*Formation of Mitochondrial Complexes I*) intervient dans l'assemblage du F_1 , à température élevée (37 °C). Fmc1p est localisée à la matrice mitochondriale. Des mutations dans ce gène conduisent à l'agrégation d' α et β à 37 °C et à une diminution de la quantité d'Atp12p. Ce phénotype est supprimé par une sur-expression d'Atp12p. Fmc1p est proposé comme étant nécessaire au repliement correct d'Atp12p ou à l'établissement de ses interactions avec α en conditions de stress thermique (Lefebvre-Legendre *et al.* 2001).

1.2.2.2.2 Formation de l'anneau Atp9p

La sous-unité *c* est capable de former des anneaux sans l'assistance d'autres protéines chez *E. coli* (Arechaga *et al.* 2002). Chez *S. cerevisiae*, l'assemblage d'Atp9p nécessite la présence de la partie N-terminale d'Atp25p. Les mutants d'Atp25p n'exprimant que la partie C-terminale sont capables de traduire Atp9p mais la protéine est incapable de s'assembler en anneaux (Zeng *et al.* 2008). Mis à part l'intervention de ce facteur, le processus d'oligomérisation est généralement considéré comme ne dépendant pas de l'état d'assemblage

des autres éléments du complexe ATP synthase (Tzagoloff *et al.* 2004) Après formation de l'anneau, il s'associe au F₁ (Rak *et al.* 2011).

1.2.2.2.3 Maturation et assemblage d'Atp6p

Trois protéines interviennent dans l'assemblage et la maturation de la sous-unité Atp6p : Atp10p, Oxa1p, et Atp23p.

1.2.2.2.3.1 Maturation du précurseur de la sous-unité 6

Atp6p est synthétisée avec une extension N-terminale de 10 résidus d'acides aminés qui est clivée au cours de l'assemblage du complexe ATP synthase (Michon *et al.* 1988). *ATP23* code pour une métalloprotéase qui possède une double fonction : elle mature Atp6p et l'assemble au complexe ATP synthase (Figure 34, page 66). Atp23p est associée à la membrane interne mitochondriale, son domaine C-terminal étant localisé dans l'espace intermembranaire (Zeng *et al.* 2007c). Elle clive le précurseur Atp6p (Osman *et al.* 2007; Zeng *et al.* 2007c). Une mutation Q>E dans son domaine conservé HEXXH nécessaire à l'activité des métalloprotéases empêche le clivage d'Atp6p mais non son assemblage. Dans un mutant nul *atp23*, les protéines Atp6p nouvellement synthétisées ne sont pas clivées et ne peuvent s'assembler, ce qui entraîne leur dégradation. L'absence de clivage du précurseur d'Atp6p ne semble pas interférer avec l'assemblage et la fonctionnalité du complexe ATP synthase. Toutefois dans des mutants où les codons 2 à 9 ou 2 à 10 ont été supprimés, l'enzyme est présente en quantité deux fois moins moindre. La pré-séquence faciliterait l'interaction d'Atp6p avec l'anneau d'Atp9p (Zeng *et al.* 2007b).

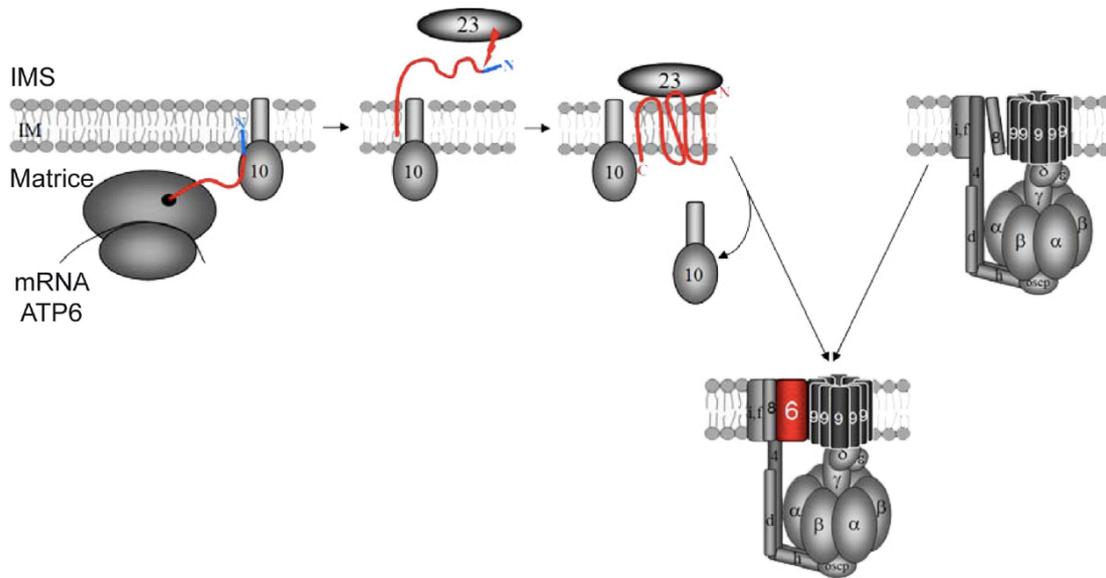


Figure 34

Maturation et assemblage d'Atp6p à l'ATP synthase. Atp6p est en rouge, la séquence en N-terminale clivée est en bleu. Atp10p et Atp23p exercent une fonction chaperonne sur Atp6p pour l'assemblage à l'ATP synthase (schéma d'après E. Tetaud).

1.2.2.2.3.2 Assemblage de la sous-unité Atp6p

L'assemblage de la sous-unité Atp6p dépend de plusieurs facteurs protéiques : Atp10p, Atp23p et Oxa1p.

Atp10p est associée à la membrane mitochondriale interne (Paul *et al.* 2000). Des mutations dans *ATP10* affectent considérablement l'assemblage du F_O (Paul *et al.* 2000; Tzagoloff *et al.* 2004). La synthèse d'Atp6p est diminuée en absence d'Atp10p (Tzagoloff *et al.* 2004). La présence d'Atp10p n'est pas nécessaire au clivage du précurseur d'Atp6p (Paul *et al.* 2000). De plus, dans une souche délétée pour *ATP10*, une substitution dans la partie C-ter d'Atp6p restaure l'assemblage de l'ATP synthase (Paul *et al.* 2000). Lors de marquage *in organello* des protéines au ³⁵S, des complexes de 48 kDa et de 54 kDa résistants au SDS sont détectés, correspondant respectivement à l'anneau d'Atp9p et au complexe anneau d'Atp9p/Atp6p. Dans le cas de cellules Δ *atp10*, seul le complexe à 48 kDa est détecté. Le complexe à 48 kDa contient Hsp70p. Atp10p n'est pas requis pour l'interaction d'Atp9p avec Hsp70p mais est nécessaire pour l'interaction d'Atp6p avec l'anneau d'Atp9p (Tzagoloff *et al.* 2004).

L'assemblage de l'anneau d'Atp9p avec la sous-unité Atp6p dépend également de l'action d'Atp23p indépendamment de son activité protéolytique sur Atp6p. La délétion d'*ATP23* empêche l'assemblage du secteur F₀ alors que des mutations inactivant l'activité protéolytique d'Atp23p n'ont pas d'action sur l'assemblage (Osman *et al.* 2007; Zeng *et al.* 2007c). Dans des mutants Δ atp23 et Δ atp10, l'analyse par BN-PAGE révèle l'apparition de complexes intermédiaires constitués de F₁ et d'Atp9p, ne contenant pas d'Atp6p (Osman *et al.* 2007). Les fonctions d'Atp23p et d'Atp10p se recouvrent car le phénotype de déficience de croissance respiratoire de Δ atp10 est supprimé par une surexpression d'Atp23p (Zeng *et al.* 2007c).

Oxa1p est une translocase impliquée dans l'insertion de protéines mitochondriales à la membrane interne comme Cox2p (Bonney *et al.* 1994a; Altamura *et al.* 1996). Oxa1p est aussi impliquée dans l'assemblage ou la stabilité du complexe ATP synthase car en son absence la quantité d'ATP synthase est fortement diminuée (Altamura *et al.* 1996). Les protéines Atp9p néo-synthétisée forment un complexe avec Oxa1p avant de s'assembler dans le complexe ATP synthase. En l'absence d'Oxa1p, le sous-complexe anneau d'Atp9p-F₁ se forme mais Atp6p n'est pas associée à ce complexe. Un comportement identique est observé en l'absence d'Atp10p (Jia *et al.* 2007). Cela suggère qu'en absence d'Oxa1p l'assemblage de l'ATP synthase est limité par l'étape d'assemblage du complexe anneau d'Atp9p-F₁ avec Atp6p. Cela a été vérifié par une autre approche. Après radiomarquage des protéines codées par le génome mitochondrial il est possible d'observer 2 complexes résistants à la dénaturation par le SDS : un complexe à 48 kDa est constitué d'Atp9p oligomérisée, alors qu'un complexe à 54 kDa consiste en un oligomère d'Atp9p et d'Atp6p. En absence d'Oxa1p le complexe à 54 kDa est en moindre quantité au profit du complexe à 48 kDa (Jia *et al.* 2003). Ces données indiquent que l'activité d'Oxa1p est requise à la suite de la traduction et de l'insertion dans la membrane d'Atp9p. Une interprétation possible est que Oxa1p maintient l'anneau d'Atp9p dans un état lui permettant de s'assembler avec la sous-unité Atp6p.

1.2.2.2.4 Etapes finales d'assemblage de l'ATP synthase

Concernant le pied périphérique du secteur F₀, il n'a pas été trouvé de facteur spécifiquement nécessaire à sa biogenèse. L'association *in vitro* de ses sous-unités (*d*, *h* *OSCP* et Atp4p) permet d'envisager un auto-assemblage (Dickson *et al.* 2006). La double traverse transmembranaire de la sous-unité Atp4p permet de relier le pied périphérique à la

membrane. Probablement, la genèse du pied périphérique débute par l'import et l'insertion de cette protéine à la membrane interne. Sur la partie hydrophile de la protéine viendrait se greffer les autres protéines du pied périphérique. L'utilisation de souches déplétées en sous-unités du pied périphérique suggère une séquence d'assemblage Atp4p, OSCP et sous-unité *d* (la sous-unité *h* n'as pas été testée) (Straffon *et al.* 1998).

Dans des souches dépourvues des sous-unités du F_0 codées par le génome mitochondrial (Atp6p, Atp8p et Atp9p), les sous-unités Atp4p et *d* ne sont pas associées à l'ATPase constituée car elles sont peu ou pas présentes après immunoprécipitations par un anticorps anti- β (Hadikusumo *et al.* 1988). Réciproquement, des mutants de délétion des sous-unités Atp4p et *d* ne permettent pas l'assemblage d'Atp6p au complexe (Paul *et al.* 1989; Norais *et al.* 1991).

Le groupe de Marzuki a réalisé des immunoprécipitations en employant un anticorps anti- β sur des mutants dépourvus de sous-unité Atp6p, Atp8p ou Atp9p. En absence d'Atp9p, Atp6p et Atp9p sont manquants, en absence d'Atp8p, Atp6p n'est plus détectée. Atp9p est nécessaire à l'assemblage dans le complexe final d'Atp8p et Atp8p est nécessaire à l'assemblage d'Atp6p. Cela suggère une séquence d'association Atp9p, Atp8p puis Atp6p (Hadikusumo *et al.* 1988). Dans un mutant de délétion d'*ATP6*, des complexes de taille intermédiaire entre le F_1 et le F_1F_0 ont été mis en évidence. Ces complexes comprennent les sous-unités γ , Atp4p, *d*, et Atp9p (Rak *et al.* 2007). Ces données indiquent qu'Atp6p est insérée en dernier dans le complexe. Le fait que la sous-unité Atp6p est dégradée dans la majorité des mutants bloqués dans l'assemblage du F_0 soutient cette hypothèse (Velours *et al.* 1988; Paul *et al.* 1989; Norais *et al.* 1991; Prescott *et al.* 1994; Spannagel *et al.* 1997). En l'absence de son intégration dans le complexe, la sous-unité Atp6p est très sensible à la dégradation.

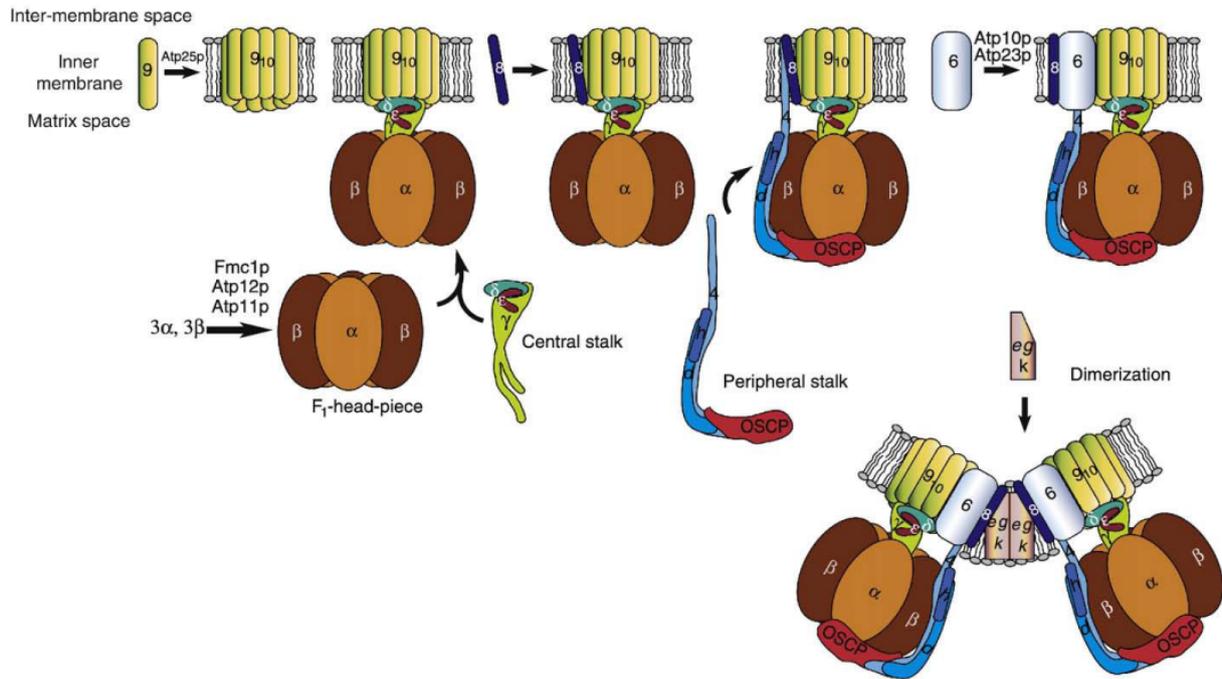


Figure 35

Modèle d'assemblage de l'ATP synthase mitochondriale de la levure selon Kucharczyk. L'assemblage a lieu suivant un processus séquentiel, assisté par des chaperonnes spécifiques. Les sous-complexes F₁, l'anneau d'Atp9p et le pied central sont pré-assemblés avant d'être intégrés en un complexe ATP synthase fonctionnel (Kucharczyk *et al.* 2009).

A partir de ces observations, une séquence d'assemblage probable est proposée (Figure 35, page 69). L'anneau d'Atp9p s'oligomérisse à l'aide d'Atp25p. Le secteur F₁ et l'anneau d'Atp9p se forment indépendamment du reste de l'enzyme. Ils s'associent pour former un sous-complexe anneau d'Atp9p-F₁. Le pied périphérique se constitue indépendamment et sans l'aide de chaperonne. Atp8p s'associe au sous-complexe Atp9p-F₁. Le pied périphérique s'assemble à ce complexe, puis vient Atp6p. Les protéines associées à la formation de dimères d'ATP synthase s'intégreraient postérieurement à la constitution du monomère d'ATP synthase.

Rak et Tzagoloff proposent un modèle de biogénèse différent. Il est basé sur des expériences de radiomarquage des protéines codées par l'ADNmt combinées à une analyse des complexes néo-synthétisés sur gradient de sucrose (Rak *et al.* 2011). L'assemblage de l'ATP synthase aurait lieu par la combinaison de deux grands modules : un complexe Atp9p-F₁ et un complexe Atp8p-Atp6p contenant au moins Atp4p et la sous-unité Atp7p (Figure 36, page 70). Ce modèle est en contradiction avec les résultats obtenus sur un délétant du gène *ATP6* où un complexe de taille inférieure à l'ATP synthase en BN-PAGE contenait les sous-

unités γ , Atp4p, Atp7p et Atp9p (Rak *et al.* 2007). Ce modèle ne concorde pas non plus avec les résultats obtenus en absence des sous-unités γ , δ ou ϵ , montrant que le canal à protons est toujours capable de se former (Giraud et Velours 1997; Lai-Zhang *et al.* 1999; Duvezin-Caubet *et al.* 2003; Duvezin-Caubet *et al.* 2006).

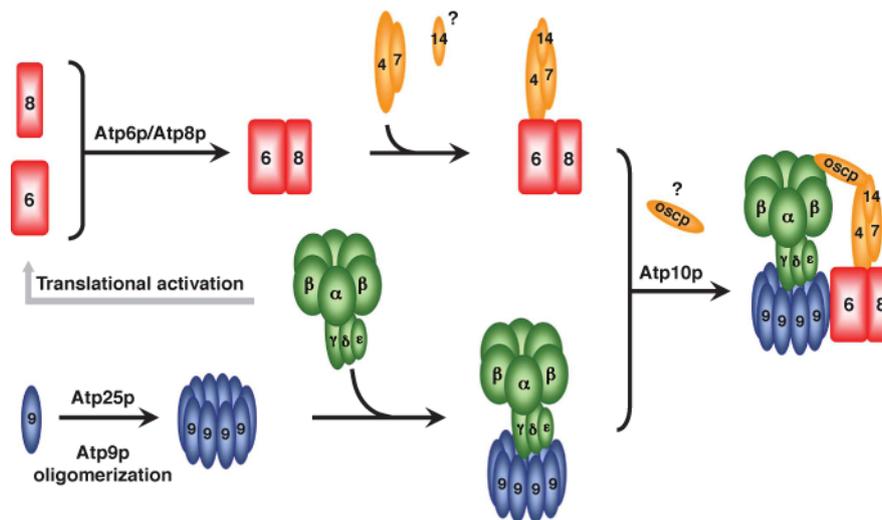


Figure 36

Modèle d'assemblage de l'ATP synthase selon le modèle de Rak et Tzagoloff. Le diagramme montre deux voies aboutissant à l'assemblage des précurseurs de l'ATP synthase. L'ATP synthase est composé d'au moins trois différents modules : le F_1 , l'anneau d'Atp9 et un sous-complexe Atp6p/Atp8p/reste du stator. La flèche grise montre l'activation de la traduction d'Atp6p et d'Atp8p par le secteur F_1 (Rak *et al.* 2011).

1.2.2.3 Contrôle traductionnel par le F_1 des sous-unités Atp6p et Atp8p

Des études chez la levure ont montré que l'expression des gènes mitochondriaux peut être contrôlée par l'assemblage de leurs produits protéiques. Dans des mutants où le complexe cytochrome oxydase n'est pas assemblé, le taux de synthèse de Cox1p, une des sous-unités de ce complexe, est fortement diminué. La synthèse de Cox1p nécessite l'activateur traductionnel Mss51p. Cox1p néo-synthétisé reste physiquement associé Mss51p jusqu'à son assemblage, après quoi Mss51p est libérée et peut synthétiser une nouvelle protéine Cox1p. La synthèse de Cox1p est ainsi couplée à la disponibilité du pré-complexe dans lequel elle doit s'insérer (Barrientos *et al.* 2004) (Figure 37, page 71).

Un mécanisme de régulation proche a été décrit dans le cas de l'ATP synthase. La traduction des gènes mitochondriaux *Atp6p* et *Atp8p* est fortement diminuée dans des mutants d'assemblage du F_1 . La présence d'un secteur F_1 assemblé stimulerait la traduction de l'ARNm *ATP8-ATP6* (Rak et Tzagoloff 2009) (Figure 36, page 70).

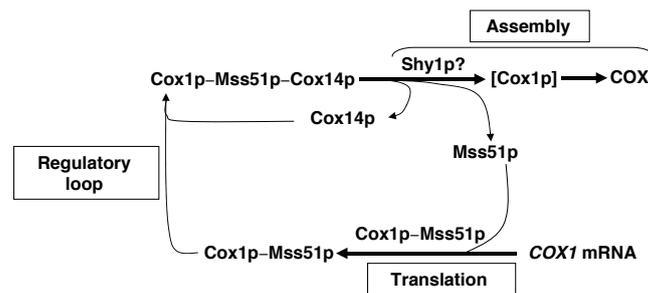


Figure 37

Modèle décrivant l'expression de Cox1p couplée à l'assemblage de la cytochrome *c* oxydase dépendant de Shy1p. Mss51p stimule l'initiation et l'élongation de la traduction de Cox1p. Cox14p et Mss51p forment un complexe ternaire avec Cox1p néo-synthétisé. La libération de Mss51p du complexe ternaire dépend de l'étape suivante d'assemblage de Cox1p, qui peut-être implique Shy1p. En accord avec ce schéma, des mutations bloquant l'assemblage maintiennent Mss51p dans le complexe ternaire, limitant sa disponibilité pour la traduction. Dans un mutant *cox14*, Mss51p est encore capable de se complexer avec Cox1p. Ce complexe binaire n'est pas compétent pour l'assemblage, Cox1p est dégradée avec une libération concomitante de Mss51p pour un nouveau cycle de synthèse de Cox1p (Barrientos *et al.* 2004).

2 Matériels et méthodes

2.1 Souches et conditions de culture

2.1.1 Souches bactériennes

La souche de bactérie XL1blue de Stratagene est utilisée pour l'amplification des plasmides. La souche pMOSblue de GE Healthcare est utilisée pour le clonage de produit PCR.

2.1.2 Souches de levures

L'ensemble des souches de levures utilisées dans ce travail est exposé dans le tableau suivant :

Souche (acronyme)	Génotype nucléaire	Génotype mitochondrial	Origine
SDC22	<i>MATα ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 arg8::HIS3</i>	ρ^+ <i>Arg8^m</i>	Duvezin-Caubet <i>et al.</i> 2003
SDC6 (Tet- δ)	<i>MATα ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 arg8::HIS3 atp16::KanMX pCM189-ATP16</i>	ρ^+ <i>Arg8^m</i>	Duvezin-Caubet <i>et al.</i> 2003
YG1 (Tet- γ)	<i>MATα ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 arg8::HIS3 atp3::KanMX pCM189-ATP3</i>	ρ^+ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
YE1 (Tet- ϵ)	<i>MATα ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 arg8::HIS3 atp15::KanMX pCM189-ATP15</i>	ρ^+ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
S1 ($\Delta\epsilon+c$ -L57F)	<i>MATα ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 arg8::HIS3 atp15::KanMX</i>	ρ^+ <i>Arg8^m c-L57F</i>	Cette étude
S1+ ϵ ($\epsilon+c$ -L57F)	<i>MATα ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 arg8::HIS3 atp15::KanMX pCM189-ATP15</i>	ρ^+ <i>Arg8^m c-L57F</i>	Cette étude
S2 ($\Delta\epsilon+a$ -A120V)	<i>MATα ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 arg8::HIS3 atp15::KanMX</i>	ρ^+ <i>Arg8^m a-A120V</i>	Cette étude
BY4741	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	ρ^+	Euroscarf

Souche (acronyme)	Génotype nucléaire	Génotype mitochondrial	Origine
KL14-4a/60	<i>MATa his1 trp2</i>	ρ^0	Collection de Gif
DFS160a	<i>MATa ade2-101 ura3-52 leu2Δ arg8::URA3 kar1-1</i>	ρ^0	Steele <i>et al.</i> 1996
MR6/b-3	<i>MATα his3-11,15 ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 CAN1 arg8::HIS3</i>	ρ^0	Cette étude
SDC17-4c	<i>MATa met6 lys2 his3 ura3 leu2 arg8::hisG atp4::URA3</i>	ρ^+ Arg8 ^m	Cette étude
SDC17-31b	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i>	ρ^+ Arg8 ^m	Duvezin-Caubet <i>et al.</i> 2006
FG3	<i>MATa ade2-101 ura3-52 leu2Δ arg8::URA3 kar1-1</i>	ρ^+ Arg8 ^m	Cette étude
FG4	<i>MATα his3-11,15 ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 CAN1 arg8::HIS3</i>	ρ^+ Arg8 ^m	Cette étude
SDC25/1	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3 pATP4-HIS3 mutant F₀ⁱ aep1</i>	ρ^+ Arg8 ^m	Cette étude
SDC25/5	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3 pATP4-HIS3 mutant F₀ⁱ aep2</i>	ρ^+ Arg8 ^m	Cette étude
FG18	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::ura3::LYS2 pATP4-HIS3 mutant F₀ⁱ aep1</i>	ρ^+ Arg8 ^m	Cette étude
FG23	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::ura3::LYS2 pATP4-HIS3 mutant F₀ⁱ aep2</i>	ρ^+ Arg8 ^m	Cette étude
FG22	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::ura3::LYS2 pATP4-HIS3 pATP16-URA3 mutant F₀ⁱ aep1</i>	ρ^+ Arg8 ^m	Cette étude
FG24	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::ura3::LYS2 pATP4-HIS3 pATP16-URA3 mutant F₀ⁱ aep2</i>	ρ^+ Arg8 ^m	Cette étude
SDC25/2	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3 pATP4-HIS3</i>	ρ^+ Arg8 ^m c-A60V	Cette étude
FG12	<i>MATa ade2-101 ura3-52 leu2Δ arg8::URA3 kar1-1</i>	ρ^+ Arg8 ^m c-A60V	Cette étude

Souche (acronyme)	Génotype nucléaire	Génotype mitochondrial	Origine
FG13	<i>MATα his3-11,15 ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 CAN1 arg8::HIS3</i>	ρ^+ Arg8 ^m c-A60V	Cette étude
SDC25/4	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3 pATP4-HIS3</i>	ρ^+ Arg8 ^m Δ3' UTR ATP6	Cette étude
SDC25/6	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3 pATP4-HIS3</i>	ρ^+ Arg8 ^m Δ3' UTR ATP6	Cette étude
SDC25/14	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3 pATP4-HIS3</i>	ρ^+ Arg8 ^m c-M67K	Cette étude
FG1	<i>MATα ade2-101 ura3-52 leu2Δ arg8::URA3 kar1-1</i>	ρ^+ Arg8 ^m c-M67K	Cette étude
FG2	<i>MATα his3-11,15 ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 CAN1 arg8::HIS3</i>	ρ^+ Arg8 ^m c-M67K	Cette étude
SDC25/26	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3 pATP4-HIS3</i>	ρ^+ Arg8 ^m Δcox1-atp8- atp6-ens2	Cette étude
SDC30/2a	<i>MATα ade2-101 ura3-52 leu2Δ arg8::URA3 kar1-1</i>	ρ^- ATP6-COX2	Rak <i>et al.</i> 2007
FG8	<i>MATα ade2-101 ura3-52 leu2Δ arg8::URA3 kar1-1</i>	ρ^- ATP8-COX2	Cette étude
FG9	<i>MATα ade2-101 ura3-52 leu2Δ arg8::URA3 kar1-1</i>	ρ^- ATP9-COX2	Cette étude
FG92	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3 pATP4-HIS3</i>	ρ^+ Arg8 ^m mutant F ₀ ⁱ ATP6	Cette étude
FG93	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3 pATP4-HIS3</i>	ρ^+ Arg8 ^m mutant F ₀ ⁱ ATP6 Stop 182	Cette étude
FG94	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3 pATP4-HIS3</i>	ρ^+ Arg8 ^m mutant F ₀ ⁱ ATP6 Stop 172	Cette étude
FG95	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3 pATP4-HIS3</i>	ρ^+ Arg8 ^m mutant F ₀ ⁱ g>t à -28 bases de l'ATG d'ATP6	Cette étude
FG96	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3 pATP4-HIS3</i>	ρ^+ Arg8 ^m mutant F ₀ ⁱ ATP6 Stop 40	Cette étude

Souche (acronyme)	Génotype nucléaire	Génotype mitochondrial	Origine
FG97	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i> mutant F ₀ ⁱ <i>ATP6</i>	Cette étude
FG98	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i> mutant F ₀ ⁱ <i>ATP6</i>	Cette étude
FG99	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i> mutant F ₀ ⁱ <i>ATP6 faux-sens de 63 à</i> <i>68 puis Stop en 69</i>	Cette étude
FG100	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i> mutant F ₀ ⁱ <i>ATP6</i>	Cette étude
FG103	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i> mutant F ₀ ⁱ <i>ATP9 Stop 20</i>	Cette étude
FG106	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i> mutant F ₀ ⁱ <i>ATP6</i>	Cette étude
FG108	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i> mutant F ₀ ⁱ mitochondrial	Cette étude
FG109	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i> mutant F ₀ ⁱ mitochondrial	Cette étude
FG110	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i> mutant F ₀ ⁱ mitochondrial	Cette étude
FG111	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i> mutant F ₀ ⁱ mitochondrial	Cette étude
FG112	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i> mutant F ₀ ⁱ mitochondrial	Cette étude
FG113	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i> mutant F ₀ ⁱ mitochondrial	Cette étude
FG114	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i> mutant F ₀ ⁱ mitochondrial	Cette étude
FG115	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i> mutant F ₀ ⁱ mitochondrial	Cette étude

Souche (acronyme)	Génotype nucléaire	Génotype mitochondrial	Origine
FG116	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i> mutant F ₀ ⁱ mitochondrial	Cette étude
FG25	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG26	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG27	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG28	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG29	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG30	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG32	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG34	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG35	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG36	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG37	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ aep2	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG38	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG39	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG40	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ aep1	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude

Souche (acronyme)	Génotype nucléaire	Génotype mitochondrial	Origine
FG41	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG42	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG43	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG44	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG47	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG48	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG50	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG55	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG56	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG57	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG61	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG62	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG63	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG64	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude
FG65	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	Cette étude

Souche (acronyme)	Génotype nucléaire	Génotype mitochondrial	Origine
FG66	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG67	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG68	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG69	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG70	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG71	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG72	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG73	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG74	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG75	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG76	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG77	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG78	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG79	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG80	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude

Souche (acronyme)	Génotype nucléaire	Génotype mitochondrial	Origine
FG81	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG82	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG83	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG84	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG85	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG86	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG87	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG88	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG89	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG90	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
FG91	<i>MATα met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i> pATP4-HIS3 mutant F ₀ ⁱ nucléaire	ρ ⁺ Arg8 ^m	Cette étude
Y03125 (ΔATP1)	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> YBL099W::kanMX4	ND	Collection Euroscarf
Y06924 (ΔATP2)	<i>MATα his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i> YJR121W::kanMX4	ρ ^{-/0} (traitement BET)	Collection Euroscarf
SDC14-4B (ΔATP3)	<i>MATα YBR039W ::kanMW4</i>	ρ ^{-/0}	Duvezin- Caubet

Souche (acronyme)	Génotype nucléaire	Génotype mitochondrial	Origine
Y02750 (ΔATP4)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YPL078C::kanMX4</i>	ND	Collection Euroscarf
Y03657 (ΔATP5)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YDR298C::kanMX4</i>	ND	Collection Euroscarf
Y04865 (ΔATP7)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YKL016C::kanMX4</i>	ND	Collection Euroscarf
Y05302 (ΔATP10)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YLR393W::kanMX4</i>	ND	Collection Euroscarf
Y07319 (ΔATP11)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YNL315C::kanMX4</i>	$\rho^{-/0}$ (traitement BET)	Collection Euroscarf
Y01245 (ΔATP12)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YJL180C::kanMX4</i>	ND	Collection Euroscarf
Y05205 (ΔATP14)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YLR295C::kanMX4</i>	ND	Collection Euroscarf
Y01021 (ΔATP15)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YPL271W::kanMX4</i>	ND	Collection Euroscarf
SDC13-14b/60 (ΔATP16)	<i>MAT a lys2 leu2 ura3-52 his3ΔHinDIII arg8::hisG YDL004W::kanMX4</i>	ρ^0	Duvezin- Caubet <i>et al.</i> 2006
Y04213 (ΔATP17)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YDR377W::kanMX</i>	ND	Collection Euroscarf
Y06068 (ΔATP18)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YML081C-A::kanMX4</i>	$\rho^{-/0}$ (traitement BET)	Collection Euroscarf
Y05439 (ΔATP20)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YPR020W::kanMX4</i>	$\rho^{-/0}$ (traitement BET)	Collection Euroscarf
Y04187 (ΔATP22)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YDR350C::kanMX4</i>	$\rho^{-/0}$ (traitement BET)	Collection Euroscarf

Souche (acronyme)	Génotype nucléaire	Génotype mitochondrial	Origine
Y05395 (Δ ATP23)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YNR020C::kanMX4</i>	$\rho^{-/0}$ (traitement BET)	Collection Euroscarf
Y06538 (Δ ATP25)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YMR098C::kanMX4</i>	ND	Collection Euroscarf
Y06197 (Δ AEP1/NCA1)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YMR064W::kanMX4</i>	ND	Collection Euroscarf
Y00868 (Δ AEP2/ATP13)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YMR282C::kanMX4</i>	ND	Collection Euroscarf
Y02823 (Δ AEP3)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YPL005W::kanMX4</i>	ND	Collection Euroscarf
Y05570 (Δ NCA2)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YPR155C::kanMX4</i>	$\rho^{-/0}$ (traitement BET)	Collection Euroscarf
YJL116c (Δ NCA3)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YJL116C::kanMX4</i>	$\rho^{-/0}$ (traitement BET)	Collection Euroscarf
Y02257 (Δ FMC1)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YIL098C::kanMX4</i>	$\rho^{-/0}$ (traitement BET)	Collection Euroscarf
Y06151 (Δ OXA1)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YER154W::kanMX4</i>	ND	Collection Euroscarf
Stf- (Δ STF1)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YDL130W-A::kanMX4</i>	$\rho^{-/0}$ (traitement BET)	J. Velours
Inh- (Δ INH)	<i>MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 YDL181W::kanMX4</i>	ND	J. Velours

Tableau 3

Tableau des souches utilisées. Le fond gris indique les isolats F_o^1 du second crible croisés avec les souches délétées pour des gènes codant pour des facteurs identifiés dans l'expression de l'ATP synthase provenant de la collection d'Euroscarf. ND : non déterminé. Sauf indications contraires, les conséquences des mutations F_o^1 de l'ADNmt sont données par rapport à la séquence protéique.

2.1.3 Conditions de culture et conservation

2.1.3.1 Milieu de culture pour bactérie

LB (*Lysogeny Broth*) : bactotryptone 10 g/L, bacto yeast extract 5 g/L, NaCl 10 g/L. Le milieu solide est constitué par ajout de bacto-agar à 15 g/L. Le milieu peut être complété par de l'ampicilline à une concentration finale de 100 mg/L.

2.1.3.2 Milieux de culture pour levure

YPGA : glucose 20 g/L, bactoyeast extract 10 g/L, bactopectone 10 g/L, adénine 80 mg/L. Le milieu solide est constitué par ajout d'agar à 20 g/L.

YPGA BET : glucose 20 g/L, bactoyeast extract 10 g/L, bactopectone 10 g/L, adénine 80 mg/L. Le milieu solide est constitué par ajout d'agar à 20 g/L. 40 µg/mL de bromure d'éthidium sont ajoutés après autoclavage.

YPGA G418 : glucose 20 g/L, bactoyeast extract 10 g/L, bactopectone 10 g/L, adénine 80 mg/L. Le milieu solide est constitué par ajout d'agar à 20 g/L. 200 mg/mL de G418 sont ajoutés après autoclavage.

YPGalA : galactose 20 g/L, bactoyeast extract 10 g/L, bactopectone 10 g/L, adénine 80 mg/L. Le milieu solide est constitué par ajout d'agar à 20 g/L.

YPEG : glycérol 20 g/L, bactoyeast extract 10 g/L, bactopectone 10 g/L, adénine 80 mg/L. 2 % d'éthanol (v/v) sont ajoutés après autoclavage. Le milieu solide est constitué par ajout d'agar à 20 g/L.

N3 : glycérol 20 g/L, bactoyeast extract 10 g/L, bactopectone 10 g/L, adénine 80 mg/L. Le milieu est tamponné à pH 6,2 avec 50 mM de phosphate de potassium. 2 % d'éthanol (v/v) sont ajoutés après autoclavage. Le milieu solide est constitué par ajout d'agar à 20 g/L.

W0 : glucose 20 g/L, yeast nitrogen base 1,67 g/L, sulfate d'ammonium 5 g/L. Le milieu solide est constitué par ajout d'agar minimum à 20 g/L.

CSM-Acides Aminés (*Complete Synthetic Medium*) : glucose 20 g/L, yeast nitrogen base 1,67 g/L, sulfate d'ammonium 5 g/L, CSM-acides aminés. CSM-acides aminés est un mélange d'acides aminées et de nucléotides en quantité connue nécessaires à la croissance des levures (exemple : adénine 80 mg/L, uracile 20 mg/L, arginine 50 mg/L, leucine 100 mg/L,

tryptophane 50 mg/L). Plusieurs formulations existent qui sont dépourvus pour un ou plusieurs acides aminés ou nucléotides permettant la sélection de souches sur la base de leurs auxotrophies. La quantité à utiliser est donnée par le fabricant. Le milieu solide est constitué par ajout d'agar minimum à 20 g/L.

BIOL3 : glucose 50 g/L ; yeast nitrogen base 1,67 g/L ; sulfate d'ammonium 5 g/L ; 0,8 g/L de CSM-Leucine ; 182,7 g de sorbitol ; adénine 40 mg/L ; agar minimum à 30 g/L.

Tous les milieux sont réalisés avec de l'eau millip. La stérilisation est effectuée par un autoclavage de 30 minutes à 110 °C.

2.1.3.3 Culture et conservation des souches

Les bactéries sont cultivées à 37 °C. Les levures sont cultivées à 28 °C (à l'exception de la souche $\Delta fmc1$ dont le phénotype est visible à 37 °C). Les cultures liquides sont agitées à une vitesse de 180 rpm afin d'obtenir une oxygénation suffisante du milieu. La croissance en milieu liquide des levures a été suivie par mesure de l'absorbance à 650 nm en utilisant l'approximation 1 unité de D.O./mL est équivalent à $1,2 \cdot 10^7$ cellules.

Levures et bactéries sont conservées à -80 °C dans une solution de glycérol à 50 %.

2.2 Techniques de génétique

2.2.1 Croisement de souches

Le croisement s'effectue entre deux souches de levures de signes sexuels opposés (*MATa* et *MAT α*). Deux techniques sont possibles. La première est la technique dite de "goutte sur goutte". Deux gouttes de 3 à 10 μ L d'une culture fraîche provenant de chaque souche sont déposées l'une sur l'autre sur un milieu solide YPGA. La deuxième technique consiste à réaliser à partir d'une culture de la première souche (200 à 300 μ L) un tapis cellulaire par étalement sur une boîte de Pétri de milieu YPGA solide. Une réplique au velours d'une autre boîte contenant les colonies de la seconde souche (une boîte de garde est réalisée en parallèle) est effectuée. Quelque soit la technique utilisée, après incubation pendant une durée de 24 à 48 h, le mélange de copulation est répliqué à l'aide d'un velours sur un milieu de sélection.

2.2.2 Cytoduction de mitochondries

Cette technique est basée sur l'utilisation de la mutation *kar1-1*, ayant pour effet de ralentir la fusion des noyaux et donc la formation d'un diploïde lors d'un croisement (Conde et Fink 1976). Ceci permet d'obtenir à une fréquence élevée, après bourgeonnement des zygotes, des cellules haploïdes dont le cytoplasme initial a été mélangé à celui du partenaire sexuel. Les contenus cytoplasmiques entre souches, notamment les mitochondries, vont fusionner et brasser leurs contenus. Les cytoductions sont réalisées comme les croisements "goutte sur goutte". Une sélection des cellules haploïdes d'intérêt est ensuite effectuée suivant les propriétés attendues.

2.2.3 Tableau des plasmides

L'ensemble des plasmides utilisés dans ce travail est exposé dans le ci-après (Tableau 4, page 85).

Plasmide	Caractéristique principale	Source
pCM189	Vecteur centromérique, marqueur URA3, promoteur <i>tetO</i>	Gari <i>et al.</i> 1997
pZVT1/13	Clonage de la région codante d' <i>ATP15</i> dans pCM189 au site <i>BamHI-NotI</i>	Ce travail
pSE1	Clonage de la région codante d' <i>ATP3</i> dans pCM189 au site <i>BamHI-NotI</i>	Ce travail
pTE1	Clonage dans pSE1 du 3' UTR d' <i>ATP3</i> aux sites <i>PstI-HindIII</i>	Ce travail
pUG6	Matrice pour utilisation de la cassette KanMX4	Guldener <i>et al.</i> 1996
pATP4-HIS3	<i>ATP4</i> sous son promoteur natif cloné dans pRS313	Giraud et Velours 1997
pSDC13 (pATP16URA3)	Clonage de la région codante d' <i>ATP16</i> dans pCM189 au site <i>BamHI-NotI</i>	Duvezin-Caubet <i>et al.</i> 2003
M2660	Utilisation de la cassette 5'URA3-LYS2-3'URA3 libérée par <i>HindIII</i>	Wach <i>et al.</i> 1994
pMOS Blue	Vecteur de clonage de produit PCR	GE Healthcare
pMOS-ATP8	Clonage du gène <i>ATP8</i> (-271 en 5' de l'ATG à +153 du Stop) au site <i>EcoRV</i>	Ce travail
pJM2	<i>AmpR</i> , <i>COX2</i>	Mulero et Fox 1993
pJM2-ATP8	Sous clonage du gène <i>ATP8</i> provenant de pMOS-ATP8 aux sites <i>BamHI-XbaI</i>	Ce travail
pFL46L	<i>AmpR</i> , <i>LEU2</i> et origine de répllication nucléaire	Bonneaud <i>et al.</i> 1991
pMOS-ATP9	Clonage du gène <i>ATP9</i> (-228 en 5' de l'ATG à +98 du Stop) au site <i>EcoRV</i>	Ce travail
pJM2-ATP9	Sous clonage du gène <i>ATP9</i> provenant de pMOS-ATP9 aux sites <i>BamHI-XbaI</i>	Ce travail

Tableau 4

Liste des plasmides utilisés.

2.2.4 Transformation de bactéries par choc thermique

Les *E. coli* XL1-Blue de Stratagene sont utilisées pour le clonage ou l'amplification des plasmides. Sur 100 µL de bactéries commerciales fraîchement décongelées ; 0,1 à 50 ng de plasmide sont ajoutés. Après une incubation de 30 minutes à 4 °C, un choc thermique de 45 secondes à 42 °C est effectué. Les bactéries sont incubées 2 minutes à 4 °C, puis 0,9 mL de milieu LB sont additionnés. Les cellules sont incubées à 37 °C pendant 1 h sous agitation. Après centrifugation, le culot est repris dans un plus petit volume, puis étalé sur un milieu LB

contenant de l'ampicilline à 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Les colonies sont visibles après incubation des milieux une nuit à 37 °C.

2.2.5 Transformation plasmidique de levures

Les cellules de levures à transformer sont cultivées de façon à se situer en phase exponentielle de croissance. 10^7 cellules sont prélevées puis centrifugées. Elles sont lavées une fois à l'eau, puis de nouveau centrifugées. Le culot est repris dans 360 μL d'une solution stérile de polyéthylène glycol 3350 à 34 % (m/v) ; 0,1 mol/L d'acétate de lithium ; 0,28 mg/mL d'ADN de sperme de saumon dénaturé ; et 5,6 $\mu\text{g}/\text{mL}$ de plasmide à transformer. Un choc thermique de 15 minutes à 42 °C est réalisé. Centrifugées puis reprises dans du milieu YPGA, les cellules sont incubées une heure à 28 °C sous agitation. Les cellules sont centrifugées, reprises dans de l'eau stérile puis étalées sur un milieu solide sélectionnant les cellules transformées (Gietz et Schiestl 2007).

2.2.6 Transformation des mitochondries par biolistique

Cette méthode a été mise au point chez la levure par Fox *et al.* (Fox *et al.* 1988). Elle consiste à générer une onde de choc qui va propulser des particules recouvertes d'ADN dans le compartiment mitochondrial. La procédure utilisée ici est identique à celle décrite dans l'article de Bonnefoy et Fox (Bonnefoy et Fox 2001). Les particules de tungstène de 0,4 μm de diamètre sont reprises dans de l'éthanol à 70 % à 4 °C. Elles sont centrifugées 15 minutes à 12 000 g, lavées avec de l'eau stérile, et remises en suspension à une concentration de 60 mg/mL dans une solution de glycérol à 50 %. Deux plasmides vont être mis à adhérer sur les particules. Le premier porte le marqueur nucléaire *LEU2* et une origine de réplication cellulaire (pFL46L). Le second dérive de pJM2, porte la cassette de recombinaison mitochondriale voulue et le gène *COX2* (Tableau 4, page 85). Un volume correspondant à 36 mg de particules de tungstène est mis en présence de 7 μg du plasmide pFL46L, 25 μg du plasmide dérivant de pJM2, dans un volume final de 220 μL à 1 M CaCl_2 et 16 mM de spermidine. Ce mélange est incubé 10 minutes dans de la glace et homogénéisé toutes les 2 minutes. Après une centrifugation de 30 secondes à 12 000 g, le culot est resuspendu dans de l'éthanol à -20 °C. Cette dernière étape est renouvelée puis les particules sont distribuées sur 6 membranes « macroporteur » Bio-Rad. Les tirs sont réalisés sur des cellules de la souche DFS160 ρ^o (*leu2*) disposées en tapis (10^8 cellules par boîte de Petri). Le tir sur les levures est effectué avec le système PDS-1000/He de Bio-Rad. Il permet de générer de part et d'autre

d'un disque de rupture (BIO-RAD Biolistic® Rupture Disks 1 350 psi) un vide de -737 mm de mercure et une pression de 93 bars. Lorsque le seuil de résistance du disque de rupture est atteint, il se rompt brutalement provoquant une onde de choc qui va projeter les particules de tungstène sur les cellules. Ces dernières sont ensuite incubées à 28 °C pendant 4 à 5 jours. Seuls les clones de DFS160 transformés par le plasmide pFL46L (*LEU2*) seront capables de pousser sur le milieu BIOL3 dépourvu en leucine. Parmi les transformants nucléaires, des transformants mitochondriaux sont identifiés par leur capacité à restaurer une croissance respiratoire par croisement contre une souche *mit- cox2* (NB40-3c) du fait de la présence du gène *COX2* sauvage du plasmide pJM2. Après une série de purifications un clone pur est obtenu, dénommé « petite synthétique ».

2.2.7 Génération d'une population de cellules $\rho^{-/0}$

Cette méthode tire partie du fait que l'ADNmt est plus sensible à la présence de BET que l'ADN nucléaire. L'exposition au BET au sein d'une population va générer des mutants $\rho^{-/0}$. A partir d'une culture de levures, 5 μ L sont déposés sur milieu solide YPGA BET. Après 2 à 3 jours de culture à 28 °C, la boîte est répliquée sur YPGA BET et YPEG. L'opération est répétée jusqu'à la perte de la croissance respiratoire sur milieu YPEG. La perte du génome mitochondrial est vérifiée par l'absence de croissance sur milieu respiratoire après croisement contre une souche de type sauvage ρ° .

2.2.8 Estimation de la proportion de cellules $\rho^{-/0}$ dans une culture

Un étalement en colonies individuelles est effectué sur un milieu non sélectif (généralement un milieu fermentescible riche comme YPGA) permettant la croissance de cellules ρ^{+} ou $\rho^{-/0}$. Après apparition des colonies, celles-ci sont répliquées avec un velours sur une boîte de garde (sur milieu fermentescible) et sur une boîte de Pétri ne permettant la culture que des souches ρ^{+} . Dans le cas d'une souche possédant un génome mitochondrial sauvage, le milieu de sélection est le milieu respiratoire riche YPEG. Les colonies ne cultivant pas sur ce milieu présentent un défaut respiratoire, qui est associé au génotype $\rho^{-/0}$. Dans le cas d'une souche possédant le marqueur d'auxotrophie *ARG8m* introduit dans son génome mitochondrial, le milieu de sélection est le milieu fermentescible synthétique dépourvu en arginine (CSM-Arg). La croissance des colonies est ici associée à la présence d'un génotype ρ^{+} *ARG8m* permettant la production de la protéine Arg8p. Pour déterminer le pourcentage de

cellule $p^{-/0}$, un rapport est effectué entre le nombre de colonies de la boîte de garde sur milieu fermentescible et le nombre de colonies sur milieu sélectif.

2.2.9 Echange de marqueur de sélection

Cette technique permet d'échanger par transformation et recombinaison un marqueur de prototrophie en un autre (Cross 1997). Dans ce travail, nous avons utilisé le plasmide M2660 (Tableau 4, page 85). Il comporte une cassette de disruption constituée du gène *LYS2* entouré par les séquences 5' et 3' du gène *URA3*. Cette cassette est libérée du plasmide après digestion par *HindIII*. Après transformation de la souche *Lys2 URA3* et intégration de la cassette contenant *LYS2* au locus de *URA3*, la sélection des clones d'intérêt *ura3 LYS2* s'effectue par leur capacité à croître en milieu dépourvu de lysine et leur incapacité à croître en milieu dépourvu en uracile.

2.2.10 Délétion d'un gène nucléaire chez la levure

La délétion d'un gène nucléaire chez la levure est réalisée grâce à la recombinaison de la cassette de résistance au G418 KanMX4 au locus du gène dont on souhaite la délétion. Deux méthodes d'obtention de la cassette de résistance sont utilisées. La première consiste à amplifier par PCR le gène KanMX4 porté par le plasmide pUG6 (Tableau 4, page 85). Les amorces utilisées contiennent à leur extrémité 3' la séquence permettant l'amplification de KanMX4 et en 5' la séquence permettant la recombinaison homologue du gène dont on souhaite la délétion. Cette technique est employée pour la délétion d'*ATP3* (Tableau 5, page 94). Une deuxième méthode génère la cassette de délétion en employant comme matrice pour la PCR, une souche préalablement délétée pour le gène souhaité par KanMX4 (par exemple une souche provenant de la banque Euroscarf). Les amorces délimitent une zone englobant KanMX4 et les séquences en 5' et en 3' du gène à déléter nécessaires à la recombinaison (Tableau 5, page 94). C'est la méthode employée pour la délétion d'*ATP15*. Quelle que soit la méthode utilisée, les souches sont ensuite transformées par la cassette de délétion. Les transformants sont ensuite étalés sur un milieu de sélection YPGA complété par du G418 à 200 $\mu\text{g/mL}$. Les clones positifs sont sous-clonés sur le même milieu. La délétion provenant de l'intégration de la cassette est ensuite vérifiée par PCR.

2.2.11 Détermination de la ploïdie par cytométrie de flux sur levures

Ce protocole permet de déterminer la ploïdie des cellules en marquant l'ADN par de l'iodure de propidium (Hutter et Eipel 1979). $0,3$ à $1,2 \cdot 10^7$ cellules d'une culture en phase exponentielle de croissance sont centrifugées. Les cellules sont suspendues dans 1 mL d'éthanol à 70 % puis incubées à température ambiante pendant 1 h. Après une nouvelle centrifugation, les cellules sont suspendues dans 1 mL de tampon PBS 1 X (187 mM NaCl ; 2,7 mM KCl ; 10 mM Na_2HPO_4 ; 1,76 mM KH_2PO_4). Le lavage au PBS 1 X est répété une fois. Les cellules sont suspendues dans 100 μL de PBS 1 X contenant 0,1 % (m/v) de RNase, et incubées pendant 2 h à 37 °C. Après centrifugation, les cellules sont lavées au PBS 1 X. Le culot est ensuite repris dans 100 μL de PBS contenant de l'iodure de propidium à une concentration de 0,5 mg/mL. Après une incubation de 1 h à 4 °C à l'obscurité, le volume est complété par 900 μL de PBS. Les échantillons subissent une sonication durant 10 secondes et sont traitées immédiatement en cytométrie de flux. Des cultures de type sauvage haploïde et diploïde asynchrone sont utilisées pour calibrer le cytomètre de flux. Les signaux correspondant à des doublets de cellules ou des débris cellulaires sont éliminés sur la base de l'aire de fluorescence par rapport au maximum de fluorescence de chaque événement.

2.3 Techniques de biologie moléculaire

2.3.1 Extraction des acides nucléiques

2.3.1.1 Extraction plasmidique à partir de bactéries

L'extraction d'un plasmide à partir de souches de bactéries est réalisée à l'aide du kit Qiagen Plasmid Midi Kit, selon les recommandations du fabricant.

2.3.1.2 Extraction d'ADN génomique de levure pour séquençage de gène

$1,2 \cdot 10^8$ levures sont centrifugées, lavées par de l'eau et de nouveau centrifugées. Les cellules sont resuspendues dans 200 μL de tampon d'extraction (triton X100 2 % (m/v) ; NaCl 100 mM ; Tris 10 mM pH 7,4 ; EDTA 1 mM ; SDS 1 % (m/v)). Un volume de 200 μL d'un mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique (dans un rapport de 25/24/1) et 0,3 g de billes de verre (diamètre de 0,45 à 0,52 mm) sont ajoutés. Le mélange est vortexé 30 secondes 3 fois, avec une pause de 30 secondes entre chaque agitation. Un volume de 200 μL de Tris 10 mM–EDTA 1 mM à pH 7,5 est ajouté. Le mélange est ensuite centrifugé 5 minutes à 16

000 g. La phase aqueuse est prélevée. Un volume de 200 μL de mélange phénol/chloroforme/alcool isoamylique 25/24/1 est ajouté. L'ensemble est vortexé 30 secondes puis centrifugé 5 minutes à 16 000 g. La phase aqueuse est prélevée et un nouveau traitement au phénol/chloroforme/alcool isoamylique 25/24/1 est effectué. La phase aqueuse est ensuite précipitée à l'éthanol. Le culot est repris dans 400 μL de Tris 10 mM–EDTA 1 mM à pH 7,5 et 1 μL de RNase A à 2 U/ μL est ajouté. Le mélange est incubé à 37 °C pendant 20 minutes. 5 μL d'acétate d'ammonium à 8 M et 1 mL d'éthanol absolu sont ajoutés. Après une centrifugation de 5 minutes à 16 000 g, le culot est lavé à l'éthanol à 70 % et séché. Le culot est repris dans 50 μL de Tris 10 mM–EDTA 1 mM à pH 7,5.

2.3.1.3 Extraction d'ADN génomique de levure pour séquençage génomique

Après une culture en milieu YPGA, l'ADN génomique des souches est extrait à l'aide du kit Qiagen Genomic Tip 100/G en suivant les recommandations du fournisseur. 7.10^9 cellules sont utilisées par échantillon.

2.3.1.4 Extraction des ADNmt de levures

Cette extraction est utilisée lors d'amplification par PCR ayant pour matrice l'ADNmt. $1,2.10^9$ cellules sont centrifugées. Le culot est suspendu dans 2 mL d'une solution de Sorbitol 1 M ; EDTA 0,1 M à pH 7,5. 200 μg de Zymolyase 20T sont ajoutés et la suspension est incubée 1 heure à 37 °C. Les sphéropastes sont centrifugés à 6 000 g pendant 5 min. Le culot est resuspendu dans une solution de Tris-HCl 50 mM ; EDTA 20 mM pH 7,4 et du SDS est ajouté à une concentration finale de 1 % (m/v). Après 30 min d'incubation à 65 °C, de l'acétate de potassium est ajouté à une concentration finale de 1,4 M. L'ensemble est incubé 30 min à 4 °C puis centrifugé à 13 000 g pendant 5 min. Le surnageant est prélevé et 3 mL d'isopropanol sont ajoutés. Après 5 minutes à température ambiante, une centrifugation de 13 000 g pendant 10 min est réalisée. Le culot est resuspendu dans 800 μL d'eau comprenant de la RNase A à 0,10 mg/mL. Après une incubation de 30 min à 37 °C, de l'acétate de sodium à pH 5,2 est ajouté à une concentration de 0,3 M ainsi que de l'éthanol à une concentration finale de 70 %. Après une incubation à -20 °C pendant 15 min, la solution est centrifugée à 13 000 g pendant 10 min. Le culot est suspendu dans 400 μL d'eau.

2.3.1.5 Extraction et vérification des ARN totaux de levures

Les ARN totaux sont extraits en utilisant du TRI Reagent (Sigma-Aldrich) en suivant les recommandations du fournisseur. Un potter à piston est utilisé pour faciliter la lyse cellulaire et l'extraction des ARN. Les extraits sont ensuite traités à la DNase (RQ1 RNase-free DNase de Promega) pour éliminer toute trace d'ADN restant suivi d'une extraction au phénol-chloroforme. Une PCR ciblant l'ADNmt est réalisée pour vérifier l'absence d'amplification. L'intégrité des ARN est vérifiée par migration sur gel d'électrophorèse non-dénaturant.

2.3.2 Dosage des acides nucléiques

Le dosage des acides nucléiques est réalisé par mesure spectrophotométrique à 260 nm. L'estimation de la pureté est effectuée en établissant les rapports entre les absorbances à 260 nm et 230 nm pour estimer la contamination des sels et entre 260 nm et 280 nm pour estimer la contamination des protéines dans l'échantillon. Un rapport $\frac{260\text{ nm}}{230\text{ nm}}$ supérieur à 2 et un rapport $\frac{260\text{ nm}}{280\text{ nm}}$ supérieur à 1,8 sont considérés comme satisfaisant les conditions de pureté. Les mesures sont réalisées sur l'appareil Nanodrop.

2.3.3 Détermination de la séquence nucléotidique

2.3.3.1 Séquençage d'un gène

La méthode de séquençage est basée sur celle de Sanger. Les réactions de séquençage engagent de 2 à 20 ng/ μL de matrice d'ADN. Le milieu réactionnel contient l'enzyme Big Dye Terminator v3.1 et le tampon correspondant, utilisé suivant les recommandations du fabricant (Applied Biosystems) ainsi que 0,5 $\mu\text{mol/L}$ d'une amorce (Tableau 5, page 94). Le programme de réaction est le suivant : 96 °C 1 minute ; suivi de 25 cycles de 96 °C pendant 10 secondes, 50 °C pendant 5 secondes, 60 °C durant 4 minutes. Le produit de réaction est analysé par la Plateforme de Génomique Fonctionnelle de l'Université de Bordeaux.

2.3.3.2 Séquençage global d'un génome

Le séquençage global utilisé repose sur la technologie de la société Illumina. La méthode permet de réaliser un multiplexage des échantillons (Lefrancois *et al.* 2009). Elle consiste en la génération de fragments aléatoires d'ADN génomique de 200 à 500 pb. Des

adaptateurs nucléotidiques sont ensuite ligaturés aux fragments d'ADN pour constituer une banque. Ces oligonucléotides permettent l'hybridation des matrices à la surface du support où est réalisée la réaction de séquençage. Les adaptateurs contiennent également les sites d'hybridation des amorces de PCR et de séquençage ainsi qu'une séquence « index » de 6 bases qui permet de traiter plusieurs échantillons au sein d'une même expérience. Les brins d'ADN de la banque subissent plusieurs cycles d'amplification-fixation, ce qui forme des foyers d'ADN clonal en grande quantité. Un des deux brins est supprimé et la réaction de séquençage est réalisée grâce à une amorce universelle. Dans le cas du séquençage *paired-end*, un nouveau cycle d'amplification par PCR est réalisé, le brin non précédemment séquencé est conservé puis séquencé. L'ensemble des séquences est ensuite apparié pour reconstituer la séquence du génome. La réalisation des séquences et leur assemblage ont été réalisés à l'EMBL de Heidelberg par l'équipe de Lars Steinmetz.

2.3.4 Amplification par PCR

L'enzyme utilisée pour l'amplification par PCR (réaction de polymérisation en chaîne) est la GoTaq DNA Polymerase de Promega. Un mélange réactionnel de PCR est constitué de 0,025 unités de polymérase ; 0,2 mM de chacun des quatre dNTP ; 1,5 à 3 mM de MgCl₂ ; 0,5 μM de chaque amorce ; le tampon de l'enzyme à 1 X à pH 8 et une concentration en matrice variant selon sa nature : 0,2 ng/μL pour un plasmide ; 2,5 ng/μL pour un ADNmt ou un ADN nucléaire. Les conditions d'amplification sont : dénaturation initiale de 2 minutes à 95 °C, suivie de 35 cycles constitués de 3 étapes : une dénaturation à 95 °C pendant 10 secondes, 30 secondes d'hybridation à une température dépendant des amorces, puis une élongation à 72 °C dont la durée dépend de la taille du fragment à amplifier (1 min par kb). Une étape finale de 5 minutes à 72 °C sert à la terminaison des produits d'élongation. La température d'hybridation dépend de la température de fusion (T_m) des amorces utilisées. En pratique la température d'hybridation retenue est inférieure de 5 °C à celle du T_m le plus bas du couple d'oligonucléotides concernés (Tableau 5, page 94). Des PCR sur colonies peuvent être réalisées : une colonie de levure est resuspendue dans 50 μL d'eau et chauffée 5 minutes à 100 °C puis centrifugée 1 minute à 12 000 g. La réaction de PCR se fait alors sur 1 μL du surnageant pour un volume final de réaction de 25 μL.

Nom	Séquence 5'-3'	Tm en °C	Utilisation
ATP15tet1	cgcgatccATGTCTGCCTGGAGGAAAGCTG	57	Clonage <i>ATP15</i>
ATP15tet2	ataagaatcgggccgcCTATTTTGTATTGGAGTGGGTTC	52	Clonage <i>ATP15</i>
ATP15-300	AGCATTGTACTAGTTCTCTCG	50	Cassette de délétion d' <i>ATP15</i> :: <i>KanMX4</i>
ATP15+300	AGAAGGGGTGACCAAAGACCG	56	Cassette de délétion d' <i>ATP15</i> :: <i>KanMX4</i>
ATP3tet1	ataggatccATGTTGTCAAGAATTGTATCAAACAATG	53	Clonage <i>ATP3</i>
ATP3tet2	atagcgccgcTCATCCCAAAGAGGAAGCACCAGTAATAATATC	61	Clonage <i>ATP3</i>
GUTR1	catcctgcagTAAAAAATCACCTGCATTGCC	52	Clonage 3' UTR d' <i>ATP3</i>
GUTR2	gatcaagcttCAAATCATTGAGATTGCGACC	50	Clonage 3' UTR d' <i>ATP3</i>
ATP3/Kan/Pro	aggtgaaacaattgaagacgagcagtaaacattatatttagtagtcCATAGGCCACTAGTGGATCT	52	Cassette de délétion <i>ATP3</i> :: <i>KanMX</i>
ATP3/Kan/Ter	tttacaaaaacaacgtcaataaagaggcaatgcagggtgattttttaCAGCTGAAGCTTCGTACGC	53	Cassette de délétion <i>ATP3</i> :: <i>KanMX</i>
ATP8.3	CGGGATCCCGCTCCGCAAAGCCGGATTAATG	68	Clonage <i>ATP8</i>
ATP8.120	ATATAAATATATAGTCCGTAAGGA	47	Clonage <i>ATP8</i>
ATP9.1	AATAAGATATATAAATAAGTCCC	45	Clonage <i>ATP9</i>
ATP9.67	GAATGTTATTAATTTAATCAAATGAG	47	Clonage <i>ATP9</i>
ATP6.1	GTATGATTCCATATTCATTG	45	Sonde <i>ATP6</i> Southern
ATP6.2TZA	ATGTATCTTTTAAGTATGATGCTG	49	Sonde <i>ATP6</i> Southern et séquençage <i>ATP6</i>
ENS2.1	CAACGTACACCTATATCTAATAAAAAGATTAATA	54	Sonde <i>ENS2</i> Southern
ENS2.2	GAGAAAGCATTAACAAAATAAGG	48	Sonde <i>ENS2</i> Southern
ENS2.6	GATACATTATTATTTAAAGATATAAGACCT	51	Sonde <i>ENS2</i> Southern

Nom	Séquence 5'-3'	T _m en °C	Utilisation
ENS2.3	GAATTCCTTTTTGTATTATAA	37	Sonde <i>ENS2</i> Southern
ATP6q1	TGGTTCAAGATGATTAATTCACAA	49	RT-PCR Q <i>ATP6</i> et séquençage <i>ATP6</i>
ATP6q2	AAATGAGCTGATAATGCAAATGAGT	51	RT-PCR Q <i>ATP6</i>
P9	CCTTTCGGTGATTTAGTACC	50	RT-PCR Q <i>ARG8^m</i>
P10	GGAAATACACCACCTTCACC	52	RT-PCR Q <i>ARG8^m</i>
ATP6.9b	GGGCGGACCCCAAAGGAGGAG	67	Séquençage <i>ATP6</i>
ATP6.3TZA	CAACGTACACCTATATCTAAT	45	Séquençage <i>ATP6</i>

Tableau 5

Tableau des amorces utilisées. Les bases en majuscules indiquent la séquence d'appariement avec la matrice. Le calcul des T_m ne tient compte que de cette séquence d'appariement.

2.3.5 Clonage d'un fragment d'ADN dans un plasmide

Le clonage d'un fragment d'ADN obtenu par PCR se fait en clonant le fragment en bord franc dans le plasmide pMOS, avec le kit pMOSBlue Blunt Ended Cloning de GE Healthcare, selon les recommandations du fabricant. Les bactéries pMOSblue transformées avec cette ligation sont sélectionnées sur boîte LB avec 100 µg/mL d'ampicilline et contenant 40 µg/mL de X-Gal et 40 µg/mL d'IPTG. Les colonies blanches possèdent le pMOS avec le fragment intégré dans le site de clonage LacZ. La vérification de l'insertion du fragment cloné est effectuée en observant le relargage de l'insert après digestion du plasmide par des enzymes de restriction coupant au niveau du multisite de clonage. Dans un deuxième temps, ce plasmide est complètement digéré par les enzymes de restriction appropriées afin d'extraire le fragment d'intérêt. Le plasmide levure dans lequel ce fragment doit être cloné est lui aussi digéré par les mêmes enzymes de restriction. La T4 DNA ligase de Promega est utilisée pour insérer le fragment dans le plasmide de levure aux sites voulus. Une autre méthode est de réaliser l'amplification par PCR avec des amorces contenant dans leur extrémité 5' les sites de restriction nécessaires au clonage dans le plasmide levure voulu. Après PCR le produit est digéré par les enzymes voulues et l'insert est lié par la T4 DNA ligase au plasmide de levure

préalablement digéré par les mêmes enzymes. La vérification de l'insertion dans le plasmide de levure final est effectuée par digestion enzymatique, PCR et séquençage de l'insert.

2.3.6 Southern-blot

Les ADN génomiques ont été extraits comme décrit par Valach *et al.* (Valach *et al.* 2008). 20 µg d'ADN génomique par échantillon sont digérés durant la nuit par 1 unité des enzymes *EcoRI*, *EcoRV* et *PvuII*. Les ADN digérés sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose à 0,8 % (m/v). La migration s'effectue dans du tampon TAE (40 mM Tris-Acétate, 1 mM EDTA). Après migration, le gel est traité pour casser les molécules d'ADN. Le gel est incubé pendant 15 minutes dans une solution de 0,25 M HCl ; puis dans une solution de 0,5 M NaOH et 1,5 M NaCl et finalement dans une solution de 1 M de Tris-HCl à pH 7,5 et 1,5 M NaCl. Le transfert des ADN du gel sur membrane Hybond N+ (GE Healthcare) est effectué pendant 2 heures en utilisant du tampon de transfert 10X SSC (1,5 M NaCl ; 0,15 M citrate de sodium), à l'aide d'un système de pompe à vide (VacuGene de Pharmacia Biotech). Les ADN sont fixés de façon covalente à la membrane par exposition aux UV à 254 nm en appliquant 120 mJoules/cm² de membrane (Stratalinker Appligene®). Les sondes sont radiomarquées au ³²P en utilisant le kit de Random Priming Rediprime II d'Amersham Biosciences, selon les recommandations du fabricant. La radioactivité non incorporée est éliminée en utilisant les colonnes MicroSpin G-25 d'Amersham Biosciences, selon les recommandations du fabricant. Les membranes sont mises en présence de 20 mL de tampon d'hybridation (1,08 mM NaCl ; 60 mM NaH₂PO₄ ; 6 mM EDTA ; 0,1% SDS à pH 7 et 100 µg/mL ADN de sperme de saumon dénaturé) et de l'intégralité des sondes purifiées et dénaturées. L'hybridation s'effectue à 50 °C pendant 16 h. Les membranes sont ensuite lavées dans du tampon de lavage (0,036 mM NaCl ; 2 mM NaH₂PO₄ ; 1,2 mM EDTA ; pH 7 et 0,1 % SDS) à 45 °C pendant 15 minutes. Cette étape est répétée deux fois. L'autoradiographie des membranes est réalisée en employant les films Hyperfilm d'Amersham.

2.3.7 Quantification d'ARN mitochondriaux par RT-PCR quantitative

La reverse transcription est effectuée avec le kit ImProm-IITM Reverse Transcription System de Promega, suivant les instructions du fournisseur. 1 µg d'ARN est mis en présence de 0,25 µg d'amorces aléatoires de 6 bases, chauffé à 65 °C pendant 5 min puis refroidit brutalement à 4 °C pendant 5 min et de nouveau chauffé 5 min à 25 °C. Un mélange réactionnel composé de tampon 1 X, MgCl₂ à 6 mM, dNTP à 0,5 mM, 0,5 unité de RNAsin

(inhibiteur de ribonucléase) est ajouté, ainsi que de la transcriptase inverse commerciale. En parallèle, des réactions sans transcriptase inverse sont réalisées et traitées de manière identique. Les mélanges réactionnels sont incubés pendant 1 h à 42 °C. La transcriptase inverse est ensuite inactivée par une élévation de la température à 70 °C pendant 15 minutes. Les ADNc sont ensuite dilués au 1/10^e et au 1/100^e puis amplifiés en utilisant le kit ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mix d'ABgene. Les couples d'amorces pour la PCR ciblent une région codante d'*ATP6* et d'*ARG8^m* (Tableau 5, page 94). La concentration des oligos utilisée est de 75 nM. Les amplifications sont réalisées en trois séries indépendantes sur le thermocycleur Mx3000P™ Real-Time PCR (Stratagene) suivant les instructions du fabricant. L'amplification consiste en une étape initiale de 15 min à 95 °C, suivie de 40 cycles à 95 °C pendant 10 s, 45 °C pendant 30 s et 72 °C pendant 30 s. En parallèle une gamme d'ADN est réalisée pour calculer l'efficacité de la réaction de PCR pour chacun des deux couples. L'ADN double brin va fixer le colorant SYBR green présent dans le tube réactionnel et la fluorescence émise sera reliée à la quantité d'ADN dans la réaction à un moment t. En fin d'amplification une courbe de dissociation du produit permet de s'assurer que la fluorescence est le fait d'un seul produit PCR. Le moment du cycle où une fluorescence spécifique de l'amplification apparaît (Ct) permet de déterminer la concentration en ADN initiale. La quantité d'ARNm d'*ATP6* par souche est calculée en intégrant l'efficacité des réactions PCR et les moments d'apparition de la fluorescence et après normalisation par rapport à l'expression des ARNm d'*ARG8m* en employant la méthode des $\Delta\Delta^{ct}$ (Pfaffl 2001).

2.4 Techniques de biochimie

2.4.1 Extraits protéiques de levures

Les protéines totales sont extraites à partir de 6.10^7 cellules en phase exponentielle de croissance. Les cellules sont centrifugées 3 minutes à 2 000 g, et incubées 10 minutes à 4 °C dans 250 μ L d'une solution à 1,85 M NaOH et 7,4 % (v/v) β -mercaptoéthanol. Un volume identique de TCA à 50 % est ajouté et les cellules sont incubées à 4 °C pendant 10 minutes. Après une centrifugation de 5 minutes à 16 000 g à 4 °C, le surnageant est éliminé et le culot est solubilisé par 50 μ L de SDS à 5 %. La solution est neutralisée par ajout de Tris à 3 M à pH 8,9. Les extraits solubilisés sont ensuite chauffés 15 minutes à 42 °C. Après centrifugation à 16 000 g pendant 5 minutes, le surnageant est prélevé puis stocké à -20 °C.

2.4.2 Préparation de mitochondries

Ce protocole de préparation de mitochondries (Guerin *et al.* 1979) combine la digestion enzymatique de la paroi, la séparation mécanique et des centrifugations différentielles pour obtenir une fraction enrichie en mitochondries. L'extraction étant réalisée dans un tampon iso-osmotique, il est possible de réaliser des études fonctionnelles sur cet extrait enrichi en mitochondries.

La souche d'intérêt est cultivée dans un volume de 1 L dans un milieu approprié (généralement milieu galactose ou glycérol) jusqu'à être en phase exponentielle de croissance (entre 1 et 4 D.O./mL à $\lambda = 650$ nm, soit un maximum de $4,8 \cdot 10^7$ cellules par mL). Les échantillons doivent toujours être à 4 °C lors des différentes étapes de l'extraction. Les cellules sont récoltées par centrifugation 5 minutes à 5 740 g. Un lavage à l'eau distillée à 4 °C est effectué. Le culot est alors repris dans une solution de Tris 0,1M ; β -mercaptoéthanol 0,5 M ; pH 9,3 à raison de 20 mL/g de poids sec. Le poids sec est calculé selon la formule : poids sec (g) = D.O. à 650nm/mL x volume de culture (L) x 0,28. Les cellules sont incubées 10 minutes à 32 °C, le β -mercaptoéthanol fragilisant les parois par réduction des ponts disulfures. L'ensemble est alors complété par ajout de tampon KCl 0,5 M ; Tris 10 mM à pH 7, puis centrifugé 5 minutes à 3840 g. De manière identique, le culot est lavé deux fois avec le tampon KCl. Le culot est repris à raison de 10 mL/g de poids sec dans du tampon sorbitol 1,35 M ; EGTA 1 mM ; acide citrique 10 mM ; phosphate disodique 30 mM ; pH 5,8 et complété avec de la zymolyase à raison de 15 mg/g de poids sec (β -D-1,3-glucanase issue d'*Artherobacter luteus* (Seikagaku Biobusiness)). La digestion s'effectue par incubation à 32 °C pendant 20 minutes. La zymolyase est une enzyme digérant la paroi cellulaire. Pour vérifier son action un aliquot de 4 μ L de la digestion est mis en présence de 15 μ L d'eau distillée. En absence de paroi le choc osmotique va détruire les protoplastes, ce qui se vérifie au microscope optique. Si la digestion n'est pas complète, la durée d'incubation peut être augmentée. Le mélange est ensuite complété avec du tampon de lavage des protoplastes (0,75 M Sorbitol ; 0,4 M Mannitol ; 10 mM Tris-Maléate ; 0,1 % (m/v) BSA ; pH 6,8) et centrifugé à 12 000 g pendant 5 minutes. Les protoplastes sont lavés par une reprise délicate du culot dans un potter de 15 cm³ dans le même tampon de lavage protoplaste, suivi d'une centrifugation de 5 minutes à 12 000 g. Cette opération est renouvelée deux fois. De la même façon les protoplastes sont repris dans du tampon d'homogénéisation (0,6 M Mannitol ; 2 mM EGTA ; 10 mM Tris-Maléate ; 0,2 % m/v BSA ; pH 6,8) et traités au potter. Les protoplastes

sont ensuite lysés par un passage au mixer 3 fois pendant 5 secondes. Les étapes suivantes vont permettre de séparer les mitochondries des autres constituants cellulaires par des centrifugations différentielles. Le lysat obtenu est centrifugé à 750 g pendant 8 minutes. Le surnageant est récupéré. Le culot est repris dans du tampon d'homogénéisation, homogénéisé au potter puis centrifugé à 750 g pendant 8 minutes. Le surnageant est à nouveau conservé. Le dernier culot contenant les débris cellulaires et les cellules entières est jeté. Les deux surnageants de centrifugation basse vitesse sont centrifugés pendant 10 minutes à 12 000 g. Le culot de mitochondries obtenu est resuspendu avec un tampon de récupération pH 6,8 (0,6 M Mannitol ; 2 mM EGTA ; 10 mM Tris-Maléate). Un nouveau cycle de centrifugation différentielle est réalisé afin d'améliorer la purification des mitochondries vis à vis des autres membranes cellulaires. Le culot de mitochondries isolées obtenu après une centrifugation de 10 minutes à 12 000 g est finalement récupéré dans du tampon de récupération, homogénéisé au potter puis transvasé dans un nouveau tube. De cette préparation, 5 µL sont prélevés et solubilisés dans 95 µL de SDS 5 % (m/v) puis incubés à 37 °C durant 30 minutes. Cette solution est utilisée pour déterminer la concentration de protéines mitochondriales par la technique de dosage colorimétrique de Lowry. Les mitochondries obtenues sont utilisées dans la journée pour les expériences de respiration, mesure du potentiel de membrane et vitesse de synthèse d'ATP. Après ces analyses le volume restant de préparation de mitochondries est congelé par projection de gouttes de mitochondries dans de l'azote liquide. Les billes obtenues sont conservées à -80 °C.

2.4.3 Quantification des protéines par colorimétrie

Cette méthode de quantification dérive de celle décrite par Lowry (Lowry *et al.* 1951). 5 µL de dilutions au 1/10^e et au 1/20^e des échantillons à doser (extraits totaux ou mitochondriaux) sont solubilisés dans du SDS 5 % (qsp 75 µL) et 750 µL d'une solution de SO₄Cu 0,01 % m/v ; NaK 0,02 % m/v ; CO₃Na₂ 3,92 % m/v (solubilisé dans du NaOH à 0,1 M) sont ajoutés. Après un traitement à 37 °C pendant 30 minutes, un volume de 75 µL de réactif de Folin (dilué au 1/3) est ajouté, et les solutions sont incubées à 37 °C pendant 6 minutes. L'absorbance est ensuite mesurée à la longueur d'onde de 750 nm. Une gamme étalon de quantité croissante de protéine albumine bovine (0 à 10 µg, dissous dans du SDS 5 %) est réalisée en parallèle pour établir la concentration des échantillons à doser.

2.4.4 Séparation des complexes membranaires mitochondriaux par BN-PAGE

Les préparations de mitochondries sont décongelées rapidement par passage des tubes dans de l'eau tiède. La quantité de protéine est déterminée par dosage colorimétrique de Lowry. Un volume équivalent à 250 à 500 µg de protéines mitochondriales est centrifugé 5 minutes à 16 000 g à 4 °C pour culoter les mitochondries. Elles sont suspendues dans un volume de 50 µL de tampon d'extraction (HEPES à 30 mM ; acétate de potassium à 150 mM ; glycérol 12 % m/v ; acide aminocaproïque à 2 mM ; EDTA à 1 mM; cocktail d'inhibiteur de protéases de Roche) contenant de la digitonine pour un rapport de 2 g de digitonine par g de protéines. La digitonine est un détergent doux qui solubilise les complexes membranaires mitochondriaux en conservant leur organisation en super-complexes (Kun *et al.* 1979). La solution est incubée pendant 30 minutes dans la glace. Après une centrifugation 30 minutes à 25 000 g à 4 °C, le surnageant est récupéré.

Les complexes membranaires mitochondriaux vont être séparés par migration sur un gel BN-PAGE. Cette technique permet de résoudre les différentes formes supramoléculaires de l'ATP synthase tout en conservant l'activité enzymatique. Après extraction des protéines de la membrane mitochondriale interne par la digitonine, les complexes vont être séparés grâce à l'utilisation d'un tampon de migration contenant du Bleu de Coomassie et d'un gel gradient d'acrylamide/bis-acrylamide non dénaturant. Ce protocole est basé sur l'article de Schägger et von Jagow (Schägger et von Jagow 1991). Le Bleu de Coomassie G250 se lie aux protéines et apporte une charge négative aux protéines. La mobilité électrophorétique des protéines et des complexes protéiques dépendra majoritairement de leur taille et de la quantité de colorant lié aux protéines. Pour créer un gradient en acrylamide, deux solutions de concentrations différentes sont utilisées : la A à une concentration d'acrylamide à 3 % et la B de 13 %. Elles sont disposées dans deux compartiments reliés par leur partie inférieure, un des deux compartiments étant connecté à une pompe péristaltique. Sous l'effet de l'aspiration créée par la pompe, la solution A se déverse et se dilue progressivement dans la solution B. L'homogénéisation des solutions est assurée par une agitation dans le compartiment de la solution B. En aval de la pompe un système de gel récolte la solution. Le bas du gel va contenir essentiellement de la solution B à 13 % acrylamide puis au fur et à mesure du mélange des solutions, un gradient d'acrylamide va se constituer. Le haut du gel sera composé essentiellement de solution A à 3 % d'acrylamide. La solution A est constituée de 2,96 % de

mix acrylamide/bis-acrylamide (29,1/0,9) ; 1 X tampon de gel pH 7 (25 mM Imidazole ; 0,5 M Acide 6-aminocaproic) ; 0,04 % APS ; TEMED. La solution B est constituée de 200 g/L de glycérol ; 13 % de mix acrylamide/bis-acrylamide (29,1/0,9) 1 X tampon de gel pH 7 (25 mM Imidazole ; 0,5 M acide 6-aminocaproic) ; 0,03 % APS ; TEMED. Le système à deux compartiments permettant de constituer le gradient est chargé avec 12,5 mL de la solution A et 11,5 mL de la solution B. Le gel de concentration est constitué de 2,96 % de mix acrylamide/bis-acrylamide (29,1/0,9) ; 1 X tampon de gel pH 7 ; 0,08 % APS ; TEMED. Le volume issu de l'extraction des complexes membranaires mitochondriaux est complété par du tampon de charge pour atteindre une concentration finale de 0,01 % (m/v) de Bleu de Coomassie G250 et 32mM d'acide 6 aminocaproïque. Le tampon à la cathode est composé d'imidazole à 7,5 mM, de tricine à 50 mM, et de 40 mg/L de Bleu de Coomassie G250, ajusté à pH 7 à 4 °C. Le tampon à l'anode est composé d'imidazole à 25 mM, ajusté à pH 7 à 4 °C. La migration s'effectue à 10 mA constant pendant environ 8 h.

2.4.5 Visualisation de l'activité ATPasique sur gel

Après séparation des complexes protéiques en condition non dénaturante (BN-PAGE), il est possible de détecter l'ATP synthase du fait de son activité ATPasique. Dans la mitochondrie, le principal complexe protéique possédant ce type d'activité est l'ATP synthase, via son secteur F_1 . La méthode décrite par Grandier-Vazeille et Guérin permet de révéler cette activité dans le gel (Grandier-Vazeille et Guerin 1996). Le gel est incubé sous agitation pendant 3 heures dans un premier tampon de révélation (270 mM Glycine ; 35 mM Tris à pH 8,4). Il est ensuite incubé dans un deuxième tampon de révélation (premier tampon de révélation, complété par 14 mM de $MgSO_4$; 0,2 % de $Pb(NO_3)_2$ et 8 mM d'ATP), jusqu'à apparition de bandes blanches localisées dans le gel. Ces bandes correspondent au précipité formé par le plomb et le phosphate généré par la dégradation de l'ATP par l'ATP synthase. Cela permet d'identifier les différentes formes de l'ATP synthase : les formes monomériques (600 kDa), dimériques (1 200 kDa) mais également des formes oligomériques. Suivant les conditions le secteur F_1 libre apparaît parfois (450 kDa).

Une fois la révélation faite, le tampon est éliminé et le gel est décoloré par une solution d'éthanol 30 % et d'HCl concentré. Une coloration au bleu de Coomassie permet d'apprécier l'ensemble des protéines présentes sur le gel.

2.4.6 Electrophorèse des protéines en conditions dénaturantes

Deux méthodes sont utilisées, la séparation sur gel 17 % selon Laemmli est la plus couramment utilisée. L'électrophorèse selon Schägger est utilisée pour résoudre des protéines de petites tailles comme Atp9p. Typiquement de 10 à 20 µg d'extraits protéiques mitochondriaux ou 50 à 100 µg d'extraits protéiques totaux sont utilisés par piste. Pour visualiser Atp9p uniquement sous sa forme monomérique, du chloroforme est ajouté à l'échantillon à déposer (dilution au 1/10^e, v/v).

2.4.6.1 Electrophorèse selon la méthode de Laemmli

Le gel de séparation est constitué de 17 % d'acrylamide:bis-bisacrylamide (à un rapport de 37,5:1) ; 0,375 M de Tris-HCl pH 8,9 ; 0,1 % de SDS ; 0,1 % d'APS ; TEMED. Le gel de concentration contient 4 % d'acrylamide:bis-bisacrylamide (rapport 37,5:1) ; 0,06 M de Tris-HCl pH 6,8 ; 0,1 % de SDS ; 0,4 % d'APS ; TEMED. Les échantillons sont dilués dans un tampon de charge (SDS à 4 %, glycérol à 12 % (m/v), Tris à 50 mM, β-mercaptoéthanol à 2 % (v/v), 0,01 % (m/v) de Bleu de Coomassie G250 à pH 6,8). Le tampon de migration est constitué de 0,025 M de Tris, 0,2 M Glycine, 0,1 % SDS. La migration est effectuée à ampérage constant de 20 mA pendant 1 à 2 h.

2.4.6.2 Electrophorèse selon la méthode de Schägger

Cette méthode d'électrophorèse a été décrite par Schägger (Schagger et von Jagow 1987). Le gel de séparation est constitué de 13 % glycérol, 16 % acrylamide (m/v), 0,5 % bisacrylamide (m/v) ; 1 M Tris HCl pH 8,45 ; 0,1 % SDS ; 0,4 % APS ; TEMED. Le gel de concentration contient 4 % acrylamide (m/v), 0,12 % bisacrylamide (m/v), 1 M de Tris HCl pH 8,45, 0,1 % SDS ; 0,4 % APS ; TEMED. Le tampon de migration à la cathode est constitué de Tris à 0,1 M ; Tricine à 0,1 M ; SDS à 0,1 % (m/v), son pH doit avoisiner 8,25. Le tampon de migration à l'anode est constitué de 0,2 M de Tris ajusté à pH 8,9. Les échantillons sont dilués dans un tampon de charge (SDS à 4 %, glycérol à 12 % (m/v), Tris à 50 mM, β-mercaptoéthanol à 2 % (v/v), 0,01 % (m/v) de Bleu de Coomassie G250 à pH 6,8). La migration est effectuée à voltage constant de 30V pendant 1h, puis à un ampérage constant de 30 mA.

2.4.7 Transfert semi-sec des protéines après électrophorèse à une membrane

2.4.7.1 Transfert classique

Après séparation sur gel en électrophorèses, les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose. Trois épaisseurs de papier Whatman 3MM sont imbibées du premier tampon d'anode (0,3 M Tris ; 75 % éthanol). Deux épaisseurs de papier Whatman sont disposées dessus, imprégnées du deuxième tampon d'anode (25 mM Tris ; 75 % éthanol). Ensuite vient la membrane Immobilon-P Millipore précédemment mouillée par de l'éthanol puis rincée dans le deuxième tampon anode. Le gel est déposé sur cet empilement puis recouvert par quatre épaisseurs de papier Whatman imprégnés dans le tampon de cathode (20 mM Acide 6-amino-n-hexanoïc ; 75 % éthanol). Le transfert a lieu après application d'un ampérage constant de 1 mA/cm² de membrane) pendant 1 heure. Dans le cas de complexes séparés en condition non-dénaturante, l'ampérage appliqué est alors de 2 mA/cm² pendant 90 minutes.

2.4.7.2 Transfert par iblot

Il s'agit également d'une méthode de transfert semi-sec sur membrane de nitrocellulose. Le kit iBlot™ Gel transfer Stacks combiné à l'appareil iBlot Dry Blotting de la société Invitrogen est utilisé selon les recommandations du fabricant. Cette méthode ne concerne que les gels d'électrophorèses réalisés en conditions dénaturantes.

2.4.8 Immunodétection des protéines séparées par électrophorèse

La membrane est incubée au minimum 30 minutes dans un tampon PBS-T 1 X (2,7 mM KCl ; 10 mM Na₂HPO₄, 2H₂O ; 1,76 mM KH₂PO₄ ; 0,14 M NaCl ; 0,05 % v/v Tween-20 ajusté à pH 7,4) complété par 5 % (m/v) de lait écrémé déshydraté. L'ensemble des opérations est effectué sous agitation et à température ambiante. L'anticorps primaire est ajouté directement dans ce tampon, et la membrane est mise à incuber pendant au moins 2 heures. La concentration de l'anticorps primaire dépend de l'anticorps utilisé (voir tableau des anticorps, page 103). Après hybridation, la membrane est lavée par du PBS-T 1 X pendant 5 minutes. Cette opération est renouvelée 3 fois. La membrane est ensuite mise en présence de l'anticorps secondaire pendant 1 h dans du tampon PBS-T 1 X complété par 5 % (m/v) de lait écrémé déshydraté. Selon la nature de l'anticorps primaire, il s'agit soit d'un anticorps anti-

lapin ou soit d'un anti-souris portant l'activité peroxydase. Après hybridation, la membrane est lavée 4 fois de suite par du PBS-T 1 X pendant 5 minutes. La révélation de l'activité peroxydase est effectuée par de l'ECL (GE Healthcare). La numérisation de cette activité est réalisée par le Genegnome ou la G:box (Syngene Bio Imaging). Le temps d'exposition est variable (de 30 secondes à 5 minutes). Les images ne présentant pas de saturation sont exploitées.

Anticorps	Provenance	Dilution	Epitope	Origine
Anti- α	Polyclonal lapin	1/50 000	Protéine entière	J. Velours
Anti- γ	Polyclonal lapin	1/10 000	Protéine entière	J. Velours
Anti-Atp4p	Polyclonal lapin	1/10 000	Protéine entière	J. Velours
Anti-Atp6p	Polyclonal lapin	1/10 000	Protéine entière	J. Velours
Anti-d	Polyclonal lapin	1/10 000	Protéine entière	J. Velours
Anti-Atp9p	Polyclonal lapin	1/10 000	LINGVSRNPSIKDT	J. Velours
Anti- ϵ	Polyclonal lapin	1/10 000	Protéine entière	J. Velours
Anti- δ	Polyclonal lapin	1/10 000	Protéine entière	J. Velours
Anti-Aac2p	Polyclonal lapin	1/10 000	Protéine entière	J. Velours
Anti-Cytochrome <i>b</i>	Polyclonal lapin	1/5 000	Protéine entière	J. Velours
Anti-porine	Monoclonal souris	1/5 000	Protéine entière	Molecular Probes
Anti-lapin HRP	Polyclonal chèvre	1/5 000	Protéine entière	Promega
Anti-souris HRP	Polyclonal chèvre	1/5 000	Protéine entière	Promega

Tableau 6

Tableau des anticorps utilisés.

2.4.9 Mesure de la respiration mitochondriale

Les mesures d'oxygraphie effectuées sur mitochondries fraîchement isolées, sont réalisées à l'aide d'une électrode de Clark. Cette électrode réduit l'oxygène au niveau de la cathode, produisant ainsi une différence de potentiel pouvant être mesurée. L'intensité de cette réaction traduit la quantité d'oxygène présente dans le milieu. L'électrode est positionnée dans une cuve d'oxygraphie de 1 mL thermostatée à 28 °C. 150 µg/mL de protéines mitochondriales sont disposées dans cette cuve, sous agitation constante dans du tampon de respiration (0,65 M mannitol ; 0,36 mM EGTA ; 5 mM Tris-Phosphate ; 10 mM Tris-Maléate pH 6,8).

Les capacités des enzymes de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase vont être déterminées en suivant la vitesse de consommation d'oxygène, en fonction de l'addition de différents substrats et inhibiteurs des complexes de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase (Rigoulet et Guerin 1979). Les substrats et inhibiteurs sont utilisés en combinaison à des concentrations de 4 mM pour le NADH ; 150 µM pour l'ADP ; 4 µM de CCCP ; 3 µg/mL pour l'oligomycine ; 12,5 mM pour l'ascorbate ; 1,4 mM pour le N,N,N,N,-tetraméthyl-p-phenylenediamine (TMPD). Les vitesses de respiration ainsi mesurées sont exprimées en nmol d'oxygène consommée par min par mg de protéines.

Une première mesure est effectuée en présence de NADH. Ce substrat de la chaîne respiratoire va permettre de générer un gradient de protons et de stimuler la consommation d'oxygène par la chaîne respiratoire. Dans cet état, l'ATP synthase ne disposant pas de substrats autres que ceux présent dans la mitochondrie, la chaîne respiratoire n'est donc active qu'à un niveau basal. Cet état est défini comme étant l'état 4.

En présence de NADH et d'ADP, l'ATP synthase synthétise de l'ATP à partir d'ADP, de Pi et du gradient de protons. La consommation du gradient va être détectée par la chaîne respiratoire. Cette dernière va s'activer afin de rétablir le gradient, entraînant ainsi une augmentation de la vitesse de consommation en oxygène. Cet état dit état 3, traduit l'état phosphorylant des mitochondries.

La mesure de la vitesse maximale de l'ensemble de la chaîne respiratoire est effectuée en mettant en présence du NADH et du CCCP. Le CCCP est un découplant transportant les protons à travers la membrane interne mitochondriale, rétablissant ainsi un équilibre en concentration des protons de part et d'autre de la membrane. Le gradient est alors dissipé.

Comme précédemment, la chaîne respiratoire va réagir à l'effondrement du gradient en s'activant pour le compenser. Cette activation se traduit par une vitesse de consommation en oxygène accrue.

Il est possible de déterminer la vitesse de consommation en oxygène du seul complexe IV de la chaîne respiratoire. De l'ascorbate et du TMPD sont introduits, fournissant alors des électrons directement au cytochrome *c*, qui vont les transmettre au complexe cytochrome *c* oxydase. Le complexe IV n'est plus dépendant du flux provenant des complexes en amont de la chaîne respiratoire. L'ajout de CCCP stimule le transfert de protons. La vitesse de consommation maximale en oxygène du complexe IV est alors obtenue.

La mesure de vitesse employant du NADH et de l'oligomycine permet de déterminer si la vitesse obtenue en présence de NADH n'est pas la conséquence d'une fuite de protons par le secteur F_0 de l'ATP synthase. L'oligomycine bloque la translocation des protons de l'ATP synthase. En cas de dissipation du gradient par une fuite du canal à protons, la vitesse obtenue en présence de NADH est supérieure à celle obtenue en présence de NADH et d'oligomycine. En cas d'absence de fuite par le canal à protons les vitesses seront équivalentes.

2.4.10 Mesure du potentiel mitochondrial $\Delta\psi$

Le potentiel de membrane mitochondrial est mesuré par fluorimétrie à l'aide de rhodamine 123 (Emaus *et al.* 1986). La rhodamine 123 est un fluorophore réagissant au potentiel membranaire des mitochondries. En effet, la différence de potentiel entre la matrice et l'espace intermembranaire permet l'entrée de cette molécule dans la mitochondrie. Plus le potentiel de membrane est élevé, plus la quantité de rhodamine 123 séquestrée dans la mitochondrie sera grande et en conséquence plus l'intensité de fluorescence diminuera. Sur mitochondries isolées, la variation du $\Delta\psi$ peut donc être observée en suivant l'évolution de la fluorescence de la rhodamine 123. Comme pour les mesures d'oxygraphie, l'aptitude de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase au maintien d'un potentiel de membrane va être testée en fonction de différents substrats et inhibiteurs. Les expériences sont réalisées grâce à un spectrofluorimètre (Flx de Safas). Les longueurs d'onde utilisées sont de 485 nm pour l'excitation et de 525 nm pour l'émission de fluorescence. Les valeurs obtenues sont arbitraires et semi-quantitatives.

Une quantité de 150 µg/mL de mitochondries isolés est placée dans la cuve de 1 mL du spectrofluorimètre dans 1 mL de tampon de respiration (0,65 M mannitol ; 0,36 mM EGTA ; 5 mM Tris-Phosphate ; 10 mM Tris-Maléate pH 6,8) en présence de 0,5 µg/mL de rhodamine 123. Le substrat générant le potentiel de membrane est l'éthanol (10 mM). Il est préféré au NADH, dont l'autofluorescence pourrait exciter la rhodamine 123. L'ajout du substrat respiratoire permet la génération du potentiel de membrane mitochondriale provoquant l'entrée de la rhodamine 123 dans les mitochondries, et en conséquence la diminution de l'intensité de fluorescence. Le maintien du potentiel est suivi en fonction de différentes molécules : ADP (75 µM) ; oligomycine (4 µM) ; CCCP (4 µM) ; KCN (2 mM) ; ATP (0,2 mM). Le KCN est utilisé comme inhibiteur de la cytochrome *c* oxydase.

2.4.11 Mesure de l'ATP synthétisé par l'ATP synthase

La mesure de la vitesse de synthèse d'ATP par l'ATP synthase est effectuée sur mitochondries fraîchement isolées. Une cinétique de synthèse d'ATP est réalisée. 150 µg de mitochondries sont placés dans une cuve thermostatée à 28 °C dans 1 mL de tampon de respiration (0,65 M mannitol ; 0,36 mM EGTA ; 5 mM Tris-Phosphate ; 10 mM Tris-Maléate pH 6,8). Le substrat respiratoire est le NADH (4 mM). La synthèse d'ATP est effectuée en présence d'un excès d'ADP (1 mM). En parallèle, des échantillons sont traités de manière identique en ajoutant de l'oligomycine (3 µg/mL, 3 minutes d'incubation en présence de l'inhibiteur avant de réaliser le protocole commun à l'ensemble des échantillons). Après ajout d'ADP, 50 µL du mélange réactionnel sont prélevés toutes les 30 secondes pendant 2 minutes, puis rapidement précipité avec 25 µL de solution à 7 % v/v d'acide perchlorique ; 25 mM EDTA. Les échantillons sont centrifugés 5 minutes à 15 000 g à 4 °C et 55 µL sont prélevés. Les surnageants obtenus sont ajustés à un pH proche de 7 par ajout de 2 M KOH ; 0,3 M MOPS et congelés à -80 °C.

L'ATP synthétisé est dosé à l'aide d'une réaction bioluminescente basée sur le couple luciférine/luciférase. L'oxydation de la luciférine en oxyluciférine est une réaction catalysée par l'enzyme luciférase. Cette réaction nécessite la consommation d'un ATP par luciférine oxydée. L'oxyluciférine étant une molécule fluorescente, il est possible de mesurer le pic d'émission de lumière au spectrophotomètre. Le kit utilisé est l'ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II de la société Roche Applied Science.

Les tubes contenant l'ATP synthétisé sont décongelés sur glace et centrifugés 5 minutes à 4 °C à 16 000 g. 1 µL du surnageant de la solution contenant l'ATP est mélangé à 200 µL d'une solution Tris 0,1 M ; EDTA 0,2 mM à pH 7,75 et au couple luciférine/luciférase. Une mesure est réalisée sur un bioluminomètre. L'émission de lumière est proportionnelle à la quantité d'ATP. Une gamme étalon est réalisée avec de l'ATP 10 µM (0 à 100 µL). Après détermination de la quantité d'ATP formée au cours de la cinétique, la vitesse de synthèse d'ATP est calculée, en nmol d'ATP par mg de protéines mitochondriales par min. Les mesures effectuées en présence d'oligomycine permettent de déterminer la quantité d'ATP ne provenant pas de l'activité de l'ATP synthase.

2.4.12 Détermination de l'activité ATPasique de l'ATP synthase

La détermination de l'activité ATPasique est effectuée à partir des mitochondries congelées. Les mitochondries sont décongelées rapidement puis les protéines sont de nouveau dosées par la méthode de Lowry. 150 µg de mitochondries sont disposés dans 900 µL de tampon ATPase à pH 8,4 (0,2 M KCl ; 3 mM MgCl₂ ; 10 mM Tris-HCl) et incubées à 30 °C. 1 série de cinq tubes est réalisée par échantillon : 2 sans oligomycine ; 2 avec 10 µg/mL d'oligomycine et 1 tube contenant 5 % de TCA. Les tubes sont incubés 3 minutes à 30 °C afin de laisser l'oligomycine agir. Une quantité d'ATP correspondant à 5 µM finale est ajoutée et le mélange réactionnel est incubé 2 minutes à 30 °C. La réaction d'hydrolyse d'ATP est stoppée par ajout de 5 % de TCA. La quantité de phosphate produit lors de l'hydrolyse d'ATP en ADP et Pi est alors mesurée (Somlo 1968). Les tubes sont centrifugés 10 minutes à 9 300 g à 4 °C. Sur la moitié du surnageant de chaque tube, 5 volumes de réactif MARIKA à pH 1,5 (5,4 mM HeptaMolybdate d'Ammonium (NH₄)₆Mo₇O₂₄, 4 H₂O ; 28,8 mM de FeSO₄, 7 H₂O) sont ajoutés, vortexés et incubés 10 minutes à l'obscurité. Le phosphore inorganique généré par l'hydrolyse d'ATP va s'associer au molybdate et former du phosphomolybdate qui, réduit par du sulfate ferreux en milieu acide prend une coloration violette quantifiable au spectrophotomètre à la longueur d'onde de 610 nm. En parallèle, une gamme d'étalonnage, avec des quantités croissantes de KH₂PO₄ 1 mM est réalisée (de 0 à 300 nmol de Pi). La vitesse d'hydrolyse d'ATP par milligramme de protéines mitochondriales en est déduite. Les mesures obtenues en présence d'oligomycine permettent de déterminer l'activité ATPasique provenant de F₁ libres ou d'autres enzymes à activité ATPasique, le pourcentage d'activité inhibé par l'oligomycine étant imputable aux ATP synthases complètes.

2.4.13 Marquage *in vivo* au ³⁵S des produits de la traduction mitochondriale

Ce marquage dérive d'un protocole précédemment décrit dans un article de Barrientos (Barrientos *et al.* 2002). Les cellules sont cultivées en phase exponentielle de croissance pendant 2 à 3 générations dans 10 mL de milieu galactose riche. Les cellules sont centrifugées, lavées deux fois dans un milieu minimum galactose 1 % dépourvu de sulfate d'ammonium, puis incubées à 28 °C sous agitation pendant 2 h dans ce même milieu complété par les acides aminés correspondant aux auxotrophies (mais sans méthionine ni cystéine). 2,4.10⁷ cellules sont prélevées pour effectuer le marquage. Les cellules sont centrifugées et reprises dans 0,5 mL du milieu utilisé précédemment, puis 1 mM de cycloheximide préparé extemporanément est ajouté. Les cellules sont incubées pendant 5 min à 25 °C. 50 microcuries d'un mélange de cystéines et de méthionines marquées au ³⁵S (1 000 Ci/mmol, Promix Amersham Biosciences) sont ajoutées et les cellules sont incubées durant 20 min à 28 °C. Les cellules sont ensuite centrifugées 1 min à 10 000 g, et la réaction est stoppée par ajout de 75 µL de tampon de lyse (1,85 M NaOH ; 14 % (v/v) β-mercaptoéthanol ; 10 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). Ce lysat est resuspendu dans 1 mL de TCA à 25 %, centrifugé 5 min à 14 000 g, lavé par de l'eau, et de nouveau centrifugé. Le culot est repris par 50 µL de tampon de dépôt Laemmli (2 % SDS ; 10 % glycérol ; 2,5 % β-mercaptoethanol, 0,06 M Tris-HCl ; pH 6,8 ; 0,002 % (m/v) de bleu de bromophénol). La radioactivité émise est quantifiée au compteur à scintillation en présence de scintillant.

Deux systèmes de gels sont utilisés pour effectuer la résolution spatiale des protéines codées par le génome mitochondrial : un gel SDS-PAGE 17,5 % (Laemmli 1970) pour séparer Atp8p d'Atp9p et un gel SDS-PAGE 12 % à 4 M urée et contenant du glycérol pour la séparation de Cox2p du cytochrome *b*, ainsi qu'Atp6p et Cox3p. Un minimum de 30 000 coups par minute par échantillon est déposé sur gel.

Le gel SDS-PAGE 17,5 % est composé d'un gel de séparation (17,5 % d'acrylamide:bis-acrylamide (rapport 37,5:1) ; 0,375 M de Tris-HCl pH 8,9 ; 0,1 % de SDS ; 0,05 % d'APS, TEMED) et d'un gel de concentration (5 % d'acrylamide:bis-acrylamide (rapport 37,5:1) ; 0,06 M de Tris-HCl pH 6,8 ; 0,1 % de SDS ; 0,05 % d'APS ; TEMED). La migration s'effectue dans un tampon constitué de 0,4 M de Tris, 0,2 M de glycine et 0,1 % de SDS pendant 4 h à 35 mA constant.

Le gel SDS-PAGE 12 %, 4 M urée/glycérol est constitué d'un gel de séparation (12 % d'acrylamide:bis-acrylamide (rapport 37,5:1) ; 4 M urée ; 25 % (m/v) glycérol ; 0,75 M Tris-HCl pH 8,9 ; 0,1 % SDS ; 0,26 % d'APS et TEMED) et d'un gel de concentration (acrylamide:bis-acrylamide à 4 % (rapport 37,5:1), 36 % urée, 6 % glycérol, 0,125 M Tris HCl pH 6,8 ; 0,1 % SDS ; 0,025 % d'APS et TEMED). La migration s'effectue dans un tampon constitué de 0,8 M Tris ; 0,2 M glycine ; et 0,1 % SDS pendant 16 h à 150 Volts constant. Cette méthode de séparation est adaptée de l'article de Kunkele *et al.* (Kunkele *et al.* 1998).

Après migration les gels sont séchés et les protéines radiomarquées sont visualisées par autoradiographie grâce à un PhosphorImager, après un temps d'exposition compris entre 24 et 96 h.

3 Résultats

Une première partie de mon travail de thèse concerne l'étude de la fonction de la sous-unité ϵ du secteur F_1 de l'ATP synthase. Dans une deuxième étude, j'ai tenté d'identifier de nouveaux facteurs impliqués dans la biogenèse du canal à protons de l'ATP synthase.

3.1 Fonction de la sous-unité de l'ATP synthase de *S. cerevisiae*

Nous nous sommes intéressés au rôle de la sous-unité surnuméraire ϵ du secteur F_1 de l'ATP synthase chez *Saccharomyces cerevisiae*, en utilisant un système permettant la régulation de son expression. Ces résultats ont fait l'objet d'une publication, parue cette année (Tetaud et al. 2014). Ils sont résumés ci-dessous, suivis de cette publication.

3.1.1 Résumé

3.1.1.1 La délétion du gène de la sous-unité ϵ de l'ATP synthase de *S. cerevisiae* aboutit à un phénotype pléiotropique.

Le secteur F_1 de l'ATP synthase comprend une tête catalytique sous la forme d'un hexamère $\alpha_3\beta_3$ et de 2 à 3 autres protéines qui constituent la tige centrale reliant cet hexamère à l'anneau de sous-unité c . La tige centrale et l'anneau de c constituent le rotor de l'enzyme qui permet de coupler la force proton motrice à l'énergie mécanique permettant la synthèse d'ATP grâce aux changements de conformation dans la partie catalytique du F_1 . Les ATP synthases mitochondriales et bactériennes diffèrent dans la composition de leur tige centrale. Dans l'enzyme mitochondriale, elle est composée de trois sous-unités : γ , δ et ϵ alors que dans la bactérienne elle n'en comporte que deux : γ et ϵ (Devenish et al. 2008; Walker 2013). Les sous-unités γ sont homologues, la sous-unité mitochondriale δ est homologue à la sous-unité ϵ de la bactérie (Figure 11, page 31). Des travaux précédents ont montré que la délétion du gène *ATP15* codant pour la sous-unité ϵ aboutit à une faible croissance respiratoire (Guelin *et al.* 1993; Lai-Zhang *et al.* 1999). Par ailleurs, les mutants $\Delta atp15$ ($\Delta\epsilon$) présentent un phénotype pléiotropique, leur culture en milieu fermentaire conduit à une conversion importante (70 %) en cellules ρ^{-0} . Pour mieux déterminer quel est l'impact de l'absence de

sous-unité ϵ sur l'ATP synthase, nous avons transformé une levure $\Delta\epsilon$ par un plasmide contenant le gène *ATP15* dont l'expression peut-être régulée négativement par ajout de doxycycline dans le milieu de culture. La souche est nommée Tet- ϵ .

3.1.1.2 Une déplétion de 25 % en sous-unité ϵ conduit à un découplage total de la mitochondrie.

En absence de doxycycline, la souche Tet- ϵ se cultive comme la souche parentale et possède un niveau normal de sous-unités ϵ . En présence de doxycycline (10 mM), après 6 h d'une croissance respiratoire normale, la croissance stoppe brutalement (Figure 1A de l'article 1). Un western-blot sur des échantillons prélevés à ce moment révèle une diminution de quantité de 25 % pour la sous-unité ϵ et de 50 % pour la sous-unité δ comparativement à des cellules cultivées en l'absence de doxycycline (Figure 1B de l'article 1). Les protéines Atp6p, Atp9p et cytochrome *b* codées par le génome mitochondrial voient elles aussi leur quantité diminuée, mais dans une moindre mesure.

Dans la souche Tet- ϵ la vitesse de consommation en oxygène en présence de NADH est de 17 % (respiration à l'état 4) par rapport à l'activité respiratoire maximale (en présence du découplant CCCP) et augmente à 53 % en présence d'ADP (respiration à l'état 3), soient des valeurs normales (Figure 1C, Table 2 de l'article 1). Par contre, les mitochondries des cellules Tet- ϵ cultivées en présence de doxycycline (Tet- ϵ + Dox) ont une vitesse de consommation en oxygène à l'état 4 pratiquement égale à la vitesse découplée des mitochondries contrôles et elle n'est pas stimulée ni par l'ADP ni par le CCCP. L'ajout d'oligomycine permet de diminuer la vitesse de respiration à une valeur proche de celle de l'état 4 de la souche Tet- ϵ où le substrat respiratoire (NADH) est disponible mais pas le substrat de phosphorylation (ADP). On peut en déduire que la déplétion en sous-unités ϵ entraîne un découplage total du compartiment mitochondrial dû à des fuites de protons par le F_0 . Cela est confirmé par des mesures du potentiel mitochondrial ($\Delta\Psi$) (Figure 1D de l'article 1). En effet, les mitochondries des cellules Tet- ϵ cultivées en présence de doxycycline ne peuvent maintenir de potentiel mitochondrial qu'en présence d'oligomycine. Ce découplage n'est pas surprenant. Dans la souche Tet- ϵ + Dox l'accumulation de δ est en effet diminuée de moitié (Figure 1B de l'article 1), et il a été montré qu'il s'agit d'une condition suffisante pour découpler totalement la mitochondrie (Duvezin-Caubet *et al.* 2003).

Les activités d'hydrolyse d'ATP sont comparables entre les mitochondries provenant de cultures en présence ou en absence de doxycycline. Cependant cette activité est un peu moins sensible à la présence d'oligomycine dans les mitochondries partiellement déplétées en sous-unité ϵ (77 % contre 89 % d'inhibition) (Table 3 de l'article 1). Cela suggère un taux de F_1 libre ou non couplé fonctionnellement au F_0 plus important dans les mitochondries des cellules traitées par la doxycycline.

3.1.1.3 Les mutants $\Delta\gamma$, $\Delta\delta$ et $\Delta\epsilon$ présentent des différences de stabilité de l'ADNmt.

Alors que des déplétions des sous-unités δ , γ et ϵ conduisent toutes à un découplage total de la mitochondrie dû des fuites de protons via le F_0 , les délétions de leurs gènes n'ont pas le même impact sur la stabilité du génome mitochondrial. En effet, alors que les cultures des mutants $D\delta$ et $D\gamma$ sont entièrement dépourvues d'ADN mitochondrial fonctionnel ($\rho^{-/0}$), (Giraud et Velours 1997; Lai-Zhang *et al.* 1999), 30 % des cellules $\Delta\epsilon$ conservent l'état ρ^+ (Guelin *et al.* 1993; Lai-Zhang *et al.* 1999).

Pour élucider cette différence, un suivi de la conversion des cellules de l'état ρ^+ à l'état $\rho^{-/0}$ a été réalisé en employant des souches dont les sous-unités de la tige centrale sont exprimées à partir d'un plasmide où le promoteur est sous le contrôle de la doxycycline (Tet- γ , Tet- δ , et Tet- ϵ). Les cultures sont réalisées en galactose riche et en présence de doxycycline, soient des conditions où les cellules $\rho^{-/0}$ peuvent survivre et se multiplier et où le plasmide portant l'un des gènes de la tige centrale n'est pas indispensable, autorisant ainsi sa perte. Les populations initiales des trois souches (avant l'ajout de doxycycline) ne comportent que 2 % de cellules $\rho^{-/0}$ (Figure 2 de l'article 1). Après 5 à 7 générations, les populations des souches Tet- δ and Tet- γ ne sont pratiquement constituées que de cellules $\rho^{-/0}$, alors que la population Tet- ϵ contient encore 70 % de ρ^+ . Après 20 générations, les populations des souches Tet- δ et Tet- γ sont composées exclusivement de cellules $\rho^{-/0}$. La population de Tet- ϵ contient 50 % de ρ^+ après 12-15 générations et 25 % après 40 générations. On retrouve donc les mêmes effets sur la stabilité du génome mitochondrial que ceux observés avec des souches $\Delta\epsilon$, $\Delta\delta$, et $\Delta\gamma$.

3.1.1.4 Des mutations dans les gènes codant pour les sous-unités Atp6p et Atp9p du F₀ permettent de maintenir l'ADNmt en absence de F₁

Après 40 générations en galactose et en présence de doxycycline, la culture de Tet- ϵ forme des colonies de taille variable (S1, S2) sur milieu respiratoire (Figure 3A de l'article 1). Ces colonies ont perdu le plasmide portant le gène *ATP15* et sont totalement dépourvues en sous-unité ϵ (Figure 3B de l'article 1). La croissance respiratoire des souches S1 et S2 est dû à l'apparition de mutations, respectivement dans la sous-unité *c* (*c-L57F*) et la sous-unité *a* (*a-A120V*). Du fait de son phénotype moins sévère, seule la souche S1 a été analysée. S1 ($\Delta\epsilon + c-L57F$) cultive moins bien en milieu respiratoire par rapport à la souche Tet- ϵ , mais après réintroduction du plasmide exprimant ϵ , elle retrouve une croissance aussi rapide que la souche contrôle (Figure 3C de l'article 1, souche S1+ ϵ). La respiration des mitochondries de S1 ($\Delta\epsilon + c-L57F$) n'est que partiellement découplée comme le montre la stimulation de leur consommation d'oxygène par l'ADP et le CCCP (Figure 4A, Table 2 de l'article 1). De plus, ces mitochondries sont capables de maintenir une différence de potentiel significative après ajout d'éthanol et en l'absence d'oligomycine (Figure 4B de l'article 1). La souche S1 présente une activité de synthèse d'ATP de 27 % par rapport à la souche contrôle Tet- ϵ (Table 3 de l'article 1). La mutation *c-L57F* permet donc de maintenir partiellement un couplage physique et fonctionnel entre le F₁ et le F₀ malgré l'absence de la sous-unité ϵ . Les western-blots montrent une accumulation de sous-unités de l'ATP synthase quasi normale dans la souche S1 (Figure 4C de l'article 1). Cependant après BN-PAGE, le complexe F₁F₀ n'est pas détecté sur gel ni par son activité ATPasique ni par immunodétection de la sous-unité β , (Figure 4D de l'article 1). Les immunodétections montrent cependant des oligomères contenant les sous-unités Atp6p et Atp9p du F₀. On peut en conclure que dans la souche S1, le complexe ATP synthase dépourvu en sous-unité ϵ est fragile et se dissocie au cours de l'extraction au détergent et/ou de l'électrophorèse.

En absence de doxycycline, la souche S1+ ϵ exprime la sous-unité ϵ et permet donc d'étudier l'effet de la mutation *c-L57F* seule. S1+ ϵ se cultive aussi bien que la souche contrôle Tet- ϵ dans un milieu respiratoire (Figure 3C de l'article 1). Les mitochondries de S1+ ϵ ont une respiration à l'état 4 normale, stimulée efficacement (4,5 fois) par le CCCP (Table 2 de l'article 1). Bien que les analyses BN-PAGE (Figure 4D de l'article 1) montrent un niveau d'ATP synthase assemblée comparable au contrôle, la respiration à l'état 3 est

diminuée de 20 % et la synthèse d'ATP est diminuée de 30 % par rapport à la souche Tet-ε. Cela suggère que la mutation c-L57F réduit l'activité du F₀ sans que cela n'affecte le couplage et l'assemblage du F₁F₀.

Je reviendrai dans la discussion générale sur ces observations et les conclusions que l'on peut en tirer.

3.1.2 Article 1

Mol Biol Cell. 2014 Mar;25(6):791-9. doi: 10.1091/mbc.E13-02-0112. Epub 2014 Jan 22.

The depletion of F₁ subunit in yeast leads to an uncoupled respiratory phenotype that is rescued by mutations in the proton-translocating subunits of F₀

Emmanuel Tetaud^{a,b}, François Godard^{a,b}, Marie-France Giraud^{a,b}, Sharon H. Ackerman^c, and Jean-Paul di Rago^{a,b}

^aCentre National de la Recherche Scientifique, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095, F-33077 Bordeaux, France ; ^bUniversité Victor Segalen Bordeaux 2, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095, F-33077 Bordeaux, France ; ^cDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Wayne State University School of Medicine, Detroit, MI 48201

PMID 24451261

The depletion of F₁ subunit ϵ in yeast leads to an uncoupled respiratory phenotype that is rescued by mutations in the proton-translocating subunits of F₀

Emmanuel Tetaud^{a,b}, François Godard^{a,b}, Marie-France Giraud^{a,b}, Sharon H. Ackerman^c, and Jean-Paul di Rago^{a,b}

^aCentre National de la Recherche Scientifique, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095, F-33077 Bordeaux, France; ^bUniversité Victor Segalen Bordeaux 2, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095, F-33077 Bordeaux, France; ^cDepartment of Biochemistry and Molecular Biology, Wayne State University School of Medicine, Detroit, MI 48201

ABSTRACT The central stalk of the ATP synthase is an elongated hetero-oligomeric structure providing a physical connection between the catalytic sites in F₁ and the proton translocation channel in F₀ for energy transduction between the two subdomains. The shape of the central stalk and relevance to energy coupling are essentially the same in ATP synthases from all forms of life, yet the protein composition of this domain changed during evolution of the mitochondrial enzyme from a two- to a three-subunit structure (γ , δ , ϵ). Whereas the mitochondrial γ - and δ -subunits are homologues of the bacterial central stalk proteins, the deliberate addition of subunit ϵ is poorly understood. Here we report that down-regulation of the gene (*ATP15*) encoding the ϵ -subunit rapidly leads to lethal F₀-mediated proton leaks through the membrane because of the loss of stability of the ATP synthase. The ϵ -subunit is thus essential for oxidative phosphorylation. Moreover, mutations in F₀ subunits *a* and *c*, which slow the proton translocation rate, are identified that prevent ϵ -deficient ATP synthases from dissipating the electrochemical potential. Cumulatively our data lead us to propose that the ϵ -subunit evolved to permit operation of the central stalk under the torque imposed at the normal speed of proton movement through mitochondrial F₀.

Monitoring Editor

Donald D. Newmeyer
La Jolla Institute for Allergy
and Immunology

Received: Feb 25, 2013

Revised: Jan 8, 2014

Accepted: Jan 14, 2014

INTRODUCTION

All members of the ATP synthase family of proteins are very similar at the structural level, regardless of evolutionary origin. Historically, the enzyme has been described in terms of an integral membrane domain (F₀) and a peripheral domain (F₁). The wealth of high-definition structural data now available (Devenish *et al.*, 2008; Walker,

2013) reveals that F₀ and F₁ are divided further into distinct oligomeric substructures. The most hydrophobic F₀ subunits associate in a proton-translocating complex, which in its simplest form is composed of one *a*-subunit adjacent to a ring of 8–15 *c*-subunits. The remaining F₀ subunits assemble a stalk anchored at one end to the stationary *a*-subunit in the membrane and attached at the other end to the outer periphery of the soluble F₁ domain. F₁ is largely defined by a globular structure ($[\alpha\beta]_3$ hexamer), which contains the catalytic sites, and two or three other proteins that constitute a central stalk, which makes contact with these sites at one end and the *c*-ring at the other. Together the *c*-ring and the central stalk comprise a functional “rotor” that turns relative to nonmoving parts to permit energy-coupling reactions catalyzed by ATP synthases. For example, in the direction of ATP synthesis, energy released by proton translocation through F₀ activates the rotor, forcing conformational changes in the catalytic sites that effect release of ATP from the enzyme.

One of the least-understood aspects of the ATP synthase coupling mechanism relates to differences in the central stalk

This article was published online ahead of print in MBoc in Press (<http://www.molbiolcell.org/cgi/doi/10.1091/mbc.E13-02-0112>) on January 22, 2014.

E.T. and J.-P.d.R. designed the study; E.T., F.G., and M.-F.G. conducted the research; E.T., F.G., M.-F.G., S.H.A., and J.-P.d.R. analyzed data; and E.T., S.H.A., and J.-P.d.R. wrote the article.

Address correspondence to: Emmanuel Tetaud (tetaud@ibgc.cnrs.fr).

Abbreviations used: BN-PAGE, blue native polyacrylamide gel electrophoresis; Dox, doxycycline; mtDNA, mitochondrial DNA.

© 2014 Tetaud *et al.* This article is distributed by The American Society for Cell Biology under license from the author(s). Two months after publication it is available to the public under an Attribution–Noncommercial–Share Alike 3.0 Unported Creative Commons License (<http://creativecommons.org/licenses/by-nc-sa/3.0>).

“ASCB®,” “The American Society for Cell Biology®,” and “Molecular Biology of the Cell®” are registered trademarks of The American Society of Cell Biology.

Strain (acronym)	Nuclear genotype	mtDNA	Source
SDC22 (WT)	<i>Matα ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 arg8::HIS3</i>	ρ^+ Arg8 ^m	Duvezin-Caubet et al. (2003)
SDC6 (Tet- δ)	<i>Matα ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 arg8::HIS3 atp16::KanMX + pCM189-ATP16</i>	ρ^+ Arg8 ^m	Duvezin-Caubet et al. (2003)
YG1 (Tet- γ)	<i>Matα ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 arg8::HIS3 atp3::KanMX + pCM189-ATP3</i>	ρ^+ Arg8 ^m	This study
YE1 (Tet- ϵ)	<i>Matα ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 arg8::HIS3 atp15::KanMX + pCM189-ATP15</i>	ρ^+ Arg8 ^m	This study
S1 ($\Delta\epsilon$ +c-L57F)	<i>Matα ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 arg8::HIS3 atp15::KanMX</i>	ρ^+ Arg8 ^m + c-L57F	This study
S1+ ϵ (ϵ +c-L57F)	<i>Matα ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 arg8::HIS3 atp15::KanMX + pCM189-ATP15</i>	ρ^+ Arg8 ^m + c-L57F	This study
S2 ($\Delta\epsilon$ +a-A120V)	<i>Matα ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 arg8::HIS3 atp15::KanMX</i>	ρ^+ Arg8 ^m + a-A120V	This study

TABLE 1: Genotypes of yeast strains.

composition between bacterial and mitochondrial enzymes. In the mitochondrial enzyme, it is made of three subunits (γ , δ , and ϵ), whereas only two (γ and ϵ) are present in bacterial ATP synthase (Devenish et al., 2008; Walker, 2013). The γ -subunits of F₁ are homologous, and mitochondrial subunit δ is homologous to bacterial subunit ϵ . However, mitochondrial subunit ϵ has no counterpart in the bacterial enzyme, identifying it as one of many so-called “supernumerary” ATP synthase subunits that most likely appeared with the establishment of mitochondria as internal organelles during evolution of the eukaryotic cell. (Unless otherwise stated, ϵ in the text and figures denotes the supernumerary subunit of mitochondrial F₁.) The work reported here defines more clearly the importance of ϵ in energy coupling.

The F₁ ϵ -subunit of *Saccharomyces cerevisiae* is encoded by the nuclear gene *ATP15*. Previous work (Guélin et al., 1993; Lai-Zhang et al., 1999) using different *atp15*-deletion ($\Delta\epsilon$) mutants reported that the yeast grew at poor to modest rates on nonfermentable substrates, which meant that cells had a variable level of respiratory competence. This finding was unexpected because the ϵ -subunit of mitochondrial F₁ is not a vestigial element inherited from the prokaryotic progenitor but instead represents a new protein function acquired during evolution of the eukaryotic enzyme, and it was assumed to be indispensable for energy-coupled oxidative phosphorylation. However, it is important to note that all of the work thus far investigating the functional relevance of the ϵ -subunit in mitochondrial F₁ used $\Delta\epsilon$ strains, which are pleiotropic mutants. When cultured on fermentable carbons, upward of 70% of $\Delta\epsilon$ cells fail to maintain mitochondrial DNA (mtDNA) and instead convert to respiratory-deficient ρ^0/ρ^- derivatives. Prompted by the notion that the functional relevance of mitochondrial F₁ subunit ϵ would remain ambiguous until conditions were established under which the effect on respiration caused by the primary nuclear mutation (*atp15*-deletion allele) could be assessed in an otherwise respiratory wild-type (ρ^+) background, we transformed $\Delta\epsilon$ yeast with a plasmid for doxycycline-regulated expression of wild-type *ATP15*. Our results show that yeast cultures down-regulated for production of the ϵ -subunit retain partial respiratory activity as a direct function of suppressor mutations in a mitochondrial-encoded F₀ protein (a- or c-subunit) that rescues the uncoupling defect imposed by the elimination of subunit ϵ . The effect of the ϵ -subunit on energy coupling and structure/function relationships in mitochondrial ATP synthase is discussed with respect to the more primitive (ϵ -less) bacterial enzyme.

RESULTS

A 25% depletion in subunit ϵ leads to a total uncoupling of mitochondria

We constructed yeast strain YE1 (henceforth referred to by its acronym Tet- ϵ), which has a null allele in place of the ϵ -subunit gene (*ATP15*) in the chromosome and carries a doxycycline-repressible form of the gene on a low-copy plasmid (see Materials and Methods and genotypes in Table 1). Without the drug, Tet- ϵ grew in nonfermentable glycerol/ethanol media like its parental strain (SDC22) and displayed normal subunit ϵ levels. Down-regulation of *ATP15* expression was achieved using doxycycline at a concentration (10 μ M) known to not affect the respiratory capacity of wild-type yeast (Duvezin-Caubet et al., 2003). The respiratory growth of Tet- ϵ remained normal for 6 h after the addition of doxycycline to the culture medium and then stopped abruptly (Figure 1A, arrowhead). Samples were removed at this time point from both the $-Dox$ and $+Dox$ Tet- ϵ cultures, and mitochondria were isolated. Western blots revealed that the amount of the ϵ -subunit decreased by ~25% at the time of doxycycline-induced growth arrest compared with control mitochondria from Tet- ϵ cells grown in the absence of doxycycline (Figure 1B). The amount of the δ subunit was reduced by ~50% in mitochondria from growth-arrested $+Dox$ cells, whereas the levels of other nuclear gene products evaluated (subunits α , γ , Atp4, *d*, porin, Aac) were quite similar for the two samples. The three mitochondrial-encoded proteins a-Atp6, c-Atp9, and cytochrome *b* were reduced in samples from $+Dox$ versus $-Dox$ cells, but the effect was less severe than with the δ -subunit.

Respiratory responses to metabolites and drugs measured for mitochondria from $-Dox$ cells were within normal range (Figure 1C and Table 2). Compared to the maximal respiratory activity, which was measured in the presence of an uncoupling agent (carbonyl cyanide *m*-chlorophenyl hydrazone [CCCP]), the rate of mitochondrial oxygen consumption was 17% with NADH alone (state 4 respiration) and increased to 53% after addition of ADP (state 3 respiration). Instead, with NADH alone, the rate of oxygen consumption in mitochondria from $+Dox$ cells was essentially equal to the CCCP-stimulated rate. Oligomycin, which blocks proton translocation through the F₀, restored mitochondria to the slower state 4 respiration rate expected under conditions in which the respiratory substrate (NADH) is available but not the phosphorylation substrate (ADP). Hence the partial depletion of subunit ϵ , which was induced by doxycycline, correlated with 100% mitochondrial uncoupling due

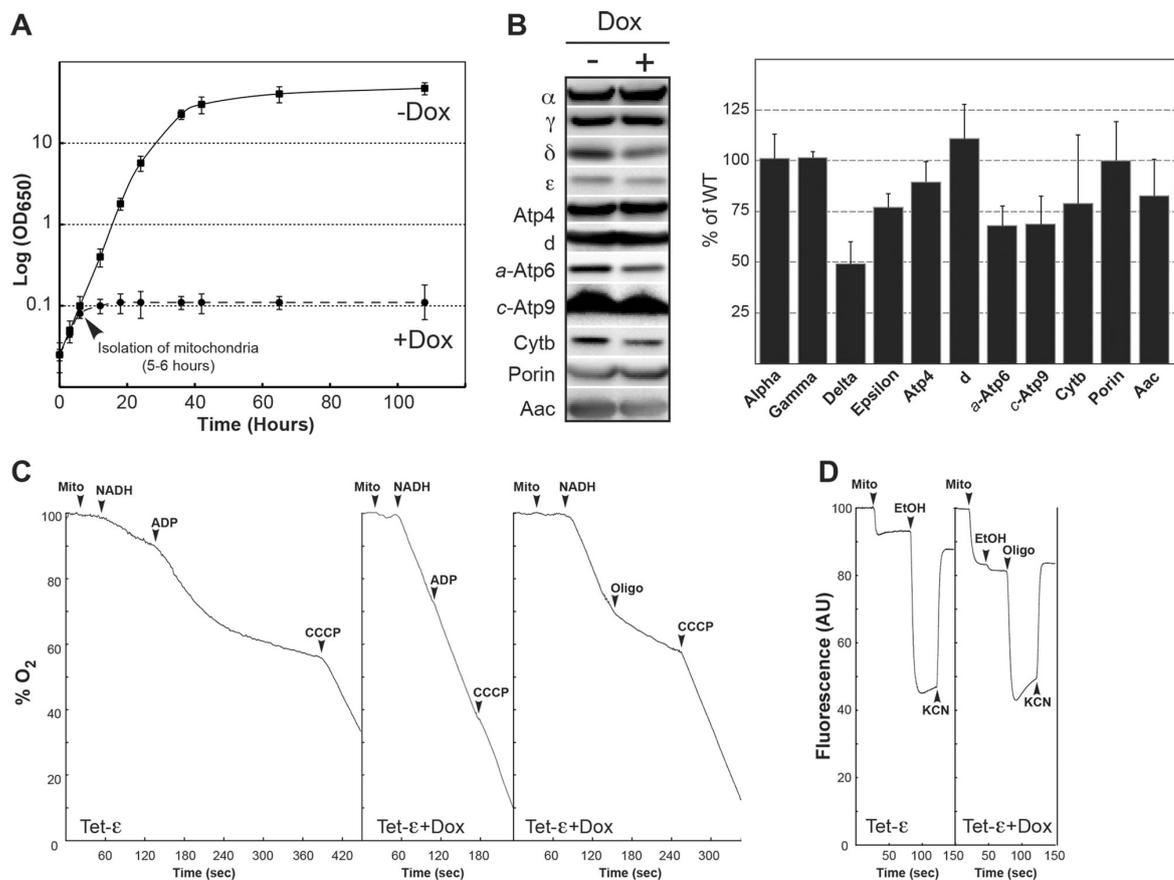


FIGURE 1: A block in ATP synthase subunit ϵ expression is rapidly followed by F_0 -mediated proton leaks that dissipate the mitochondrial membrane potential. The consequences of a block in subunit ϵ expression were followed using a strain (Tet- ϵ) in which this protein is under the control of a doxycycline-repressible promoter. (A) Growth curves of Tet- ϵ in rich glycerol/ethanol medium at 28°C in the presence (+Dox) or absence (-Dox) of doxycycline. Mitochondria were extracted from the two cultures at the time indicated by the arrowhead and used in the experiments shown in the subsequent panels. (B) Mitochondrial proteins were separated via SDS-PAGE and probed with antibodies against the indicated proteins. Setting the amount of each protein in Tet- ϵ cells grown in the absence of doxycycline at 100%, the relative levels of the proteins in Tet- ϵ cultured in the presence of the drug (+Dox) are plotted in the bar graph. The results shown are means of three experiments, and the vertical lines denote the SD in the data. (C) Oxygen consumption. The additions were 0.15 mg/ml mitochondrial proteins (mito), 4 mM NADH, 400 μ M ADP, 3 μ g/ml oligomycin (oligo), and 4 μ M CCCP. (D) Energization of the mitochondrial inner membrane. Variations in $\Delta\Psi$ were monitored by the fluorescence quenching of rhodamine 123. The additions were 0.5 μ g/ml rhodamine 123, 0.15 mg/ml proteins (mito), 10 μ l of ethanol (EtOH), 4 μ g/ml oligomycin (oligo), 2 mM potassium cyanide (KCN), and 4 μ M CCCP. Oxygen consumption and fluorescence traces are representative of three to five experimental trials.

specifically to proton leakage through F_0 . This finding was corroborated in experiments that used rhodamine 123 as a reporter of mitochondrial membrane potential ($\Delta\Psi$; Figure 1D). In mitochondria from untreated Tet- ϵ cells, supplying the respiratory chain with electrons from ethanol produced a large fluorescent quenching of the dye that collapsed after subsequent addition of potassium cyanide. In contrast, the mitochondria partially depleted of subunit ϵ could not be energized with ethanol until the proton leak in F_0 was blocked by the addition of oligomycin to the reaction sample. The severity of the uncoupling defect observed for doxycycline-treated Tet- ϵ cells was not unexpected because the steady-state level of the δ -subunit was reduced by half in these cells (Figure 1B; see earlier discussion), and we knew from previous work (Duvezin-Caubet *et al.*, 2003) that decreasing the amount of F_1 δ by 50% was sufficient to uncouple yeast mitochondria completely. Assays of oligomycin-sensitive mito-

chondrial ATPase activity in the two samples showed that although comparable rates were obtained in the absence of the inhibitor, the sample from +Dox cells was less sensitive than normal to oligomycin (77 vs. 89% inhibition; Table 3). The latter finding suggests that there is a higher percentage of F_1 in the free, oligomycin-insensitive state in mitochondria isolated from +Dox yeast, which was predicted given the fact that these cells are partially depleted for two proteins (subunits δ and ϵ) that are known to be critical factors in mitochondria for physically coupling F_1 to F_0 .

Differential effects on mtDNA stability in $\Delta\epsilon$ versus $\Delta\gamma$ or $\Delta\delta$ null mutants

The oligomycin-sensitive uncoupling defect we observed in response to partial depletion of the ϵ -subunit is similar to the phenotype others reported for yeast in which the cellular level of γ - or δ -subunit

Strain (acronym)	Dox	Asc/TMPD + CCCP (nAtO ₂ /min/mg)	NADH + CCCP (nAtO ₂ /min/mg)	NADH + ADP (nAtO ₂ /min/mg)	NADH + oligo (nAtO ₂ /min/mg)	NADH (nAtO ₂ /min/mg)	ρ ^{-/0} (%)
YE1 (Tet-ε)	-	1617 ± 325	1031 ± 169	546 ± 107	217 ± 79	181 ± 55	2 ± 1
YE1 (Tet-ε)	+	1708 ± 203	1182 ± 70	975 ± 94	195 ± 31	966 ± 84	4 ± 1
S1 (Δε+c-L57F)	-	2180 ± 7	1240 ± 179	792 ± 109	216 ± 32	753 ± 86	12 ± 2
S1+ε (c-L57F)	-	1430 ± 302	912 ± 260	444 ± 55	221 ± 55	202 ± 56	3 ± 1

The strains were grown in rich glycerol/ethanol medium in the presence/absence of 10 μM doxycycline (Dox). Oxygen consumption was measured using isolated mitochondria. The additions were 0.15 mg/ml mitochondrial proteins, 4 mM NADH, 150 μM ADP, 12.5 mM ascorbate (Asc), 1.4 mM *N,N,N',N'*-tetramethyl-*p*-phenylenediamine (TMPD), 3 μg/ml oligomycin (oligo), and 4 μM CCCP. *n* = 3–7.

TABLE 2: Oxygen consumption of mitochondria.

Strain (acronym)	Dox	ATP synthase (nmol/ATP/min/mg)	ATPase (nmol P _i /min/mg)		Inhibition (%)	ρ ^{-/0} (%)
			-Oligo	+Oligo		
YE1 (Tet-ε)	-	697 ± 141	3030 ± 163	341 ± 17	89 ± 1	2 ± 1
YE1 (Tet-ε)	+	ND	3063 ± 216	706 ± 66	77 ± 2	4 ± 1
S1 (Δε+c-L57F)	-	188 ± 22	1133 ± 191	1010 ± 179	11 ± 2	12 ± 2
S1+ε (c-L57F)	-	488 ± 96	3102 ± 77	323 ± 9	90 ± 1	3 ± 1

The strains were grown in rich glycerol/ethanol medium in the presence/absence of 10 μM doxycycline (Dox). ATP synthesis was measured in freshly isolated mitochondria using 0.15 mg/ml mitochondrial proteins, 4 mM NADH, and 1 mM ADP. For the ATPase assays, mitochondria kept at -80°C were thawed and the reaction performed in absence of osmotic protection and at pH 8.4 in the absence or presence of 6 μg/ml oligomycin (Oligo). The percentage of inhibition of ATPase activity by oligomycin is indicated.

TABLE 3: ATP synthesis/hydrolysis activities of mitochondria.

protein was effectively reduced, by either dilution through the creation of heterozygous diploids (Δγ/γ or Δδ/δ; Xiao *et al.*, 2000) or the use of a repressible promoter (Duvezin-Caubet *et al.*, 2003). Hence a partial deficit in any one of the three rotor subunits can interfere with the mitochondrial ΔΨ by allowing protons to leak through F₀. The circumstances are exacerbated in yeast null mutants that are completely deleted for one or another rotor subunit protein. Pertinent to our work, previous characterization of such strains revealed a dichotomy in mtDNA phenotypes that could not be explained. On one hand, Δγ and Δδ cells rapidly lost mtDNA and converted 100% to the ρ^{-/0} state (Giraud and Velours, 1997; Lai-Zhang *et al.*, 1999). Instead, cultures of Δε mutants harboring one (Guélin *et al.*, 1993) or another (Lai-Zhang *et al.*, 1999) null allele in place of *ATP15* contained a significant subpopulation (~30%) of ρ⁺ cells. We investigated the discrepancy in mtDNA phenotypes in Δε versus Δγ or Δδ yeast in experiments that monitored, side by side, the conversion of ρ⁺ cells to the ρ^{-/0} state as each of the three rotor subunits became limiting. Three of the four yeast strains used in this study (Tet-γ, Tet-δ, and Tet-ε) produced one of the rotor subunits from a plasmid-borne, doxycycline-repressible gene; the fourth corresponded to the parental strain (SDC22), in which the rotor protein genes are all under control of their respective native promoter in the chromosome. All four strains were grown in rich galactose supplemented with 10 μM doxycycline, conditions under which ρ^{-/0} cells can survive and divide. At the time doxycycline was added, ρ^{-/0} levels were <2% for each strain (Figure 2). After five to seven doublings of the cell density, the Tet-δ and Tet-γ cultures were already almost completely invaded by ρ^{-/0} cells (90–95%), whereas 70% of Tet-ε cells were still scored ρ⁺. After 20 generations, the Tet-δ and Tet-γ cultures were composed exclusively of ρ^{-/0} cells, whereas the Tet-ε cultures still contained a substantial subpopulation of ρ⁺ cells, with a 50% peak after 12–15 generations, followed by a progressive decline to 25% after 40 generations. Conversely, the ρ^{-/0} level remained <5% in SDC22 cultures during the course of the entire experiment.

Mutations in F₀-subunit genes enable yeast to maintain mtDNA in the absence of the F₁ ε-subunit

Samples of the ρ⁺ Tet-ε cells that had accumulated in galactose media after 40 generations in the presence of doxycycline (Figure 2) formed either medium-sized (S1) or small (S2) colonies on rich glycerol/ethanol medium (Figure 3A), and both types of clones failed to grow on glucose plates lacking uracil (Figure 3B). The latter condition indicated that strains S1 and S2 had lost the *URA3*-plasmid (pCM189-*ATP15*) bearing the doxycycline-repressible gene for wild-type subunit ε and were, in fact, ε-subunit null (Δε) strains. Missense mutations were identified in F₀ subunits c (c-L57F) and a (a-A120V) of strains S1 and S2, respectively (see *Materials and Methods*). S1

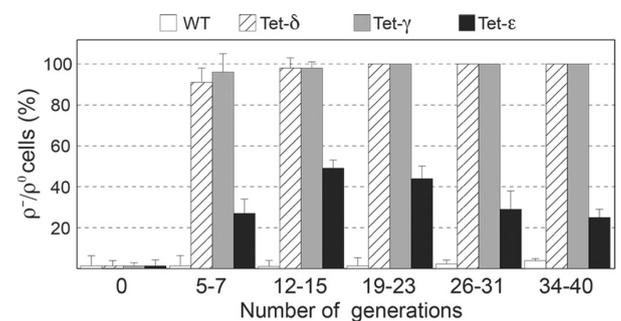


FIGURE 2: Kinetics of ρ^{-/0} cell production. The Tet-γ, Tet-δ, and Tet-ε strains and their parental strain SDC22 (WT) were grown in rich galactose in the presence of 10 μM doxycycline. The cultures were refreshed several times with the same medium to produce a total of 40 generations, which was estimated by measuring the turbidity at 650 nm. The contents in ρ^{-/0} cells were determined at the indicated number of generations.

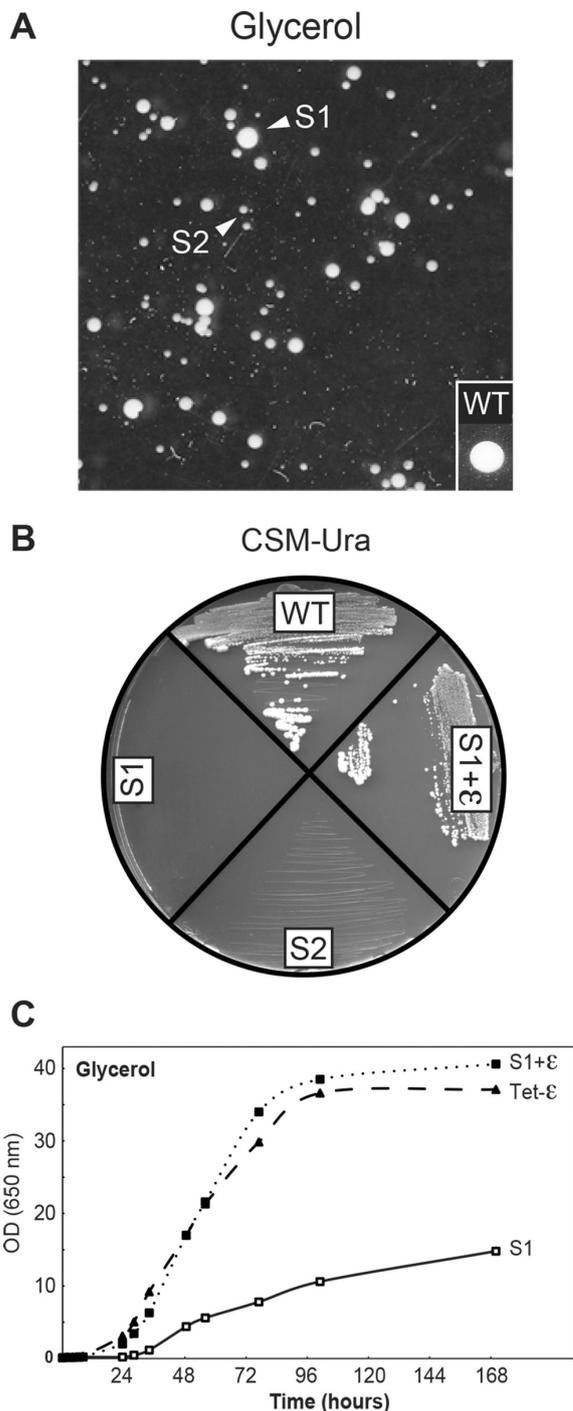


FIGURE 3: Mutations in F_0 a - and c -subunits can bypass the need for subunit ϵ . (A) Samples of the Tet- ϵ galactose cultures after 40-generation growth in the presence of doxycycline (Figure 2) produce colonies that grow on rich glycerol/ethanol medium. Arrowheads indicate medium-size (S1) and small (S2) clones that carry mutations in subunit c (c -L57F) and subunit a (a -A128V), respectively. (B, C) Growth of Tet- ϵ , S1, and S1 retransformed with the Tet- ϵ gene on glucose plates lacking uracil (B) and in liquid glycerol/ethanol medium (C).

($\Delta\epsilon$ + c -L57F) was notably impaired for growth in liquid glycerol/ethanol medium in comparison with the plasmid-bearing Tet- ϵ cells from which it originated but could be restored to the control level after reintroduction of pCM189-ATP15 (Figure 3C, S1+ ϵ).

The c -L57F mutation slows F_0 activity

Respiration in the S1 ($\Delta\epsilon$ + c -L57F) mitochondria was only partially uncoupled, as evidenced by a significant stimulation by both ADP and CCCP (Figure 4A and Table 2). These mitochondria could sustain a significant $\Delta\Psi$ with ethanol without adding oligomycin (Figure 4B), and 27% the control level of ATP synthesis activity was observed (Table 3). These data provide evidence that the c -L57F mutation enables partial recovery of the physical and functional coupling of F_1 to F_0 defect imposed by the absence of subunit ϵ . However, although Western blots revealed the presence of near-normal to modestly reduced amounts of ATP synthase subunits α , γ , δ , $Atp4$, d , a , and c in S1 mitochondria (Figure 4C), F_1F_0 complexes minus the ϵ -subunit could not be detected by blue native PAGE (BN-PAGE) by in-gel activity assays or Western blotting with antibody against the β subunit of F_1 (Figure 4D). Instead, Western blots showed evidence of high-molecular weight oligomers of the hydrophobic F_0 proteins, subunits a and c . Such findings indicate that the S1 variant produces an ϵ -minus form of the ATP synthase that is fragile and dissociates in response to detergent extraction and/or gel electrophoresis.

The nuclear and mitochondrial chromosomal genotypes of the strains S1 and S1+ ϵ are identical ($\Delta\epsilon$ + c -L57F), the difference being that the latter strain is transformed with plasmid pCM189-ATP15, in which the wild-type gene for subunit ϵ is subject to down-regulation by doxycycline. In the absence of drug, S1+ ϵ yeast are replete with the ϵ -subunit and provide a cell model to study the c -L57F substitution as a stand-alone mutation. Strain S1+ ϵ grew as well as the control Tet- ϵ cells in rich glycerol/ethanol medium (Figure 3C). State 4 respiration was also normal in S1+ ϵ mitochondria and was stimulated efficiently (4.5-fold) by CCCP (Table 2). However, state 3 respiration (Table 2) and ATP synthesis (Table 3) were both diminished, by ~20–30%, compared with the control, notwithstanding the fact that BN-PAGE (Figure 4D) revealed control amounts of fully assembled ATP synthase in the S1+ ϵ strain. These data suggest that, by itself, the c -L57F mutation reduces the rate of proton translocation through F_0 without any effect on F_1F_0 coupling and assembly.

DISCUSSION

Energy coupling in the ATP synthase occurs by means of an elongated hetero-oligomeric structure called the central stalk, which makes contact at one end with the catalytic sites in the soluble F_1 domain and at the other end with the proton-translocating unit in the membrane (Devenish *et al.*, 2008; Walker, 2013). In the mitochondrial enzyme, the central stalk is made of three subunits (γ , δ , and ϵ) instead of two as found in bacterial ATP synthase (γ and ϵ). Bacterial subunit ϵ is homologous to mitochondrial subunit δ , whereas the mitochondrial ϵ -subunit has no counterpart in bacteria. Our investigation into the functional relevance of mitochondrial ϵ provides information that helps explain the appearance of this novel protein with the evolution of mitochondrial ATP synthase. The results also offer valuable insight into previous publications in which the phenotype of yeast strains lacking the chromosomal gene encoding the ϵ -subunit ($\Delta\epsilon$) was described but could not be explained fully.

Deleting the yeast gene for one of the two conserved, central stalk proteins (γ or δ) destroys oxidative phosphorylation in the cell (Paul *et al.*, 1994; Giraud and Velours, 1997; Lai-Zhang *et al.*, 1999).

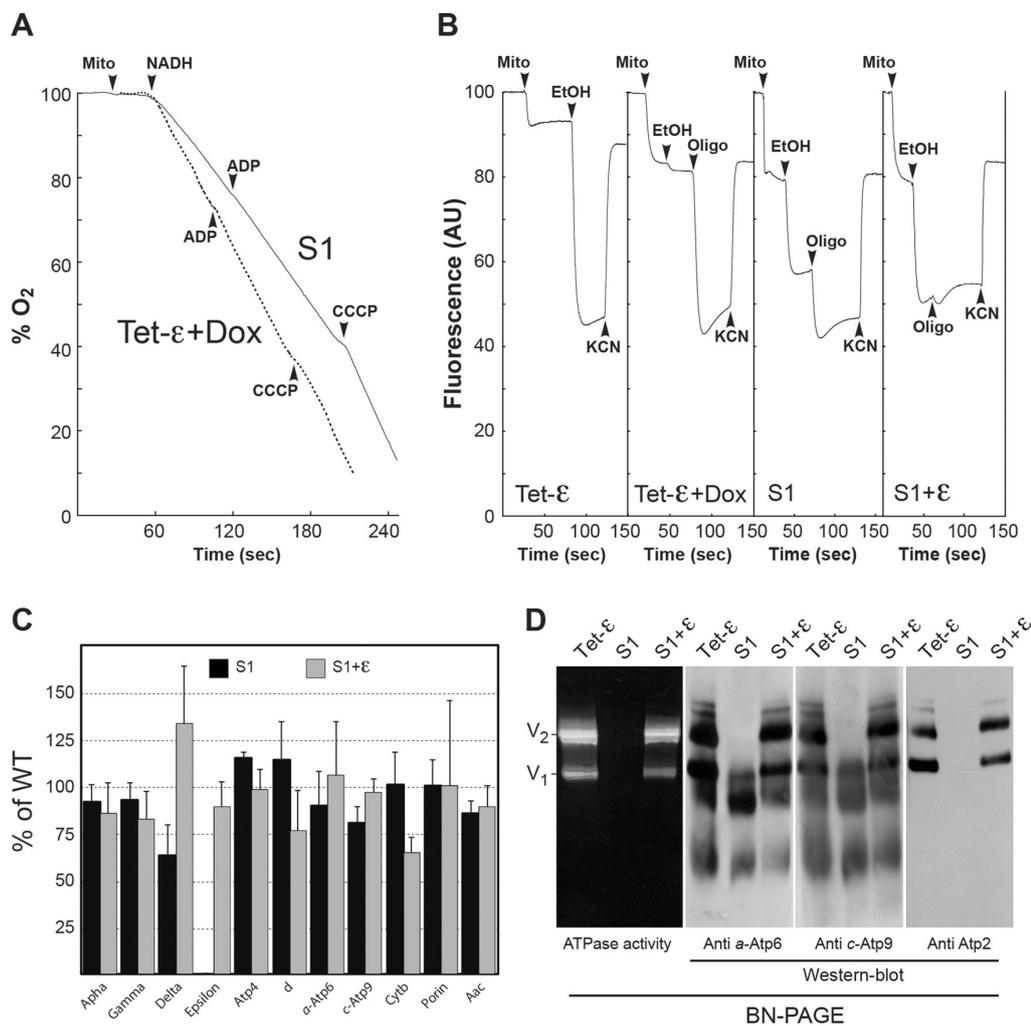


FIGURE 4: Properties of the c-L57F mutation. All of the experiments shown were performed using mitochondria prepared from cells grown in rich glycerol/ethanol medium. (A) Oxygen consumption. The additions were 0.15 mg/ml mitochondrial proteins (mito), 4 mM NADH, 150 μ M ADP, and 4 μ M CCCP. (B) Energization of the mitochondrial inner membrane. Variations in $\Delta\Psi$ were monitored by the fluorescence quenching of rhodamine 123. The additions were 0.5 μ g/ml rhodamine 123, 0.15 mg/ml proteins (mito), 10 μ l ethanol (EtOH), 4 μ g/ml oligomycin (oligo), and 2 mM potassium cyanide (KCN). For comparison, we include the experiment shown in Figure 1, which was performed with mitochondria prepared from Tet- ϵ cells grown in the presence of doxycycline. Oxygen consumption and fluorescence traces are representative of three to five experimental trials. (C) Steady-state levels of different mitochondrial proteins in S1. Mitochondrial proteins were separated via SDS-PAGE and probed with antibodies against the indicated proteins. The level of each protein in S1 relative to the Tet- ϵ control is represented by the bars. The results are representative of at least three experiments. The lines indicate standard deviations. (D) Mitochondrial proteins were extracted with digitonin (2 g/g), separated by BN-PAGE, and either assayed for in-gel ATPase activity or transferred to membranes for Western blotting with the indicated antibodies. V_1 and V_2 , monomeric and dimeric species of ATP synthase (complex V), respectively.

Instead, poor to modest growth on nonfermentable substrates has been reported for yeast $\Delta\epsilon$ strains (Guelin *et al.*, 1993; Lai-Zhang *et al.*, 1999). Another complicating feature is that primary mutations in any of the three central stalk proteins promote the loss of mtDNA. The mtDNA instability is most severe in $\Delta\gamma$ and $\Delta\delta$ yeast, which convert 100% to ρ^-/ρ^0 cells (Giraud and Velours, 1997; Lai-Zhang *et al.*, 1999; Duvezin-Caubet *et al.*, 2003, 2006; this study). This phenomenon is best described as a survival tactic based on the fact the proton-translocating subunits of F_0 are mitochondrial gene prod-

ucts, and the seal provided by the central stalk can be compromised if the structure of this element is incomplete (Lai-Zhang *et al.*, 1999; Duvezin-Caubet *et al.*, 2006; Godard *et al.*, 2011). By eliminating mtDNA, the ρ^-/ρ^0 derivatives of $\Delta\gamma$ and $\Delta\delta$ yeast lose the capacity to synthesize an integral membrane F_0 domain that can collapse the $\Delta\Psi$ by leaking protons.

In contrast, $\Delta\epsilon$ yeast convert only partially to cytoplasmic *petite* derivatives such that the constitution of stable cultures is a heterogeneous mixture of ρ^+ and ρ^-/ρ^0 cells (~30:70 split). The degree of

mtDNA instability makes it impossible to distinguish the effects on respiration attributed solely to the missing ϵ -subunit. For this reason we used a transformed $\Delta\epsilon$ yeast strain (Tet- ϵ) for our experiments that carried a doxycycline-repressible form of the ϵ -subunit gene, *ATP15*, on a plasmid. In the absence of drug, Tet- ϵ is ρ^+ and behaves just like the parental control strain (SDC22), in which *ATP15* is expressed from its native promoter in the chromosome. Instead, a doxycycline-induced block in subunit ϵ production was rapidly followed by a growth arrest in nonfermentable media (Figure 1A). At the point of growth arrest, the mitochondria were only partially depleted of subunit ϵ (25% depletion; Figure 1B), had a normal content of mtDNA, but were totally uncoupled due to F_0 -mediated proton leaks (Figure 1, C and D, and Table 1).

The correlation of 25% reduction in the ϵ -subunit with 100% mitochondrial uncoupling in growth-arrested Tet- ϵ cells supports the idea that a full complement of ϵ protein is required to support energy coupling in the organelle. However, this conclusion is difficult to reconcile with the phenotype of simple $\Delta\epsilon$ strains, which lack completely the ϵ -subunit but retain partial respiratory competence (Guelin *et al.*, 1993; Lai-Zhang *et al.*, 1999). A solution to the puzzle was revealed from experiments in which Tet- ϵ cells were cultured for 40 generations with a fermentable carbon source (galactose) in a rich medium that also contained doxycycline (Figure 2). Because rich galactose media can support the growth of respiratory-deficient yeast that are auxotrophic for uracil, it was no surprise to find that many cells from the original culture had lost the *URA3*-linked plasmid, which rendered them equivalent to untransformed $\Delta\epsilon$ yeast that were incapable of producing any ϵ -subunit (Figure 3B). Remarkably, whereas after two or three generations *ATP15* plasmid-replete Tet- ϵ cells stopped growing on respiratory substrates in media that contained 10 μ M doxycycline (Figure 1A), the cured cells that were recovered after extensive culturing in a rich fermentable medium supplemented with the drug formed two populations (S1 and S2) of respiring colonies on glycerol/ethanol plates (Figure 3A).

Suppressor mutations were identified in the mitochondrial genes coding for subunits of the proton translocation machinery in strains S1 and S2. For S1, a missense mutation was found in *ATP9* that resulted in phenylalanine substitution for Leu-57 in the *c*-subunit, and for S2 a genetic lesion was located to *ATP6* that caused an A120V mutation in subunit *a*. Because the respiratory function of S2 was much worse relative to S1, only the latter strain was investigated in detail (Figure 4 and Tables 2 and 3). Experiments with S1 that queried the characteristics of respiration and energy coupling in the ATP synthase revealed significant levels of coupled enzyme activities that indicated the assembly in mitochondria of an ϵ -deficient F_1F_0 complex that did not leak protons. The fact such complex was not detected by BN-PAGE analysis of digitonin-extracted mitochondria (Figure 4D) suggests that the physical association of F_1 with F_0 is compromised significantly in S1 yeast. Under conditions in which the c-L57F mutation could be investigated in the context of an otherwise normal F_1F_0 structure (S1+ ϵ strain), the results showed that in this configuration the ATP synthase is fully coupled but reduced in capacity to translocate protons across the membrane (Tables 2 and 3).

Having shown that combining either the c-L57F or a-A120V mutation with the null allele for subunit ϵ enables yeast to retain mtDNA, we suggest that similar mutations may have occurred in the genetic background of the $\Delta\epsilon$ strains that have been described (Guelin *et al.*, 1993; Lai-Zhang *et al.*, 1999), which permitted a subpopulation of ρ^+ cells to persist. In contrast, it has not been possible to recover ρ^+ derivatives of $\Delta\gamma$ and $\Delta\delta$ that are respiratory competent. Previously we showed that the mtDNA instability in $\Delta\delta$ yeast can be suppressed by mutations in the mitochondrial genes for subunits *c* and *a*, but

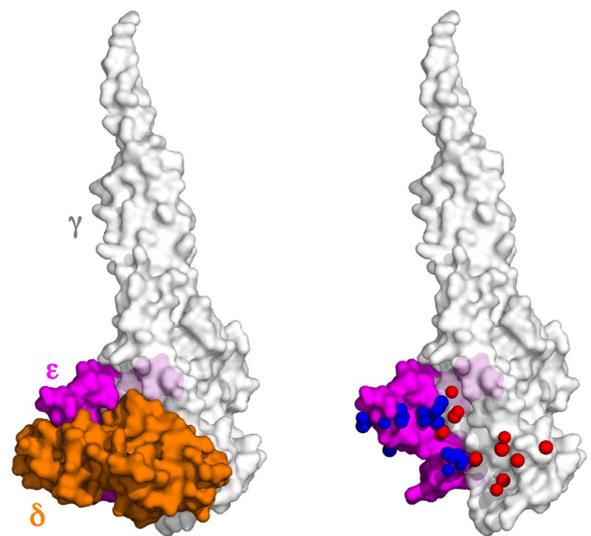


FIGURE 5: Contact zones between the different subunits of the central stalk in yeast F_1 . Left, surface-rendered model of the yeast F_1 showing only γ (light gray, rendered at 20% transparency), δ (orange), and ϵ (magenta) subunits. Right, the surface of the δ -subunit was removed and in its place the red and blue dots show the positions of atoms in δ that are within 3.5 Å of the γ - and ϵ -subunits, respectively. PyMOL was used to calculate the atomic distances and make the Figure with the coordinates from the x-ray structure of yeast F_1C_{10} ATP synthase (2WPD.pdb).

whereas these maintain the mitochondrial inner membrane in a proton-impermeable state, such mutant ATP synthases fail to ensure proton-linked energy-transducing activities (Godard *et al.*, 2011).

Information on the atomic structure of ATP synthases supports an explanation for phenotypic differences between $\Delta\epsilon$ and $\Delta\delta$ yeast strains. Partial structures of the enzyme show that most of the contacts between the central stalk and the proton translocation apparatus in the membrane involve the δ -subunit (Stock *et al.*, 1999; Dautant *et al.*, 2010). Hence transduction of the proton motive force to the F_1 catalytic sites largely depends on subunit δ . However, within the central stalk, the ϵ -subunit provides more than half of the atomic contacts for the δ -subunit (Figure 5, blue vs. red spheres). It follows that the stability of δ in the protein structure is likely compromised under conditions in which the ϵ -subunit is missing (e.g., $\Delta\epsilon$). Accelerated degradation of unbound subunit δ in doxycycline-treated Tet- ϵ is supported by Western analysis, which shows a reduction in the levels of this protein in comparison with mitochondria from control cells (Figure 1B).

We propose that the ϵ -subunit evolved as a means of securing the contact between γ and δ , which otherwise might be compromised by the torque imposed on subunit δ when the *c*-ring rotates. Consistent with this idea is that the c-L57F mutation acquired by $\Delta\epsilon$ yeast to sustain coupled oxidative phosphorylation did so by slowing the rate of proton-linked activities in the enzyme, as this may have been necessary to reduce the amount of strain on the structure.

MATERIALS AND METHODS

Strains and media

Escherichia coli XL1-Blue strain (Stratagene, Santa Clara, CA) was used for the cloning and propagation of plasmids. The

S. cerevisiae strains used and their genotypes are listed in Table 1. The following rich media were used for the growth of yeast: 1% (wt/vol) yeast extract, 1% (wt/vol) peptone, 40 mg/l adenine, 2% (wt/vol) glucose, 2% (wt/vol) galactose, or 2% (wt/vol) glycerol. The glycerol medium was buffered at pH 6.2 with 50 mM potassium phosphate, and 2% (wt/vol) ethanol was added after sterilization. We also used complete synthetic medium (CSM; 0.17% [wt/vol] yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, 0.5% [wt/vol] ammonium sulfate, 2% [wt/vol] glucose, and 0.8% [wt/vol] of a mixture of amino acids and bases from ForMedium, Norfolk, UK). The solid media contained 2% (wt/vol) agar.

Construction of a yeast strain expressing the subunit ϵ under the control of a doxycycline-repressible promoter

The coding sequence of the subunit ϵ gene (*ATP15*) was amplified by PCR using DNA from strain W303-1B as a template and the primers ATP15tet1 (5'-cgcgatccATGTCTGCCTGGAGGAAAGCTG-3') for the sense strand and ATP15tet2 (5'-ataagaatcgccgcCTATTTT-GTTATTGGAGTGGGTTC-3') for the antisense strand. The PCR product was digested with *Bam*HI-*Not*I and ligated into the vector pCM189 (Duvezin-Caubet *et al.*, 2003) to produce plasmid pZVT1/13. The cloned gene was verified by DNA sequencing. The SDC22 strain (Duvezin-Caubet *et al.*, 2003) was transformed with pZVT1/13 and selected on synthetic complete medium lacking uracil. SDC22 containing pZVT1/13 was transformed with the deletion cassette of *ATP15* obtained by PCR amplification using DNA from strain YPL271w (Δ *atp15* from the European *Saccharomyces cerevisiae* Archive for Functional Analysis, Frankfurt, Germany) as a template and the primers ATP15-300 (5'-AGCATTGTAAGTCTCTCG-3') for the sense strand and ATP15+300 (5'-AGAA-GGGGTGACCAAGACCG-3') for the antisense strand according to a previously described procedure (Wach *et al.*, 1994). The transformants were selected on YPGA (yeast extract, peptone, glucose, adenine) supplemented with 200 μ g/ml G418 and analyzed by PCR analysis. One clone, called YE1, carrying the expected deletion in the chromosomal *ATP15* gene, in a p^+ state and containing pZVT1/13, was retained for further analysis.

Construction of a yeast strain expressing the subunit γ under the control of a doxycycline-repressible promoter

The coding sequence of the γ -subunit gene (*ATP3*) was amplified by PCR using DNA from strain W303-1B as template and primers ATP3tet1 (5'-atagatccATGTTGTCAAGAATTGTATCAAACAATG-3') for the sense strand and ATP3tet2 (5'-atagcgccgcTCATCCCCAAGAGGAAGCACCAGTAATAATATC-3') for the antisense strand. The PCR product was digested with *Bam*HI-*Not*I and ligated into the vector pCM189 (Duvezin-Caubet *et al.*, 2003) to produce plasmid pSE1. The 3' untranslated region of *ATP3* was amplified by PCR using DNA from strain W303-1B as template and primers GUTR1 (5'-catcctgcagTAAAAAATCACCCCTGCATTGCC-3') for the sense strand and GUTR2 (5'-gatcaagcctCAAATCATTGAGATTGCGACC-3') for the antisense strand. The PCR product was digested with *Pst*I-*Hind*III and ligated into the vector pSE1 to produce plasmid pTE1. The cloned gene was verified by DNA sequencing. The SDC22 strain was transformed with pTE1 and selected on synthetic complete medium lacking uracil. SDC22 containing pTE1 was transformed with the deletion cassette of *ATP3* obtained by the PCR amplification of the pUG6 plasmid containing the KanMX4 module (Wach *et al.*, 1994) as template and primers ATP3/Kan/Pro (5'-aggtgaaacaattgaagacgagcagtaaacattatttttagtagtcCATAGGCCAC-TAGTGGATCT-3') for the sense strand and ATP3/Kan/Ter (5'-ttctacaaaaaacacgtcaataaagaggcaatgacgggtgatttttttaCAGCT-

GAAGCTTCGTACGC-3') for the antisense strand according to a previously described procedure. Lowercase letters refer to regions of homology to *ATP3*, and capital letters refer to regions of KanMX4 homology. The transformants were selected on yeast extract/peptone/dextrose supplemented with 200 μ g/ml G418 and analyzed by PCR analysis. One clone, called YG1, carrying the expected deletion in the chromosomal *ATP3* gene, in a p^+ state and containing pTE1, was retained for further analysis.

Miscellaneous procedures

Isolated mitochondria were prepared by the enzymatic method (Guerin *et al.*, 1979). The protein amounts were determined by the Lowry method (Lowry *et al.*, 1951) in the presence of 5% SDS. Oxygen consumption rates were measured with a Clark electrode in the respiration buffer (0.65 M mannitol, 0.36 mM ethylene glycol tetraacetic acid, 5 mM Tris-phosphate, 10 mM Tris-maleate, pH 6.8) as previously described (Rigoulet and Guerin, 1979). For ATP synthesis rate measurements, mitochondria (0.3 mg/ml) were placed in a 2-ml thermostatically controlled chamber at 28°C in respiration buffer. The reaction was started by the addition of 4 mM NADH and 1 mM ADP and stopped by 3.5% perchloric acid and 12.5 mM EDTA. The samples were then neutralized to pH 6.5 by the addition of KOH and 0.3 M 3-(*N*-morpholino)propanesulfonic acid. ATP was quantified in a luciferin/luciferase assay (Perkin Elmer) with an LKB bioluminometer. The specific ATPase activity was measured at pH 8.4 by using a previously described procedure (Somlo, 1968). The participation of the F_1F_0 -ATP synthase in ATP production or hydrolysis was assessed by addition of oligomycin (20 μ g/mg of protein). Variations in $\Delta\Psi$ were evaluated in the same buffer by measuring the fluorescence quenching of rhodamine 123 with a SAFAS (Monte Carlo, Monaco) fluorescence spectrophotometer (Emaus *et al.*, 1986). SDS-PAGE was conducted as described previously (Laemmli, 1970; Schagger and von Jagow, 1987). BN-PAGE and clear native-PAGE experiments were carried out as described previously (Schagger and von Jagow, 1991). Briefly, mitochondrial extracts solubilized with digitonin to a protein ratio of 2 g/g were separated in a 3–13% acrylamide continuous gradient gel. After electrophoresis, the gel was either stained with Coomassie blue or incubated in a solution of 5 mM ATP, 5 mM $MgCl_2$, 0.05% lead acetate, 50 mM glycine-NaOH, pH 8.4, to detect the ATPase activity (Grandier-Vazeille and Guerin, 1996) or transferred to poly(vinylidene difluoride) membranes and analyzed by Western blotting. Western blot analyses were performed as previously described (Arselin *et al.*, 1996). Polyclonal antibodies raised against yeast ATP synthase were used at a dilution of 1:50,000 for subunit α ; 1:10,000 for subunits γ , Atp4, a-Atp6, d, c-Atp9, ϵ , and δ ; 1:10,000 for Aac2; and 1:5000 for cytochrome *b*. Monoclonal antibodies against yeast porin (from Molecular Probes) were used at a dilution of 1:5000. Nitrocellulose membranes were incubated with peroxidase-labeled antibodies at a 1:5000 dilution (Promega), and the blot visualization was conducted with an electrochemiluminescence reagent.

ACKNOWLEDGMENTS

This work was supported by the Centre National de la Recherche Scientifique, the Université Bordeaux Segalen, the Conseil Régional d'Aquitaine, and the Agence Nationale de la Recherche (program Chloro/mito CES) to J.P.d.R., as well as by funding from the Office of the Vice President for Research at Wayne State University to S.H.A. We particularly thank G. Lauquin for providing the immune serum against the Aac2 transporter and J. Velours and T. Langer for yeast ATP synthase and cytochrome *b* antibodies.

REFERENCES

- Arselin G, Vaillier J, Graves PV, Velours J (1996). ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of the subunit h and disruption of the ATP14 gene. *J Biol Chem* 271, 20284–20290.
- Dautant A, Velours J, Giraud MF (2010). Crystal structure of the Mg₂ADP-inhibited state of the yeast F₁c₁₀ ATP synthase. *J Biol Chem* 285, 29502–29510.
- Devenish RJ, Prescott M, Rodgers AJ (2008). The structure and function of mitochondrial F₁F₀-ATP synthases. *Int Rev Cell Mol Biol* 267, 1–58.
- Duvezin-Caubet S, Caron M, Giraud MF, Velours J, di Rago JP (2003). The two rotor components of yeast mitochondrial ATP synthase are mechanically coupled by subunit delta. *Proc Natl Acad Sci USA* 100, 13235–13240.
- Duvezin-Caubet S, Rak M, Lefebvre-Legendre L, Tetaud E, Bonnefoy N, di Rago JP (2006). A “petite obligate” mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: functional mtDNA is lethal in cells lacking the delta subunit of mitochondrial F₁-ATPase. *J Biol Chem* 281, 16305–16313.
- Emaus RK, Grunwald R, Lemasters JJ (1986). Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties. *Biochim Biophys Acta* 850, 436–448.
- Giraud MF, Velours J (1997). The absence of the mitochondrial ATP synthase delta subunit promotes a slow growth phenotype of rho-yeast cells by a lack of assembly of the catalytic sector F₁. *Eur J Biochem* 245, 813–818.
- Godard F, Tetaud E, Duvezin-Caubet S, di Rago JP (2011). A genetic screen targeted on the FO component of mitochondrial ATP synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 286, 18181–18189.
- Grandier-Vazeille X, Guerin M (1996). Separation by blue native and colorless native polyacrylamide gel electrophoresis of the oxidative phosphorylation complexes of yeast mitochondria solubilized by different detergents: specific staining of the different complexes. *Anal Biochem* 242, 248–254.
- Guelin E, Chevallier J, Rigoulet M, Guerin B, Velours J (1993). ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation and disruption of the ATP epsilon gene. *J Biol Chem* 268, 161–167.
- Guerin B, Labbe P, Somlo M (1979). Preparation of yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*) with good P/O and respiratory control ratios. *Methods Enzymol* 55, 149–159.
- Laemmli UK (1970). Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227, 680–685.
- Lai-Zhang J, Xiao Y, Mueller DM (1999). Epistatic interactions of deletion mutants in the genes encoding the F₁-ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 18, 58–64.
- Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951). Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193, 265–275.
- Paul MF, Ackerman S, Yue J, Arselin G, Velours J, Tzagolof A, Ackermann S (1994). Cloning of the yeast ATP3 gene coding for the gamma-subunit of F₁ and characterization of atp3 mutants. *J Biol Chem* 269, 26158–26164.
- Rigoulet M, Guerin B (1979). Phosphate transport and ATP synthesis in yeast mitochondria: effect of a new inhibitor: the tribenzylphosphate. *FEBS Lett* 102, 18–22.
- Schagger H, von Jagow G (1987). Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal Biochem* 166, 368–379.
- Schagger H, von Jagow G (1991). Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal Biochem* 199, 223–231.
- Somlo M (1968). Induction and repression of mitochondrial ATPase in yeast. *Eur J Biochem* 52, 276–284.
- Stock D, Leslie AG, Walker JE (1999). Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* 286, 1700–1705.
- Wach A, Brachat A, Pohlmann R, Philippsen P (1994). New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 10, 1793–1808.
- Walker JE (2013). The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem Soc Trans* 41, 1–16.
- Xiao Y, Metzl M, Mueller DM (2000). Partial uncoupling of the mitochondrial membrane by a heterozygous null mutation in the gene encoding the gamma- or delta-subunit of the yeast mitochondrial ATPase. *J Biol Chem* 275, 6963–6968.

3.2 Recherche de nouveaux facteurs impliqués dans la biogenèse du secteur F_O de l'ATP synthase

Nous nous sommes intéressés à la recherche nouveaux facteurs impliqués dans la biogenèse du secteur F_O de l'ATP synthase chez *Saccharomyces cerevisiae*, en utilisant un crible génétique original. En premier lieu nous avons validé l'utilisation de ce crible génétique. Ces résultats sont résumés ci-dessous, complétés de données non publiées, suivis de la publication correspondante (Godard *et al.* 2011). A la suite, je décris les résultats obtenus lors de l'utilisation de ce crible à une plus grande échelle en vue d'identifier de nouveaux facteurs d'origine nucléaire intervenants dans la biogenèse du secteur F_O de l'ATP synthase.

3.2.1 Un crible génétique pour la sélection de mutations inactivant spécifiquement le secteur F_O de l'ATP synthase.

Le laboratoire a conçu une méthode qui permet la recherche en aveugle de mutations ciblées sur le canal à protons de l'ATP synthase. Elle est basée sur l'observation qu'un défaut d'expression de la sous-unité δ (Atp16p) de l'ATP synthase n'empêche pas l'assemblage des autres sous-unités de l'enzyme et entraîne une fuite massive de protons via le F_O non couplé au F₁ (Duvezin-Caubet *et al.* 2006). Le potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi$) devient nul, ce qui est létal pour la cellule car beaucoup de réactions mitochondriales vitales pour la cellule dépendent du maintien d'un potentiel minimal de part et d'autre de la membrane interne. La survie cellulaire n'est alors possible que si une mutation inactive la fonction de transport du canal à protons. En conséquence on observe chez les cellules $\Delta\delta$ une conversion en cellules $\rho^{-/0}$, car le maintien de l'ADNmt codant pour les sous-unités du canal à protons dans ces conditions est létale (Figure 1A de l'article 2 et Figure 38, page 125).

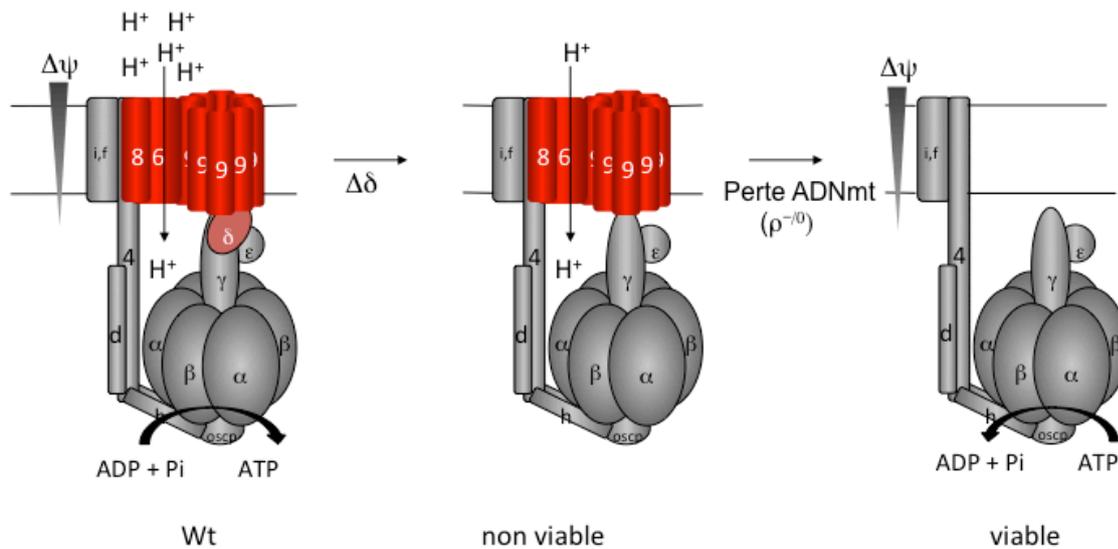


Figure 38

La perte de la sous-unité δ conduit à une fuite massive de protons à travers la membrane mitochondriale interne et à la perte du génome mitochondrial.

A priori, des mutations inactivant plus spécifiquement le F_0 devraient suffire à restaurer la viabilité des cellules $\Delta\delta$. Cette hypothèse a été testée dans une souche Δatp4 , délétée pour la sous-unité 4 de l'ATP synthase. Cette sous-unité fait partie du pied périphérique. En son absence, la sous-unité Atp6p ne peut être incorporée dans le complexe. Donc, la perte de la sous-unité δ dans une souche Δatp4 ne peut plus entraîner de fuites de protons via le F_0 , et la perte du génome mitochondrial ne devrait plus être nécessaire à la viabilité (Figure 39, page 126).

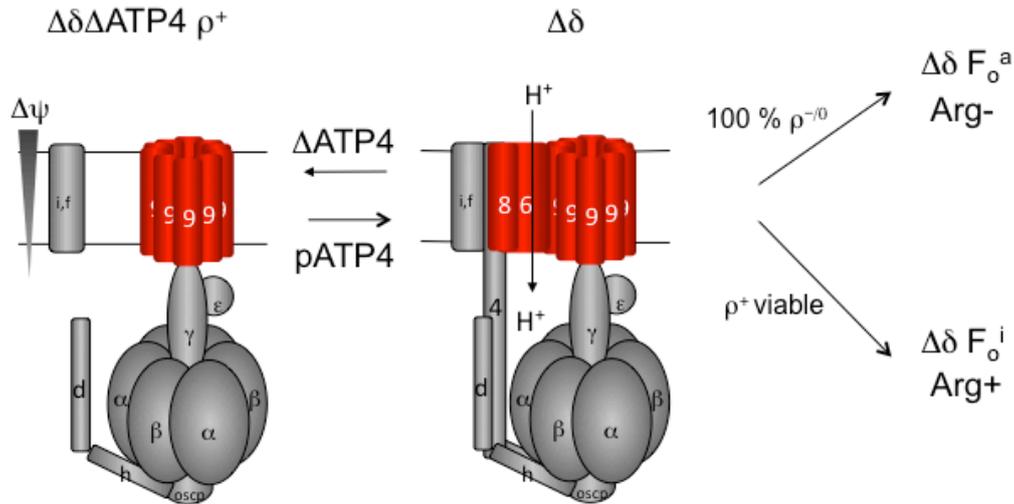


Figure 39

Principe de sélection de mutations inactivant le secteur F_0 de l'ATP synthase. F_0^a : secteur F_0 actif, F_0^i : secteur F_0 inactif.

Cela a bien été confirmé (Duvezin-Caubet *et al.* 2006). Ces observations permettaient d'envisager un crible génétique ciblé sur le F_0 en conditionnant la viabilité cellulaire à l'inactivation de cet élément de l'ATP synthase. Parmi les événements mutationnels possibles, citons des mutations spécifiques dans le canal à protons de l'ATP synthase où dans des facteurs intervenant spécifiquement dans la biogenèse de ce canal. Toutefois, ces mutations sont beaucoup moins fréquentes (10^{-6}) que la mutation $\rho^{-/0}$ (10^{-2}). Il était donc nécessaire d'éliminer du crible les mutants $\rho^{-/0}$. A cette fin, une version mitochondriale du gène *ARG8*, appelée *ARG8m*, codant pour une protéine mitochondriale intervenant dans la voie de synthèse de l'arginine a été insérée dans une région inter-génique de l'ADNmt, donc en conservant tous les gènes résidant dans cet ADN. Ainsi, dans un contexte nucléaire $\Delta arg8$, et en absence d'arginine dans le milieu, les mutations d'intérêt pourront seules être sélectionnées. En pratique, une souche $\Delta atp4 \Delta \delta [\rho^+ ARG8m]$ est transformée avec le gène *ATP4* porté sur un plasmide pour autoriser à nouveau la biogenèse du F_0 . Seules les cellules possédant préalablement à la transformation avec *ATP4* une mutation inactivant le canal à protons survivront tout en conservant leur génome mitochondrial (Figure 1A de l'article 2, panneau de droite).

Avant ma venue au laboratoire, cette méthode a permis d'isoler une première série de mutants nommés F_0^i . Je décris ci-dessous la caractérisation de ces isolats.

3.2.1.1 Caractérisation des mutants F_0^i

3.2.1.1.1 Localisation des mutations F_0^i

L'ATP synthase et les facteurs nécessaires à sa biogenèse ont une origine génétique double, nucléaire et mitochondriale. Une série de croisements génétiques permet de déterminer la localisation de la mutation F_0^i : nucléaire, mitochondriale ou sur le plasmide portant *ATP4* (Figure 1B de l'article 2). Sur 35 isolats, 28 sont mutés sur le plasmide, 5 ont une mutation d'origine mitochondriale (SDC25/2, SDC25/4, SDC25/6, SDC25/14 et SDC25/26) et 2 ont une mutation d'origine nucléaire (SDC25/1 et SDC25/5). Les mutations nucléaires obtenues ont un phénotype récessif.

3.2.1.1.1.1 Les mutations F_0^i de SDC25/1 et SDC25/5 sont localisées respectivement dans les gènes AEP1 et AEP2.

Les mutations de SDC25/1 et SDC25/5 peuvent être présentes dans un gène nucléaire déjà identifié comme nécessaire à l'expression de l'ATP synthase. Pour le savoir, les isolats F_0^i sont croisés avec des mutants nucléaires définis, déficients dans un facteur de biogenèse de l'ATP synthase ou une sous-unité du F_0 . Si le diploïde ainsi généré est incapable de croître sur un milieu respiratoire, on pourra en déduire que la mutation F_0^i est localisée dans le même gène que celui inactivé dans la souche testrice. Comme attendu, tous les croisements avec la souche $\Delta atp16$ ont donné uniquement des diploïdes déficients pour la respiration, puisque les isolats d'origine portent une mutation nulle dans le gène *ATP16* (Figure 2A de l'article 2). Les isolats SDC25/1 et SDC25/5 après croisement avec les autres souches testrices sont capables de croissance respiratoire à l'exception des souches délétées pour *AEP1* et *AEP2* respectivement. Que les mutations F_0^i affectent bien ces gènes est confirmé par le fait que lorsque les souches SDC25/1 et SDC25/5 sont transformées avec les gènes sauvages *AEP1* et *AEP2*, respectivement, ils sont cette fois complétés par les testeurs $\Delta aep1$ et $\Delta aep2$ (Figure 40, page 128).

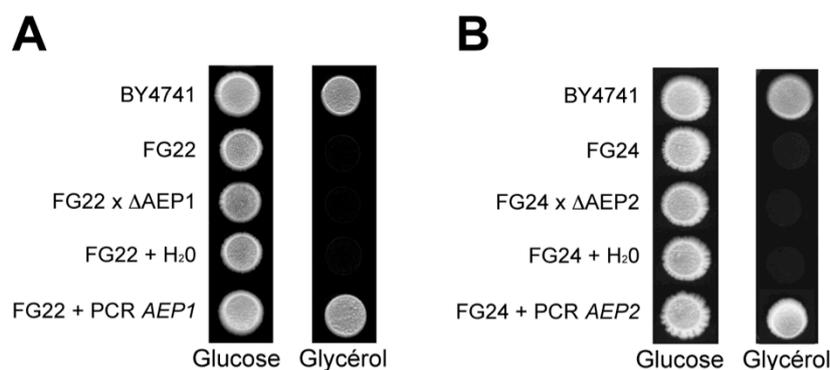


Figure 40

Correction des mutations des gènes *AEP1* et *AEP2*. A : correction de la mutation *aep1* dans FG22. La souche FG22 (SDC25/1 transformée par un plasmide codant pour la sous-unité δ) est déposée sur milieu glucose et glycérol après croisement avec la souche ΔAEP1, ou transformée en présence d'eau ou d'un produit PCR du gène *AEP1* sauvage. BY4741 : souche sauvage. B : même expérience que A avec la souche FG24 (SDC25/5 transformée par un plasmide codant pour la sous-unité δ) et produit PCR du gène *AEP2* sauvage.

3.2.1.1.1.2 Localisation des mutations F_0^i dans l'ADNmt

On s'attend à ce que les mutations F_0^i puissent être localisées dans les gènes mitochondriaux *ATP6*, *ATP8* et *ATP9* qui codent pour des sous-unités essentielles à l'activité du F_0 . La localisation des mutations dans le génome mitochondrial est effectuée par croisement avec des souches « petites synthétiques » dont l'ADNmt ne contient qu'un des gènes *ATP6*, *ATP8* ou *ATP9*. Si la mutation F_0^i est localisée dans le gène *ATP6*, la petite synthétique *ATP6* sera capable par recombinaison de corriger cette mutation et donc de restaurer la croissance respiratoire, à l'inverse du résultat des croisements employant les petites synthétiques *ATP8* et *ATP9*. Par cette méthode, les mutations F_0^i des souches SDC25/2 et SDC25/14 ont été localisées au niveau du locus d'*ATP9* (Figure 2B de l'article 2), celles de SDC25/4 et SDC25/6 dans le locus *ATP6*. Curieusement la mutation de la souche SDC25/26 n'est corrigée par aucune des petites synthétiques pour des raisons expliquées plus loin.

3.2.1.1.2 Caractérisation moléculaire des mutants F_o^i

3.2.1.1.2.1 Les isolats F_o^i SDC25/1 et SDC25/5 sont mutés respectivement dans *AEP1* et *AEP2*, deux gènes impliqués dans l'expression de la sous-unité *c/Atp9p* de l'ATP synthase.

Le séquençage montre que le gène *AEP1* de la souche SDC25/1 présente une délétion d'une base conduisant à un changement de cadre de lecture et à un codon Stop précoce, ce qui aboutit à une protéine tronquée de 201 résidus (la protéine sauvage *Aep1p* est constituée de 518 résidus). Le gène *AEP2* dans SDC25/5 présente une substitution de base introduisant un codon stop prématuré, aboutissant à une protéine tronquée de 260 résidus (la protéine sauvage *Aep2p* est constituée de 580 résidus). Ces gènes ont été décrits dans la littérature comme intervenant dans la synthèse de la sous-unité *c/Atp9p* (Finnegan *et al.* 1991; Payne *et al.* 1993). Pour vérifier l'impact de ces mutations sur la synthèse des constituants du canal à protons, un marquage radioactif spécifique des protéines codées par l'ADNmt est réalisé (Pour la méthode, voir paragraphe 2.4.13, page 108). Les résultats, en accord avec la littérature, montrent que la sous-unité *c/Atp9p* n'est pas synthétisée dans les mutants SDC25/1 et SDC25/5 (Figure 41, page 130) tandis que toutes les autres protéines codées par l'ADNmt le sont.

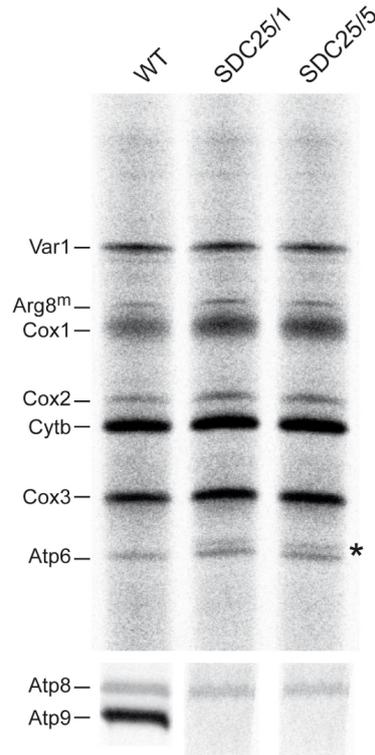


Figure 41

Radiomarquage des protéines mitochondriales de SDC25/1 et SDC25/5. Les protéines radiomarquées codées par le génome mitochondrial de SDC25/1 et SDC25/5 sont séparées sur gel Laemmli 17 % (résolution d'Atp8p et d'Atp9p) et urée/glycérol 12 % (résolution de Cox3p et Atp6p). Les différentes protéines du génome mitochondrial sont indiquées. L'astérisque indique le précurseur d'Atp6p.

3.2.1.1.2.2 Caractérisation des mutants F_0^i mitochondriaux.

3.2.1.1.2.2.1 La mutation F_0^i de SDC25/26

Le mutant SDC25/26 n'est sauvé par aucun des croisements contre les petites synthétiques ρ^- ATP6, ρ^- ATP8, et ρ^- ATP9. Afin de caractériser les effets de cette mutation, les mitochondries de SDC25/26 ont été cytoductées dans une souche sauvage. Le cytoductant résultant se nomme FG15. Le radiomarquage des protéines codées par le génome mitochondrial et des analyses par RT-PCR sur les ARN mitochondriaux montre une absence de synthèse de Coxp1, Atp8p et Atp6p, protéines codées par le même polycistron (Figure 42, page 131). Les analyses par Southern-Blot indiquent que cette souche comporte une large délétion du locus *COX1-ATP6-ATP8* (Figure S1 de l'article 2).

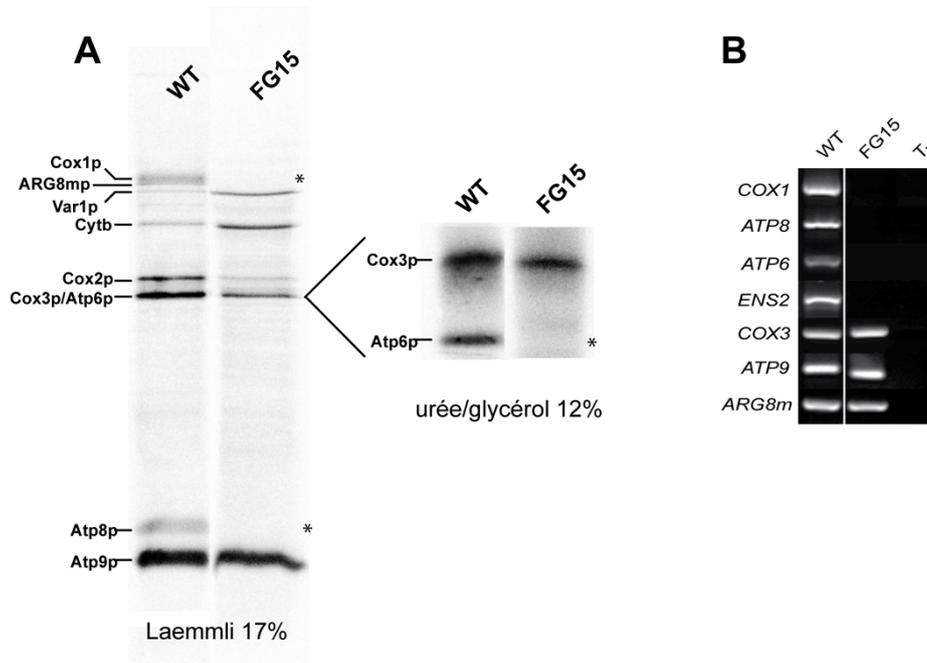


Figure 42

Expression des protéines mitochondriales de FG15. **A** : synthèse des protéines mitochondriales de FG15. Les protéines radiomarquées codées par le génome mitochondrial de FG15 sont séparées sur gel Laemmli 17 % et urée/glycérol 12 % (résolution de Cox3p et Atp6p). Les différentes protéines du génome mitochondrial sont indiquées. **B** : produits de RT-PCR séparés sur gel d'agarose. Les gènes correspondant aux produits PCR sont indiqués. WT : RT-PCR à partir d'ARN de FG4 ; FG15 : RT-PCR à partir d'ARN de FG15 ; T- : PCR sur ARN à partir d'ARN de FG15.

3.2.1.1.2.2.2 La mutation F_0^i de SDC25/4 et SDC25/6

Les mutations SDC25/4 et SDC25/6 sont localisées au niveau du locus d'*ATP6*. Le séquençage n'identifie pas de mutation dans la séquence codante ni dans le 5' UTR d'*ATP6*. Nous nous sommes donc intéressés au 3' UTR de *ATP6* dans ces mutants. Dans la souche SDC17-31b, à partir de laquelle SDC25/4 et SDC25/6 ont été isolés, *ATP6* est suivie par *ENS2*, un gène codant pour une endonucléase optionnelle qui est co-transcrit avec *COX1*, *ATP8* et *ATP6* (Figure S1A). Les transcrits *ATP8-ATP6-ENS2* matures contiennent un motif dodécamérique, un élément nécessaire à la maturation de l'extrémité 3' et à la stabilité des ARNm dans les mitochondries de levure (Butow *et al.* 1989). En revanche, l'ADN mitochondrial dans la petite synthétique *ATP6* (SDC30/2a) qui a réussi à sauver SDC25/4 et SDC25/6 provient de la souche FY1679 qui ne contient pas *ENS2* (Foury *et al.* 1998). Dans cette souche, un dodécamère se trouve en aval du codon stop d'*ATP6* (Figure S1B de l'article 2). Nous avons pensé que les mutations dans SDC25/4 et SDC25/6 peuvent impliquer la perte du dodécamère en aval de *ENS2*, et que la complémentation génétique de ces mutants

provient de l'acquisition en aval d'*ATP6* du dodécamère présent dans l'ADNmt de SDC30/2a (Figure S1B). Cela s'est avéré être le cas. En effet, la PCR avec des amorces spécifiques pour la première moitié de *ENS2* amplifie avec succès un fragment de l'ADN mitochondrial de SDC25/4 et SDC25/6, alors que des amorces spécifiques pour la seconde moitié de *ENS2* n'ont pas réussi à le faire. En outre, des expériences de Southern-blot ont indiqué la perte d'environ 1 kbp à l'intérieur de cette région de l'ADNmt dans SDC25/4 et SDC25/6 (Figure S1C de l'article 2). L'absence de dodécamère du côté 3' de l'ARNm d'*ATP8-ATP6-ENS2* dans SDC25/4 et SDC25/6 devrait affecter la stabilité de cet ARNm. Effectivement, la RT-PCR quantitative confirme une diminution d'au moins 95 % de ces transcrits dans les deux mutants (Figure S1D de l'article 2). En conséquence, la synthèse des sous-unités Atp6p et Atp8p a été réduite mais non complètement abolie chez les mutants (Figure S1E de l'article 2). Ceci explique la croissance respiratoire résiduelle après croisement de SDC25/4 et SDC25/6 avec les petites synthétiques *ATP8* et *ATP9* (Figure 2B de l'article 2).

3.2.1.1.2.3 Caractérisation des mutations dans la sous-unité *c/Atp9p* de SDC25/2 et SDC25/14

Le séquençage d'*ATP9* montre des mutations A60V pour SDC25/2 et M67K pour SDC25/14 au niveau de la deuxième hélice transmembranaire de la sous-unité *c/Atp9p* (Figure 3A de l'article 2). Ces mutations ont un impact modéré sur la synthèse de la sous-unité *c/Atp9p* (Figure 4A de l'article 2). Les isolats d'origines étant dépourvus d'Atp16p, leurs mitochondries sont cytoductées dans une souche sauvage afin de pouvoir tester les conséquences de ces mutations sur l'ATP synthase. Ces cytoductants se nomment respectivement FG13 et FG2. L'accumulation de la sous-unité *c/Atp9p* est déterminée par Western-blot en absence et en présence de chloroforme (qui dissocie l'anneau de la sous-unité *c/Atp9p*). L'accumulation de la sous-unité *c/Atp9p* représente 70 % du niveau sauvage pour FG13 et 40 % pour FG2. Ces diminutions peuvent être en partie attribuées à la proportion de cellules ρ^{-} dans les cultures de ces mutants (20 % et 60 %, respectivement). Lorsque les extraits de protéines mitochondriales n'ont pas été traités par du chloroforme, l'anneau de *c/Atp9p* est détecté pour FG13 mais est présent seulement sous forme de traces pour FG2 (Figure 4B de l'article 2). Cela indique que la mutation M67K compromet l'assemblage de la sous-unité *c/Atp9p* sous forme d'anneau alors que la mutation A60V n'a aucune incidence importante sur la capacité de la sous-unité *c/Atp9p* à former des anneaux stables. Bien que la sous-unité *a/Atp6p* soit synthétisée à un taux normal (Figure 4A de l'article 2), elle ne

parvient pas à s'accumuler dans FG2 et FG13 (Figure 4B de l'article 2). Ceci suggère que ces deux mutations de la sous-unité *c/Atp9p* empêchent l'incorporation de la sous-unité *a/Atp6p* dans le complexe ATP synthase, qui est dès lors dégradée. L'analyse par BN-PAGE des extraits mitochondriaux a révélé l'absence de complexes ATP synthase assemblés pour FG2 et FG13 (Figure 4C de l'article 2). Une immunodétection en BN-PAGE a révélé la présence dans FG13 d'un complexe réactif à l'anticorps anti-*c/Atp9p* correspondant à la taille de l'anneau de *c/Atp9p* (Figure 4C de l'article 2). Cela confirme que la mutation A60V n'empêche pas la constitution de l'anneau de *c/Atp9p* mais nuit à l'interaction de l'anneau avec la sous-unité *a/Atp6p*. Dans les deux cas, les mutations A60V et M67K perturbent considérablement la biogenèse de l'ATP synthase.

3.2.1.2 Les mutations des isolats F_0^i aboutissent comme attendu à une inactivation du secteur F_0

Après caractérisation de ces 7 premiers mutants F_0^i il apparaît, comme attendu, qu'ils ont été sélectionnés du fait de leur incapacité à exprimer un secteur F_0 fonctionnel. 2 sont incapables de synthétiser la sous-unité *c* du fait d'altérations dans *AEP1* et *AEP2*, deux gènes nécessaires à son expression. Les 5 autres mutations sont présentes dans l'ADNmt : 3 empêchent la synthèse des sous-unités *a* et *Atp8p* du fait de délétions dans l'unité de transcription encodant ces protéines. Les 2 dernières mutations conduisent à des substitutions A60V et M67K dans la sous-unité *c/Atp9p* (Figure 3B de l'article 2). La mutation M67K compromet sévèrement l'assemblage/stabilité de l'anneau de *c/Atp9p*, probablement du fait de l'introduction d'un résidu chargé dans la membrane (Figure 3A de l'article 2). Malgré la bonne synthèse dans ce mutant de la sous-unité *a/Atp6p*, elle ne parvient pas à s'accumuler, ce qui n'est pas surprenant car elle ne peut s'associer à son partenaire *Atp9p* absent. La seconde mutation A60V ne montre pas d'impact sur l'assemblage/stabilité de l'anneau de *c/Atp9p*. Selon une structure récente de l'ATP synthase, le résidu A60 est situé à la surface externe de l'anneau de *c/Atp9p* et sa substitution par une valine n'est pas censé créer un conflit avec les résidus voisins de la sous-unité *c/Atp9p*. La capacité de la sous-unité *c/Atp9p* à former un anneau tend à valider cette hypothèse. La sous-unité *a/Atp6p* malgré une synthèse normale ne s'accumule plus. On peut en déduire que cette mutation empêche l'association de l'anneau de *c/Atp9p* avec la sous-unité *a/Atp6p*, et en conséquence la sous-unité *a/Atp6p* est dégradée. Le résidu muté A60 est situé juste à côté du résidu E59 qui est essentiel pour l'activité de translocation des protons du F_0 (Figure 3B de l'article 2). Le glutamate est censé

interagir avec le résidu arginine de la sous-unité *a*/Atp6p (R186) et ainsi libérer le proton. On suppose que la mutation A60V altère l'interaction entre *a*-R186 et *c*-E59 et que cela est responsable du défaut d'accumulation de la sous-unité *a*/Atp6p (Figure 5 de l'article 2). Cet effet peut provenir d'un encombrement stérique de la valine empêchant l'entrée de *a*-R186 dans le site de liaison des protons. Une autre possibilité est que la mutation déstabilise le résidu *c*-E59. Il y a des fortes évidences pour que la stabilisation de ce résidu nécessite la présence d'une molécule d'eau comme cela a été démontré pour l'ATP synthase de *Bacillus pseudofirmus* OF4. Les résidus de la sous-unité *c* entourant le glutamate sont impliqués dans la liaison de la molécule d'eau. Si la molécule d'eau est présente aussi dans le site de liaison au H⁺ de l'anneau de *c* de la levure, son positionnement correct ou même son accès à ce site peut être compromis par la mutation A60V. En conséquence, le résidu *c*-E59 peut ne pas atteindre la position qui permet son interaction avec *a*-R186. En toute état de cause, l'interaction entre *c*-E59 et *a*-R186 pourrait être un déterminant clé pour maintenir la sous-unité *a* associée à l'anneau de *c*, même si cette interaction est constamment défaite et reconstituée pendant la rotation de l'anneau de *c*. Si cette interaction est interrompue de manière permanente, la sous-unité *a* peut être reliée plus faiblement au complexe et en conséquence être plus facilement dégradée par protéolyse. Une autre possibilité est que la sous-unité *a* ne peut se structurer correctement que si *a*-R186 est en interaction avec *c*-E59. Une structuration de la sous-unité *a* en face de l'anneau de *c* aurait l'avantage de minimiser des interactions non-productives durant l'assemblage de la sous-unité Atp6p. Le fort impact de la mutation A60V sur la sous-unité *a* est surprenant. En effet, d'autres mutations plus radicales à l'interface de l'anneau de *c* et de la sous-unité *a* comme *a*-L183R localisée à un tour d'hélice de *a*-R186 compromettent le fonctionnement du canal à proton sans toutefois altérer l'assemblage/la stabilité de l'ATP synthase. Ces données suggèrent que la zone de contact entre la sous-unité *a* et l'anneau de *c* est très restreint dans la région où les protons sont échangés entre les deux sous-unités.

3.2.1.3 Conclusion sur les mutations F_Oⁱ

Ces résultats montrent que ce crible génétique est à priori parfaitement approprié pour la sélection de mutations affectant spécifiquement le secteur F_O de l'ATP synthase. Les mutants obtenus sont localisés au génome nucléaire ou mitochondrial et montrent une sévère déficience dans le secteur F_O de l'ATP synthase. Cela permet d'envisager un crible sur un échantillonnage plus large pour à la fois identifier des résidus des sous-unités *a* et *c* impliqués

dans le mécanisme de transport des protons et pour identifier des nouveaux facteurs intervenant dans la constitution du F_0 pour une meilleure compréhension des mécanismes de biogenèse de l'ATP synthase.

3.2.2 Article 2

J Biol Chem. 2011 May 20 ;286(20):18181-9. doi: 10.1074/jbc.M110.214825. Epub 2011 Mar 28.

A genetic screen targeted on the F_O component of mitochondrial ATP synthase in *Saccharomyces cerevisiae*

François Godard*, Emmanuel Tetaud*¹, Stéphane Duvezin-Caubet and Jean-Paul di Rago
Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095 CNRS, Université Victor Segalen
Bordeaux 2, 33077 Bordeaux, France

*These authors contributed equally and are listed in alphabetical order

PMID 21454598

A Genetic Screen Targeted on the F_O Component of Mitochondrial ATP Synthase in *Saccharomyces cerevisiae*^{*[S]}

Received for publication, December 21, 2010, and in revised form, March 9, 2011. Published, JBC Papers in Press, March 28, 2011, DOI 10.1074/jbc.M110.214825

François Godard¹, Emmanuel Tetaud^{1,2}, Stéphane Duvezin-Caubet, and Jean-Paul di Rago³

From the Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095 CNRS, Université Victor Segalen Bordeaux 2, 33077 Bordeaux, France

In yeast, the two main F_O proton-translocating subunits of the ATP synthase (subunits 6/*a* and 9/*c*) are encoded by mitochondrial DNA (mtDNA). Unfortunately, mutations that inactivate the F_O typically result in loss of mtDNA under the form of ρ^-/ρ^0 cells. Thus, we have designed a novel genetic strategy to circumvent this problem. It exploits previous findings that a null mutation in the nuclear *ATP16* gene encoding ATP synthase subunit δ results in massive and lethal F_O-mediated protons leaks across the inner mitochondrial membrane. Mutations that inactivate the F_O can thus, in these conditions, be selected positively as cell viability rescuing events. A first set of seven mutants was analyzed and all showed, as expected, very severe F_O deficiencies. Two mutants carried nuclear mutations in known genes (*AEP1*, *AEP2*) required for subunit *c* expression. The five other mutations were located in mtDNA. Of these, three affect synthesis or stability of subunit *a* transcripts and the two last consisted in a single amino acid replacement in subunit *c*. One of the subunit *c* mutations is particularly interesting. It consists in an alanine to valine change at position 60 of subunit *c* adjacent to the essential glutamate of subunit *c* (at position 59) that interacts with the essential arginine 186 of subunit *a*. The properties of this mutant suggest that the contact zone between subunit *a* and the ten subunits *c*-ring structure only involves critical transient interactions confined to the region where protons are exchanged between the subunit *a* and the *c*-ring.

The energy needs of living organisms are essentially met through the action of an F₁F_O-type ATP synthase, a complex found in the plasma membrane of bacteria, in the inner membrane of mitochondria, and in the thylakoid membrane of chloroplasts. The ATP synthase catalyzes the synthesis of ATP from ADP and orthophosphate using a chemiosmotic energy, most commonly that of a proton gradient, across its host membrane (1–3). The ATP synthase consists of two distinct domains, a globular extramembrane catalytic unit called F₁, and a membrane-embedded proton-translocating domain known as F_O. The current model for the ATP synthase energy coupling is the binding change mechanism, according to which affinity

changes for substrates and products at the catalytic sites are coupled to proton transport through the rotation of a subcomplex of the enzyme (1).

In mitochondria, the F₁ is an assembly of five different subunits, with a $\alpha_3\beta_3\gamma\delta\epsilon$ stoichiometry, that contains three catalytic sites located in the β -subunits (4–6). The synthesis of ATP by the β subunits depends upon rotation of the F₁ subcomplex (called the central stalk) formed by subunits γ , δ , and ϵ . Evidence for this rotation has been obtained by optical microscopy (7). The main components involved in proton translocation are a ring of *c* subunits (ten in yeast where this subunit is also referred to as Atp9p, (8)) and a single subunit *a* (also referred to as Atp6p in yeast) (9, 10). Direct contacts between the *c*-ring and subunits γ and δ enable the *c*-ring and the central stalk to rotate together as a fixed ensemble (8, 11). The F₁ is also physically connected to F_O via its external surface by the so-called peripheral stalk that acts as a stator to counter the tendency of the $\alpha_3\beta_3$ subcomplex to follow the rotation of the subunit γ during catalysis. In yeast mitochondria, the peripheral stalk consists of single copies of subunits OSCP (Oligomycin Sensitivity Conferring Protein), 4, d, h, f, 8, and i (2, 12, 13). In mitochondria, the ATP synthase exists as a dimer (14), a structure mediated by subunits *e* and *g* that is important for cristae formation (15, 16). The mitochondrial ATP synthase also contains peptides (If1p, Stf1p, and Stf2p in yeast) that have been implicated in the regulation of the enzyme by modulating its hydrolytic activity (17). In most eukaryotes, the mitochondrial ATP synthase has a dual genetic origin, nuclear and mitochondrial. In *Saccharomyces cerevisiae*, the mitochondrial genome encodes three subunits of the F_O (subunits *a*, *c*, and 8). Studies in yeast have revealed that the assembly pathway of the ATP synthase is particularly complex with a number of protein factors having specific actions in the expression of the mitochondrial DNA (mtDNA)-encoded subunits and in the establishment of proper subunit interactions (reviewed in Refs. 2, 13, 18).

As a genetically tractable eukaryote with a good fermenting capacity, yeast is a good system to study the ATP synthase. Both nuclear and mitochondrial genes can be manipulated in this organism (19), making it possible to introduce virtually any change in ATP synthase structure and in proteins involved in the assembly of this enzyme. However, defects in ATP synthase often result, in yeast, in loss of mtDNA under the form of ρ^-/ρ^0 cells (20). Only mutants deficient in α -F₁ and β -F₁ proteins do not produce ρ^-/ρ^0 cells because of the inability of these mutants to survive the loss of the respiratory proteins encoded

* This work was supported by grants from the Conseil Régional d'Aquitaine and the Agence Nationale de la Recherche (ANR).

[S] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Fig. S1.

¹ Both authors contributed equally and are listed in alphabetical order.

² To whom correspondence may be addressed. Tel.: 33-5-56-99-90-43; Fax: 33-5-56-99-90-51; E-mail: tetaud@ibgc.cnrs.fr.

³ To whom correspondence may be addressed. Tel.: 33-5-56-99-90-43; Fax: 33-5-56-99-90-51; E-mail: jp.dirago@ibgc.cnrs.fr.

⁴ The abbreviation used is: mtDNA, mitochondrial DNA.

Yeast F_O Inactive Mutants

TABLE 1
Genotypes of yeast strains

Strain	Nuclear genotype	mtDNA	Source
BY4741	<i>Mata his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0</i>	ρ ⁺	Euroscarf
KL14-4a/60	<i>Mata his1 trp2</i>	ρ ⁰	Gif collection
DFS160a	<i>Mata ade2-101 ura3-52 leu2Δ arg8::URA3 kar1-1</i>	ρ ⁰	This study
MR6/b-3	<i>Mata his3-1,15 ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 CAN1 arg8::HIS3</i>	ρ ⁰	This study
SDC17-4c	<i>Mata met6 lys2 his3 ura3 leu2 arg8::hisG atp4::URA3</i>	ρ ⁺ Arg8 ^m	This study
SDC17-31b	<i>Mata met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i>	ρ ⁺ Arg8 ^m	(25)
FG3	<i>Mata ade2-101 ura3-52 leu2Δ arg8::URA3 kar1-1</i>	ρ ⁺ Arg8 ^m	This study
FG4	<i>Mata his3-11,15 ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 CAN1 arg8::HIS3</i>	ρ ⁺ Arg8 ^m	This study
SDC25/1	<i>Mata met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3 + pATP4-HIS3 aep1 F_O¹ mutant</i>	ρ ⁺ Arg8 ^m	This study
SDC25/5	<i>Mata met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3 + pATP4-HIS3 aep2 F_O¹ mutant</i>	ρ ⁺ Arg8 ^m	This study
FG18	<i>Mata met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::ura3::LYS2 + pATP4-HIS3 aep1 F_O¹ mutant</i>	ρ ⁺ Arg8 ^m	This study
FG23	<i>Mata met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::ura3::LYS2 + pATP4-HIS3 aep2 F_O¹ mutant</i>	ρ ⁺ Arg8 ^m	This study
FG22	<i>Mata met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::ura3::LYS2 + pATP4-HIS3 + pATP16-URA3 (pSDC13) aep1 F_O¹ mutant</i>	ρ ⁺ Arg8 ^m	This study
FG24	<i>Mata met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::ura3::LYS2 + pATP4-HIS3 + pATP16-URA3 (pSDC13) aep2 F_O¹ mutant</i>	ρ ⁺ Arg8 ^m	This study
SDC25/2	<i>Mata met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3 + pATP4-HIS3</i>	ρ ⁺ Arg8 ^m atp9-A60V	This study
FG12	<i>Mata ade2-101 ura3-52 leu2Δ arg8::URA3 kar1-1</i>	ρ ⁺ Arg8 ^m atp9-A60V	This study
FG13	<i>Mata his3-11,15 ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 CAN1 arg8::HIS3</i>	ρ ⁺ Arg8 ^m atp9-A60V	This study
SDC25/4	<i>Mata met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3 + pATP4-HIS3</i>	ρ ⁺ Arg8 ^m Δ3'UTR of ATP6	This study
SDC25/6	<i>Mata met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3 + pATP4-HIS3</i>	ρ ⁺ Arg8 ^m Δ3'UTR of ATP6	This study
SDC25/14	<i>Mata met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3 + pATP4-HIS3</i>	ρ ⁺ Arg8 ^m atp9-M67K	This study
FG1	<i>Mata ade2-101 ura3-52 leu2Δ arg8::URA3 kar1-1</i>	ρ ⁺ Arg8 ^m atp9-M67K	This study
FG2	<i>Mata his3-11,15 ade2-1 ura3-1 leu2-3,112 trp1-1 CAN1 arg8::HIS3</i>	ρ ⁺ Arg8 ^m atp9-M67K	This study
SDC25/26	<i>Mata met6 lys2 his3 ura3 arg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3 + pATP4-HIS3</i>	ρ ⁺ Arg8 ^m Δ cox1-atp8-atp6-ens2	This study
SDC30/2a	<i>Mata ade2-101 ura3-52 leu2Δ arg8::URA3 kar1-1</i>	ρ ATP6	(50)
FG8	<i>Mata ade2-101 ura3-52 leu2Δ Arg8::URA3 kar1-1</i>	ρ ATP8	This study
FG9	<i>Mata ade2-101 ura3-52 leu2Δ Arg8::URA3 kar1-1</i>	ρ ATP9	This study

by the mitochondrial genome (21). The most prominent impact on mtDNA stability, with 100% ρ⁻/ρ⁰ cells, has been observed in mutants lacking the γ-F₁ and δ-F₁ proteins (22, 23). Using a regulatable subunit δ gene (*ATP16*), we have shown that a lack in this subunit results in the formation of partial F₁F_O assemblies freely transporting protons across the mitochondrial inner membrane (24). Beyond a 50% deficit in subunit δ, the cells are unable to maintain any electrical potential (ΔΨ) across the mitochondrial inner membrane (25). As a consequence, the cells need then to inactivate the F_O to survive, which explains the 100% conversion into ρ⁻/ρ⁰ cells of strains lacking the subunit δ gene. Mutations in the F_O have usually also a strong impact on the mtDNA, but the reason for this is still unknown. There is no reported case of mutations of the F_O that largely uncouple the mitochondrion like mutations in the central stalk. A recent study has revealed that in bacteria specific subunit *a* mutations may generate massive protons leaks through the F_O (26). In yeast, such mutations would render maintenance of a complete (ρ⁺) mtDNA not compatible with cell viability, like in strains deficient in subunit δ, which may explain the failure to isolate such mutants.

We describe in this study a novel genetic strategy for the study of yeast F_O. The screen is designed for the isolation of mutations that inactivate the F_O, like point mutations in the proton channel subunits or lesions in proteins needed to assemble the F_O. The mutations are selected for their ability to rescue the viability of cells lacking the subunit δ. The screen is thus positive and targeted on the F_O. To avoid rescue of δ-deficient cells by the ρ⁻/ρ⁰ mutation, which is much more frequent than specific mutations of the F_O (~10⁻² versus <10⁻⁵), we used a host strain in which a non-respiratory genetic marker, ARG8^m (27), has been integrated into an intergenic region of the mitochondrial genome (25). This is a mitochondrial version of the nuclear gene ARG8 that encodes a mitochondrial protein involved in arginine biosynthesis (27). Consequently, without external arginine and in a Δ*arg8* nuclear background, ρ⁻/ρ⁰

cells can no longer grow and only F_O inactive mutants with a complete (ρ⁺) mtDNA are selected as arginine prototrophs. We report the analysis of a first series of seven mutants isolated with this system.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Yeast Strains and Media—The *S. cerevisiae* strains used and their genotypes are listed in Table 1. The following rich media were used for the growth of yeast: 1% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) peptone, 40 mg/l adenine, supplemented with 2% (w/v) glucose, 2% (w/v) galactose, or 2% (w/v) glycerol, respectively. The glycerol medium was buffered at pH 6.2 with 50 mM potassium phosphate. We also used minimal medium W0 (0.17% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, 0.5% (w/v) ammonium sulfate, 2% (w/v) glucose) and complete synthetic medium CSM medium (0.17% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids and ammonium sulfate, 0.5% (w/v) ammonium sulfate, 2% (w/v) glucose, and 0.8% (w/v) of a mixture of amino acids and bases from BIO-101). Solid media contained 2% (w/v) agar.

Cytoduction of the atp9-A60V and atp9-M67K Mutations in a Wild-type Nuclear Context—We studied the properties of the *atp9-A60V* and *atp9-M67K* mutations in a wild-type nuclear context. To do this, we transferred the mitochondrial genomes of SDC25/2 and SDC25/14 by cytoduction, first into DFS160a and then into MR6/b-3. The final cytoductants were named FG12/13 and FG1/2, respectively (Table 1). As a wild-type control for FG12/13 and FG1/2, we used strain FG3/4 similarly obtained by two steps cytoduction of the parental strain SDC17-31b from which SDC25/2 and SDC25/14 were isolated.

Restoration of ATP16 Expression in SDC25/1 and SDC25/5 Mutants—To reintroduce the *ATP16* gene into mutants SDC25/1 and SDC25/5, we first used plasmid M2660 carrying a DNA cassette including *LYS2* to replace the *URA3* marker used to delete *ATP4* (28). SDC25/1 and SDC25/2 were transformed with plasmid M2660 cut with HindIII and transformed cells

were selected on W0 supplemented with methionine and uracil, and named, respectively, FG18 and FG23. The plasmid pSDC13 containing *ATP16* under its native promoter (24) was then introduced in FG18 and FG23 to give FG22 and FG24, respectively (Table 1).

Construction of the Synthetic ρ^- Strain FG8 and FG9—The wild-type *ATP8* locus, from nucleotide position -271 upstream from the *ATP8* initiator codon to nucleotide position $+153$ downstream from the *ATP8* stop codon, was amplified by PCR using mtDNA from strain SDC17–31b as a template and primers ATP8.3 (5′-CGGGATCCCGCTCCGCAAAGCCGG-ATTAATG-3′) for the sense strand and ATP8.120 (5′-ATATAAATATATAGTCCGTAAGGA-3′) for the antisense strand. The PCR product was blunt-end ligated into the EcoRV site of pMOS-Blue (pMOS Blue Blunt Ended Cloning Kit from GE Healthcare) to give plasmid pMOS-ATP8. The insert was removed from pMOS-ATP8 by digestion with BamHI-XbaI and ligated into the vector pJM2; this vector contains *COX2* as a genetic marker for mitochondrial transformation (19)) creating plasmid pJM2-ATP8. This plasmid was introduced by biolistic transformation into DFS160a mitochondria with the nuclear selectable LEU2 plasmid pFL46 by microprojectile bombardment using a biolistic PDS-1000/He particle delivery system (Bio-Rad) as described previously (19). Mitochondrial transformants were identified among the Leu⁺ nuclear transformants by their ability to produce respiring clones when mated with the non-respiring NB40–3C strain bearing a deletion in the mitochondrial *COX2* gene (19). One such mitochondrial transformant was isolated and named FG8.

The wild-type *ATP9* locus, from nucleotide position -228 upstream from the *ATP9* initiator codon to nucleotide position $+98$ downstream from the *ATP9* stop codon, was amplified by PCR using mtDNA from strain SDC17–31b (25) as a template and primers ATP9.1 (5′-AATAAGATATATAAATAAGTCC-C-3′) for the sense strand and ATP9.67 (5′-GAATGTTATTA-ATTTAATCAAATGAG-3′) for the antisense strand. The PCR product was blunt-end ligated into the EcoRV site of pMOS-Blue (pMOS Blue Blunt Ended Cloning kit from GE Healthcare) to give plasmid pMOS-ATP9. The insert was removed from pMOS-ATP9 by digestion with BamHI-XbaI and ligated in the vector pJM2 to create plasmid pJM2-ATP9. This plasmid was introduced into mitochondria by biolistic transformation as described above. One mitochondrial transformant was isolated and named FG9.

In Vivo Labeling of Mitochondrial Translation Products—These experiments were performed as previously described (29). Briefly, strains were grown to early exponential phase (10^7 cells/ml) in 10 ml of galactose-rich media. The cells were harvested by centrifugation and washed twice with a low sulfate medium (W0-AS, W0 without ammonium sulfate (30)). Cells were resuspended in 10 ml of W0-AS containing 1% galactose, supplemented with the corresponding auxotrophic markers but without methionine and cysteine and incubated for 2 h. These cultures were centrifuged, and the cells were resuspended in 0.5 ml of W0-AS containing 1% galactose and 1 mM of a freshly prepared solution of cycloheximide and incubated at 20 °C for 5 min; then 50 μ Ci of [³⁵S]methionine-[³⁵S]cysteine mix (1000 Ci/mmol, Perkin Elmer) was added. The reaction

was terminated after 20 min by the addition of 75 μ l of 1.85 M NaOH, 1 M β -mercaptoethanol, and 0.01 M phenylmethylsulfonyl fluoride. An equal volume of 50% trichloroacetic acid was added, and the mixture was centrifuged in a microcentrifuge for 5 min at 14,000 rpm. The pellet consisting of precipitated proteins was washed once with water and resuspended in 50 μ l of sample buffer (2% SDS, 10% glycerol, 2.5% β -mercaptoethanol, 0.06 M Tris-HCl, pH 6.8, and 0.002% bromphenol blue). The proteins were then separated on a 16.5% polyacrylamide gel (31).

Miscellaneous Procedures—Isolated mitochondria were prepared by the enzymatic method (32). Protein amounts were determined by the procedure of Lowry (33) in the presence of 5% SDS. SDS-PAGE was as described by Laemmli and Schagger (31, 34). BN-PAGE experiments were carried out as described previously (35). Western blot analyses were performed as described (36). Polyclonal antibodies raised against yeast ATP synthase were used at a dilution of 1:50,000 for subunits β ; 1:10,000 for subunit Atp6p and 1:5,000 for subunit Atp9p. Monoclonal antibodies against yeast porin (from Molecular Probes) were used at a dilution of 1:5000. Nitrocellulose membranes were incubated with peroxidase-labeled antibodies at a 1:10,000 dilution and revealed with the ECL reagent (GE Healthcare).

RESULTS

Procedure for Random Isolation of Mutants with an Inactive F_0 —Retention of functional mtDNA in $\Delta\delta$ cells is not viable due to massive F_0 -mediated proton leaks across the inner mitochondrial membrane (25). As a result, 100% of $\Delta\delta$ cells are found as ρ^-/ρ^0 petites (22). Specific mutations of the F_0 (F_0^i) can thus not be selected for directly from $\Delta\delta$ cells. We therefore designed a strategy based on the use of a null mutation of Atp4p (Δ atp4), a subunit of the peripheral stalk of the ATP synthase. A lack of Atp4p prevents the incorporation of Atp6p into the F_0 (37). In these conditions, the absence of subunit δ can no longer uncouple the mitochondrial membrane and subunit δ -deficient cells with a complete mtDNA are viable (25). Transformation of $\Delta\delta + \Delta$ atp4 cells with a plasmid-borne wild-type *ATP4* gene will restore the assembly of a functional F_0 and the reconstituted $\Delta\delta$ cells will die. However, if the $\Delta\delta + \Delta$ atp4 cells acquired a mutation that alone inactivates the F_0 prior to their transformation with *ATP4*, the reconstituted $\Delta\delta$ cells are expected to be viable. To eliminate the ρ^-/ρ^0 mutation from the screen, we used cells with modified mtDNA in which *ARG8^m*, a non-respiratory genetic marker (27), has been integrated into an intergenic region (25). This is a mitochondrial version of the nuclear gene *ARG8* encoding a mitochondrial protein involved in arginine biosynthesis (27). As ρ^-/ρ^0 cells always lack at least one of the mitochondrial genes encoding components of the organelle protein synthesis system (tRNAs, rRNAs, and Var1p), they are unable to express *ARG8^m* and hence unable to grow in the absence of external arginine (in a nuclear *Δarg8* context). Only those F_0^i mutants that contain a complete mitochondrial genome (ρ^+), can therefore be selected for directly by their ability to grow in the absence of arginine.

In practice, the $F_0^i \rho^+$ mutants were selected as follows (Fig. 1A). Freshly grown $\Delta\delta + \Delta$ atp4 cells (strain SDC17–31b (25))

Yeast F_0 Inactive Mutants

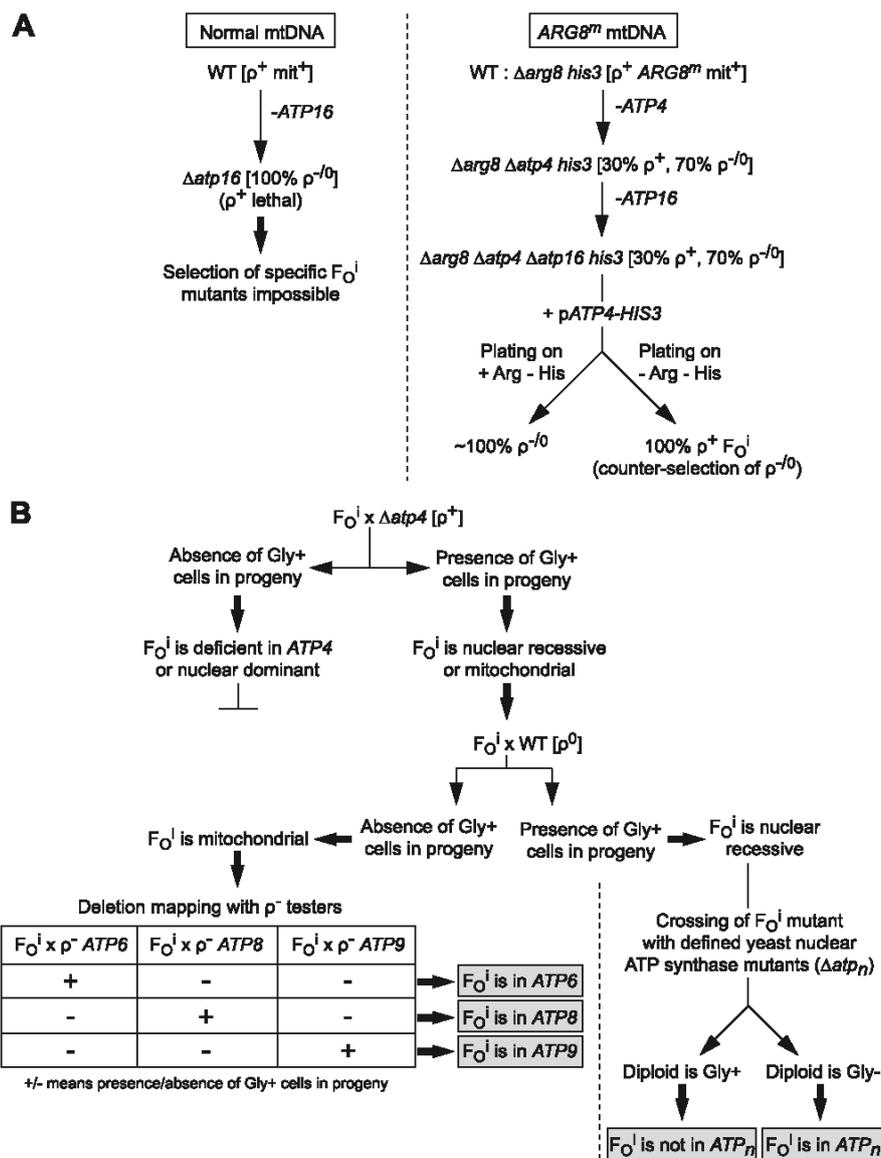


FIGURE 1. Procedure for the isolation and mapping of yeast mutants with an inactive F_0 (F_0^i). Panel A describes the procedure for the isolation of F_0^i mutants using a host strain where the nuclear $ARG8$ gene has been replaced by a mitochondrial version of that gene ($ARG8^m$) integrated into an intergenic region of the mitochondrial genome (mtDNA); see text for details. Panel B describes the procedure for mapping the mutations in nuclear or mitochondrial DNA, see text for details. $Gly^{+/-}$ refers to yeast cells able/unable to grow on glycerol; WT , wild-type; $\rho^{-/0}$ refers to large (>50%) deletions (ρ^-) or complete loss (ρ^0) of the mtDNA; ρ^+ , complete mtDNA; ATP_n is a known nuclear gene required for ATP synthase expression.

were transformed with a $HIS3$ plasmid containing $ATP4$ under control of its native promoter. The transformed cells were plated on a medium lacking both histidine and arginine (CSM-RH), *i.e.* conditions selective for both the plasmid (histidine synthesis) and the ρ^+ state (arginine synthesis). As to estimate the total number of transformed cells (ρ^+ and ρ^-/ρ^0 petites) that were plated on CSM-RH, an aliquot of transformed cells was plated on a medium lacking only histidine (CSM-H). On this medium, those transformed cells that were *petites*, *i.e.* by far the most frequent (70%), are able to grow. Out of 10^8 transformed cells plated on CSM-RH, about 30 viable clones were obtained, indicating that, excluding the ρ^-/ρ^0 petites, mutations rescuing cells lacking subunit δ are rare (10^{-6} to 10^{-7}).

Genetic Origin, Nuclear, or Mitochondrial, of the F_0^i Mutants—Plasmid-borne genes are more exposed to mutation or rearrangement than chromosomal genes. We therefore primarily tested whether the F_0^i isolates resulted from the inactivation of the plasmid-borne $ATP4$ gene. F_0^i isolates were crossed with a $\Delta atp4$ strain containing a wild-type mitochondrial genome (SDC17-4c, see Fig. 1B): when the F_0^i mutation is located in the plasmid-borne $ATP4$ gene, the progeny will be entirely deficient for respiratory growth whereas other mutations, either nuclear or mitochondrial, will result in respiratory competent progeny. Out of 28 F_0^i isolates, only 7 produced respiratory competent cells when crossed with SDC17-4c. Note that the absence of complementation by SDC17-4c may alternatively

Yeast F_0 Inactive Mutants

be the consequence of an F_0^i mutation being nuclear dominant affecting a gene other than *ATP4*. However, although this type of rescuing event could theoretically occur, it must be very rare as the screen is designed to isolate loss-of-function mutations, which are expected to be mostly recessive if located in nuclear DNA. We therefore decided not to analyze further the F_0^i isolates that were not rescued by the $\Delta atp4$ strain.

The seven F_0^i isolates that proved to be competent for *ATP4* expression (*ATP4*⁺) were further analyzed by crossing with a wild-type strain lacking mtDNA (KL14–4a/60). This cross should restore respiratory competence in any nuclear recessive F_0^i mutant but fail to rescue any mutation in the mtDNA. This genetic test indicated that two of the seven F_0^i *ATP4*⁺ isolates (SDC25/1 and SDC25/5) were nuclear recessive mutants and that the five others (SDC25/2, SDC25/4, SDC25/6, SDC25/14, and SDC25/26) were mitochondrial mutants.

Nuclear F_0^i Mutants—To determine whether SDC25/1 and SDC25/5 carried mutations in a nuclear gene already known to be necessary for the expression of a functional F_0 , we tested these mutants for rescue in crosses with defined nuclear ATP synthase mutants. The tester strains were deficient in a gene encoding either a structural subunit (*ATP4*, *ATP5*, *ATP7*, *ATP14*, *ATP18*, *ATP17*) or an accessory factor (*ATP10*, *ATP23*, *AEP1*, *AEP2*, *AEP3*, *ATP22*, *ATP25*, *NCA3*) of the F_0 . We also tested mutants lacking α - F_1 (*ATP1*) or β - F_1 (*ATP2*) or assembly factors of these subunits (*ATP11*, *ATP12*, *FMC1*), since α - F_1 and/or β - F_1 deficient mutants exhibit a secondary defect in F_0 with notably a failure to accumulate subunit *a* (38–40). When a F_0^i isolate carries a mutation in one of these tester genes, the corresponding homozygous diploid strain will be unable to grow on glycerol, whereas all the other crosses will produce respiratory competent progenies. The only testers that failed to complement SDC25/1 and SDC25/5 were those deficient in *AEP1* or *AEP2*, respectively (Fig. 2A). As expected these mutants were not complemented also by crossing with a $\Delta atp16$ strain since they lack the *ATP16* gene encoding subunit δ . *AEP1* and *AEP2* encode mitochondrial proteins required for the synthesis of subunit *c* (41–46). Upon reintroduction of *AEP1* into SDC25/1 and of *AEP2* into SDC25/5, complementation was restored in crosses with $\Delta aep1$ and $\Delta aep2$ testers (not shown), confirming that *AEP1* and *AEP2* were actually inactivated in SDC25/1 and SDC25/5 respectively. DNA sequencing revealed a single nucleotide deletion in *AEP1*, -A at position 547 of the coding sequence, which leads to a truncated protein of 201 residues (the wild-type Aep1p protein being 518 residues long). The *AEP2* gene in SDC25/5 carries a single nucleotide substitution (A781T) introducing a premature stop codon, which results in a truncated protein of 260 residues (the wild-type Aep2p protein being 580 residues long). Consistent with these genetic data, pulse labeling of mitochondrial translation products revealed that SDC25/1 and SDC25/5 failed to synthesize subunit *c*, while all the other mitochondrially encoded proteins were properly synthesized (not shown).

Mitochondrial F_0^i Mutants—The five F_0^i mutations that were localized to mtDNA were expected to be located in one of the three mitochondrial ATP synthase genes encoding subunit *a* (*ATP6* gene), subunit *c* (*ATP9* gene), and subunit 8 (*ATP8* gene). We therefore tried to map these mutations by crossing

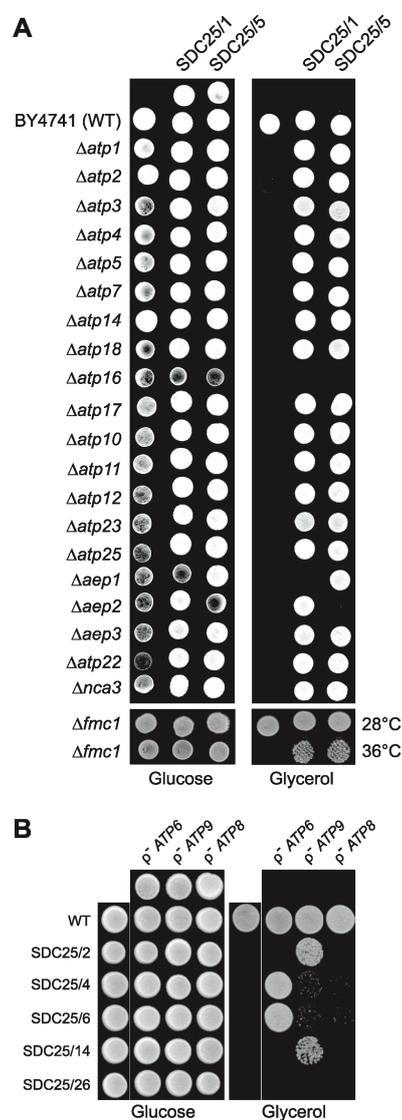


FIGURE 2. Test crosses for the mapping of the F_0^i mutants. Panel A, the nuclear F_0^i mutants SDC25/1 and SDC25/5 were crossed with a series of yeast strains each carrying a null mutation in one of known nuclear genes (indicated on the left) required for ATP synthase expression. The various strains were crossed drop on drop on rich glucose medium (YPGA) for 2 days at 28 °C, and then replica plated on glycerol medium (N3). The N3 plate was incubated at 28 or 36 °C, as indicated, for 4 days and photographed. As controls the non-mated strains were spotted on the YPGA plate. Panel B, the mitochondrial F_0^i mutants SDC25/2, SDC25/4, SDC25/6, SDC25/14 and SDC25/26 were crossed with synthetic ρ^- testers carrying only the *ATP6* (ρ^- *ATP6*, strain SDC30/2a), the *ATP8* (ρ^- *ATP8*, strain FG8) or the *ATP9* (ρ^- *ATP9*, strain FG9) gene in their mitochondria. The various strains were crossed drop on drop on YPGA for 2 days at 28 °C, with as controls the non-mated strains. A N3 replicate of the YPGA plate was incubated for 4 days at 28 °C and then photographed.

them with three synthetic ρ^- strains each carrying only one of these genes in their mitochondria (ρ^- *ATP9*/strain FG9, ρ^- *ATP6*/strain SDC30/2a, and ρ^- *ATP8*/strain FG8). The rationale for these crosses is as follows (see Figs. 1B and 2B): when the F_0^i mutation is, for example, in the *ATP9* gene, it can be corrected by mtDNA recombination in crosses with FG9 but not in crosses with FG8 or SDC30/2a. The presence/absence of

Yeast F₀ Inactive Mutants

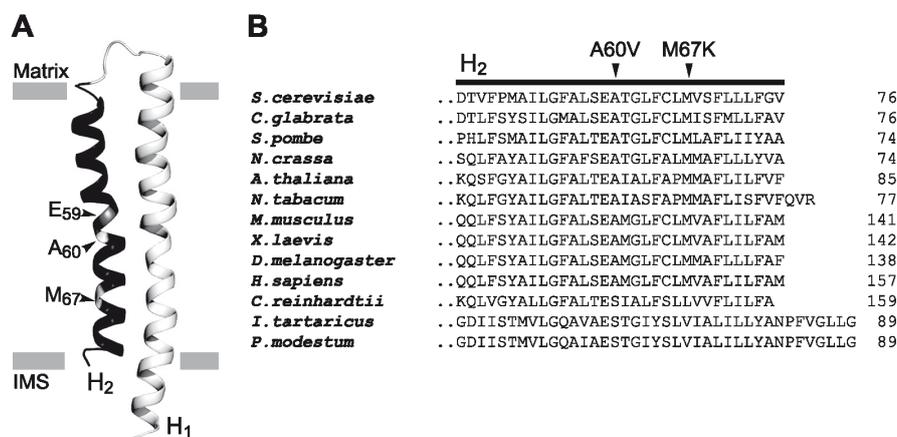


FIGURE 3. **Topological location and evolutionary conservation of the Ala-60 and Met-67 residues of yeast subunit *c*.** Panel A, three-dimensional structure of yeast subunit *c* monomer according to (48); the view is perpendicular to the membrane plane. The positions of the c-E59, c-A60, and c-M67 residues are indicated by arrowheads. H₁ and H₂ helices of subunit *c* are colored in bright and dark gray, respectively. The gray bars mark the membrane borders. IMS, intermembrane space. Panel B, alignments of subunits *c* from various species around helix H₂: *S. cerevisiae* (NP_009319.1), *Candida glabrata* (NP_818784.1), *Schizosaccharomyces pombe* (NP_039507.1), *Neurospora crassa* (0808299A), *Arabidopsis thaliana* (NP_651852.1), *Nicotiana tabacum* (NC_006581.1), *Mus musculus* (NP_778180.1), *Xenopus laevis* (NP_001080083.1), *Drosophila melanogaster* (NP_651852.1), and *Homo sapiens* (NP_001002031.1). The Ala-60 and Met-67 residues of yeast subunit *c* are replaced by Val and Lys in mutants SDC25/2 and SDC25/14, respectively.

wild-type mtDNA recombinants can be determined by testing for the presence/absence of glycerol-positive (Gly⁺) clones in the cross progenies (Fig. 2B). On this basis, two of the five F₀ⁱ mutations of mitochondrial origin (SDC25/2 and SDC25/14) were mapped to the *ATP9* locus (see below for a detailed description of these mutants). Two others (SDC25/4 and SDC25/6) mapped to the *ATP6* locus and consisted in small deletions within the 3'-UTR of *ATP6* leading to a strong decrease in the synthesis of subunits *a* and 8 (supplemental Fig. S1). The last mutant (SDC25/26) was not rescued in any of the three crosses (Fig. 2B), and this mutant later proved to be lacking both the *ATP8* and *ATP6* genes due to a deletion in the transcription unit containing these two genes (supplemental Fig. S1).

The Subunit *c* Mutants SDC25/2 and SDC25/14—The *ATP9* genes in SDC25/2 and SDC25/14 were sequenced: both carried a single nucleotide substitution leading to an amino acid substitution in subunit *c*, A60V (in SDC25/2) and M67K (in SDC25/14). The two mutated residues are located in the second transmembrane helix of subunit *c* (Fig. 3, A and B) and both are rather well evolutionary conserved (Fig. 3B). These subunit *c* mutations had a moderate if any impact on subunit *c* synthesis (Fig. 4A). We tested their consequences on the ATP synthase after transferring the mtDNA from SDC25/2 and SDC25/14 into the wild-type nuclear genetic background of the MR6 strain (the original isolates lack the *ATP16* gene). The resulting cytoductants were named FG13 and FG2, respectively. The mtDNA of the SDC17–31b strain, from which SDC25/2 and SDC25/14 were isolated, was similarly cytoducted into MR6 to provide a wild-type control (FG4) for FG2 and FG13. In view of previous findings showing that mutations of the ATP synthase often destabilize the mitochondrial genome in yeast (20), we first determined the influence of the two subunit *c* mutations on mtDNA stability by scoring the percentage of ρ⁻/ρ⁰ cells in glucose cultures of the different strains. The FG2 and FG13 cultures contained 60 and 20% of ρ⁻/ρ⁰ cells, respectively, ver-

sus less than 5% for the corresponding wild-type control (FG4). The steady-state accumulation of subunit *c* in these strains was then assessed by Western blotting of mitochondrial protein extracts treated with chloroform (conditions that completely dissociate the *c*-ring; Fig. 4B). In FG13, subunit *c* accumulation was 70% of wild-type levels and in FG2 it was only 40%. The decreases in subunit *c* content can be in part attributed to the increased propensities of FG13 and FG2 to produce ρ⁻/ρ⁰ cells (20 and 60%, respectively, see above). When the mitochondrial protein extracts were not treated with chloroform, a substantial proportion of subunit *c* both in FG13 and in the wild-type was detected as assembled oligomers, whereas in FG2 only trace amounts of the *c*-ring were detected (Fig. 4B). This indicated that the M67K mutation in subunit *c* severely compromised the assembly/stability of the *c*-ring while the A60V mutation had no significant impact on the ability of subunit *c* to form stable oligomers.

Although the subunit *a* was synthesized at normal rates (Fig. 4A), it fails to accumulate both in FG2 and in FG13 (Fig. 4B). This suggests that both subunit *c* mutations prevent the incorporation of subunit *a* into the ATP synthase such that unassembled subunit *a* is subsequently eliminated from the cells. Consistent with this, BN-PAGE analyses of mitochondrial extracts revealed the absence in FG2 and FG13 of fully assembled F₁F₀ complexes (Fig. 4C). Western blotting of the BN-PAGE gels revealed the presence in FG13 of a subunit *c*-immunoreactive complex that had the size of the *c*-ring (Fig. 4C). This further confirmed that the *c*-A60V mutation does not prevent the assembly of the *c*-ring but may impair the interaction of the *c*-ring with subunit *a*.

DISCUSSION

We report a genetic screen designed to randomly isolate mutations that impair the F₀ component of the ATP synthase. A first set of seven mutants was analyzed and all proved as intended to be severely deficient in the F₀. Two

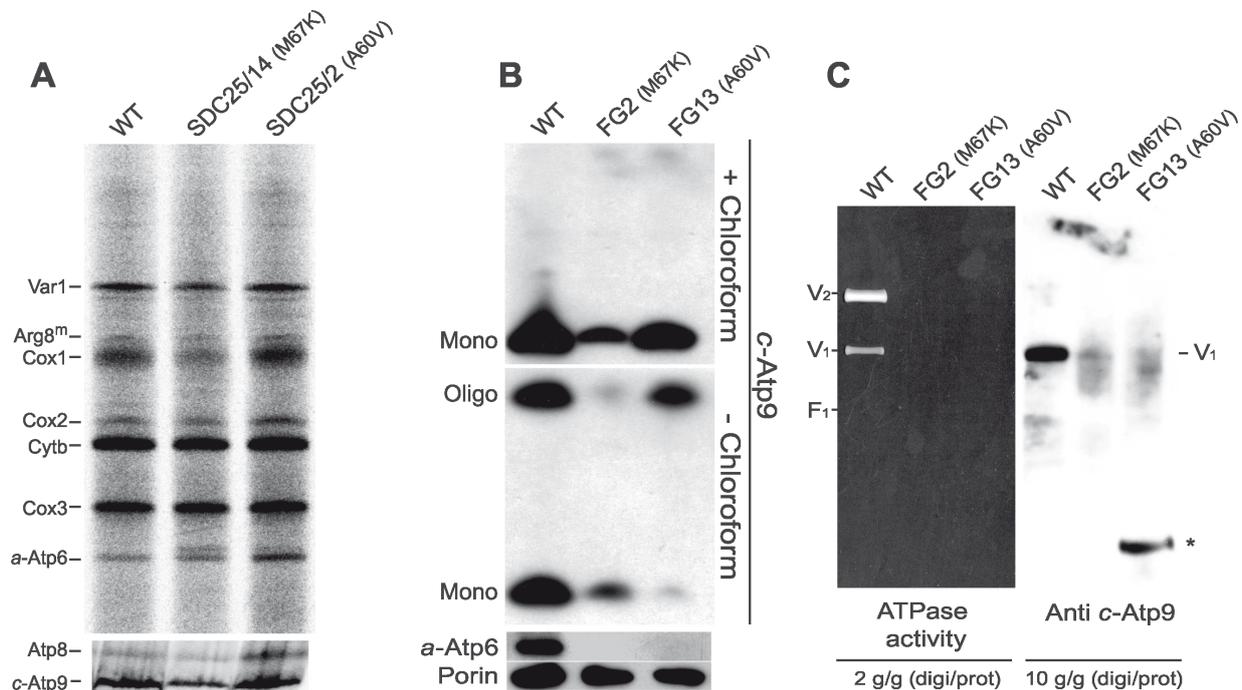


FIGURE 4. Influence of the c-A60V and c-M67K mutations on mitochondrial protein synthesis and ATP synthase assembly. *Panel A*, pulse labeling of mtDNA-encoded proteins. Freshly grown cells of the mutants SDC25/14 (*c*-M67K) and SDC25/2 (*c*-A60V), and corresponding parental strain SDC17-31b, were incubated for 20 min in the presence of a mixture of [35 S]methionine + [35 S]cysteine and cycloheximide to inhibit cytosolic protein synthesis. Total cellular protein extracts were prepared from the radiolabeled cells and run in SDS-PAGE gels containing either 12% acrylamide-4 M urea (for a good separation of Cox3p and subunit *a*) or 17% acrylamide (for good resolution of Atp8 and subunit *c*). Each lane was loaded with 30000 disintegrations/min, which in this experiment corresponded to about the same numbers of cells for each analyzed strain. The gel was dried and analyzed with a PhosphorImager. The mitochondrial translation products corresponding to the various radioactive bands are indicated on the left. *Panels B and C*, effects of the *c*-M67K and *c*-A60V mutations on ATP synthase assembly. Mitochondria were extracted from the mutants FG2 (*c*-M67K) and FG13 (*c*-A60V) and the corresponding wild-type strain (FG4) grown in a synthetic (CSM) galactose medium lacking arginine. *Panel B*, 15 μ g of mitochondrial proteins were separated by SDS-PAGE, transferred onto a nitrocellulose membrane, and probed with antibodies against the indicated proteins. Prior to loading on the gel, the samples were preincubated in presence or absence of chloroform as indicated. In absence of chloroform, some subunit *c* proteins migrate as *c*-ring oligomers whereas in the presence of chloroform all *c*-rings dissociate into monomeric subunit *c*. *Panel C*, the mitochondria were treated with 2 g or 10 g of digitonin (*dig*) per g of protein, as indicated, and then centrifuged to remove insoluble materials. The mitochondrial complexes were separated by BN-PAGE and probed in-gel for ATPase activity (left) or transferred to polyvinylidene difluoride membranes and probed with antibodies against subunit *c* (right). V_1 and V_2 correspond to monomeric and dimeric ATP synthase, respectively.

mutants fail to synthesize subunit *c* due to alterations in *AEP1* or *AEP2*, two nuclear genes encoding mitochondrial proteins required for expression of subunit *c* (41–46). The five other mutations are in the mtDNA. Of these, three impair the synthesis of both subunits *a* and 8 due to restricted deletions within the transcriptional unit encoding these two proteins; the last two involve single point mutations leading to an amino acid substitution in subunit *c*, Ala-60 by Val and Met-67 by Lys.

The *c*-M67K mutation severely compromises the assembly/stability of the *c*-ring, which is not very surprising because it introduces a charged residue in the membrane (in the second transmembrane segment of subunit *c*, see Fig. 3A). The mutated methionine is particularly well conserved, in 95% of known subunits *c* from various origins, and in those few species where it is not conserved only non-polar residues (leucine or valine) are found at the corresponding position (Fig. 3B). Not surprisingly, despite a substantial synthesis, the subunit *a* fails to accumulate in the *c*-M67K mutant, which is in line with previous work showing that the subunit *a* is rapidly degraded in yeast cells when it cannot properly associate with its partner subunits (2, 18).

The second subunit *c* mutation, *c*-A60V, is particularly interesting. Unlike the *c*-M67K mutation, it has no visible impact on the assembly/stability of the *c*-ring. However, it has dramatic consequences on subunit *a* that despite a normal synthesis is no longer detectable at steady state. It can be inferred that the *c*-A60V mutation must impair the interaction of the *c*-ring with subunit *a*, such that unassembled subunit *a* is subsequently eliminated from the cells. The mutated *c*-A60 residue is located besides the *c*-E59 residue that is essential for the proton translocating activity of the F_0 (Fig. 3B). This glutamate interacts with an arginine residue of subunit *a* (*a*-R186), which is hypothesized to lower the pK_a of the glutamate thereby enabling it to release a proton (47). According to a recently solved structure of the yeast *c*-ring (48), the *c*-A60 residue is at the external surface of the *c*-ring and its substitution by valine is predicted not to create significant clashes with neighboring residues of subunit *c*, which is consistent with the ability of the mutated subunit *c* to form stable oligomers.

We hypothesize that the *c*-A60V mutation disrupts the interaction between *a*-R186 and *c*-E59 and that the loss of this interaction is responsible for the defect in subunit *a*. Indeed, the *c*-A60 and *c*-E59 residues of two adjacent subunits *c* are in close

Yeast F₀ Inactive Mutants

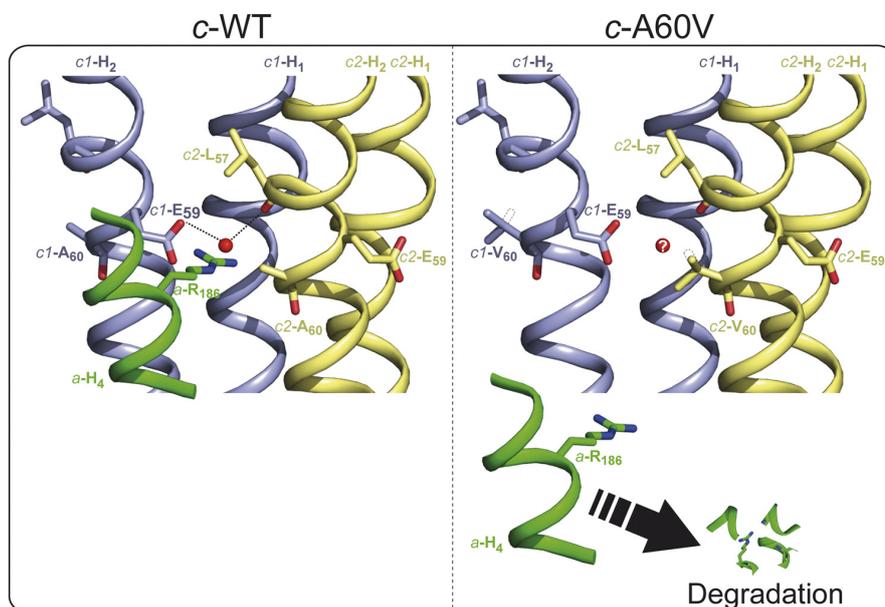


FIGURE 5. The loss of the interaction between the essential c-E59 and a-R186 residues is hypothesized to be responsible for the degradation of subunit a in the yeast c-A60V mutant. The figure on the left shows a ribbon diagram built with PyMOL of two adjacent c subunits (c1 in blue and c2 in yellow) around the proton binding site in wild-type yeast ATP synthase, according to the recently solved structure of the yeast c-ring/F₁ subcomplex (48). The two transmembrane segments of subunit c are labeled H₁ and H₂. The proton translocating activity of the ATP synthase depends on the interaction of the glutamate residue 59 of subunit c (E59) with the arginine residue 186 of subunit a (a-R186). The latter residue belongs to the fourth transmembrane segment of subunit a (a-H₄, represented in green color). It is believed (48) that proper interaction of c-E59 and a-R186 depends on a water molecule (represented by a red sphere), like in the H⁺ and Na⁺ ATP synthases of *B. pseudofirmus* OF4 (49) and *I. tartaricus* (54), respectively. In one of the F₀ inactive mutants isolated in this study, the alanine 60 of yeast subunit c is replaced by valine (right panel). The valine substituting c-A60 is shown in two rotameric conformations (solid and dashed line). The c-A60V mutation does not compromise the ability of subunit c to form stable oligomers but leads to elimination from the cells of the subunit a, presumably because of disruption of the interaction between c-E59 and a-R186 (see text for details). The question mark indicates that the water molecule is perhaps prevented to enter the proton binding site.

proximity (Fig. 5). It is thus possible that the c-A60V mutation is responsible for a steric hindrance preventing entrance of a-R186 into the proton binding site. Alternatively the mutation may destabilize the c-E59 residue. Indeed, there is strong evidence that its stabilization requires a water molecule in the yeast ATP synthase (48), like in the H⁺ ATP synthase of *Bacillus pseudofirmus* OF4 (49). Subunit c residues surrounding the glutamate are involved in the binding of the water molecule (49). Thus if, as believed (48), a water molecule is present also in the H⁺ binding site of the yeast c-ring, its correct positioning or even its access to this site might be compromised by the c-A60V mutation. As a consequence the c-E59 residue may not reach the position that allows it to properly interact with a-R186.

It might be that the ionic interaction between c-E59 and a-R186 is a key determinant to maintain subunit a associated with the c-ring, even though this interaction is constantly disrupted and reformed during rotation of the c-ring. If permanently interrupted, subunit a may become loosely attached to the complex thereby increasing its susceptibility to proteolytic degradation. Another possibility is that subunit a cannot fold properly if a-R186 cannot interact with c-E59. This is an interesting hypothesis according to which the folding of subunit a would be confined in front of the c-ring, possibly as a means to minimize non-productive interactions of subunit a during its assembly.

The strong impact of the c-A60V mutation on subunit a is somewhat surprising. Indeed, much more radical mutations at the interface between the c-ring and subunit a, like the a-L183R

mutation located one helix turn from a-R186 (50), were found to have no effect on the assembly/stability of the ATP synthase. Although the a-L183R mutation severely compromises the functioning of the ATP synthase proton channel, the assembly/stability of subunit a is unaffected (50). Altogether these findings suggest that the contact zone between subunit a and the c-ring only involves critical transient interactions confined to the region of the F₀ where protons are exchanged between the two subunits.

The results show that our genetic screen is perfectly appropriate for the selection of mutations specifically affecting the F₀ component of the ATP synthase. Both nuclear and mitochondrial mutants were obtained, and the seven analyzed isolates were all different and each showed a very severe F₀ deficiency. We have now started a more extensive hunt for F₀ inactive mutants, with two main goals: (i) the identification of amino-acids of subunits a and c that are critical for a proper operation of the proton channel of the ATP synthase; (ii) a better comprehension of the assembly of F₀. Regarding the second goal, although several factors involved in the assembly of the F₀ are already known (18), it is likely that others remain to be discovered. This is evident when one considers the extraordinary complexity of the assembly pathway of complex IV with at least 30 different assembly factors (51) whereas only a dozen of proteins are known to be implicated in the biogenesis of the ATP synthase, an enzyme whose structure is certainly not lesser sophisticated than that of complex IV (2, 18). The strong instability of mtDNA in mutants with a defective F₀ (with up to

90–95% ρ^-/ρ^0 cells, see (52) for an example) may have hampered the identification of factors required for F₀ expression. Our genetic screen allows one to circumvent that problem because ρ^-/ρ^0 cells are strictly eliminated.

Our screen may also be exploited to better define the *cis*-elements that control expression of the mitochondrial ATPase genes. In this respect, recent work from Tzagoloff's laboratory has revealed a complex interplay between assembly and expression of these genes aiming to balance the production of different assembly intermediates, possibly to avoid F₀-mediated protons leaks across the inner mitochondrial membrane (39, 53). Our screen may lead to the isolation of mutants defective in these mechanisms, like those showing a diminished synthesis of subunits *a* and 8 (SDC25/4 and SDC25/6) due to restricted deletions in the 3'-UTR of the transcripts encoding these proteins.

Acknowledgments—We thank J. Velours for the generous gift of antibodies against yeast subunit *a*, and M-F. Giraud and A. Dautant for helpful discussions.

REFERENCES

- Boyer, P. D. (1997) *Annu. Rev. Biochem.* **66**, 717–749
- Ackerman, S. H., and Tzagoloff, A. (2005) *Prog. Nucleic Acids Res. Mol. Biol.* **80**, 95–133
- Senior, A. E., Nadanaciva, S., and Weber, J. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1553**, 188–211
- Bianchet, M. A., Hüllihen, J., Pedersen, P. L., and Amzel, L. M. (1998) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **95**, 11065–11070
- Abrahams, J. P., Leslie, A. G., Lutter, R., and Walker, J. E. (1994) *Nature* **370**, 621–628
- Kabaleeswaran, V., Puri, N., Walker, J. E., Leslie, A. G., and Mueller, D. M. (2006) *EMBO J.* **25**, 5433–5442
- Noji, H., Yasuda, R., Yoshida, M., and Kinosita, K., Jr. (1997) *Nature* **386**, 299–302
- Stock, D., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (1999) *Science* **286**, 1700–1705
- Stock, D., Gibbons, C., Arechaga, I., Leslie, A. G., and Walker, J. E. (2000) *Curr. Opin. Struct. Biol.* **10**, 672–679
- Fillingame, R. H., and Dmitriev, O. Y. (2002) *Biochim. Biophys. Acta* **1565**, 232–245
- Tsunoda, S. P., Aggeler, R., Yoshida, M., and Capaldi, R. A. (2001) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **98**, 898–902
- Velours, J., and Arselin, G. (2000) *J. Bioenerg. Biomembr.* **32**, 383–390
- Devenish, R. J., Prescott, M., and Rodgers, A. J. (2008) *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* **267**, 1–58
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A., and Schägger, H. (1998) *EMBO J.* **17**, 7170–7178
- Allen, R. D. (1995) *Protoplasma* **189**, 1–8
- Paumard, P., Vaillier, J., Couly, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Brèthes, D., di Rago, J. P., and Velours, J. (2002) *EMBO J.* **21**, 221–230
- Hong, S., and Pedersen, P. L. (2002) *Arch. Biochem. Biophys.* **405**, 38–43
- Rak, M., Zeng, X., Brière, I. J., and Tzagoloff, A. (2009) *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 108–116
- Bonnefoy, N., and Fox, T. D. (2001) *Methods Cell Biol.* **65**, 381–396
- Contamine, V., and Picard, M. (2000) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **64**, 281–315
- Lefebvre-Legendre, L., Balguería, A., Duvezin-Caubet, S., Giraud, M. F., Slonimski, P. P., and Di Rago, J. P. (2003) *Mol. Microbiol.* **47**, 1329–1339
- Giraud, M. F., and Velours, J. (1997) *Eur. J. Biochem.* **245**, 813–818
- Lai-Zhang, J., Xiao, Y., and Mueller, D. M. (1999) *EMBO J.* **18**, 58–64
- Duvezin-Caubet, S., Caron, M., Giraud, M. F., Velours, J., and di Rago, J. P. (2003) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **100**, 13235–13240
- Duvezin-Caubet, S., Rak, M., Lefebvre-Legendre, L., Tetaud, E., Bonnefoy, N., and di Rago, J. P. (2006) *J. Biol. Chem.* **281**, 16305–16313
- Mitome, N., Ono, S., Sato, H., Suzuki, T., Sone, N., and Yoshida, M. (2010) *Biochem. J.* **430**, 171–177
- Steele, D. F., Butler, C. A., and Fox, T. D. (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **93**, 5253–5257
- Voth, W. P., Jiang, Y. W., and Stillman, D. J. (2003) *Yeast* **20**, 985–993
- Zeng, X., Neupert, W., and Tzagoloff, A. (2007) *Mol. Biol. Cell* **18**, 617–626
- Claissie, M. L., and Pajot, P. F. (1974) *Eur. J. Biochem.* **49**, 49–59
- Laemmli, U. K. (1970) *Nature* **227**, 680–685
- Guérin, B., Labbe, P., and Somlo, M. (1979) *Methods Enzymol.* **55**, 149–159
- Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) *J. Biol. Chem.* **193**, 265–275
- Schägger, H., and von Jagow, G. (1987) *Anal. Biochem.* **166**, 368–379
- Schägger, H., and von Jagow, G. (1991) *Anal. Biochem.* **199**, 223–231
- Arselin, G., Vaillier, J., Graves, P. V., and Velours, J. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 20284–20290
- Paul, M. F., Velours, J., Arselin de Chateaubodeau, G., Aigle, M., and Guerin, B. (1989) *Eur. J. Biochem.* **185**, 163–171
- Lefebvre-Legendre, L., Vaillier, J., Benabdelhak, H., Velours, J., Slonimski, P. P., and di Rago, J. P. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 6789–6796
- Rak, M., and Tzagoloff, A. (2009) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* **106**, 18509–18514
- Paul, M. F. (1992) *Disruption et Mutagenèse du Gène ATP4, Codant pour une Sous-unité du Secteur F₀ de l'ATP Synthase Mitochondriale de Saccharomyces cerevisiae*. Ph.D. thesis, Université de Bordeaux II, Bordeaux, France
- Finnegan, P. M., Ellis, T. P., Nagley, P., and Lukins, H. B. (1995) *FEBS Lett.* **368**, 505–508
- Finnegan, P. M., Payne, M. J., Keramidaris, E., and Lukins, H. B. (1991) *Curr. Genet* **20**, 53–61
- Ackerman, S. H., Gatti, D. L., Gellefors, P., Douglas, M. G., and Tzagoloff, A. (1991) *FEBS Lett.* **278**, 234–238
- Payne, M. J., Schweizer, E., and Lukins, H. B. (1991) *Curr. Genet* **19**, 343–351
- Payne, M. J., Finnegan, P. M., Smooker, P. M., and Lukins, H. B. (1993) *Curr. Genet* **24**, 126–135
- Ziaja, K., Michaelis, G., and Lisowsky, T. (1993) *J. Mol. Biol.* **229**, 909–916
- Fillingame, R. H., Angevine, C. M., and Dmitriev, O. Y. (2003) *FEBS Lett.* **555**, 29–34
- Dautant, A., Velours, J., and Giraud, M. F. (2010) *J. Biol. Chem.* **285**, 29502–29510
- Preiss, L., Yildiz, O., Hicks, D. B., Krulwich, T. A., and Meier, T. (2010) *PLoS Biol.* **8**, e1000443
- Rak, M., Tetaud, E., Duvezin-Caubet, S., Ezkurdia, N., Bietenhader, M., Rytka, J., and di Rago, J. P. (2007) *J. Biol. Chem.* **282**, 34039–34047
- Fontanesi, F., Soto, I. C., Horn, D., and Barrientos, A. (2006) *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* **291**, C1129–C1147
- Ellis, T. P., Helfenbein, K. G., Tzagoloff, A., and Dieckmann, C. L. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 15728–15733
- Rak, M., Gokova, S., and Tzagoloff, A. (2011) *EMBO J.* **30**, 920–930
- Meier, T., Kraha, A., Bond, P. J., Pogoryelov, D., Diederichs, K., and Faraldo-Gómez, J. D. (2009) *J. Mol. Biol.* **391**, 498–507

SUPPLEMENTAL DATA

A genetic screen targeted on the F₀ component of mitochondrial ATP synthase in *Saccharomyces cerevisiae*

François Godard*, Emmanuel Tetaud*¹, Stéphane Duvezin-Caubet and Jean-Paul di Rago¹
Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095 CNRS, Université Victor Segalen Bordeaux
2, 33077 Bordeaux, France

Running title: yeast F₀ inactive mutants

*These authors contributed equally and are listed in alphabetical order

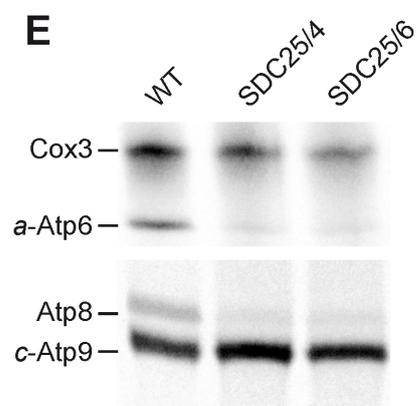
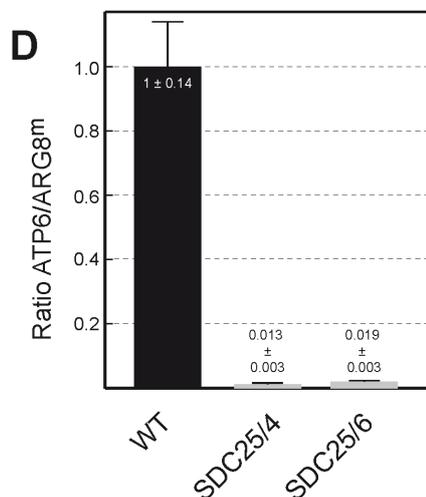
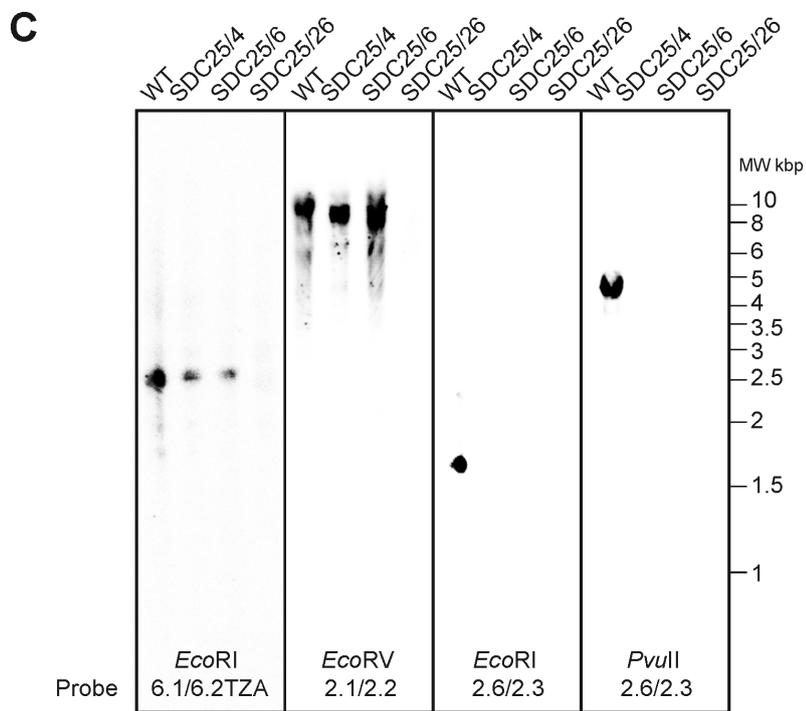
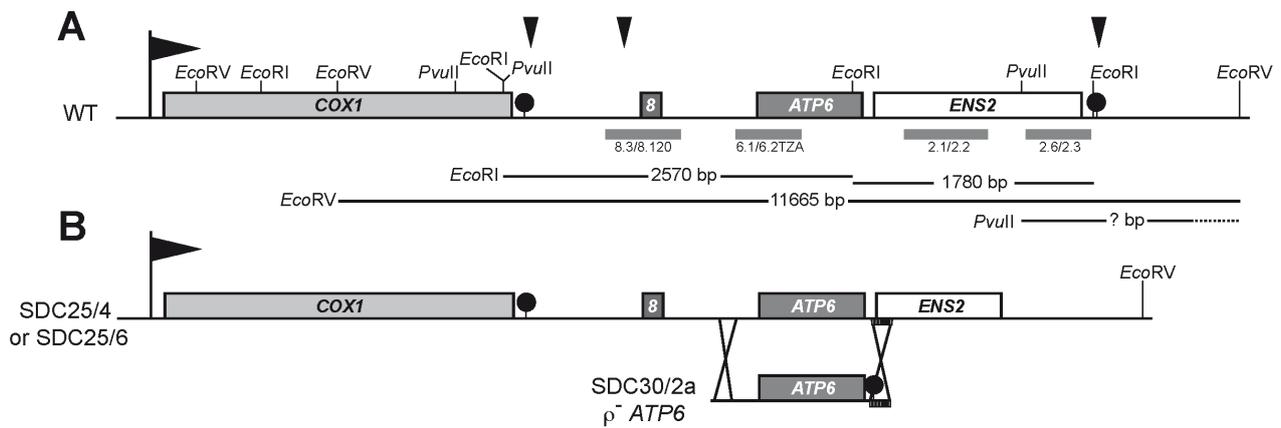
¹Corresponding authors: **Jean-Paul di Rago or Emmanuel Tetaud:** Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095 CNRS, 1 Rue Camille Saint Saëns, 33077 Bordeaux, France. Tel: +33 (0)5 56 99 90 43. Fax: +33 (0)5 56 99 90 51. e-mail: jp.dirago@ibgc.cnrs.fr or e-mail: tetaud@ibgc.cnrs.fr

Analysis of the mutants SDC25/4 and SDC25/6—The mutations in SDC25/4 and SDC25/6 were mapped to the *ATP6* locus (Fig. 2B). They were not found in the coding sequence, nor in the 5' untranslated region (UTR) of *ATP6*. We therefore focused our attention on the 3' UTR of *ATP6*. In the SDC17-31b strain, from which SDC25/4 and SDC25/6 were isolated, *ATP6* is followed by *ENS2*, an optional gene encoding a DNA endonuclease (Fig. S1A). *ENS2* is co-transcribed with *COX1*, *ATP8* and *ATP6* and is part of the *ATP8,6* transcripts that are liberated after cleavage of the primary transcript. The mature *ATP8-ATP6-ENS2* transcripts contain a dodecamer motif near their 3' end, an element required for the processing of the 3' end and stability of mRNAs in yeast mitochondria (1). By contrast, the mtDNA in the ρ⁻ tester (SDC30/2a) that was able to rescue SDC25/4 and SDC25/6 originated from strain FY1679 and does not contain *ENS2* (2). In this strain, a dodecamer is found a few bp downstream from the stop codon of *ATP6* (Fig. S1B). Thus, we reasoned that the mutations in SDC25/4 and SDC25/6 may involve the loss of the dodecamer downstream from *ENS2*, and that the genetic complementation of these mutants resulted from the acquisition downstream from *ATP6* of the dodecamer present in SDC30/2a mtDNA (Fig. S1B). This proved to be the case. Indeed, PCR with primers specific for the first half of *ENS2* successfully amplified a fragment from the mtDNA of SDC25/4 and SDC25/6, whereas primers specific for the second half of *ENS2* did not (not shown). Also, Southern blot experiments indicated the loss of a segment of about 1 kbp within this region of the mtDNA in SDC25/4 and SDC25/6 (Fig. S1C). The absence of a dodecamer on the 3' side of the *ATP8-ATP6-ENS2* transcripts in SDC25/4 and SDC25/6 is expected to affect the stability of these transcripts. This was confirmed by quantitative RT-PCR experiments showing a selective decrease of at least 95% in these transcripts in both mutants (Fig. S1D). As a result, the synthesis of subunits 8 and α was strongly reduced but not completely abolished in the mutants (Fig. S1E) This explains the observed residual growth on glycerol after crossing SDC25/4 and SDC25/6 with the ρ⁻*ATP8* and ρ⁻*ATP9* strains (Fig. 2B). Thus, the SDC25/4 and SDC25/6 mutants exemplify that strains with strongly decreased F₀ synthesis and not only completely inactivated mutants can be selected through our genetic screen.

Analysis of the mutant SDC25/26—The mutant SDC25/26 failed to be rescued by any of the three ρ⁻ tester strains specific for *ATP6*, *ATP8* or *ATP9* (Fig. 2B). Pulse labeling experiments revealed that SDC25/26 was unable to synthesize Cox1p, subunit 8 and subunit α , while all the other mitochondrially-encoded proteins showed a substantial synthesis (not shown). We therefore suspected that this mutant resulted from a large deletion within the *COX1-ATP8-ATP6-ENS2* transcription unit, which was confirmed by Southern blot analysis (Fig. S1C). The mutant SDC25/26 thus showed a complete absence of F₀ synthesis, allowing its selection through our screen.

FIGURE S1. The F_0^1 mutants SDC25/4, SDC25/6 and SDC25/26 result from restricted deletions in the mitochondrial transcription unit containing *ATP8* and *ATP6* genes. *A*, schematic representation of the *COX1-ATP8-ATP6-ENS2* transcription unit of the mtDNA. The transcription start site is indicated by a flag; dodecamer sequences and RNA processing sites are represented by black circles and arrow heads respectively. The regions corresponding to the DNA probes used in the Southern-blot experiments shown in (*C*) are depicted as thick grey lines. The mtDNA restriction fragments detected by these probes are indicated by black lines interrupted by numbers corresponding to their sizes in bp in the middle. The *COX1* gene is not to scale with the rest of the unit (5x times condensed) and its intronic sequences are not represented. *B*, scheme representing the recombination events leading to the rescue of SDC25/4 and SDC25/6 by the synthetic ρ^- strain SDC30/2a. PCR (not shown) and Southern blot analysis (*C*) show that the mutants SDC25/4 and SDC25/6 carry a deletion of about 1 kb encompassing the 3' half of *ENS2* and the dodecamer located downstream from *ENS2*. *C*, southern blot analysis. Genomic DNA from SDC17-31b, SDC25/4, SDC25/6 and SDC25/26 strains were isolated as described elsewhere (3). The DNAs (20 μ g) were digested with *EcoRI*, *EcoRV* or *PvuII*, electrophoresed in 0.8% agarose gel, blotted onto Hybond N^+ membrane (GE Healthcare), and hybridized with 32 P-labeled probes at 50°C in 6X SSPE-0.1% SDS (1X SSPE = 0.18 mM NaCl, 10 mM NaH_2PO_4 , 1 mM ethylenediaminetetraacetate, pH 7.0). Membranes were washed at 45°C in 0.2X SSPE-0.1% SDS and then used for autoradiography. The DNA probes were obtained by PCR amplification with primers 6.1/6.2TZA (5'-GTATGATTCCATATTCATTTG-3' / 5'-ATGTATCTTTTAAAGTATGATGCTG-3') for *ATP6*, 2.1/2.2 (5'-CAACGTACACCTATATCTAATAAAAAGATTAATA-3' / 5'-GAGAAAGCATTAACAAAATAAGG-3') and 2.6/2.3 (5'-GATACATTATTATTTAAAGATATAAGACCT-3' / 5'-GAATTCTTTTTGTATTATAA-3') for *ENS2*, respectively. *D*, quantitative real time RT-PCR results. Total RNA extracts were prepared using TRI® Reagent (Sigma-Aldrich) from cultures of SDC17-31b (WT) and mutants (SDC25/4, SDC25/6) grown in CSM-R. The extracts were further treated with RQ1 RNase-free DNase (Promega) to remove any contaminating DNA from the RNA preparations. The integrity of extracted RNA was assessed on denaturing agarose gel. The RT was performed with ImProm-II™ Reverse Transcription System (Promega) according to the manufacturer's instructions. The obtained cDNA was mixed with ABsolute™ QPCR SYBR® Green Mix (ABgene) and with gene-specific primers. For *ATP6*, the forward primer was 5'-TGGTTCAAGATGATTAATTCACAA-3' (ATP6q1) and the reverse was 5'-AAATGAGCTGATAATGCAAATGAGT-3' (ATP6q2). For *ARG8^m*, the forward primer was the 5'-CCTTTCGGTGATTTAGTACC-3' (P9) and the reverse was the 5'-GGAAATACACCACCTTACC-3' (P10). Real time PCR analysis was performed in triplicate on the Mx3000P™ Real-Time PCR system (Stratagene) according to the manufacturer's instructions. The amplification consisted of an initial 15 min step at 95°C, followed by 40 cycles of 95°C for 10 s, 45°C for 30 s and 72°C for 30 s. The dissociation curves were analyzed to ensure the amplification of a single PCR product and efficiency of each primer was performed. The relative gene expression of *ATP6* was normalized using *ARG8^m* as an internal standard. This ratio was normalized to the WT condition using the method described by Pfaffl (4). *E*, pulse labeling of mtDNA-encoded proteins. Freshly grown cells of the F_0^1 mutants (SDC25/4, SDC25/6) and corresponding parental strain SDC17-31b were incubated for 20 min in the presence of a mixture of [35 S]-methionine + [35 S]-cysteine, and cycloheximide to inhibit cytosolic protein synthesis. Total cellular protein extracts were prepared from the radiolabeled cells and run in SDS-PAGE gels containing either 12% acrylamide-4M urea (to distinguish Atp6p from Cox3p) or 17% acrylamide (for a good resolution of Atp8p and Atp9p). Each lane was loaded with 30000 disintegrations/min, which corresponded to about 5 times more mutant cells than wild-type cells. The gel was dried and analyzed with a PhosphorImager. The corresponding mitochondrial translation products are indicated on the left of the figure.

1. Butow, R. A., Zhu, H., Perlman, P., and Conrad-Webb, H. (1989) *Genome* **31**, 757-760
2. Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., and Purnelle, B. (1998) *FEBS Lett* **440**, 325-331
3. Valach, M., Tomaska, L., and Nosek, J. (2008) *Curr Genet* **54**, 105-109
4. Pfaffl, M. W. (2001) *Nucleic Acids Res* **29**, e45



3.2.3 Recherche de nouveaux facteurs intervenant dans la biogenèse du secteur F_O de l'ATP synthase

Le chapitre précédent décrit la caractérisation de 7 mutants issus d'un crible génétique ciblant l'activité du secteur F_O. Parmi ceux-ci, 2 sont des mutants des gènes nucléaires *AEP1* et *AEP2* qui interviennent dans l'expression d'Atp9p. Les 5 autres sont des mutants mitochondriaux incapables d'exprimer les sous-unités Atp6p et d'Atp8p, ou portant des altérations structurales ponctuelles dans la sous-unité Atp9p. Chez ces 7 mutants, comme cela était attendu, l'activité de transfert de protons du F_O est abolie de manière à pouvoir restaurer la viabilité de cellules dépourvues en sous-unité δ. Ces résultats valident l'utilisation de cette méthode en vue d'identifier de nouveaux facteurs intervenant dans la biogenèse du canal à protons de l'ATP synthase. J'ai dès lors sélectionné et analysé de nouveaux clones comme décrit ci-après.

3.2.3.1 Procédure d'obtention des clones F_Oⁱ

La procédure d'obtention des mutants est décrite dans l'article présenté plus haut (Figure 1A de l'article). Des cellules de la souche SDC17-31b (*Δatp4 Δatp16 his3 Δarg8* [*ρ⁺ARG8m*]) en phase exponentielle de croissance dans un milieu minimum W0 à 2 % glucose, additionnée de méthionine, de lysine et d'histidine, sont transformées par un plasmide portant le gène *ATP4* avec son promoteur natif et le marqueur *HIS3* (pATP4-HIS3, cf. Matériels et méthodes). La quantité de cellules mise à transformer est de 2.10⁸. Après transformation, les cellules sont étalées sur un milieu fermentaire dépourvu en arginine et en histidine puis incubées pendant 1 semaine à 28 °C. Seuls les clones possédant un canal à proton altéré, un génome mitochondrial capable d'exprimer *ARG8m* et le plasmide pATP4-HIS3 sont susceptibles de croître sur ce milieu. Ils sont nommés clones F_Oⁱ pour « F_O inactif ». Après 7 jours de culture, plus d'un millier de clones F_Oⁱ apparaissent. 1056 d'entre eux sont prélevés et mis en culture liquide dans du milieu W0 à 2 % glucose additionné de méthionine et de lysine. Après 3 jours de cultures, seuls 270 isolats possédaient toujours une bonne croissance dans ces conditions.

3.2.3.2 Détermination de l'origine génomique des mutations F_O^i .

Du fait de l'origine génétique double des protéines constituant le secteur F_O de l'ATP synthase, les mutations inactivant le secteur F_O peuvent être localisées dans le génome mitochondrial ou nucléaire. Par ailleurs, une mutation inactivant le gène *ATP4* sur le plasmide pATP4-HIS3 restaurerait également la survie cellulaire, car sans *ATP4* l'absence de la sous-unité δ ne peut entraîner de fuites de protons via le F_O , comme expliqué plus haut. Pour déterminer la localisation des mutations F_O^i , une série de croisements est effectuée avec une souche ρ^+ délétée pour *ATP4*, SDC17-4c, et la souche ρ^0 KL14-4a/60. Une assez grande proportion des clones doivent leur survie à une inactivation du gène *ATP4* plasmidique. Ces isolats sont abandonnés. Parmi les autres, 20 possédaient des mutations localisées à l'ADNmt et 51 des mutations nucléaires récessives. Aucun des clones nucléaires isolés ne contenait de mutations dominantes (Tableau 7, page 150).

Localisation et type de mutation	Croissance respiratoire après croisement avec SDC17-4c	Croissance respiratoire après croisement avec KL14-4a/60	Nombre de clones
pATP4-HIS3	-	+	199
Nucléaire dominante	-	-	0
Nucléaire récessive	+	+	51
Mitochondriale	+	-	20

Tableau 7

Répartition de la localisation génomique des mutations F_O^i . Les cellules sont testées pour leur croissance respiratoire après croisements avec les souches SDC17-4c et KL14-4a/60. Une absence de croissance sur milieu glycérol après croisement avec SDC17-4c associée à une croissance sur glycérol après croisement avec KL14-4a/60 indique une inactivation de l'ATP4 porté par pATP4-HIS3. Une absence de croissance sur milieu glycérol après croisement avec SDC17-4c associée à une absence de croissance sur glycérol après croisement avec KL14-4a/60 indique une mutation nucléaire dominante. Une croissance sur milieu glycérol après croisement avec SDC17-4c et après croisement avec KL14-4a/60 indique une mutation nucléaire récessive. Une croissance sur milieu glycérol après croisement avec SDC17-4c associée à une absence de croissance sur glycérol après croisement avec KL14-4a/60 indique une mutation mitochondriale.

3.2.3.3 Caractérisation génétique des isolats F_0^i

3.2.3.3.1 Mutants de l'ADN mitochondrial

3.2.3.3.1.1 Cartographie génétique

On s'attend à ce que les mutations mitochondriales soient situées dans un des gènes mitochondriaux codant pour le canal à protons : *ATP6*, *ATP8* ou *ATP9*. Pour localiser les mutations F_0^i de l'ADNmt des croisements sont effectués avec des souches dites « petite synthétique » dont l'ADNmt est restreint au gène *ATP6* (ρ^-ATP6), *ATP8* (ρ^-ATP8) ou *ATP9* (ρ^-ATP9). Si la mutation F_0^i est localisée dans le gène *ATP6*, le diploïde issu du croisement du clone F_0^i avec la souche testrice ρ^-ATP6 sera capable après recombinaison de croître sur milieu non-fermentescible. A l'inverse, les petites synthétiques ρ^-ATP8 et ρ^-ATP9 ne la corrigeront pas. Ces croisements permettent donc d'identifier lequel des trois gènes mitochondriaux de l'ATP synthase porte la mutation F_0^i . Les souches FG92, FG93, FG94, FG95, FG96, FG97, FG98, FG99, FG100 et FG106 montrent une restauration de la croissance respiratoire après croisements avec la ρ^-ATP6 (Figure 43, page 152). La souche FG103 est complétée par la ρ^-ATP9 . Les souches FG108, FG109, FG110, FG111, FG112, FG113, FG114, FG115, et FG116 ne sont corrigées par aucune des petites synthétiques. Elles peuvent comme dans le cas décrit plus haut du mutant SDC25/26 correspondre à des délétions de l'ADNmt englobant *ATP6* et *ATP8*. Ces mutants n'ont pas été analysés plus avant.

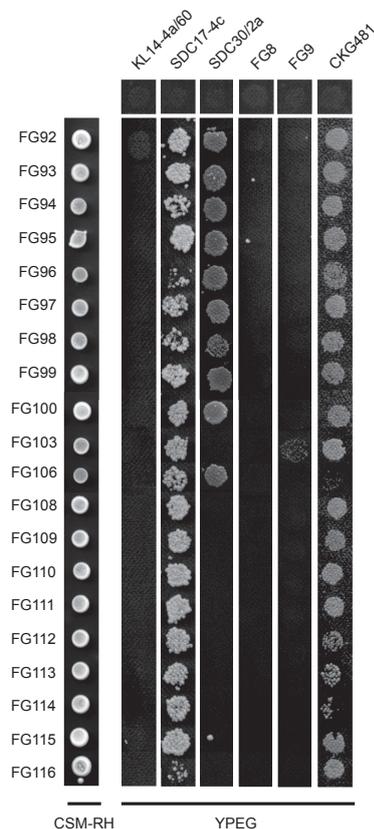


Figure 43

Localisation des gènes mutés dans les isolats F_0^i mitochondriaux. La première ligne correspond aux dépôts des souches testrices sur le milieu respiratoire YPEG. La première colonne correspond à la croissance des souches sur milieu fermentaire CSM-RH. Les colonnes 2 à 7 correspondent à la réplique sur milieu respiratoire des croisements des mutants F_0^i mitochondriaux avec respectivement KL14-4a/60, SDC17-4c, SDC30/2a (petite synthétique *ATP6*), FG8 (petite synthétique *ATP8*), FG9 (petite synthétique *ATP9*), et CKG481 (mutation mit-*COX1*). CKG481 est un contrôle supplémentaire permettant en cas d'absence de restauration de la croissance de s'assurer de la présence de l'ADNmt. Les souches sont croisées gouttes sur gouttes en YPGA pendant 2 jours à 28 °C, elles sont ensuite répliquées sur milieu YPEG et incubée 4 jours à 28 °C.

3.2.3.3.1.2 Séquencage

Sur les 10 isolats dont la mutation F_0^i a été localisée dans *ATP6*, 4 contiennent une mutation dans la séquence codante conduisant à la formation d'une protéine tronquée pour une grande partie de sa séquence (

Tableau 8, page 153). La souche FG95 possède une substitution de base en 28 bases en amont du codon d'initiation d'*ATP6* qui pourrait altérer la traduction d'*ATP6*. Pour les 5 souches restantes, aucune modification dans la séquence codante n'est identifiée. Les mutations pourraient se trouver dans les régions flanquantes qui n'ont pas été entièrement séquencées ; ces séquences comme expliqué plus haut sont nécessaire à la stabilité de ces transcrits et leur traduction. La mutation FG103 au locus *ATP9* conduit à la création d'une protéine tronquée des 3/4 de sa séquence, et qui est donc nécessairement non-fonctionnelle.

Souches	Localisation de la mutation	Séquençage de la partie codante du gène	Séquence protéique déduite
FG092	ATP6	Pas de mutation identifiée	
FG093	ATP6	Substitution C>A à + 545 de l'ATG	Interruption au résidu 182
FG094	ATP6	Substitution G>T à + 514 de l'ATG	Interruption au résidu 172
FG095	ATP6	Substitution G>T à -28 de l'ATG	
FG096	ATP6	Substitution C>A en 119 de l'ATG	Interruption au résidu 40
FG097	ATP6	Pas de mutation identifiée	
FG098	ATP6	Pas de mutation identifiée	
FG099	ATP6	Délétion de A en 184 de l'ATG	Changement de résidus de 63 à 68 puis interruption au résidu 69
FG100	ATP6	Pas de mutation identifiée	
FG103	ATP9	Délétion de A en 58 de l'ATG	Interruption au résidu 20
FG106	ATP6	Pas de mutation identifiée	

Tableau 8

Localisation et séquençage des mutations F_O^i de l'ADNmt. Les positions des mutations sont indiquées par rapport au codon d'initiation du gène considéré. La taille de la séquence protéique sauvage d'Atp6p est de 259 résidus d'acides aminés, celle d'Atp9p est de 76 résidus d'acides aminés.

3.2.3.3.2 Mutants de l'ADN nucléaire

3.2.3.3.2.1 Cartographie génétique

Les mutations nucléaires F_O^i peuvent affecter un gène connu comme nécessaire à l'expression du secteur F_O (une sous-unité ou un facteur d'assemblage). Pour s'en assurer, les mutants nucléaires ont été croisés avec des souches où ces gènes ont été éliminés. Lorsque la mutation F_O^i est dans l'un de ces gènes, le croisement ne produira pas de diploïdes capables de croître sur milieu respiratoire. Compte tenu de la lourdeur de ces tests, seulement 26 des 51 mutants F_O^i nucléaires récessifs sélectionnés ont été analysés ainsi (Figure 44, page 154).

Seuls deux clones, FG37 et FG40, apparaissent affectés dans l'un de ces gènes testeurs, *AEP1* et *AEP2* respectivement. Les autres clones F_0^i n'ont pu être complétés par aucun des testeurs (sauf $\Delta atp16$ car le gène *ATP16* est délété dans tous les clones F_0^i).

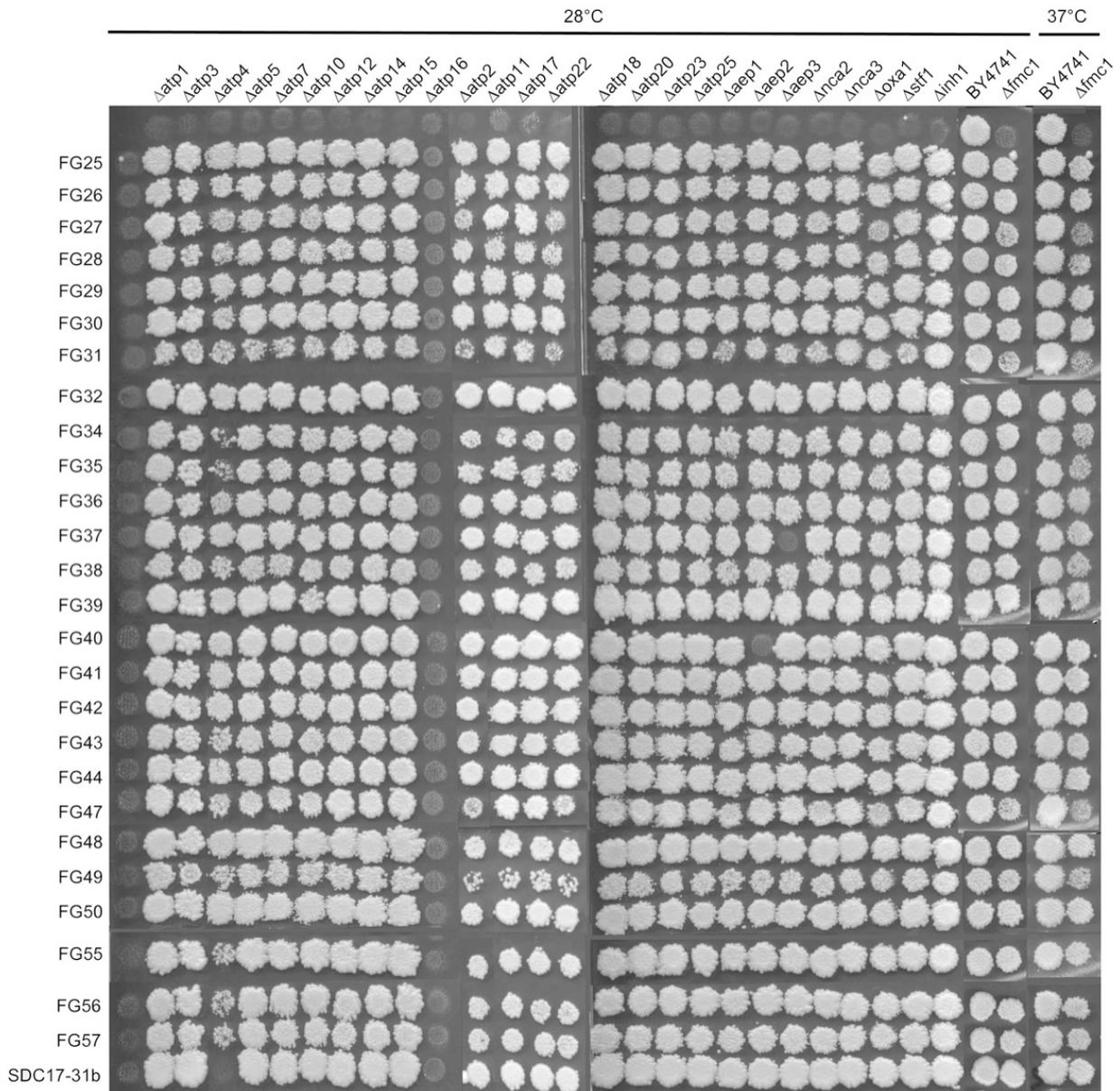


Figure 44

Croisements des mutants nucléaires récessifs F_0^i avec les souches délétées pour les facteurs intervenant dans la biogenèse de l'ATP synthase. Les souches sont mélangées en YPGA liquide puis déposés sur YPGA solide et incubés 48 h à 28 °C. Après croissance, les cellules sont répliquées sur milieu YPEG et incubées 4 jours à 28 °C (et à 37 °C dans le cas de BY4742 et $\Delta fmc1$). Les mutants nucléaires récessifs F_0^i et les souches délétées pour les facteurs intervenant dans la biogenèse de l'ATP synthase non croisées entre eux sont déposés pour vérifier l'absence de croissance respiratoire.

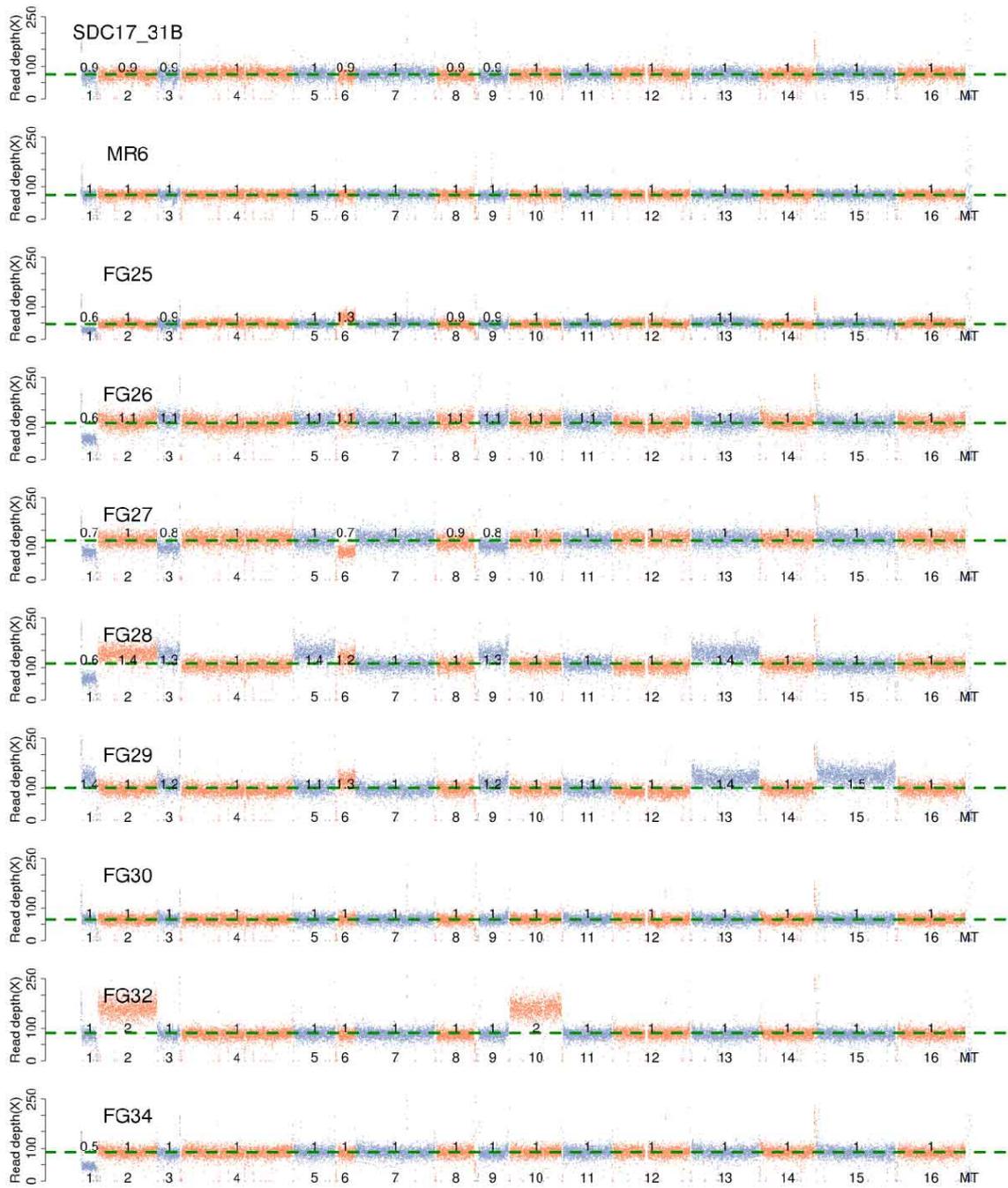
3.2.3.3.2.1 Séquençage

3.2.3.3.2.1.1 Sélection de clones pour le séquençage génomique

Dans le but d'identifier de nouveaux facteurs de biogenèse de l'ATP synthase, nous avons décidé d'identifier les mutations des souches F_0^i sélectionnées. Compte tenu de la complexité génétique de la souche hôte, des approches classiques (croisements génétiques, complémentation à partir de banques génomiques) auraient sans doute été laborieuses à mettre en œuvre. Une solution plus commode et plus rapide est d'effectuer le séquençage intégral des génomes des souches F_0^i . Le laboratoire de Lars Steinmetz (Heidelberg) a séquencé 19 des clones isolés. Nous avons choisi de faire séquencer les clones nucléaires F_0^i qui après croisement avec les testrices ne semblent pas être altérés au niveau de facteurs connus comme étant nécessaires à l'expression du F_0 . 18 mutants nucléaires F_0^i sont séquencés ainsi que la souche parentale SDC17-31b afin de repérer d'éventuels polymorphismes. Après culture en YPGA et extraction de l'ADN total, les échantillons ont été envoyés au laboratoire de Heidelberg pour séquençage. Les clones qui ont été séquencés sont FG25, FG26, FG27, FG28, FG29, FG30, FG32, FG34, FG36, FG38, FG41, FG42, FG43, FG44, FG47, FG48, FG50 et FG55.

3.2.3.3.2.1.2 Certains mutants F_0^i présentent des variations dans la quantité de certains chromosomes.

Le séquençage génomique a été effectué par la technique '*paired-end*' d'Illumina. Ce procédé génère des petits fragments aléatoires d'ADN génomique qui sont ensuite séquencés. Une même région du chromosome est séquencée plusieurs dizaines de fois. La fréquence d'une séquence donnée, autrement dit la « profondeur de séquençage », est normalement corrélée à son niveau de représentation dans la banque de fragments. Si tous les chromosomes sont présents en même nombre dans la population, la fréquence de chaque fragment séquencé doit être plus ou moins la même. De manière inattendue, plusieurs des mutants F_0^i séquencés présentent un dosage altéré de certains voire de tous les chromosomes (Figure 45, pages 157 et suivante).



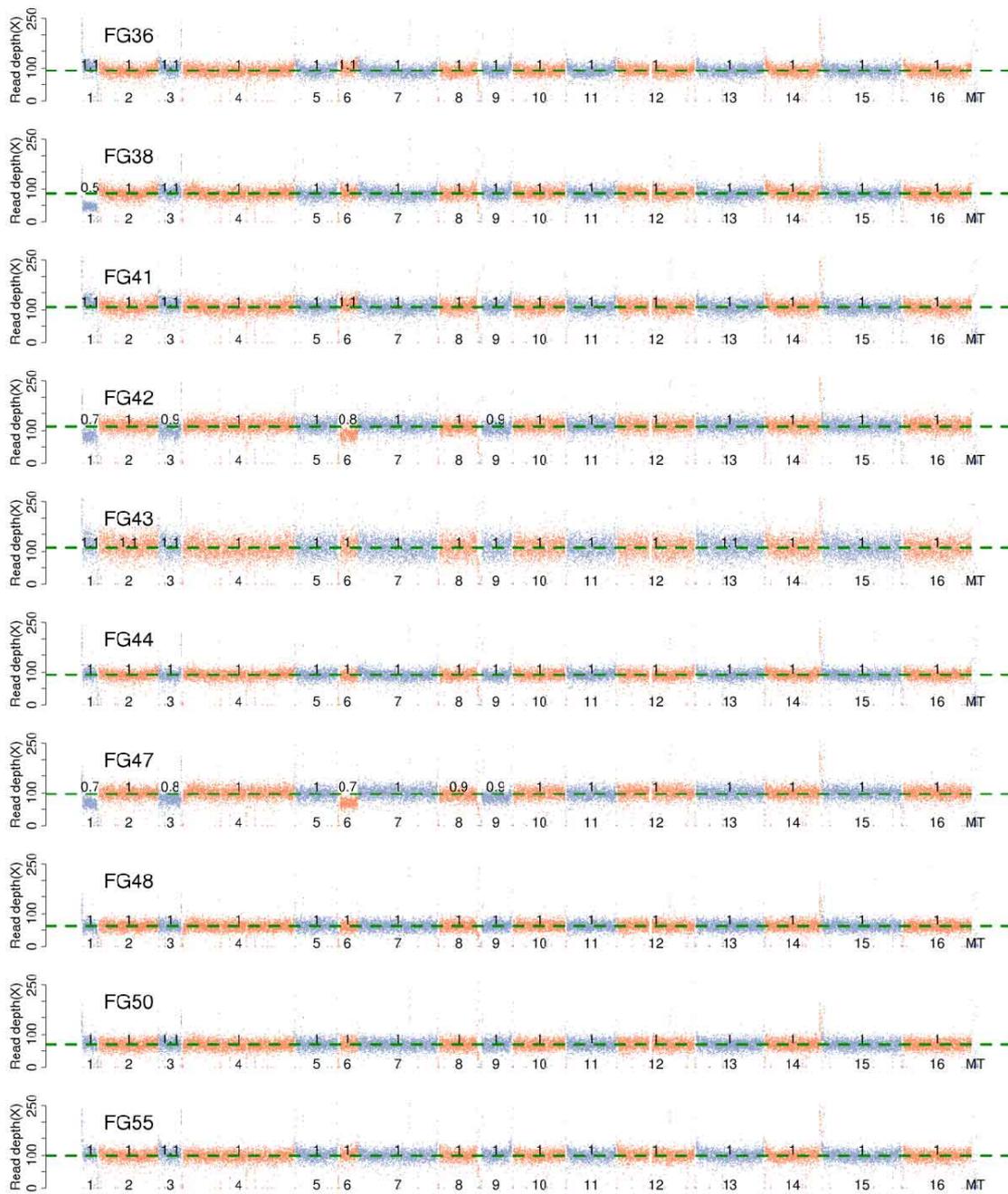


Figure 45

Quantification relative des chromosomes d'isolats F_0^I nucléaires. En ordonnée, la profondeur de séquençage. En abscisse, le numéro des chromosomes. La fréquence relative de séquençage des chromosomes est établie par normalisation en prenant comme référence le chromosome IV de chaque souche. MT = chromosome mitochondrial.

On peut considérer qu'une variation de profondeur de séquençage de 10 % est non significative (Tableau 9, page 150). Nous concluons que la souche parentale SDC17-31b et les mutants FG30, FG36, FG41, FG43, FG44, FG48, FG50 et FG55 ont des chromosomes en quantité équivalente.

Les chromosomes II et X du clone FG32 ont une fréquence de séquençage 2 fois plus importante que les autres chromosomes ; il peut s'agir d'une duplication de ces 2 chromosomes.

Les souches FG26, FG34 et FG38 ont une fréquence de séquençage du chromosome I d'environ 0,6. Dans ce cas, il est probable qu'après un événement de duplication du génome, une des deux copies du chromosome I se soit perdue.

Dans le cas de la souche FG25, la fréquence du chromosome I est de 0,6 et celle du chromosome VI est de 1,3. Ce cas pourrait s'expliquer par la présence de trois copies du génome, de deux copies du chromosome I et de 4 copies du chromosome VI.

La souche FG42 a une fréquence de séquençage de 0,7 et 0,8 respectivement pour les chromosomes I et VI. Ce cas pourrait s'expliquer par la présence de trois copies du génome et de deux copies du chromosome I et du chromosome VI.

La souche FG47 a une fréquence de séquençage de 0,7 à 0,8 pour ses chromosomes I, III et VI. Cela peut provenir d'un génome où la majorité des chromosomes sont présents en 3 exemplaires et les chromosomes I, III et VI en deux exemplaires. Un rapport identique permettrait d'expliquer l'aneuploïdie de la souche FG27.

Pour la souche FG28, les chromosomes II, III, V, VI, IX et XIII présentent des fréquences allant de 1,2 à 1,4. La fréquence du chromosome I est de 0,6. Une interprétation possible est que la majorité des chromosomes (fréquence de 1) sont présents en doubles exemplaires, le chromosome I présent en 1 exemplaire, et ceux proches d'une fréquence de 1,4 présents en 3 exemplaires.

La souche FG29 présente des fréquences de chromosomes de 1 à 1,5 ; la majorité des chromosomes seraient présents sous la forme de 2 copies, et les chromosomes dont la fréquence est de 1,5 seraient présents en 3 exemplaires.

Une grande partie des isolats séquencés présentent des remaniements chromosomiques importants. La quantification des chromosomes étant normalisée sur le chromosome IV, il est difficile en l'état de déterminer le degré de ploïdie de ces cellules.

3.2.3.3.2.1.3 Hétérozygotie des isolats F_0^i

Le séquençage a révélé des hétérozygoties dans certains clones F_0^i , c'est-à-dire un mélange d'allèles sur une même position chromosomique (Tableau 10, page 161). A l'exception des souches FG26 et FG32, toutes en présentent au moins une. Si deux allèles différents dans une position donnée sont détectés en quantité similaire cela signifie que le chromosome correspondant est au moins présent en deux copies. Ces souches devraient posséder au moins 2 copies du chromosome incriminé. Les hétérozygoties sont toujours présentes sur des chromosomes dont la profondeur de séquençage est toujours supérieure ou égale à 1. Une exception est la souche FG38 qui possède une hétérozygotie au chromosome I, et dont la profondeur de séquençage donne un ratio de 0,5. Dans ce cas, il est possible que les chromosomes soient présents en 4 copies et 2 copies pour le chromosome I. Le cas le plus étonnant est la présence d'une hétérozygotie dans la souche SDC17-31b, qui est sans doute due à une erreur de séquençage. Une dernière possibilité est qu'au cours de la culture à partir de laquelle l'ADN a été extrait et utilisé pour le séquençage génomique, une mutation soit apparue et se soit propagée, donnant lieu à des cellules de génotype différents.

Profondeur de séquençage des chromosomes normalisée par rapport au chromosome IV																
Souches	I	II	III	IV	V	VI	VII	VIII	IX	X	XI	XII	XIII	XIV	XV	XVI
MR6	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1
SDC17-31b	0,9	0,9	0,9	1	1	0,9	1	0,9	0,9	1	1	<u>1</u>	1	1	1	1
FG25	0,6	1	0,9	1	1	<u>1,3</u>	1	0,9	0,9	1	1	1	1,1	1	<u>1</u>	<u>1</u>
FG26	0,6	1,1	1,1	1	1,1	1,1	1	1,1	1,1	1,1	1,1	1	1,1	1	1	1
FG27	0,7	1	0,8	1	1	0,7	1	0,9	0,8	1	1	1	1	1	<u>1</u>	1
FG28	0,6	1,4	1,3	1	1,4	1,2	<u>1</u>	1	1,3	<u>1</u>	1	1	1,4	<u>1</u>	1	1
FG29	1,4	1	1,2	<u>1</u>	1,1	1,3	<u>1</u>	1	1,2	<u>1</u>	1,1	1	<u>1,4</u>	1	<u>1,5</u>	1
FG30	1	1	1	<u>1</u>	1	1	1	1	1	1	1	<u>1</u>	1	1	1	1
FG32	1	2	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	1	1
FG34	0,5	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	<u>1</u>	1	1	<u>1</u>	1
FG36	1,1	1	1,1	1	1	1,1	1	1	1	1	1	<u>1</u>	1	1	<u>1</u>	1
FG38	<u>0,5</u>	1	1,1	<u>1</u>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	<u>1</u>	<u>1</u>
FG41	1,1	1	1,1	1	1	1,1	1	1	1	1	1	1	1	1	<u>1</u>	1
FG42	0,7	1	0,9	1	1	0,8	1	1	0,9	1	1	1	1	1	<u>1</u>	1
FG43	1,1	1,1	1,1	1	1	1	1	1	1	<u>1</u>	1	1	1,1	1	<u>1</u>	1
FG44	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	<u>1</u>	1
FG47	0,7	1	0,8	1	1	0,7	1	0,9	0,9	1	1	1	1	1	<u>1</u>	1
FG48	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	<u>1</u>	1
FG50	1	1	1,1	1	1	1	1	1	1	1	<u>1</u>	1	1	1	<u>1</u>	1
FG55	<u>1</u>	1	1,1	1	<u>1</u>	1	1	1	1	1	1	1	1	1	<u>1</u>	1

Tableau 9

Fréquence relative des chromosomes et hétérozygoties. En considérant que SDC17-31b n'a pas subi de remaniement chromosomique, une fréquence de 1,1 n'est pas considérée comme significative. Les variations de fréquences supérieures à 10 % sont considérées comme significatives et indiquées en rouge. MR6 est une souche contrôle. Les nombres soulignés signifient la présence d'une hétérozygotie dans le chromosome considéré.

Chromosome	Position	Référence	Mutée	SDC17-31B															ORF	Gène	Effet de la mutation	
				FG28	FG30	FG29	FG25	FG26	FG34	FG55	FG43	FG36	FG38	FG32	FG42	FG41	FG48	FG44				FG47
chr01	12006	C	T	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr01	98755	G	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YAL026C	DRS2	Faux-sens
chr02	589803	A	G	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	YBR180W	DTR1	Synonyme
chr04	262374	C	G	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YDL112W	TRM3	Faux-sens
chr04	393914	G	C	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YDL032W	YDL032W	Faux-sens
chr04	669633	C	A	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YDR107C	TMN2	Faux-sens
chr04	739377	A	T	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	YDR141C	DOP1	Faux-sens
chr04	780275	A	G	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	NA	NA	NA
chr04	927065	T	C	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr04	1183399	G	C	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	YDR353W	TRR1	Faux-sens
chr05	275192	T	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	YER060W	FCY21	Faux-sens
chr05	422483	C	G	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr06	197230	C	T	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YFR022W	ROG3	Faux-sens
chr07	978860	G	C	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YGR244C	LSC2	Faux-sens
chr07	982715	G	A	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YGR246C	BRF1	Faux-sens
chr08	67150	C	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YHL020C	OPI1	Faux-sens
chr09	41651	T	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr09	260231	G	C	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YIL049W	DFG10	Faux-sens
chr09	260232	C	T	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YIL049W	DFG10	Synonyme
chr10	217710	A	G	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	YJL108C	PRM10	Synonyme
chr10	239157	A	G	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr10	244794	C	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YJL098W	SAP185	Synonyme
chr10	324365	A	G	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YJL060W	BNA3	Faux-sens
chr10	524015	C	T	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	tS(AGA)J	tS(AGA)J	NA
chr10	719468	A	G	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr11	117251	G	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YKL176C	LST4	Stop précoce
chr11	168795	C	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YKL149C	DBR1	Faux-sens
chr11	483557	T	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	-1	-1	-1	YKR023W	YKR023W	Faux-sens
chr12	210479	G	A	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr12	628409	G	C	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	tL(CAA)J	tL(CAA)J	NA
chr12	777591	C	G	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YLR321C	SFH1	Faux-sens
chr12	794401	A	C	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	NA	NA	NA
chr12	940107	A	G	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YLR410W	VIP1	Faux-sens
chr13	846260	C	A	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YMR288W	SHS155	Stop précoce
chr14	225675	A	G	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YNL224C	SQS1	Synonyme
chr14	445059	A	T	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YNL095C	YNL095C	Stop précoce
chr14	611704	T	C	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr14	729047	G	T	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YNR055C	HOL1	Faux-sens
chr15	8438	T	C	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr15	9376	G	C	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr15	33974	C	T	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr15	362535	C	A	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	YOR017W	PET127	Faux-sens
chr15	472210	C	T	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YOR077W	RTS2	Synonyme
chr15	721633	T	C	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	YOR201C	MRM1	Faux-sens
chr15	721661	A	C	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	YOR201C	MRM1	Synonyme
chr15	721768	C	A	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	NA	NA	NA
chr15	721815	C	T	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	NA	NA	NA
chr15	721920	A	G	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	NA	NA	NA
chr15	721957	G	A	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	YOR202W	HIS3	Synonyme
chr15	722033	A	C	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	YOR202W	HIS3	Faux-sens
chr15	722060	G	A	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	YOR202W	HIS3	Faux-sens
chr15	722346	A	T	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	YOR202W	HIS3	Faux-sens
chr15	722554	C	T	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	YOR202W	HIS3	Synonyme
chr15	722616	G	C	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	YOR203W	YOR203W	Faux-sens
chr15	722718	A	C	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	YOR203W	YOR203W	Faux-sens
chr15	722724	A	G	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	1	0	0	0	0	0	YOR203W	YOR203W	Faux-sens
chr15	795175	G	T	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YOR245C	DGA1	Faux-sens
chr15	934720	C	T	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YOR328W	PDR10	Faux-sens
chr15	998941	C	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YOR353C	SOG2	Faux-sens
chr16	347883	G	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr16	408215	T	C	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YPL078C	ATP4	Faux-sens
chr16	408258	T	C	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YPL078C	ATP4	Faux-sens
chr16	408282	T	C	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	YPL078C	ATP4	Faux-sens
chr16	601566	C	G	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YPR021C	AGC1	Faux-sens
chr16	689480	A	G	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA

Tableau 10

Identification des mutations présentes dans les isolats Foⁱ par séquençage global. Les mutations sont définies par rapport au génome de S288C. « -1 » signifie qu'il n'y a pas de mutation par rapport à la séquence génomique de référence de S288C, « 0 » signifie une mutation hétérozygote, « 1 » une mutation homozygote.

3.2.3.3.2.1.4 Détermination de la ploïdie des clones F_0^i par cytométrie de flux

Les données issues du séquençage génomique suggèrent que certains chromosomes présentent des variations de ploïdie dans certains clones F_0^i . Nous avons dès lors quantifié l'ADN par cytométrie de flux dans les différentes souches. Pour cela, l'ADN des cellules en croissance est marqué à l'iodure de propidium. La fluorescence émise peut être reliée à la quantité d'ADN présent dans les cellules (Figure 46, page 164).

Sur la base de ces données, il apparaît que les souches SDC17-31b, FG27, FG32, FG42, FG41, FG44, FG47, FG48 et FG50 sont haploïdes. SDC17-31b est donc haploïde malgré l'hétérozygotie détectée sur le chromosome XII ainsi que les souches FG41, FG44, FG48 qui présentent une hétérozygotie sur le chromosome XV. Les souches FG42 et FG47 sont également haploïdes malgré une hétérozygotie sur le chromosome XV et une profondeur de séquençage de 0,7 pour le chromosome I. La souche FG27, haploïde selon les données de cytométrie, possède une hétérozygotie au chromosome XV et des variations de dosage allant de 0,7 à 0,9 pour 5 de ses chromosomes. La souche FG32 ne possède pas d'hétérozygotie, mais deux copies des chromosomes II et X contre un seul pour les autres chromosomes. Cette modification n'est pas suffisante pour modifier le profil de cytométrie. La souche FG50 est haploïde malgré une hétérozygotie sur le chromosome XI. Ces souches ont en commun d'avoir un faible nombre de chromosomes touchés par une hétérozygotie (entre 0 et 1) et des fréquences chromosomiques pouvant atteindre 0,7 (mise à part FG32 comme décrit plus haut). Il est possible que les fréquences allant de 0,7 à 0,9 soient le reflet d'un artefact expérimental. La localisation de l'hétérozygotie est souvent située sur le chromosome XV, cela sera expliqué plus loin.

Les données de cytométrie font apparaître un groupe de clones diploïdes : FG25, FG26, FG28, FG29, FG30, FG34, FG36, FG38, FG43 et FG55. Les résultats de cytométrie indiquent clairement une duplication du génome des souches FG30, FG36, FG43 et FG55, en accord avec la présence d'hétérozygoties et une faible variation de dosage chromosomique (<10 %). Dans le cas de FG26, FG34 et FG38, les données de cytométrie sont en accord avec la présence d'hétérozygoties et une fréquence proche de 0,5 pour le chromosome I. Ces souches sont donc diploïdes et ont perdu une copie du chromosome I.

FG25 apparaît en cytométrie comme diploïde. Son chromosome I a une fréquence de 0,6 ce qui peut s'expliquer par la présence d'une copie unique de ce chromosome. Son

chromosome VI présente une fréquence de 1,3. Cette fréquence est soit non significative (comme les dosages dans les haploïdes atteignant 0,7), soit elle est située dans la variable d'erreur du dosage d'un chromosome présent en 3 copies et dont la valeur théorique serait 1,5.

La souche FG28 apparaît comme diploïde en accord avec la présence d'hétérozygoties. Son chromosome I a une fréquence de 0,6 ce qui peut s'expliquer par la présence d'une copie unique de ce chromosome. Ce clone a beaucoup de chromosomes possédant des fréquences chromosomiques variant de 1,2 à 1,4. Comme pour le clone FG25 ces valeurs peuvent être non significatives, ou bien être le fait de chromosomes présents en 3 copies.

La souche FG29 apparaît comme diploïde en accord avec la présence d'hétérozygoties. Ce clone a beaucoup de chromosomes possédant des fréquences chromosomiques variant de 1,1 à 1,5. Comme pour le clone FG25, ces valeurs peuvent être soit non significatives, soit être le fait de chromosome présent en 3 copies.

J'ai fait la synthèse des altérations chromosomiques en relation avec les résultats de cytométrie de flux en considérant comme significatives les fréquences chromosomiques inférieures à 0,7 ou supérieures à 1,3 (Tableau 11, page 150).

Il est assez remarquable que les hétérozygoties soient souvent situées sur le chromosome XV, cela sera expliqué plus bas.

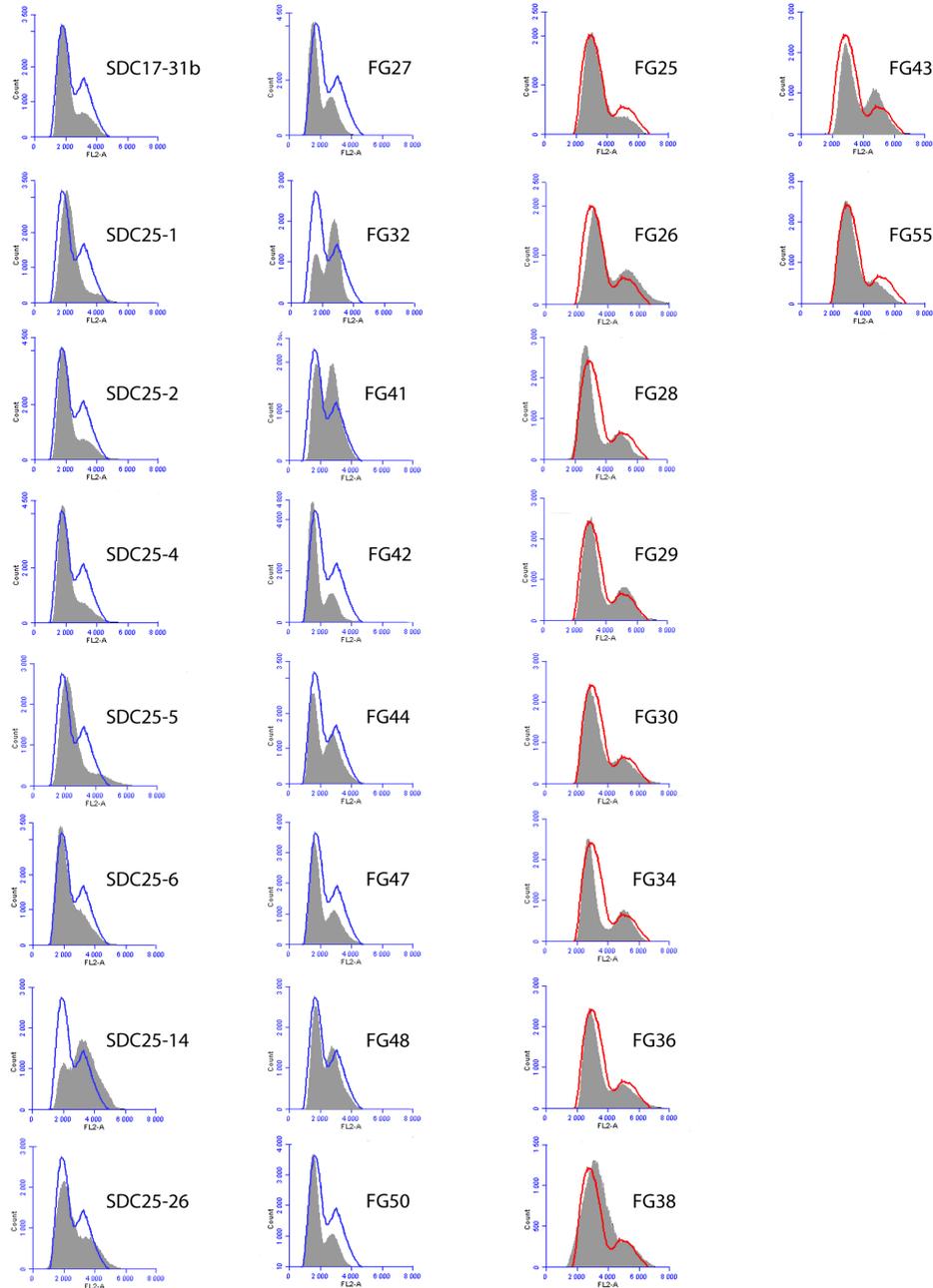
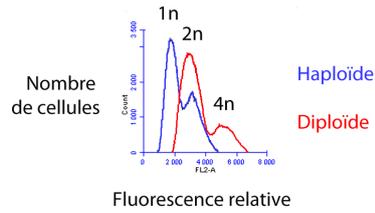


Figure 46

Détermination de la ploïdie des cellules par cytométrie de flux. En abscisse, l'intensité de fluorescence provenant de l'iodure de propidium. En ordonnée, le nombre de cellules. Le profil de souches contrôles haploïde (en bleu) et diploïde (en rouge) est rappelé pour chacun des isolats.

Souches	Ploïdie	Altération chromosomique en considérant une profondeur de séquençage >1,3 ou <0,7	Chromosomes présentant une hétérozygotie
SDC17-31b	haploïde		XII
FG25	diploïde	1 copie du Ch. I, 3 copies du Ch. VI	VI, XV, XVI
FG26	diploïde	1 copie du Ch. I	aucun
FG27	haploïde		XV
FG28	diploïde	1 copie du Ch. I, 3 du Ch. II, 3 du Ch. V, 3 du Ch. XIII	VII, X, XIV
FG29	diploïde	3 copies du Ch. I, 3 du Ch. XIII, 3 du Ch. XV	IV, VII, X, XIII, XV
FG30	diploïde		IV, XII
FG32	haploïde	2 copies du Ch. II, 2 copies du Ch. X	aucun
FG34	diploïde	1 copie du Ch. I	XII, XV
FG36	diploïde		XII, XV
FG38	diploïde	1 copie du Ch. I	I, IV, XV, XVI
FG41	haploïde		XV
FG42	haploïde		XV
FG43	diploïde		X, XV
FG44	haploïde		XV
FG47	haploïde		XV
FG48	haploïde		XV
FG50	haploïde		XI
FG55	diploïde		I, V et XV

Tableau 11

Ploïdie et altérations chromosomiques proposées pour les clones F_O¹. Les numéros de chromosomes présentant une hétérozygotie dans une souche jugée haploïde sont en rouge.

Si l'on se fie aux données de cytométrie de flux, nous pouvons considérer que plusieurs des hétérozygoties sont en fait dues à des erreurs de séquençage. Dans les souches haploïdes, elles sont néanmoins peu nombreuses, à l'exception de celles affectant le chromosome XV (voir plus bas), seules les souches SDC17-31b, FG50 et FG42 en dénombrent une chacune. Comme dit auparavant, l'hétérozygotie en position 210479 du chromosome 12 de SDC17-31b pourrait être une mutation apparue au cours de la culture des cellules utilisées pour le séquençage.

On ne peut pas exclure que les hétérozygoties et les dosages anormaux de chromosomes puissent provenir d'une population hétérogène établie à partir d'un même clone. La SDC17-31b est relativement instable, elle produit même en l'absence d'arginine dans le milieu une proportion relativement importante de petites ρ^-/ρ^0 . En la cultivant en l'absence d'arginine, on exerce une pression de sélection pour minimiser cette instabilité, voire améliorer l'expression du marqueur *ARG8m* inséré dans le génome mitochondrial. Peut-être sa culture induit la formation de cellules diploïdes à croissance plus vigoureuse en nombre significatif, ce qui pourrait expliquer les variabilités chromosomiques observées dans les mutants F_0^i . Cette hypothèse est compatible avec un dosage de 0,9 pour plusieurs chromosomes de la souche parentale SDC17-31b.

3.2.3.3.2.1.5 Mutations n'intervenant pas dans le phénotype F_0^i .

Comme cité plus haut, beaucoup de clones présentent un ensemble de mutation dans une même région du chromosome XV. La souche SDC17-31b comporte plusieurs divergences de séquences dans la région du gène *HIS3* (comprenant YOR203W et YOR201C) par rapport à la souche de référence S288C (Tableau 10, page 161 et détail en Tableau 12, page 167). Ces mutations conduisent à 3 mutations faux sens dans la séquence codante. C'est attendu car SDC17-31b possède un phénotype *his3* (voir liste des souches utilisées). Après transformation par le plasmide pATP4-HIS3, les souches du type de FG41 montrent des positions d'hétérozygotie. Cela correspond à la présence concomitante de l'allèle muté de *HIS3* génomique et de la version plasmidique non mutée. L'ADN génomique cloné dans la version plasmidique de *HIS3* couvre les emplacements 721633 à 722724 recouvrant les ORF YOR203W et YOR201C. L'emplacement 721633 présente un profil particulier. Alors qu'entre les souches S288C et SDC17-31b il ne présente pas de divergences lorsque le plasmide pATP4-HIS3 est présent, cette position présente une hétérozygotie. La séquence du

plasmide pATP4-HIS3 présente une délétion à cette position qui n'est pas retrouvée dans la séquence de référence de S288C, ce qui explique l'hétérozygotie. Les isolats du type de FG55 ne présentent pas de mutations sur la zone chromosomique de *HIS3* alors qu'ils sont censés contenir le plasmide pATP4-HIS3. Cela est certainement dû à la croissance des souches en YPGA avant l'extraction de l'ADN génomique pour séquençage qui a conduit en absence de pression de sélection à la perte du plasmide pATP4-HIS3. Il faut noter que le gène *his3* n'est pas délété dans SDC17-31b, il est possible que le gène *HIS3* du plasmide puisse se recombiner à la séquence génomique de *his3*, dans ce cas une perte du plasmide pATP4-HIS3 entrainerait un phénotype F_0^i sans conséquence sur la croissance en milieu dépourvu en histidine. Nous obtiendrions donc des clones faussement positifs. Cependant, le croisement effectué avec SDC17-4c pour vérifier la fonctionnalité d'*ATP4* nous permet d'éliminer ces clones du crible. Les souches FG42 et FG43 présentent un profil particulier. En positions 721633, 721661, 721768, 721815 leur séquence est identique à SDC17-31b ce qui indiquerait que le plasmide pATP4-HIS3 n'est pas présent. Cependant, aux positions suivantes les souches présentent des hétérozygoties compatibles avec la présence du plasmide portant *HIS3*. Il est possible que cela soit le résultat d'une recombinaison partielle au locus de *his3*.

L'ensemble des divergences de séquences couvrant la zone 721633 à 722724 résulte donc de la présence du plasmide pATP4-HIS3. Ils ne concourent pas à l'établissement du phénotype F_0^i . Ils ne seront donc pas pris en compte pour la suite de l'analyse.

Chromosome	Position	Référence	Mutée	SDC17-31B	FG28	FG30	FG29	FG25	FG26	FG34	FG55	FG43	FG36	FG38	FG32	FG42	FG41	FG48	FG44	FG47	FG27	FG50	ORF	Gène	Effet de la mutation	
chr15	721633	T	C	-1	-1	-1	0	0	-1	-1	-1	-1	0	0	-1	-1	0	0	0	0	0	0	0	YOR201C	MRM1	Faux-sens
chr15	721661	A	C	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	YOR201C	MRM1	Synonyme
chr15	721768	C	A	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	NA
chr15	721815	C	T	1	1	1	0	0	1	1	1	1	0	0	1	1	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	NA
chr15	721920	A	G	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	NA	NA	NA
chr15	721957	G	A	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	YOR202W	HIS3	Synonyme
chr15	722033	A	C	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	YOR202W	HIS3	Faux-sens
chr15	722060	G	A	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	YOR202W	HIS3	Faux-sens
chr15	722346	A	T	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	YOR202W	HIS3	Faux-sens
chr15	722554	C	T	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	YOR202W	HIS3	Synonyme
chr15	722616	G	C	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	YOR203W	YOR203W	Faux-sens
chr15	722718	A	C	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	YOR203W	YOR203W	Faux-sens
chr15	722724	A	G	1	1	1	0	0	1	1	1	0	0	0	1	0	0	0	0	0	0	0	0	YOR203W	YOR203W	Faux-sens

Tableau 12

Mutations dans la région chromosomique du gène *HIS3*. La position sur le chromosome de la base considérée est donnée. Les positions en bleu sont celles couvertes par le fragment d'ADNg comportant *HIS3* cloné dans PRS313 dont dérive pATP4-HIS3. Le bleu plus soutenu indique les positions de la séquence codante de *HIS3* (Sikorski et Hieter 1989). « Référence » indique la base trouvée dans S288C, « Mutée » indique quelle base est trouvée modifiée dans les autres souches. « -1 » signifie qu'il n'y a pas de divergence de séquence entre la souche considérée et S288C, « 1 » et vert signifie une divergence de séquence entre la souche considérée et S288C, « 0 » et rouge signifie une hétérozygotie entre S288C et la souche considérée. YOR201C est l'ORF identifié pour *MRM1*, YOR202W est l'ORF de *HIS3*, YOR203W est une ORF sujette à caution.

Le gène *ATP4* comporte des hétérozygoties dans 3 clones : FG38, FG29 et FG25. La souche SDC17-31b est censée posséder un *ATP4* délété par *URA3* (cassette de délétion *URA3* entourée par la région 5' en -28 du codon d'initiation d'*ATP4* et le 3' d'*ATP4*) qui provient de la souche PVY10 (Paul *et al.* 1992). D'après le séquençage génomique, il s'agit en fait d'une délétion seulement partielle, une partie de la séquence codante en 3' apparaissant toujours dans le séquençage (Figure 47, page 168). Le positionnement de la délétion est lui exact du côté 5' d'*ATP4*. Ceci explique les hétérozygoties dans la région d'*ATP4* génomique qui n'est pas délétée dans les clones analysés (Tableau 13, page 169). En tout état de cause, les croisements effectués avec SDC17-4c montrent qu'*ATP4* est fonctionnel, ces mutations ne concourent pas à l'établissement du phénotype F_0^i . Elles ne seront donc pas prises en compte pour la suite de l'analyse.

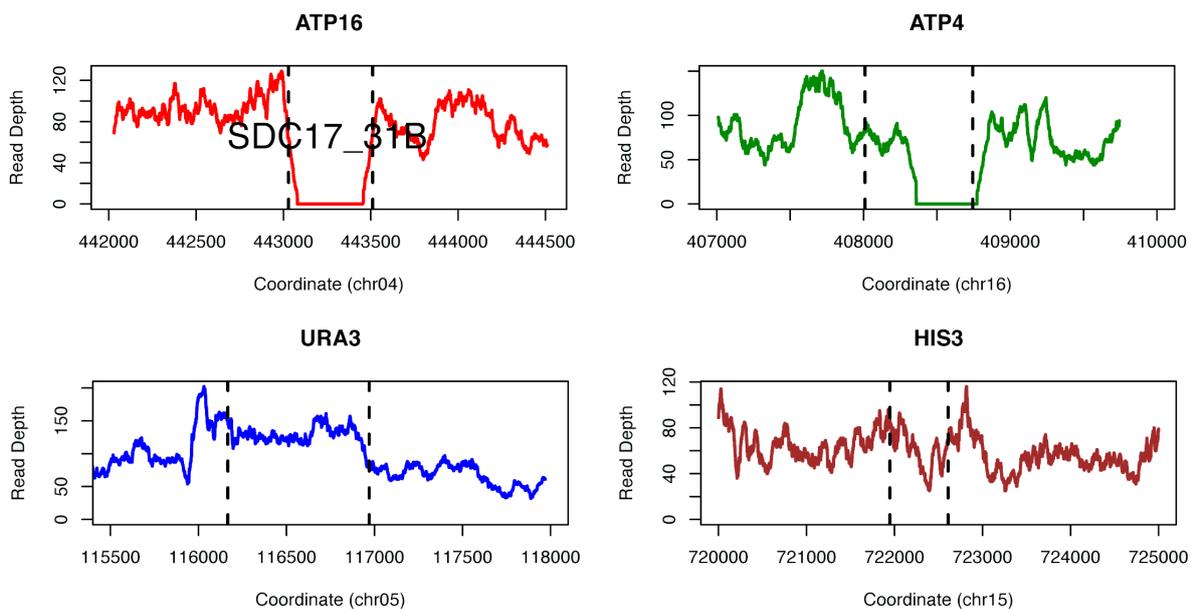


Figure 47

Profondeurs de séquençage des gènes *ATP16*, *ATP4*, *URA3* et *HIS3* obtenues sur SDC17-31b. En abscisse figurent les coordonnées des positions des bases. En ordonnée, figure la profondeur de séquençage obtenue. Les lignes discontinues délimitent la séquence codante du gène considéré. Une profondeur de 0 indique la délétion de la zone considérée.

Chromosome	Position	Référence	Mutée	SDC17-31B	FG28	FG30	FG29	FG25	FG26	FG34	FG55	FG43	FG36	FG38	FG32	FG42	FG41	FG48	FG44	FG47	FG27	FG50	ORF	Gène	Effet de la mutation
				-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1			
chr16	408215	T	C	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YPL078C	ATP4	Faux-sens
chr16	408258	T	C	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YPL078C	ATP4	Faux-sens
chr16	408282	T	C	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YPL078C	ATP4	Faux-sens

Tableau 13

Mutations du gène *ATP4*. La position sur le chromosome de la base considérée est donnée. « Réf » indique la base trouvée dans S288C, « Mutée » indique quelle base est trouvée modifiée dans les autres souches. « -1 » signifie qu'il n'y a pas de divergence de séquence entre la souche considérée et S288C, « 0 » et rouge signifie une hétérozygotie entre S288C et la souche considérée. YPL078C est l'ORF correspondant à *ATP4*.

3.2.3.3.2.1.6 Mutations pouvant intervenir dans le phénotype de survie.

Aucun des isolats F_0^i séquencés ne comporte qu'une unique mutation comparativement à la souche parentale SDC17-31b. De plus, une assez grande proportion de clones présente des variations de dosage chromosomique qui pourraient avoir un rôle dans la suppression, par exemple en diminuant le niveau d'expression d'un gène et donc de sa fonction ou en permettant de préserver la viabilité cellulaire suite à une mutation F_0^i dans un gène essentiel. Il est de ce fait difficile de savoir quel(s) gène(s) sont responsable(s) de la survie des clones F_0^i . Toutefois comme indiqué ci-après, l'analyse des changements révèle quelques gènes candidats intéressants.

Je décris ici les mutations et remaniements chromosomiques des clones F_0^i en y ajoutant ce qui est connu des fonctions des gènes mutés et de la localisation cellulaire de leurs produits protéiques. Ces données proviennent du site internet « Saccharomyces Genome Database » (www.yeastgenome.org, consulté en avril 2014). J'ai inclus dans cette analyse les mutations trouvées dans des régions intergéniques qui pourraient affecter l'expression des gènes adjacents. Seul les gènes dont la séquence codante est située à moins de 1,5 kb d'une mutation intergénique sont considérés.

FG28 est une souche diploïde, présentant 1 seul chromosome I, 3 chromosomes II, 3 chromosomes V et 3 chromosomes XIII. Par ailleurs, elle comporte 3 hétérozygoties dans d'autres chromosomes uniques à ce clone, dans les gènes *LSC2* (mutation faux-sens), *SQS1* (mutation synonyme) et dans la région non-codante à 198 bases en amont de l'ATG de *DAL5*. *LSC2* est le gène codant pour la sous-unité β de la succinyl-CoA ligase, une enzyme mitochondriale du cycle de Krebs qui catalyse la conversion du succinyl-CoA en succinate.

Cette réaction est couplée à une phosphorylation d'ADP, la seule du cycle de Krebs. *SQS1* est le gène codant pour une protéine qui stimule l'activité hélicase et ATPase de Prp43p qui intervient dans la maturation des ARNr 18S. Etonnamment, le programme Mitoprot attribue à la protéine une forte probabilité d'adressage à la mitochondrie (0,97) et une séquence clivable. Le gène *DAL5* code pour une allantoate et ureidosuccinate perméase de la membrane plasmique.

FG30 est une souche diploïde comportant 2 hétérozygoties uniques à ce clone dans les gènes *TRM3* (mutation faux-sens) et *VIP1* (mutation faux-sens). *TRM3* code pour une protéine qui catalyse la méthylation des riboses des guanosines en position 18 des ARNt. *VIP1* code pour l'inositol heptakisphosphate kinase dont la production est importante pour la signalisation phosphate, une activité impliquée dans la fonction corticale du cytosquelette de l'actine et la croissance invasive pseudohyphale.

FG29 est une souche diploïde présentant 1 chromosome I surnuméraire (donc 3 au total), 3 chromosomes XIII et 3 chromosomes XV. Par ailleurs, elle comporte 4 hétérozygoties uniques à ce clone. 3 sont situées sur d'autres chromosomes que les aneuploïdes dans les gènes *TMN2* (faux-sens), *BRF1* (faux-sens), tS(AGA)_j (ARNt sérine). La quatrième hétérozygotie, dans *HSH155* (stop précoce) est située dans le chromosome XIII. *TMN2* code pour une protéine qui a un rôle dans l'adhésion cellulaire et la croissance filamenteuse. *BRF1* code pour une des 3 sous-unités de TFIIB, facteur d'initiation de la transcription par l'ARN polymérase III qui est responsable de la synthèse d'ARN courts (ARN de transfert et ribosomiques); ce gène est essentiel. *HSH155* code pour un facteur d'épissage associé au snRNP (*small nuclear RiboNucleic Particles*). Sa délétion est non viable.

FG25 est une souche diploïde présentant 1 un seul chromosome I et 3 copies du chromosome VI. Par ailleurs, elle comporte 4 hétérozygoties uniques à ce clone. 3 sont situées sur d'autres chromosomes que les aneuploïdes, à savoir *PDR10* (faux-sens), *AGC1* (faux-sens) et dans une région non codante, à 323 bases en aval du Stop de *BDS1* et à 1159 bases en amont de YOL163W. La quatrième hétérozygotie dans le gène *ROG3* (faux-sens) est située dans le chromosome VI. *PDR10* code pour une protéine de la membrane plasmique appartenant à la famille des ABC transporteurs (*ATP Binding Cassette*) impliqués dans la résistance pléiotropique aux drogues. *AGC1* (*Aspartate-Glutamate Carrier*) code pour un transporteur de la membrane mitochondrial interne, transportant simplement du glutamate ou

contre-échangeant de l'aspartate et du glutamate. Il est impliqué dans le métabolisme de l'azote et dans la biosynthèse des composés azotés. Le gène *BDS1* code pour une sulfatase requise pour l'utilisation des sulfates comme sources de soufre. L'ORF YOL163W code pour une putative protéine de fonction inconnue et ayant une prédiction de localisation mitochondriale élevée (0,79). Notons que cette protéine interagirait directement avec la protéine Nam7p qui a initialement été décrite comme un suppresseur de mutations affectant les introns des gènes du cytochrome *b* et *COX1*. *ROG3* code pour une protéine qui se lie à l'ubiquitine ligase Rsp5p qui est supposée réguler l'endocytose des protéines de la membrane plasmique.

Les autres clones F_O^i se distinguent par la présence commune de 3 mutations « pures », c'est à dire sans hétérozygotie présumée y compris dans les clones diploïdes. Ces mutations affectent les gènes *PRM1* (mutation synonyme), *PET127* (mutation faux-sens), et dans une région non codante à 85 bases en aval du STOP de *SNR61* et à 132 bases en aval de la séquence ARS1226 (séquence de répllication autonome). *PRM1* code pour une protéine membranaire régulée par les phéromones ; elle est impliquée dans la fusion membranaire lors de l'accouplement. *PET127* code pour une protéine de la membrane mitochondriale interne impliquée dans la maturation en 5' des ARN mitochondriaux. Le gène *SNR61* est impliqué dans la maturation des ARNr. Il est à noter que les 14 clones F_O^i possédant ces trois mutations sont soit haploïdes ou diploïdes (Tableau 14, page 176). Ils dérivent donc nécessairement d'un ancêtre commun probablement haploïde. En plus de ces trois mutations communes, ces clones présentent des modifications spécifiques, comme décrit ci-après :

FG26 est une souche diploïde présentant une aneuploïdie du chromosome I (une seule copie).

FG34 présente la même aneuploïdie que le clone FG26, et deux hétérozygoties uniques à ce clone, dans le gène *SFHI/YLR321C* (faux-sens) et dans une région non-codante à 1261 bases en aval du gène *BDS1* et à 221 bases en amont de l'ORF YOL163W. Une mutation dans une autre position de cette région intergénique a été trouvée dans le clone FG25 (voir plus haut). Le gène *SFHI* code pour une sous-unité du complexe RSC impliqué dans le remodelage de la chromatine ; c'est un gène essentiel à la progression du cycle cellulaire et la maintenance de la ploïdie.

FG55 est une souche diploïde possédant 4 mutations hétérozygotes uniques à ce clone, dans les gènes *DRS2* (faux-sens), *SOG2* (faux-sens), *DGA1* (faux-sens) et à 37 bases en amont de l'ATG de *COM2*. Le gène *DRS2* code pour une flippase du réseau transgolgien impliquée dans le trafic vésiculaire. De manière intéressante, la délétion de ce gène entraîne un phénotype de perte de la croissance respiratoire. Le gène *SOG2* code pour une protéine nécessaire à la séparation des cellules après la mitose. Sa délétion est non viable. Le gène *DGA1* code pour une diacylglycérol transférase nécessaire à la formation de triacylglycérol. La deuxième mutation n'est pas située dans une séquence codante mais qui code pour un facteur de transcription. Le gène *COM2* code pour un facteur transcriptionnel régulant l'expression du gène *IME1*, un régulateur majeur de la méiose.

FG43 est une souche diploïde. Elle possède 1 mutation hétérozygote à 71 bases en aval du codon stop de *LSB6* et à 257 bases en amont de l'ATG de *CHS6*. Le gène *LSB6* code pour une protéine impliquée dans l'assemblage du filament d'actine et dans la mobilité de l'endosome. Le produit du gène *CHS6* est impliqué dans le trafic entre le Golgi et la membrane plasmique.

FG36 est une souche diploïde. Elle possède 1 hétérozygotie dans un ARNt leucine et 7 mutations homozygotes : (i) à 115 bases en amont de l'ATG de *COX20* et à -387 de l'ATG de *HEM1*. Le gène *COX20* code pour une protéine de la membrane mitochondriale interne requise pour l'expression de Cox2p, une sous-unité du complexe cytochrome *c* oxydase codée par le génome mitochondrial. Le gène *HEM1* code pour une protéine mitochondriale qui intervient dans la première étape de la voie de biosynthèse de l'hème ; (ii) deux des mutations sont situées dans le gène *DFG10*, l'une est synonyme, l'autre est de type faux-sens. *DFG10* code pour une polyprénol réductase putative impliquée dans la glycosylation. (iii) Une autre mutation est située dans le gène *SAP185* qui serait nécessaire à la fonction de Sit4p, qui lui est nécessaire à la transition G1/S du cycle cellulaire mitotique. La protéine Sap185p serait présente dans la mitochondrie. (iv) Une mutation faux-sens dans le gène *BNA3* qui code pour une protéine mitochondriale impliquée dans la voie de synthèse de l'acide nicotinique. (v) Une mutation STOP est située dans l'ORF YNL095C, qui coderait pour une protéine putative de fonction inconnue. (vi) La dernière mutation est dans le gène *RTS2*, codant pour une protéine à doigt de zinc. Sa délétion est inviable. Elle présente des similitudes

de séquence avec les protéines Kin17 de souris et de l'Homme qui sont associées à la chromatine et impliquées à la réponse aux UV et dans la réplication de l'ADN.

FG38 est une souche diploïde, elle présente la même aneuploïdie du chromosome I que les clones FG26 et FG34. Elle possède 2 mutations hétérozygotes. La première est située à 40 bases en amont de l'ATG de l'ORF YAL064W-B et à 55 bases en amont de l'ATG de YAL065C, toutes deux codant pour des putatives protéines de fonction inconnue. Cette « hétérozygotie » est située sur le chromosome I censé être présent en une seule copie. Cette une mutation « impure ». La deuxième hétérozygotie est située dans le gène *DOP1* qui code pour une protéine à domaine leucine zipper impliquée entre autre dans le transport des endosomes au Golgi. Sa délétion est non viable, et sa répression conduit à une diminution du maintien des chromosomes et des plasmides. Des données de criblage à haut débit décrivent cette protéine comme présente dans la mitochondrie ainsi que dans le cytosol.

FG32 est une souche haploïde mais avec 2 copies du chromosome I et 2 copies du chromosome X. Par ailleurs, elle comporte 2 mutations situées dans les gènes *FCY21* et *HOLI*. *FCY21* code pour une purine-cytosine perméase putative de la membrane plasmique. *HOLI* code pour un transporteur putatif de cations et d'histidinol. La protéine a été identifiée par des études à haut débit comme faisant partie du compartiment mitochondrial.

FG42 est une souche haploïde sans aucune variation de dosage chromosomique. Par ailleurs, le séquençage indique une hétérozygotie à 684 bases en amont de l'ATG de *ZPS1*, qui code pour une putative protéine GPI (glycosylphosphatidylinositol). Cette « hétérozygotie » est incompatible avec le caractère haploïde de cette souche et est donc possiblement une erreur dans le séquençage. C'est une mutation « impure ». La deuxième mutation est située à 494 bases en amont de l'ATG de l'ORF YPL109C qui coderait pour une putative protéine de fonction inconnue, dont la délétion est viable et dont le programme Mitoprot prédit une probabilité de localisation mitochondriale très élevée (0,99). Il est intéressant de noter que la délétion de ce gène est synthétique létale avec de nombreuses altérations mitochondriales, notamment dans la biosynthèse de l'ubiquinone, la réplication de l'ADN mitochondriale ou encore dans des systèmes impliqués dans la maintenance de la structure mitochondriale. De plus, elle est classée dans la famille des protéines ABC (*Activity of bcl Complex*). Toutefois, la mutation

étant assez loin de l'ATG initiateur de ce gène, il est prématuré de conclure que l'expression de celui-ci est modifiée dans le clone FG42.

FG41 est une souche haploïde comportant trois mutations « pures ». La première est une mutation synonyme dans *DTRI* qui code pour un transporteur putatif des dityrosines, et est nécessaire à la synthèse des parois de spores. La deuxième est une mutation faux-sens dans le gène *TRR1* qui code pour une enzyme contrôlant l'état redox du système thioredoxine impliqué dans la protection des cellules contre le stress oxydatif. La protéine codée par *TRR1* est localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial. Sa délétion est non viable. La troisième est une mutation faux-sens dans l'ORF *YKR023W* qui code pour une putative protéine de fonction inconnue. Des analyses par spectrométrie de masse sur des mitochondries hautement purifiées indiquent que la protéine de ce gène est localisée dans la mitochondrie.

FG48 est une souche haploïde comportant 3 mutations « pures ». Deux sont communes à celles de la souche FG41, dans *TRR1* et *YKR023W*. Ces deux souches doivent dériver d'un même ancêtre. La troisième mutation est située à 39 bases en aval du stop de *SPO1*, dont la protéine est impliquée dans la sporulation et à 132 bases en aval du stop de *YNL011C*, une ORF qui coderait pour une putative protéine de fonction inconnue.

FG44 est une souche haploïde. Elle comporte 1 mutation « pure », située à 207 bases de l'ATG de *POT1*, impliqué dans la β -oxydation des acides gras. Elle est localisée dans l'espace intermembranaire mitochondrial. La mutation est aussi située à 174 bases en amont de l'ATG de *BNR1* qui code pour une protéine impliquée dans la formation des filaments d'actine.

FG47 est une souche haploïde et comporte 3 mutations « pures ». La première dans *YDL032W* qui est une ORF incertaine. La délétion conduit à une croissance respiratoire absente ou diminuée. Cette ORF chevauche *MTO2* (*YDL033C*) qui code pour une protéine responsable de modifications des ARNt mitochondriaux dont l'absence conduit à une déstabilisation du génome mitochondrial. La deuxième mutation est située à 31 en aval du stop de *YDR161W* qui code pour une protéine putative de fonction inconnue. Elle est également située à 115 bases en aval du stop de *NBP2*, dont le produit est impliqué dans de nombreuses voies de signalisation. La dernière mutation est de type

faux-sens et est située dans *DBRI*, codant pour une protéine qui débranche les introns en forme de lassot (lariat) formé pendant leur épissage.

FG27 est une souche haploïde. Elle comporte une mutation « pure » dans le gène *DBRI*, identique à celle trouvée dans la souche FG47.

FG50 est une souche haploïde. Elle comporte une mutation « pure » dans le gène *OPII* dont le produit est un régulateur transcriptionnel d'un nombre important de gènes. Son produit protéique a une localisation mitochondriale et son absence conduit à un phénotype de petite négativité, un défaut respiratoire, probablement dû à un défaut dans la synthèse de la cardiolipine. Cette souche possède également une mutation « impure » dans le gène *LST4*. Le séquençage indique une hétérozygotie, ce qui est incompatible avec le caractère haploïde de la souche. Cela pourrait être une erreur de séquençage. Ce gène code pour une protéine possiblement impliquée dans une voie de sécrétion post-Golgi.

Chromosome	Position	Référence	Mutée																ORF	Gène	Effet de la mutation			
				haploïde	diploïde 1 x I, 3 x II, 3 x V, 3 x XIII	diploïde	diploïde 3 x I, 3 x XIII, 3 x XV	diploïde 1 x I, 3 x VI	diploïde 1 x I	diploïde 1 x I	diploïde	diploïde	diploïde	diploïde 1 x I	haploïde 2 x II, 2 x X	haploïde	haploïde	haploïde				haploïde	haploïde	haploïde
chr01	12006	C	T	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA	
chr01	98755	G	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YAL026C	DRS2	Faux-sens
chr02	589803	A	G	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YBR180W	DTR1	Synonyme
chr04	262374	C	G	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YDL112W	TRM3	Faux-sens
chr04	393914	G	C	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YDL032W	YDL032W	Faux-sens
chr04	669633	C	A	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YDR107C	TMN2	Faux-sens
chr04	739377	A	T	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	YDR141C	DOP1	Faux-sens
chr04	780275	A	G	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr04	927065	T	C	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr04	1183399	G	C	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YDR353W	TRR1	Faux-sens
chr05	275192	T	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	YER060W	FCY21	Faux-sens
chr05	422483	C	G	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr06	197230	C	T	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YFR022W	ROG3	Faux-sens
chr07	978860	G	C	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YGR244C	LSC2	Faux-sens
chr07	982715	G	A	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YGR246C	BRF1	Faux-sens
chr08	67150	C	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YHLO20C	OPI1	Faux-sens
chr09	41651	T	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr09	260231	G	C	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	YIL049W	DFG10	Faux-sens
chr09	260232	C	T	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	YIL049W	DFG10	Synonyme
chr10	217710	A	G	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	1	1	1	1	1	YJL108C	PRM10	Synonyme
chr10	239157	A	G	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr10	244794	C	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	YJL098W	SAP185	Synonyme
chr10	324365	A	G	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YJL060W	BNA3	Faux-sens
chr10	524015	C	T	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	tS(AGA)J	tS(AGA)J	NA
chr10	719468	A	G	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr11	117251	G	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YKL176C	LST4	Stop précoce
chr11	168795	C	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YKL149C	DBR1	Faux-sens
chr11	483557	T	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YKR023W	YKR023W	Faux-sens
chr12	210479	G	A	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr12	628409	G	C	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	tL(CAA)L	tL(CAA)L	NA
chr12	777591	C	G	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YLR321C	SFH1	Faux-sens
chr12	794401	A	C	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr12	940107	A	G	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YLR410W	VIP1	Faux-sens
chr13	846260	C	A	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YMR288W	HSH155	Stop précoce
chr14	225675	A	G	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YNL224C	SQS1	Synonyme
chr14	445059	A	T	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	1	-1	-1	-1	-1	-1	YNL095C	YNL095C	Stop précoce
chr14	611704	T	C	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr14	729047	G	T	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YNR055C	HOL1	Faux-sens
chr15	8438	T	C	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr15	9376	G	C	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr15	33974	C	T	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr15	362535	C	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YOR017W	PET127	Faux-sens
chr15	472210	C	T	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YOR077W	RTS2	Synonyme
chr15	795175	G	T	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YOR245C	DGA1	Faux-sens
chr15	934720	C	T	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YOR328W	PDR10	Faux-sens
chr15	998941	C	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YOR353C	SOG2	Faux-sens
chr16	347883	G	A	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA
chr16	601566	C	G	-1	-1	-1	-1	0	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	YPR021C	AGC1	Faux-sens
chr16	689480	A	G	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	-1	NA	NA	NA

Tableau 14

Mutations potentiellement responsables de la survie des isolats F_0^1 . Les mutations sont définies par rapport au génome de S288C. « -1 » signifie qu'il n'y a pas de mutation par rapport à la séquence génomique de référence de S288C, « 0 » signifie une mutation hétérozygote, « 1 » une mutation homozygote. La ploïdie et les altérations chromosomiques proposés sont présentées. Les cases entourées en gras indiquent des mutations dans des chromosomes aneuploïdes. Les cases barrées indiquent des « hétérozygoties » en contradiction avec la ploïdie des isolats.

4 Discussion Générale

4.1 Un crible génétique ciblant le secteur F_O de l'ATP synthase

4.1.1 Validation du crible

Le laboratoire a développé un crible génétique permettant d'isoler des mutations inactivant le secteur F_O de l'ATP synthase. Ce crible est basé sur des observations montrant que l'inactivation de la sous-unité δ de la tige centrale entraîne une fuite de protons *via* le F_O qui conduit à la dissipation du gradient de protons, un événement létal pour la cellule (Duvezin-Caubet *et al.* 2006). La restauration de la viabilité cellulaire exige l'inactivation ou un ralentissement du transport des protons par le secteur F_O . L'événement mutationnel suppresseur le plus fréquent est ici la perte du génome mitochondrial (ρ^{-0}) qui code pour les deux principales composantes du canal à protons de l'ATP synthase, les sous-unités Atp6p et Atp9p. D'autres mutations plus spécifiques peuvent aboutir à l'inactivation du F_O comme des mutations dans la structure de ce canal ou dans les facteurs nucléaires nécessaires à l'expression du F_O , en particulier ceux impliqués dans la synthèse et l'assemblage des sous-unités Atp6p et Atp9p. On peut supposer que de tels facteurs nous sont encore inconnus. En effet, une dizaine de facteurs impliqués dans la biogenèse de l'ATP synthase de levure est connue contre plus de 25 dans le cas de la cytochrome oxydase. De plus, la déstabilisation du génome mitochondrial souvent observée dans les mutants de l'ATP synthase, en particulier ceux incapables d'exprimer le secteur F_O , a pu rendre difficile l'identification de facteurs impliqués dans sa biogenèse. Notre crible génétique permet de contourner cette difficulté en employant le marqueur *ARG8m* inséré dans une région intergénique du génome mitochondrial, ce qui permet de limiter l'envahissement des cultures par des cellules ρ^{-0} lorsque de l'arginine n'est pas présent dans le milieu.

Dans un premier temps, j'ai cherché à valider ce crible génétique via la caractérisation de 7 premiers isolats F_O^i (pour F_O inactif). J'ai montré que deux d'entre eux portaient des mutations inactivant deux gènes nucléaires, *AEP1* et *AEP2*, qui sont nécessaires à la synthèse d'Atp9p. Les 5 autres isolats F_O^i portaient des mutations dans l'ADN mitochondrial. Trois étaient incapables d'exprimer Atp6p et Atp8p ; les deux autres portaient des mutations faux-

sens dans le gène *ATP9* qui empêchent soit l'oligomérisation d'Atp9p, soit l'interaction de cet oligomère avec Atp6p. Ces résultats valident l'emploi de ce crible pour la sélection de mutations inactivant le secteur F_0 .

4.1.2 Nouvelle chasse de mutants F_0^i

Forts des résultats validant le crible F_0 , nous avons donc décidé de l'exploiter à large échelle avec l'isolement et l'analyse de plusieurs centaines de nouveaux isolats, le but principal étant de mieux définir la biogenèse du secteur F_0 voire l'identification de nouveaux facteurs impliqués dans ce processus. J'ai isolé plus d'un millier de clones. Beaucoup d'entre eux (environ 70 %) se sont révélés assez instables, à en juger par leur incapacité au bout d'un certain nombre de générations à croître en l'absence d'arginine dans le milieu. Pour les clones présentant une assez bonne stabilité (270), j'ai effectué un premier tri de façon à éliminer les mutations F_0^i localisées dans ATP4 porté par le plasmide, dans le génome mitochondrial ou celles affectant des facteurs nucléaires déjà connus pour intervenir dans l'expression de l'ATP synthase. Après ces tests, il restait 51 d'isolats susceptibles de révéler de nouveaux facteurs de ce type. Il aurait été difficile d'identifier les gènes suppresseurs par des méthodes classiques de génétique, et nous avons dès lors opté pour le séquençage complet des mutants F_0^i qui a été réalisé par l'équipe de Lars Steinmetz (EMBL, Heidelberg). 18 clones F_0^i ont été entièrement séquencés.

4.1.2.1 Plusieurs des clones F_0^i présentent des variations de ploïdie

Contre toute attente, alors que la souche à partir de laquelle ont été isolés les clones F_0^i était haploïde (SDC17-31b), certains isolats F_0^i se sont avérés être diploïdes avec parfois une, voire plusieurs, aneuploïdie(s) spécifique(s) conduisant à un dosage chromosomique déficitaire ou un excédentaire (Tableau 11, page 165). Par exemple, le clone FG32 est haploïde mais possède deux copies des chromosomes II et X. Le clone FG36 est diploïde et tous les chromosomes sont en deux copies. Le clone FG26 est diploïde et possède une copie du chromosome I. Seuls 7 clones avaient la ploïdie attendue (1n) sans aucune anomalie de dosage chromosomique, comme la souche parentale SDC17-31b. Il est à noter que malgré la diploïdisation de certains clones, ceux-ci étaient toujours capables de copuler en étant homozygote pour le caractère *MATa* de la souche parentale. La diploïdisation n'invalide donc pas les résultats des tests génétiques réalisés sur ces clones.

Une étude récente au laboratoire a eu également recours à des séquençages complets de souches de levure pour identifier des mutations améliorant la capacité des cellules de levure à exprimer des gènes mitochondriaux depuis le noyau (Martos 2012). De telles variations de ploïdie n'ont pas été observées dans cette étude. Aussi, nous pouvons suspecter que celles trouvées dans les mutants F_0^i ne sont peut-être pas simplement accidentelles et qu'elles peuvent avoir un rôle dans la capacité de ces clones à survivre en l'absence de la sous-unité δ .

Les aneuploïdies concernant le chromosome I, observées dans 5 isolats F_0^i (FG25, FG26, FG28, FG34, FG38), conduisent toujours à un déficit dans le dosage de ce chromosome relativement aux autres chromosomes (à l'exception de l'isolat FG29 où le chromosome I est présent en trois copies). Une interprétation possible est qu'une diminution de l'expression relative d'un, voire de plusieurs gènes, présent(s) sur ce chromosome, peut colmater en partie la fuite de protons liée à l'absence de la sous-unité δ et de ce fait aider à la restauration de la viabilité cellulaire. Ce chromosome contient 102 gènes. Les gènes les plus interpellant sont : (i) *POP5* qui code pour une sous-unité de la RNase mitochondriale impliquée dans la maturation des pre-ARN, une perte partielle de cette activité pourrait altérer l'expression des gènes mitochondriaux de l'ATP synthase ; (ii) *AIM1* et *AIM2* qui spécifient des protéines dont la fonction n'est pas connue mais qui seraient impliquées dans la mitochondrie, leur absence conduit à une instabilité du génome mitochondrial, soit un phénotype souvent associé à des altérations dans le F_0 ; (iii) *MDM10* et *GEM1* qui codent pour des sous-unités du complexe ERMES (*Endoplasmic Reticulum Mitochondria Encounter Structure*). Ce complexe établit des contacts entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique qui faciliteraient entre eux des échanges de calcium et de phospholipides. *MDM10* est important pour l'assemblage des protéines à tonneaux β dans la membrane externe mitochondriale et la réplication/transmission du génome mitochondrial. Peut-être que le complexe ERMES facilite l'expression de l'ATP synthase, par exemple en aidant l'acheminement à la mitochondrie de certaines de ses composantes ou de leurs facteurs d'assemblage. Un déficit d'activité de ce complexe pourrait ainsi atténuer le découplage de la membrane interne provoqué par la perte de la sous-unité δ en compromettant partiellement la formation du F_0 . Ces hypothèses pourront être testées aisément en déterminant l'impact de mutations dans ces gènes du chromosome I sur le secteur F_0 et leur capacité à restaurer la viabilité de cellules incapables d'exprimer la sous-unité δ .

Les aneuploïdies concernant les chromosomes II et X, trouvées dans le clone F_0^i FG32 (Tableau 11, page 165), conduisent à un excédent de ces chromosomes. De manière intéressante, les gènes de trois sous-unités du F_1 (α , β , γ) y sont localisés. La formation de l'ATP synthase commencerait par l'assemblage de ces trois protéines. Peut-être qu'un excédent de ce sous-complexe titrerait d'autres sous-unités, du pied périphérique notamment, de sorte qu'il y aurait au final moins de complexes entièrement assemblés (à l'exception de la sous-unité δ), réduisant de ce fait les fuites de protons via le F_0 .

4.1.2.2 Mutations ponctuelles

4.1.2.2.1 Une mutation F_0^i dans le gène *PET127*

14 des 18 isolats F_0^i qui ont été entièrement séquencés ont en commun trois mutations, une mutation synonyme dans le gène *PRM10*, une mutation en aval du codon Stop du gène *SNR61*, et une mutation faux-sens dans le gène *PET127* (Tableau 14, page 176). Ce tronc commun de mutations est étonnant dans la mesure où les clones F_0^i sont obtenus après transformation de la souche parentale double mutante $\Delta\delta \Delta atp4$ avec un plasmide *HIS3* contenant le gène *ATP4*, suivi immédiatement de l'étalement des cellules transformées sur un milieu sans arginine (pour la sélection des mutations F_0^i) et sans histidine (pour la sélection des cellules contenant le plasmide). On s'attendait donc à ce que les isolats F_{0i} soient majoritairement indépendants, uniques en termes de mutations. On peut en déduire que ces trois mutations préexistaient dans la population avant transformation avec le plasmide *ATP4*, et qu'elles ne sont donc pas apparues au cours de la croissance des transformants sur milieu solide sélectif. Si ces mutations, au moins l'une d'entre elles, permet(tent) de réduire le découplage mitochondrial après transformation avec le plasmide *ATP4*, pourquoi se sont-elles propagées de manière apparemment significative dans la population avant cette transformation ? Je formulerais l'hypothèse suivante. Nous avons jusqu'ici considéré que l'absence du gène *ATP4* empêche l'insertion de la sous-unité Atp6p dans le complexe ATP synthase. En effet, cette protéine n'est plus décelable par Western-blot dans un mutant $\Delta atp4$ (Duvezin-Caubet *et al.* 2006). Peut-être que l'assemblage d'Atp6p n'est en fait pas complètement bloqué et qu'une très faible quantité de cette protéine s'accumule puis s'associe avec l'anneau de sous-unité Atp9p, formant une structure capable de transporter des protons à travers la membrane interne. Mon étude sur la sous-unité ϵ montre qu'il faut peu de secteurs F_0 non associés au F_1 pour engendrer des fuites importantes de protons à travers la membrane

interne. Si l'assemblage d'Atp6p n'était effectivement pas complètement aboli dans une souche Δatp4 , le potentiel de la membrane serait impacté ce qui aurait un effet néfaste global sur la biogenèse mitochondriale. Ceci pourrait expliquer la conversion relativement importante (70 %) en petites ρ^-/ρ^0 de la souche $\Delta\text{atp4 } \Delta\delta$ malgré la pression de sélection pour l'état ρ^+ via le gène *ARG8m*. En effet, les systèmes impliqués dans la maintenance du génome mitochondrial seraient moins bien importés du fait d'un affaiblissement du potentiel de la membrane interne. De manière intéressante, il a été établi que le gène *PET127* est important pour la stabilité des ARNm mitochondriaux, particulièrement ceux des gènes *ATP9*, *ATP8* et *ATP6* (Wiesenberger et Fox 1997). Cette fonction s'exercerait en protégeant les séquences 5' UTR de ces ARNs de la dégradation par une exoribonucléase 5'-3'. Ces considérations nous amènent à formuler l'hypothèse que la mutation du gène *PET127* dans les clones F_0^i pourrait colmater la fuite de protons résiduelle putative dans la souche parentale SDC17-31b en abaissant le taux d'expression des sous-unités du canal à protons codées par le génome mitochondrial. Notons que l'ARNm du gène *COX2* est nettement moins sensible à l'inactivation de *PET127* (Wiesenberger et Fox 1997). Ainsi l'impact de la mutation dans *PET127* dans les clones F_0^i sur l'expression d'*ARG8m*, qui est placé sous le contrôle du 5' UTR du gène *COX2* (Duvezin-Caubet *et al.* 2006), serait moins fort. De plus, des analyses au laboratoire ont montré qu'il faut très peu de protéine Arg8p pour croître sans arginine. En conclusion, nous pouvons considérer que la mutation dans *PET127* trouvée dans 14 clones F_0^i a vraisemblablement un impact positif sur la croissance de la souche parentale SDC17-31b en l'absence d'arginine dans le milieu et qu'elle a donc pu se propager dans la population avant même la transformation avec le plasmide *ATP4*. Concernant les deux autres mutations communes à ces 14 clones, il nous est impossible à ce stade compte tenu des informations disponibles sur les gènes correspondants, de définir si elles ont aussi une action bienfaitrice sur la souche SDC17-31b. Peut-être s'agit-il simplement de polymorphismes neutres. Notons qu'un seul des 14 clones présentant la mutation *PET127* (le clone FG26), ne possède pas d'autres mutations ponctuelles. Toutefois, ce dernier présente un déficit dans le dosage du chromosome I alors que d'autres clones portant la mutation *PET127* ne présentent aucune variation de ploïdie. Cette observation renforce l'hypothèse d'une action suppressive de cette mutation, mais aussi l'idée développée plus haut qu'un dosage altéré du chromosome I pourrait lui aussi avoir un effet correcteur.

4.1.2.2.2 Les autres mutations ponctuelles F_0^i

Les 14 clones présentant le tronc commun de trois mutations, dont celle dans *PET127*, portent d'autres mutations ponctuelles, de 2 à 7, à l'exception du clone FG26 comme déjà mentionné ci-avant. Ces mutations additionnelles sont dans leur grande majorité uniques à chacun de ces clones, et on peut donc penser que si elles ont une activité F_0^i , cette activité ne devient réellement bénéfique qu'après transformation de la souche SDC17-31b avec le plasmide *ATP4*. Les quatre clones restant (FG28, FG30, FG29 et FG25) qui n'ont pas la mutation dans *PET127*, présentent 2 à 3 mutations ponctuelles. Ces quatre clones sont tous diploïdes et leurs mutations ponctuelles sont toutes hétérozygotes, indiquant qu'elles sont apparues après la diploïdisation de leur génome (Tableau 14, page 176).

Sur l'ensemble des 18 clones F_0^i , il y a 59 mutations ponctuelles différentes. 25 d'entre elles sont des mutations faux-sens, 6 sont synonymes, 3 introduisent des codons Stop précoces, 2 affectent des ARNt ; les autres sont localisées dans des régions intergéniques relativement proches, en amont ou en aval, de régions codantes (Tableau 15, page 182).

	36 intragéniques		23 intergéniques	
	21 hétérozygotes	15 homozygotes	10 hétérozygotes	13 homozygotes
25 faux-sens	<i>DRS2</i> <i>TRM3</i> <i>TMN2</i> <i>DOP1</i> <i>TMN2</i> <i>ROG3</i> <i>LSC2</i> <i>BRF1</i> <i>DFG10</i> <i>SFH1</i> <i>VIP1</i> <i>DGA1</i> <i>PDR10</i> <i>SOG2</i> <i>AGC1</i>	YDL032W <i>TRR1</i> <i>FCY21</i> <i>OPI1</i> <i>DFG10</i> <i>BNA3</i> <i>DBR1</i> YKR023W <i>HOL1</i> <i>PET127</i>	<u><i>YAL064W-B</i></u> <u><i>YAL065C</i></u> <i>COM2</i> <i>RPS26B</i> <i>LSB6</i> <i>CHS6</i> <i>DAL5</i> <i>BDS1</i> YOL163W <u><i>ZPS1</i></u>	YDR161W <i>NBP2</i> <i>MTO2</i> <i>COX20</i> <i>HEM1</i> <i>POT1</i> <i>BNR1</i> <i>SNR61</i> <i>ARS1226</i> <i>SPO1</i> YNL011C YPL109c YPL108w ts(UGA)P
6 synonymes	<i>PRM10</i> <i>SQS1</i>	<i>DTR1</i> <i>DFG10</i> <i>SAP185</i> <i>RTS2</i>		
3 Stops	<u><i>LST4</i></u> <i>HSH155</i>	YNL095C		
2 ARNt	Ts(AJA)J Tl(CAA)L			

Tableau 15

Répartition des gènes « F_0^i » potentiels suivant la nature de la mutation. Les gènes soulignés sont porteurs de mutations « impures ».

Pour l'instant, nous ne savons pas si ces mutations ont réellement une activité F_0^i . Néanmoins nous donnons ci-après les informations connues sur les fonctions des gènes

affectés et envisageons pour certains de ces gènes un possible mécanisme suppresseur, même si à ce stade ces considérations sont purement spéculatives.

4.1.2.2.2.1 Gènes affectés

4.1.2.2.2.1.1 Gènes à fonction mitochondriale reconnue ou possiblement impliqués dans une fonction mitochondriale.

Neuf des mutations identifiées dans les clones F_0^i affectent des gènes ayant une fonction mitochondriale établie : *PET127* (métabolisme des ARN mitochondriaux), *COX20* (biogenèse du complexe IV), *LSC2* (cycle de Krebs), *OPI1* (synthèse de la cardiolipine), *POT1* (β -oxydation des acides gras), *BNA3* (synthèse du NADH), *MTO2* (modification post-transcriptionnelle des ARNt mitochondriaux), *AGC1* (transporteur d'acide aminé de la membrane interne), et *HEM1* (synthèse de l'hème) (Tableau 16, page 185).

Dix autres mutations affectant des gènes dont certains n'ont pas une fonction mitochondriale reconnue, mais qui ont néanmoins possiblement un rôle au niveau de la mitochondrie sur la base de prédictions de location cellulaire de leur produits protéiques et/ou la présence d'un défaut respiratoire associé à leur inactivation : *DRS2* (flippase du réseau trans-golgien), *YDL032W* (fonction inconnue), *SQS1* (maturation des ARNr 18S), *YPL109C* (fonction inconnue), *NBP2* (régulation de la voie HOG), *RPS26B* (protéine ribosomique cytosolique), *TRR1* (régulation du système thioredoxine), *SAP185* (cycle cellulaire), *YKR023W* (fonction inconnue), et *HOLI* (transporteur de cations de la membrane plasmique) (Tableau 16, page 185).

Nous avons déjà évoqué plus haut comment la mutation dans *PET127* pourrait avoir une action F_0^i en affectant l'expression des gènes mitochondriaux de l'ATP synthase. Un mécanisme similaire peut être envisagé pour la mutation de *MTO2* affectant des systèmes contrôlant l'expression des gènes mitochondriaux. En revanche, il est a priori plus difficile de comprendre comment les autres mutations pourraient agir sur le F_0 , comme celles affectant *COX20*, un gène dont la fonction est décrite comme restreinte à la biogenèse de la cytochrome oxydase, ainsi que pour les mutations dans des gènes contrôlant le cycle de Krebs ou la synthèse de l'hème, pour autant qu'elles aient réellement un rôle dans la suppression. Il sera en revanche plus intéressant d'examiner une implication possible des mutations dans les gènes de fonction inconnue, pour lesquels il sera facile de savoir si oui ou non ils contrôlent

spécifiquement le F_O. Qu'il reste des facteurs de ce type à découvrir n'est sûrement pas une hypothèse irréaliste.

4.1.2.2.1.2 Gènes sans fonction mitochondriale connue

Les gènes affectés par les autres mutations trouvées dans les clones F_Oⁱ peuvent être regroupés en différentes catégories fonctionnelles, mise à part *ZPS1*, du fait du peu d'information disponible sur ce gène (Tableau 17, page 186) : (i) expression génétique (*TRM3*, *BRF1*, *DBR1*, *SNR61*, *HSH155*, 2 ARNt sérine et 1 ARNt leucine) ; (ii) transporteurs de la membrane plasmique (*DTRI*, *FCY21*, *DAL5* et *PDR10*) ; (iii) activité en lien avec le Golgi (*DOPI*, *LST4* et *CHS6*) ; (iv) formation des filaments d'actine (*LSB6*, *VIP1* et *BNR1*) ; (v) facteurs associés à la chromatine (*SFHI* et *RTS2*) ; (vi) fonctions métaboliques (*BDS1* et *DGAI*) ; (vii) méiose/sporulation (*COM2*, *SPO1*, *DTRI*) ; (viii) adhésion et division des cellules (*TMN2*, *PRM10*, *SOG2*, *BNR1*) ; (ix) croissance pseudohyphale (*VIP1* et *DFG10*) ; (x) endosome et endocytose (*LSB6* et *ROG3*). Il est impossible à ce stade de savoir comment ces mutations pourraient altérer la fonction du F_O. Si c'est le cas, les effets sont sans doute très indirects. Une autre possibilité est qu'elles n'ont aucun rôle dans la surpression.

Huit des gènes modifiés ont des fonctions inconnues : YAL064W-B, YNL095C, YAL065C, YNL011C, YOL163W, YPL108W, YDR161W et YPR071W. Il pourrait être intéressant de déterminer si leur inactivation impacte réellement le F_O, et si oui, d'aller plus avant dans l'étude de leur fonction.

ORF & Nom du gène	Type de mutation ou localisation	Fonction	Catégorie fonctionnelle	Localisation du produit du gène	Prédiction de localisation par Mitoprot	Phénotype du mutant nul
YOR017W (<i>PET127</i>)	Faux-sens	Maturation en 5' des ARN mitochondriaux	Expression génétique	Mitochondrie	0,9796 et séq. cliv.	Viable, défaut de respiration
YDR231C (<i>COX20</i>)	à - 115 de l'ATG	Maturation de Cox2p et assemblage dans la cytochrome c oxydase	Métabolisme énergétique	Mitochondrie	0,0269	Petite, défaut de respiration
YGR244C (<i>LSC2</i>)	Faux-sens	Sous-unité β de la succinyl-CoA ligase	Métabolisme énergétique	Mitochondrie	0,9772 et séq. cliv.	Viable
YHL020C (<i>OPI1</i>)	Faux-sens	Régulateur transcriptionnel d'un nombre important de gènes	Expression génétique	Réticulum endoplasmique, noyau	0,0077	Petite négative, défaut de respiration, faible contenu en cardiolipide
YIL160c (<i>ROT1</i>)	à - 207 de l'ATG	β-oxydation des acides gras	Métabolisme énergétique	Mitochondrie, peroxisome	0,1903	Viable
YJL060W (<i>BNA3</i>)	Faux-sens	Synthèse de l'acide nicotinique	Métabolisme énergétique	Cytoplasme, mitochondrie	0,9798 et séq. cliv.	Viable
YDL033C (<i>MTO2</i>)	à - 2 de l'ATG	Modification des ARNT mitochondriaux	Expression génétique	Mitochondrie	0,8717 et séq. cliv.	Petite, diminution de la croissance respiratoire
YPR021C (<i>AGC1</i>)	Faux-sens	Transporteur aspartate et glutamate de la membrane mitochondriale interne	Transporteur de la membrane mitochondriale	Mitochondrie	0,0177	Viable
YDR232W (<i>HEM1</i>)	à - 387 de l'ATG	Voie de biosynthèse de l'hème	Métabolisme énergétique	Mitochondrie	0,8958 et séq. cliv.	Non viable
YAL026C (<i>DRS2</i>)	Faux-sens	Flippase (translocase aminophospholipide) du réseau trans-golgien impliquée dans le trafic vésiculaire	Relatif au Golgi	Réseau trans-golgien	0,001	Viable, absence de croissance respiratoire
YDL032W	Faux-sens	ORF douteuse	Fonction inconnue	Inconnue	0,5481 et séq. cliv.	Viable, absence/diminution croissance respiratoire
YNL224C (<i>SQS1</i>)	Synonyme	Maturation des ARNr 18S	Expression génétique	Préribosome, Cytoplasme, noyau, nucléole (EHD)	0,9724 et séq. cliv.	Viable
YPL109C	à - 494 de l'ATG	Protéine putative de fonction inconnue	Fonction inconnue	Mitochondrie (EHD)	0,9911 et séq. cliv.	Viable
YDR162C (<i>NBP2</i>)	à + 115 du Stop	Impliquée dans la voie de signalisation HOG (<i>High Osmolarity Glycerol</i>)	Signalisation	Cytoplasme, Noyau (EHD)	0,0411	Viable, diminution de la croissance respiratoire
YER131W (<i>RPS26B</i>)	à - 1108 de l'ATG	Protéine de la petite sous-unité ribosomale 40S	Expression génétique	Ribosome	0,7271 et séq. cliv.	Viable, absence de croissance respiratoire
YDR353W (<i>TRR1</i>)	Faux-sens	Enzyme contrôlant l'état redox du système thioredoxine impliqué dans la protection des cellules contre le stress oxydatif	Stress oxydatif	Cytosol et mitochondrie	0,0479	Non viable
YJL098W (<i>SAP185</i>)	Synonyme	Nécessaire à la fonction de Sit4p, qui lui est requis pour la transition G1/S du cycle cellulaire mitotique	Mitose	Cytoplasme, Mitochondrie (EHD)	0,0062	Viable
YKR023W	Faux-sens	Protéine putative de fonction inconnue	Fonction inconnue	cytoplasme et mitochondrie (EHD)	0,1998	Viable
YNR055C (<i>HOL1</i>)	Faux-sens	Transporteur putatif de cations et d'histidinol	Transporteur de la membrane plasmique	Membrane plasmique, Membranaire et mitochondrie (EHD)	0,0377	Viable

Tableau 16

Liste des gènes mutés dans les isolats Foⁱ à fonction mitochondriale reconnue ou possiblement impliqués dans une fonction mitochondriale. 'EHD' signifie que la localisation du produit du gène est issue d'étude à haut débit. 'séq. cliv.' indique que le programme Mitoprot détecte la présence d'une séquence clivable.

ORF & Nom du gène	Type de mutation ou localisation	Fonction	Catégorie fonctionnelle	Localisation du produit du gène	Prédiction de localisation par Mitoprof	Phénotype du mutant nul
YOL154W (<i>ZPS1</i>)	à - 684 de l'ATG	Protéine de surface régulée par le zinc et le pH	Fonction inconnue	Paroi cellulaire	0,1185	Viable
YDL112W (<i>TRM3</i>)	Faux-sens	Catalyse la méthylation des riboses des guanosines en position 18 des ARN	Expression génétique	Cytoplasme (EHD)	0,1052	Viable
YGR246C (<i>BRF1</i>)	Faux-sens	Sous-unités de TFIIB, facteur d'initiation de la transcription par l'ARN polymérase III qui est responsable de la synthèse d'ARN courts (ARN de transfert et ribosomiques)	Expression génétique	Complexe du facteur de transcription TFIIB	0,3504	Non viable
YKL149C (<i>DBR1</i>)	Faux-sens	Protéine qui débranche les introns en forme de lassot (ariat) formés pendant leur épissage	Expression génétique	Noyau	0,4009	Viable
<i>SNR61</i>	à + 85 du Stop	Maturation des ARnr	Expression génétique	Nucléole	ND	Viable
YMR288W (<i>HSH155</i>)	Stop précoce	Facteur d'épissage associé au snRNP (<i>small nuclear RiboNucleic Particles</i>)	Expression génétique	Complexe snRNP	0,037	Non viable
tS(AGA)J	NA	ARNI sérine	Expression génétique	Cytosol	ND	ND
tL(CAA)L	NA	ARNI leucine	Expression génétique	Cytosol	ND	ND
tS(UGA)P	à - 85 de l'ATG	ARNI sérine	Expression génétique	Cytosol	ND	ND
YBR180W (<i>DTR1</i>)	Synonyme	Transporteur putatif des dityrosines, nécessaire à la synthèse des parois de spores	Transporteur de la membrane plasmique/sporulation	Membrane prospore	0,0156	Viable
YER060W (<i>FCY21</i>)	Faux-sens	Purine-cytosine perméase putative de la membrane plasmique	Transporteur de la membrane plasmique	Membrane plasmique	0,0179	Viable
YJR152W (<i>DAL5</i>)	à - 198 de l'ATG	Allantoïase et ureiduosuccinate perméase de la membrane plasmique	Transporteur de la membrane plasmique	Membrane plasmique	0,0102	Viable
YOR328W (<i>PDR10</i>)	Faux-sens	ABC transporteur	Transporteur de la membrane plasmique	Membrane plasmique	0,0279	Viable
YDR141C (<i>DOP1</i>)	Faux-sens	Protéine à domaine <i>leucine zipper</i> impliquée dans le transport des endosomes au Golgi, l'organisation du réticulum endoplasmique, l'établissement de la polarité cellulaire et la morphogénèse	Relatif au Golgi	Réseau trans-golgien	0,0108	Non viable
YKL176C (<i>LST4</i>)	Stop précoce	Protéine possiblement impliquée dans une voie de sécrétion post-Golgi	Relatif au Golgi	Manteau vésiculaire	0,1772	Viable
YJL099W (<i>CHS6</i>)	à - 257 de l'ATG	Trafic entre le Golgi et la membrane plasmique	Relatif au Golgi	Réseau trans-golgien	0,0079	Viable
YJL100W (<i>LSB6</i>)	à + 71 du Stop	Assemblage du filament d'actine et mobilité de l'endosome	Relatif à l'actine/endosome	Membrane de la vacuole, membrane plasmique, Cytoplasme (EHD)	0,0228	Viable
YLR410W (<i>VIP1</i>)	Faux-sens	Signalisation phosphate, impliquée dans la fonction corticale du cytosquelette de l'actine et la croissance invasive pseudohyphale	Relatif à l'actine/croissance pseudohyphale	Cytoplasme	0,0254	Viable
YIL159W (<i>BNR1</i>)	à - 174 de l'ATG	Formation des filaments d'actine	Relatif à l'actine/mitose	Anneau de constriction	0,6328 et séq. cliv.	Viable
YLR321C (<i>SFH1</i>)	Faux-sens	Remodelage de la chromatine, essentiel à la progression du cycle cellulaire et à la maintenance de la ploïdie	Chromatine	Complexe de remodelage de la structure de la chromatine	0,3951	Non viable
YOR077W (<i>RTS2</i>)	Synonyme	Protéine à doigt de zinc, similitudes de séquence avec des protéines associées à la chromatine et impliquées à la réponse aux UV et dans la réplication de l'ADN	Chromatine	Cytoplasme, noyau (EHD)	0,398	Non viable
YOL164W (<i>BDS1</i>)	à + 323 du Stop	Sulfatase requise pour l'utilisation des sulfates comme sources de soufre	Métabolisme	Inconnue	0,3107 et séq. cliv.	Viable
YOL164W (<i>BDS1</i>)	à + 1261 du Stop	Sulfatase requise pour l'utilisation des sulfates comme sources de soufre	Métabolisme	Inconnue	0,3107 et séq. cliv.	Viable
YOR245C (<i>DGA1</i>)	Faux-sens	Diacylglycérol transférase, nécessaire à la formation de triacylglycérol	Métabolisme	Membranaire, particule lipidique	0,0736	Viable
YER130c (<i>COM2</i>)	à - 37 de l'ATG	Facteur transcriptionnel régulant l'expression du gène <i>IME1</i> , un régulateur majeur de la méiose	Méiose	Inconnue	0,0508	Viable
YNL012W (<i>SPO1</i>)	à + 39 du Stop	Protéine impliquée dans la sporulation	Sporulation	RE, noyau, membrane prospore	0,2769	Viable
YDR107C (<i>TMN2</i>)	Faux-sens	Rôle dans l'adhésion cellulaire et la croissance filamenteuse	Adhésion cellulaire	Membrane de la vacuole	0,3559	Viable
YJL108C (<i>PRM10</i>)	Synonyme	Protéine membranaire régulée par les phéromones impliquée dans la fusion membranaire lors de l'accouplement	Accouplement	Membranaire	0,3486	Viable
YOR353C (<i>SOG2</i>)	Faux-sens	Séparation des cellules après la mitose	Mitose	Bourgeon cellulaire, cytoplasme	0,0179	Non viable
YIL049W (<i>DFG10</i>)	Faux-sens	Polyprénil réductase putative impliquée dans la glycosylation	Croissance pseudohyphale	Membranaire (EHD)	0,0224	Viable
YIL049W (<i>DFG10</i>)	Synonyme	Polyprénil réductase putative impliquée dans la glycosylation	Croissance pseudohyphale	Membranaire (EHD)	0,0224	Viable
YFR022W (<i>ROG3</i>)	Faux-sens	Protéine se liant à l'ubiquitine ligase Rsp5p qui est supposée réguler l'endocytose des protéines de la membrane plasmique	Endocytose	Inconnue	0,0778	Viable
YAL064W-B	à - 40 de l'ATG	Protéine de fonction inconnue	Fonction inconnue	Membranaire (EHD)	0,0173	ND
YNL095C	Stop précoce	Protéine putative de fonction inconnue	Fonction inconnue	Membranaire	0,331	Viable
YAL065C	à + 55 de l'ATG	Protéine putative de fonction inconnue	Fonction inconnue	Inconnue	0,0631	Viable
YNL011C	à + 132 du Stop	Protéine putative de fonction inconnue	Fonction inconnue	Inconnue	0,3016	Viable
YOL163W	à - 1159 de l'ATG	Protéine putative de fonction inconnue	Fonction inconnue	Membranaire	0,7858	Viable
YOL163W	à - 221 de l'ATG	Protéine putative de fonction inconnue	Fonction inconnue	Membranaire	0,7858	Viable
YPL108W	à - 563 de l'ATG	protéine cytoplasmique de fonction inconnue	Fonction inconnue	Cytoplasme	0,2343	Viable
YDR161W	à + 31 du Stop	Protéine de fonction inconnue, proposée comme intervenant dans les ARnr et la biosynthèse du ribosome, rôle suggéré dans la dégradation des protéines associées au RE	Fonction inconnue	Cytoplasme, noyau (EHD)	0,0662	Viable
YPR071W	à + 673 du Stop	Protéine membranaire putative	Fonction inconnue	Membranaire (EHD)	0,0751	Viable
ARS1226	à + 132 bases	Séquence de réplication autonome	Réplication ADN	NA	ND	ND

Tableau 17

Liste des gènes mutés dans les isolats Fo dont la fonction n'est pas connue pour être en lien avec la mitochondrie. 'EHD' signifie que la localisation du produit du gène est issue d'étude à haut débit. 'séq. cliv.' indique que le programme Mitoprof détecte la présence d'une séquence clivable. NA : Non applicable. ND : Non déterminé.

4.2 Fonction de la sous-unité surnuméraire ϵ de l'ATP synthase mitochondriale

Des études antérieures ont montré qu'en l'absence de la sous-unité δ de la tige centrale, le domaine translocateur de protons de l'ATP synthase est toujours capable de s'assembler mais il n'est plus couplé au secteur catalytique F_1 (Giraud et Velours 1997; Lai-Zhang *et al.* 1999). Il en résulte des fuites massives de protons qui dissipent totalement le potentiel électrique de la membrane interne ($\Delta\Psi$). Les cellules incapables d'exprimer la sous-unité δ ne sont de ce fait pas viables. Ceci explique que les cultures d'une souche $\Delta\delta$, où le gène de cette protéine a été délété, sont entièrement dépourvues d'ADN mitochondrial car le canal à protons ne peut alors plus être synthétisé et les cellules $\Delta\delta$ recouvrent la possibilité de maintenir un $\Delta\Psi$ suffisant *via* l'échangeur ADP/ATP de la membrane interne car son activité de transport est électrogénique. L'élimination de la sous-unité γ de la tige centrale conduit également à une conversion 100 % en cellules ρ^-/ρ^0 car elle aussi entraîne un découplage total de la membrane interne (Lai-Zhang *et al.* 1999).

La délétion du gène de la troisième sous-unité de la tige centrale, $\Delta\epsilon$ n'impacte pas aussi fortement le maintien de l'ADN mitochondrial, il reste dans les cultures environ 30 % de cellules ρ^+ et celles-ci sont capables de croître lentement sur des milieux non-fermentaires (Guelin *et al.* 1993; Lai-Zhang *et al.* 1999). Curieusement, j'ai trouvé, à l'aide d'un système d'expression régulable (promoteur tetO répressible par la doxycycline), qu'une déplétion en sous-unité ϵ d'à peine 25 % suffit à découpler totalement la membrane interne. Ce résultat est en apparence contradiction avec l'étude utilisant l'allèle nul $\Delta\epsilon$ car il indique que la sous-unité ϵ est essentielle pour le couplage des secteurs F_1 et F_0 . J'ai résolu cette contradiction en montrant que les cellules dépourvues en sous-unités ϵ mais toujours ρ^+ portent des mutations dans les deux principales composantes du canal à protons, les sous-unités Atp6p et Atp9p. J'ai montré que l'une de ces mutations (le remplacement d'un résidu leucine par une phénylalanine en position 57 de la sous-unité Atp9p, c-L57F) n'a pas d'impact sur l'assemblage de l'ATP synthase mais réduit son activité de synthèse d'ATP d'environ 30 %, probablement à cause d'un ralentissement dans l'activité de transport de protons.

Ces observations suggèrent que la fonction de la sous-unité ϵ est de renforcer les interactions entre les sous-unités γ et δ , ce qui est cohérent avec les analyses structurales qui

montrent que la sous-unité ϵ établit de nombreux contacts tant avec la sous-unité δ qu'avec la sous-unité γ (Figure 5 de l'article n°1). Les contacts entre la tige centrale et l'anneau de sous-unités c impliquent principalement la sous-unité δ . Aussi, lorsque cet anneau tourne (dans le sens de la synthèse d'ATP) il exercera sur la sous-unité δ une force. Il faut que les interactions entre δ et γ résistent à cette force. Manifestement lorsque la sous-unité ϵ est absente cela n'est pas le cas, car la sous-unité δ se détache alors du complexe, avec comme conséquence des fuites de protons à travers le F_0 . En effet, on note que la déplétion en sous-unité ϵ s'accompagne d'une diminution du niveau d'accumulation de la sous-unité δ , indiquant que celle-ci n'arrive plus à se maintenir dans le complexe et est alors dégradée par l'une ou l'autre protéase mitochondriale. Si l'anneau tourne lentement, les interactions entre δ et γ devraient être moins sollicitées, et pourraient alors résister à la rotation de l'anneau malgré l'absence de la sous-unité ϵ . C'est ce que l'on observe dans le mutant c -L57F. Dans cette logique, la présence de la sous-unité ϵ peut être considérée comme nécessaire au maintien de l'intégrité de l'enzyme à un régime normal de fonctionnement.

De manière intéressante la sous-unité ϵ de l'ATP synthase mitochondriale n'a pas d'équivalent chez les bactéries où la tige centrale est constituée seulement de deux sous-unités, lesquelles sont homologues aux sous-unités δ et γ mitochondriales. Il faut noter ici qu'à l'origine, la mitochondrie était une bactérie proche du phylum des α -protéobactéries qui utilisaient de l'oxygène et un complexe ATP synthase de type F_1F_0 pour produire de l'ATP, comme les mitochondries actuelles. Cette bactérie se serait associée il y a deux milliards d'années à une cellule proto-eucaryote anaérobie ce qui a donné naissance aux cellules eucaryotes. Par la suite, les mitochondries se sont spécialisées dans le processus énergétique et les gènes mitochondriaux transférés au noyau. Selon ce schéma évolutif largement accepté aujourd'hui on peut considérer que la sous-unité ϵ de l'ATP synthase mitochondriale est née au sein des cellules eucaryotes après l'endosymbiose originelle. C'est également le cas pour d'autres sous-unités de l'ATP synthase mitochondriale qui comprend près d'une dizaine de sous-unités sans équivalent bactérien, ce qui leur vaut d'être qualifiées de « surnuméraire ». Les complexes de la chaîne respiratoire ont suivi une évolution similaire. Le complexe I par exemple contient plus de 40 sous-unités dans les mitochondries contre un peu plus de 10 chez les bactéries.

A priori, on peut considérer que ces sous-unités « surnuméraires » du système énergétique mitochondrial doivent avoir des fonctions propres aux mitochondries qui n'ont pas de raison d'être chez les bactéries. A l'appui de cette hypothèse il a par exemple été montré que des protéines du complexe III ont pour fonction chez les plantes de cliver les préséquences d'adressage des protéines mitochondriales d'origine nucléaire, soit une activité qui n'a évidemment aucune utilité chez les bactéries (Glaser *et al.* 1994). Un autre exemple bien étudié concerne les sous-unités *e* et *g* de l'ATP synthase. Il a été montré que ces sous-unités sont nécessaires à l'organisation supramoléculaire de l'ATP synthase sous forme de rubans constitués par une succession de dimères d'ATP synthase (Arnold *et al.* 1998). Cette organisation de l'ATP synthase est nécessaire à la formation des crêtes mitochondriales, des invaginations de la membrane interne qui permettent à la cellule de stocker d'avantage d'enzymes transductrices d'énergie. Ces observations illustrent bien l'évolution des mitochondries vers un système très spécialisé dans la production d'énergie cellulaire, ce qui a permis aux cellules d'acquérir une capacité énergétique bien plus importante comparativement aux bactéries. Notre étude indique que l'apparition de la sous-unité ϵ s'inscrit dans cette évolution. En effet, on peut imaginer qu'en plus d'un plus grand stockage en ATP synthase, la cellule eucaryote a cherché à accroître les performances de cette enzyme, c'est à dire sa vitesse de synthèse d'ATP tout en conservant son intégrité. Nos données appuient cette hypothèse en montrant que la cellule de levure est capable de s'affranchir de la sous-unité *e* si elle ralentit le fonctionnement de l'ATP synthase.

Bibliographie

- Butow, R. A., H. Zhu *et al.* (1989). "The role of a conserved dodecamer sequence in yeast mitochondrial gene expression." Genome **31**(2): 757-760.
- Contamine, V. and M. Picard (2000). "Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast." Microbiol Mol Biol Rev **64**(2): 281-315.
- Devenish, R. J., M. Prescott *et al.* (2008). "The structure and function of mitochondrial F1F0-ATP synthases." Int Rev Cell Mol Biol **267**: 1-58.
- Duvezin-Caubet, S., M. Caron *et al.* (2003). "The two rotor components of yeast mitochondrial ATP synthase are mechanically coupled by subunit delta." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13235-13240.
- Duvezin-Caubet, S., M. Rak *et al.* (2006). "A "petite obligate" mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: functional mtDNA is lethal in cells lacking the delta subunit of mitochondrial F1-ATPase." J Biol Chem **281**(24): 16305-16313.
- Finnegan, P. M., M. J. Payne *et al.* (1991). "Characterization of a yeast nuclear gene, AEP2, required for accumulation of mitochondrial mRNA encoding subunit 9 of the ATP synthase." Curr Genet **20**(1-2): 53-61.
- Foury, F., T. Roganti *et al.* (1998). "The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Lett **440**(3): 325-331.
- Giraud, M. F. and J. Velours (1997). "The absence of the mitochondrial ATP synthase delta subunit promotes a slow growth phenotype of rho- yeast cells by a lack of assembly of the catalytic sector F1." Eur J Biochem **245**(3): 813-818.
- Godard, F., E. Tetaud *et al.* (2011). "A genetic screen targeted on the FO component of mitochondrial ATP synthase in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **286**(20): 18181-18189.
- Guelin, E., J. Chevallier *et al.* (1993). "ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation and disruption of the ATP epsilon gene." J Biol Chem **268**(1): 161-167.
- Lai-Zhang, J., Y. Xiao *et al.* (1999). "Epistatic interactions of deletion mutants in the genes encoding the F1-ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Embo J **18**(1): 58-64.
- Paul, M. F., B. Guerin *et al.* (1992). "The C-terminal region of subunit 4 (subunit b) is essential for assembly of the F0 portion of yeast mitochondrial ATP synthase." Eur J Biochem **205**(1): 163-172.
- Payne, M. J., P. M. Finnegan *et al.* (1993). "Characterization of a second nuclear gene, AEP1, required for expression of the mitochondrial OLI1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*." Curr Genet **24**(1-2): 126-135.

- Sikorski, R. S. and P. Hieter (1989). "A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **122**(1): 19-27.
- Tetaud, E., F. Godard *et al.* (2014). "The depletion of F1 subunit {varepsilon} in yeast leads to an uncoupled respiratory phenotype that is rescued by mutations in the proton-translocating subunits of F0." Mol Biol Cell **25**(6): 791-799.
- Tzagoloff, A., A. Akai *et al.* (1975). "Assembly of the mitochondrial membrane system: isolation of nuclear and cytoplasmic mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with specific defects in mitochondrial functions." J Bacteriol **122**(3): 826-831.
- Walker, J. E. (2013). "The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown." Biochem Soc Trans **41**(1): 1-16.
- Xiao, Y., M. Metzl *et al.* (2000). "Partial uncoupling of the mitochondrial membrane by a heterozygous null mutation in the gene encoding the gamma- or delta-subunit of the yeast mitochondrial ATPase." J Biol Chem **275**(10): 6963-6968.
- Alvarez, J. M. (2000). "Use of Molecular Tools for Discriminating Between Two Populations of the Citrus Leafminer Parasitoid *Ageniaspis* (Hymenoptera: Encyrtidae)."
- Barrientos, A., D. Korr *et al.* (2002). "Shy1p is necessary for full expression of mitochondrial COX1 in the yeast model of Leigh's syndrome." Embo J **21**(1-2): 43-52.
- Bonneaud, N., O. Ozier-Kalogeropoulos *et al.* (1991). "A family of low and high copy replicative, integrative and single-stranded *S. cerevisiae*/*E. coli* shuttle vectors." Yeast **7**(6): 609-615.
- Bonnefoy, N. and T. D. Fox (2001). "Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria." Methods Cell Biol **65**: 381-396.
- Conde, J. and G. R. Fink (1976). "A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective for nuclear fusion." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(10): 3651-3655.
- Cross, F. R. (1997). "'Marker swap' plasmids: convenient tools for budding yeast molecular genetics." Yeast **13**(7): 647-653.
- Duvezin-Caubet, S., M. Caron *et al.* (2003). "The two rotor components of yeast mitochondrial ATP synthase are mechanically coupled by subunit delta." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13235-13240.
- Duvezin-Caubet, S., M. Rak *et al.* (2006). "A 'petite obligate' mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: functional mtDNA is lethal in cells lacking the delta subunit of mitochondrial F1-ATPase." J Biol Chem **281**(24): 16305-16313.
- Emaus, R. K., R. Grunwald *et al.* (1986). "Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties." Biochim Biophys Acta **850**(3): 436-448.
- Fox, T. D., J. C. Sanford *et al.* (1988). "Plasmids can stably transform yeast mitochondria lacking endogenous mtDNA." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(19): 7288-7292.

- Gari, E., L. Piedrafita *et al.* (1997). "A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*." *Yeast* **13**(9): 837-848.
- Gietz, R. D. and R. H. Schiestl (2007). "High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method." *Nat Protoc* **2**(1): 31-34.
- Giraud, M. F. and J. Velours (1997). "The absence of the mitochondrial ATP synthase delta subunit promotes a slow growth phenotype of rho- yeast cells by a lack of assembly of the catalytic sector F1." *Eur J Biochem* **245**(3): 813-818.
- Grandier-Vazeille, X. and M. Guerin (1996). "Separation by blue native and colorless native polyacrylamide gel electrophoresis of the oxidative phosphorylation complexes of yeast mitochondria solubilized by different detergents: specific staining of the different complexes." *Anal Biochem* **242**(2): 248-254.
- Guerin, B., P. Labbe *et al.* (1979). "Preparation of yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*) with good P/O and respiratory control ratios." *Methods Enzymol* **55**: 149-159.
- Guldener, U., S. Heck *et al.* (1996). "A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast." *Nucleic Acids Res* **24**(13): 2519-2524.
- Hutter, K. J. and H. E. Eipel (1979). "Microbial determinations by flow cytometry." *J Gen Microbiol* **113**(2): 369-375.
- Kun, E., E. Kirsten *et al.* (1979). "Stabilization of mitochondrial functions with digitonin." *Methods Enzymol* **55**: 115-118.
- Kunkele, K. P., S. Heins *et al.* (1998). "The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria." *Cell* **93**(6): 1009-1019.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." (0028-0836 (Print)).
- Lefrancois, P., G. M. Euskirchen *et al.* (2009). "Efficient yeast ChIP-Seq using multiplex short-read DNA sequencing." *BMC Genomics* **10**: 37.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough *et al.* (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." *J Biol Chem* **193**(1): 265-275.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." *Nucleic Acids Res* **29**(9): e45.
- Rak, M., E. Tetaud *et al.* (2007). "Yeast cells lacking the mitochondrial gene encoding the ATP synthase subunit 6 exhibit a selective loss of complex IV and unusual mitochondrial morphology." *J Biol Chem* **282**(15): 10853-10864.
- Rigoulet, M. and B. Guerin (1979). "Phosphate transport and ATP synthesis in yeast mitochondria: effect of a new inhibitor: the tribenzylphosphate." *FEBS Lett* **102**(1): 18-22.

- Schagger, H. and G. von Jagow (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal Biochem **166**(2): 368-379.
- Schagger, H. and G. von Jagow (1991). "Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form." Anal Biochem **199**(2): 223-231.
- Somlo, M. (1968). "Induction and repression of mitochondrial ATPase in yeast." Eur J Biochem **5**(2): 276-284.
- Steele, D. F., C. A. Butler *et al.* (1996). "Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(11): 5253-5257.
- Valach, M., L. Tomaska *et al.* (2008). "Preparation of yeast mitochondrial DNA for direct sequence analysis." Curr Genet **54**(2): 105-109.
- Wach, A., A. Brachat *et al.* (1994). "New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast **10**(13): 1793-1808.
- Abrahams, J. P., A. G. Leslie *et al.* (1994). "Structure at 2.8 Å resolution of F₁-ATPase from bovine heart mitochondria." Nature **370**(6491): 621-628.
- Ackerman, S. H., D. L. Gatti *et al.* (1991). "ATP13, a nuclear gene of *Saccharomyces cerevisiae* essential for the expression of subunit 9 of the mitochondrial ATPase." FEBS Lett **278**(2): 234-238.
- Ackerman, S. H. and A. Tzagoloff (1990). "Identification of two nuclear genes (ATP11, ATP12) required for assembly of the yeast F₁-ATPase." Proc Natl Acad Sci U S A **87**(13): 4986-4990.
- Ackerman, S. H. and A. Tzagoloff (2005). "Function, structure, and biogenesis of mitochondrial ATP synthase." Prog Nucleic Acid Res Mol Biol **80**: 95-133.
- Allen, R. D. (1995). "Membrane tubulation and proton pumps." Protoplasma **189**(1-2): 1-8.
- Altamura, N., N. Capitanio *et al.* (1996). "The *Saccharomyces cerevisiae* OXA1 gene is required for the correct assembly of cytochrome c oxidase and oligomycin-sensitive ATP synthase." FEBS Lett **382**(1-2): 111-115.
- Andersson, S. G., A. Zomorodipour *et al.* (1998). "The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria." Nature **396**(6707): 133-140.
- Angevine, C. M. and R. H. Fillingame (2003). "Aqueous access channels in subunit a of rotary ATP synthase." J Biol Chem **278**(8): 6066-6074.
- Angevine, C. M., K. A. Herold *et al.* (2003). "Aqueous access pathways in subunit a of rotary ATP synthase extend to both sides of the membrane." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13179-13183.
- Arechaga, I., P. J. Butler *et al.* (2002). "Self-assembly of ATP synthase subunit c rings." FEBS Lett **515**(1-3): 189-193.

- Arnold, I., K. Pfeiffer *et al.* (1998). "Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits." Embo J **17**(24): 7170-7178.
- Arnold, I., K. Pfeiffer *et al.* (1999). "ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of subunit j and disruption of the ATP18 gene." J Biol Chem **274**(1): 36-40.
- Asher, E. B., O. Groudinsky *et al.* (1989). "Novel class of nuclear genes involved in both mRNA splicing and protein synthesis in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria." Mol Gen Genet **215**(3): 517-528.
- Barrientos, A., D. Korr *et al.* (2002). "Shy1p is necessary for full expression of mitochondrial COX1 in the yeast model of Leigh's syndrome." Embo J **21**(1-2): 43-52.
- Barrientos, A., A. Zambrano *et al.* (2004). "Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*." Embo J **23**(17): 3472-3482.
- Bauer, M., M. Behrens *et al.* (1994). "PET1402, a nuclear gene required for proteolytic processing of cytochrome oxidase subunit 2 in yeast." Mol Gen Genet **245**(3): 272-278.
- Becker, T., L. Bottinger *et al.* (2012). "Mitochondrial protein import: from transport pathways to an integrated network." Trends Biochem Sci **37**(3): 85-91.
- Becker, T., L. S. Wenz *et al.* (2011). "The mitochondrial import protein Mim1 promotes biogenesis of multispinning outer membrane proteins." J Cell Biol **194**(3): 387-395.
- Beilharz, M. W., G. S. Cobon *et al.* (1982). "Physiological alteration of the pattern of transcription of the oli2 region of yeast mitochondrial DNA." FEBS Lett **147**(2): 235-238.
- Berger, K. H. and M. P. Yaffe (2000). "Mitochondrial DNA inheritance in *Saccharomyces cerevisiae*." Trends Microbiol **8**(11): 508-513.
- Bhatia-Kissova, I. and N. Camougrand (2010). "Mitophagy in yeast: actors and physiological roles." FEMS Yeast Res **10**(8): 1023-1034.
- Biswas, T. K. and G. S. Getz (1986). "Nucleotides flanking the promoter sequence influence the transcription of the yeast mitochondrial gene coding for ATPase subunit 9." Proc Natl Acad Sci U S A **83**(2): 270-274.
- Bonneaud, N., O. Ozier-Kalogeropoulos *et al.* (1991). "A family of low and high copy replicative, integrative and single-stranded *S. cerevisiae*/*E. coli* shuttle vectors." Yeast **7**(6): 609-615.
- Bonnefoy, N., F. Chalvet *et al.* (1994a). "OXA1, a *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene whose sequence is conserved from prokaryotes to eukaryotes controls cytochrome oxidase biogenesis." J Mol Biol **239**(2): 201-212.
- Bonnefoy, N. and T. D. Fox (2001). "Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria." Methods Cell Biol **65**: 381-396.

- Bonnefoy, N., M. Kermorgant *et al.* (1994b). "Cloning of a human gene involved in cytochrome oxidase assembly by functional complementation of an oxal- mutation in *Saccharomyces cerevisiae*." Proc Natl Acad Sci U S A **91**(25): 11978-11982.
- Boyer, P. D. (1993). "The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities." Biochim Biophys Acta **1140**(3): 215-250.
- Boyer, P. D. (1997). "The ATP synthase--a splendid molecular machine." Annu Rev Biochem **66**: 717-749.
- Braig, K., R. I. Menz *et al.* (2000). "Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase inhibited by Mg(2+) ADP and aluminium fluoride." Structure **8**(6): 567-573.
- Brix, J., S. Rudiger *et al.* (1999). "Distribution of binding sequences for the mitochondrial import receptors Tom20, Tom22, and Tom70 in a presequence-carrying preprotein and a non-cleavable preprotein." J Biol Chem **274**(23): 16522-16530.
- Broadley, S. A., C. M. Demlow *et al.* (2001). "Peripheral mitochondrial inner membrane protein, Mss2p, required for export of the mitochondrially coded Cox2p C tail in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Cell Biol **21**(22): 7663-7672.
- Burger, G., M. W. Gray *et al.* (2003). "Mitochondrial genomes: anything goes." Trends Genet **19**(12): 709-716.
- Butow, R. A., H. Zhu *et al.* (1989). "The role of a conserved dodecamer sequence in yeast mitochondrial gene expression." Genome **31**(2): 757-760.
- Cabezón, E., I. Arechaga *et al.* (2000). "Dimerization of bovine F1-ATPase by binding the inhibitor protein, IF1." J Biol Chem **275**(37): 28353-28355.
- Cabezón, E., M. G. Montgomery *et al.* (2003). "The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1." Nat Struct Biol **10**(9): 744-750.
- Cain, B. D. (2000). "Mutagenic analysis of the F0 stator subunits." J Bioenerg Biomembr **32**(4): 365-371.
- Camougrand, N., P. Pelissier *et al.* (1995). "NCA2, a second nuclear gene required for the control of mitochondrial synthesis of subunits 6 and 8 of ATP synthase in *Saccharomyces cerevisiae*." J Mol Biol **247**(4): 588-596.
- Cedergren, R., M. W. Gray *et al.* (1988). "The evolutionary relationships among known life forms." J Mol Evol **28**(1-2): 98-112.
- Chacinska, A., C. M. Koehler *et al.* (2009). "Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms." Cell **138**(4): 628-644.
- Chacinska, A., M. Lind *et al.* (2005). "Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17." Cell **120**(6): 817-829.
- Chacinska, A., S. Pfannschmidt *et al.* (2004). "Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins." Embo J **23**(19): 3735-3746.

- Chen, Y., A. Beck *et al.* (2005). "Characterization of TRZ1, a yeast homolog of the human candidate prostate cancer susceptibility gene ELAC2 encoding tRNase Z." BMC Mol Biol **6**: 12.
- Chinnery, P. F., D. R. Thorburn *et al.* (2000). "The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy: random drift, selection or both?" Trends Genet **16**(11): 500-505.
- Christianson, T. and M. Rabinowitz (1983). "Identification of multiple transcriptional initiation sites on the yeast mitochondrial genome by in vitro capping with guanylyltransferase." J Biol Chem **258**(22): 14025-14033.
- Cingolani, G. and T. M. Duncan (2011). "Structure of the ATP synthase catalytic complex (F₁) from *Escherichia coli* in an autoinhibited conformation." Nat Struct Mol Biol **18**(6): 701-707.
- Collinson, I. R., J. M. Skehel *et al.* (1996). "The F₁F₀-ATPase complex from bovine heart mitochondria: the molar ratio of the subunits in the stalk region linking the F₁ and F₀ domains." Biochemistry **35**(38): 12640-12646.
- Collinson, I. R., M. J. van Raaij *et al.* (1994). "ATP synthase from bovine heart mitochondria. In vitro assembly of a stalk complex in the presence of F₁-ATPase and in its absence." J Mol Biol **242**(4): 408-421.
- Conde, J. and G. R. Fink (1976). "A mutant of *Saccharomyces cerevisiae* defective for nuclear fusion." Proc Natl Acad Sci U S A **73**(10): 3651-3655.
- Contamine, V. and M. Picard (2000). "Maintenance and integrity of the mitochondrial genome: a plethora of nuclear genes in the budding yeast." Microbiol Mol Biol Rev **64**(2): 281-315.
- Costanzo, M. C. and T. D. Fox (1988). "Specific translational activation by nuclear gene products occurs in the 5' untranslated leader of a yeast mitochondrial mRNA." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(8): 2677-2681.
- Costanzo, M. C. and T. D. Fox (1993). "Suppression of a defect in the 5' untranslated leader of mitochondrial COX3 mRNA by a mutation affecting an mRNA-specific translational activator protein." Mol Cell Biol **13**(8): 4806-4813.
- Cross, F. R. (1997). "'Marker swap' plasmids: convenient tools for budding yeast molecular genetics." Yeast **13**(7): 647-653.
- Davies, K. M., M. Strauss *et al.* (2011). "Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **108**(34): 14121-14126.
- de Zamaroczy, M. and G. Bernardi (1986). "The primary structure of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*--a review." Gene **47**(2-3): 155-177.
- Devenish, R. J., M. Prescott *et al.* (2008). "The structure and function of mitochondrial F₁F₀-ATP synthases." Int Rev Cell Mol Biol **267**: 1-58.
- Dickson, V. K., J. A. Silvester *et al.* (2006). "On the structure of the stator of the mitochondrial ATP synthase." Embo J **25**(12): 2911-2918.

- Dienhart, M., K. Pfeiffer *et al.* (2002). "Formation of the yeast F1F0-ATP synthase dimeric complex does not require the ATPase inhibitor protein, Inh1." J Biol Chem **277**(42): 39289-39295.
- Dmitriev, O. Y., P. C. Jones *et al.* (1999). "Structure of the subunit c oligomer in the F1Fo ATP synthase: model derived from solution structure of the monomer and cross-linking in the native enzyme." Proc Natl Acad Sci U S A **96**(14): 7785-7790.
- Dmochowska, A., P. Golik *et al.* (1995). "The novel nuclear gene DSS-1 of *Saccharomyces cerevisiae* is necessary for mitochondrial biogenesis." Curr Genet **28**(2): 108-112.
- Dolezal, P., V. Likic *et al.* (2006). "Evolution of the molecular machines for protein import into mitochondria." Science **313**(5785): 314-318.
- Dong, H. and R. H. Fillingame (2010). "Chemical reactivities of cysteine substitutions in subunit a of ATP synthase define residues gating H⁺ transport from each side of the membrane." J Biol Chem **285**(51): 39811-39818.
- Duvezin-Caubet, S., M. Caron *et al.* (2003). "The two rotor components of yeast mitochondrial ATP synthase are mechanically coupled by subunit delta." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13235-13240.
- Duvezin-Caubet, S., M. Rak *et al.* (2006). "A "petite obligate" mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: functional mtDNA is lethal in cells lacking the delta subunit of mitochondrial F1-ATPase." J Biol Chem **281**(24): 16305-16313.
- Dyall, S. D., M. T. Brown *et al.* (2004). "Ancient invasions: from endosymbionts to organelles." Science **304**(5668): 253-257.
- Dyall, S. D. and P. J. Johnson (2000). "Origins of hydrogenosomes and mitochondria: evolution and organelle biogenesis." Curr Opin Microbiol **3**(4): 404-411.
- Dziembowski, A., M. Malewicz *et al.* (1998). "The yeast nuclear gene DSS1, which codes for a putative RNase II, is necessary for the function of the mitochondrial degradosome in processing and turnover of RNA." Mol Gen Genet **260**(1): 108-114.
- Dziembowski, A., J. Piwowarski *et al.* (2003). "The yeast mitochondrial degradosome. Its composition, interplay between RNA helicase and RNase activities and the role in mitochondrial RNA metabolism." J Biol Chem **278**(3): 1603-1611.
- Egner, A., S. Jakobs *et al.* (2002). "Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast." Proc Natl Acad Sci U S A **99**(6): 3370-3375.
- Ellis, T. P., K. G. Helfenbein *et al.* (2004). "Aep3p stabilizes the mitochondrial bicistronic mRNA encoding subunits 6 and 8 of the H⁺-translocating ATP synthase of *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **279**(16): 15728-15733.
- Ellis, T. P., H. B. Lukins *et al.* (1999). "Suppression of a nuclear aep2 mutation in *Saccharomyces cerevisiae* by a base substitution in the 5'-untranslated region of the mitochondrial oli1 gene encoding subunit 9 of ATP synthase." Genetics **151**(4): 1353-1363.

- Emaus, R. K., R. Grunwald *et al.* (1986). "Rhodamine 123 as a probe of transmembrane potential in isolated rat-liver mitochondria: spectral and metabolic properties." Biochim Biophys Acta **850**(3): 436-448.
- Ernster, L. and G. Schatz (1981). "Mitochondria: a historical review." J Cell Biol **91**(3 Pt 2): 227s-255s.
- Fekete, Z., T. P. Ellis *et al.* (2008). "Pet127 governs a 5' -> 3'-exonuclease important in maturation of apocytochrome b mRNA in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **283**(7): 3767-3772.
- Fillingame, R. H. (1997). "Coupling H⁺ transport and ATP synthesis in F1F0-ATP synthases: glimpses of interacting parts in a dynamic molecular machine." J Exp Biol **200**(Pt 2): 217-224.
- Fillingame, R. H., C. M. Angevine *et al.* (2002). "Coupling proton movements to c-ring rotation in F(1)F(o) ATP synthase: aqueous access channels and helix rotations at the a-c interface." Biochim Biophys Acta **1555**(1-3): 29-36.
- Fillingame, R. H., C. M. Angevine *et al.* (2003). "Mechanics of coupling proton movements to c-ring rotation in ATP synthase." FEBS Lett **555**(1): 29-34.
- Fillingame, R. H. and O. Y. Dmitriev (2002). "Structural model of the transmembrane Fo rotary sector of H⁺-transporting ATP synthase derived by solution NMR and intersubunit cross-linking in situ." Biochim Biophys Acta **1565**(2): 232-245.
- Fillingame, R. H. and P. R. Steed (2014). "Half channels mediating H transport and the mechanism of gating in the F sector of *Escherichia coli* FF ATP synthase." Biochim Biophys Acta.
- Finnegan, P. M., T. P. Ellis *et al.* (1995). "The mature AEP2 gene product of *Saccharomyces cerevisiae*, required for the expression of subunit 9 of ATP synthase, is a 58 kDa mitochondrial protein." FEBS Lett **368**(3): 505-508.
- Finnegan, P. M., M. J. Payne *et al.* (1991). "Characterization of a yeast nuclear gene, AEP2, required for accumulation of mitochondrial mRNA encoding subunit 9 of the ATP synthase." Curr Genet **20**(1-2): 53-61.
- Foury, F., T. Roganti *et al.* (1998). "The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*." FEBS Lett **440**(3): 325-331.
- Fox, T. D. (2012). "Mitochondrial protein synthesis, import, and assembly." Genetics **192**(4): 1203-1234.
- Fox, T. D., J. C. Sanford *et al.* (1988). "Plasmids can stably transform yeast mitochondria lacking endogenous mtDNA." Proc Natl Acad Sci U S A **85**(19): 7288-7292.
- Fritz, S., D. Rapaport *et al.* (2001). "Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion." J Cell Biol **152**(4): 683-692.
- Fronzes, R., T. Weimann *et al.* (2006). "The peripheral stalk participates in the yeast ATP synthase dimerization independently of e and g subunits." Biochemistry **45**(21): 6715-6723.

- Gao, Y. Q., W. Yang *et al.* (2005). "A structure-based model for the synthesis and hydrolysis of ATP by F1-ATPase." Cell **123**(2): 195-205.
- Gari, E., L. Piedrafita *et al.* (1997). "A set of vectors with a tetracycline-regulatable promoter system for modulated gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*." Yeast **13**(9): 837-848.
- Geissler, A., A. Chacinska *et al.* (2002). "The mitochondrial presequence translocase: an essential role of Tim50 in directing preproteins to the import channel." Cell **111**(4): 507-518.
- Gietz, R. D. and R. H. Schiestl (2007). "High-efficiency yeast transformation using the LiAc/SS carrier DNA/PEG method." Nat Protoc **2**(1): 31-34.
- Giraud, M. F. and J. Velours (1994). "ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of the F1 delta subunit, sequence and disruption of the structural gene." Eur J Biochem **222**(3): 851-859.
- Giraud, M. F. and J. Velours (1997). "The absence of the mitochondrial ATP synthase delta subunit promotes a slow growth phenotype of rho- yeast cells by a lack of assembly of the catalytic sector F1." Eur J Biochem **245**(3): 813-818.
- Glaser, E., A. Eriksson *et al.* (1994). "Bifunctional role of the bc1 complex in plants. Mitochondrial bc1 complex catalyses both electron transport and protein processing." FEBS Lett **346**(1): 83-87.
- Godard, F., E. Tetaud *et al.* (2011). "A genetic screen targeted on the FO component of mitochondrial ATP synthase in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **286**(20): 18181-18189.
- Golik, P., T. Szczepanek *et al.* (1995). "The *S. cerevisiae* nuclear gene SUV3 encoding a putative RNA helicase is necessary for the stability of mitochondrial transcripts containing multiple introns." Curr Genet **28**(3): 217-224.
- Grandier-Vazeille, X. and M. Guerin (1996). "Separation by blue native and colorless native polyacrylamide gel electrophoresis of the oxidative phosphorylation complexes of yeast mitochondria solubilized by different detergents: specific staining of the different complexes." Anal Biochem **242**(2): 248-254.
- Gray, M. W. (1999). "Evolution of organellar genomes." Curr Opin Genet Dev **9**(6): 678-687.
- Gray, M. W., G. Burger *et al.* (1999). "Mitochondrial evolution." Science **283**(5407): 1476-1481.
- Gray, M. W., R. Cedergren *et al.* (1989). "On the evolutionary origin of the plant mitochondrion and its genome." Proc Natl Acad Sci U S A **86**(7): 2267-2271.
- Gray, M. W., D. Sankoff *et al.* (1984). "On the evolutionary descent of organisms and organelles: a global phylogeny based on a highly conserved structural core in small subunit ribosomal RNA." Nucleic Acids Res **12**(14): 5837-5852.
- Groudinsky, O., I. Bousquet *et al.* (1993). "The NAM1/MTF2 nuclear gene product is selectively required for the stability and/or processing of mitochondrial transcripts of

- the *atp6* and of the mosaic, *cox1* and *cytb* genes in *Saccharomyces cerevisiae*." Mol Gen Genet **240**(3): 419-427.
- Guelin, E., J. Chevallier *et al.* (1993). "ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation and disruption of the ATP epsilon gene." J Biol Chem **268**(1): 161-167.
- Guerin, B., P. Labbe *et al.* (1979). "Preparation of yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*) with good P/O and respiratory control ratios." Methods Enzymol **55**: 149-159.
- Guldener, U., S. Heck *et al.* (1996). "A new efficient gene disruption cassette for repeated use in budding yeast." Nucleic Acids Res **24**(13): 2519-2524.
- Habersetzer, J., W. Ziani *et al.* (2013). "ATP synthase oligomerization: from the enzyme models to the mitochondrial morphology." Int J Biochem Cell Biol **45**(1): 99-105.
- Hackstadt, T. (1996). "The biology of rickettsiae." (1056-2044 (Print)).
- Hadikusumo, R. G., S. Meltzer *et al.* (1988). "The definition of mitochondrial H⁺ ATPase assembly defects in mit- mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with a monoclonal antibody to the enzyme complex as an assembly probe." Biochim Biophys Acta **933**(1): 212-222.
- Haffter, P. and T. D. Fox (1992). "Suppression of carboxy-terminal truncations of the yeast mitochondrial mRNA-specific translational activator PET122 by mutations in two new genes, MRP17 and PET127." Mol Gen Genet **235**(1): 64-73.
- Hashimoto, T., Y. Yoshida *et al.* (1983). "Binding properties of an intrinsic ATPase inhibitor and occurrence in yeast mitochondria of a protein factor which stabilizes and facilitates the binding of the inhibitor to F1F0-ATPase." J Biochem **94**(3): 715-720.
- Hashimoto, T., Y. Yoshida *et al.* (1984). "Purification and properties of factors in yeast mitochondria stabilizing the F1F0-ATPase-inhibitor complex." J Biochem **95**(1): 131-136.
- Hashimoto, T., Y. Yoshida *et al.* (1990a). "Regulatory proteins of F1F0-ATPase: role of ATPase inhibitor." J Bioenerg Biomembr **22**(1): 27-38.
- Hashimoto, T., Y. Yoshida *et al.* (1990b). "Simultaneous bindings of ATPase inhibitor and 9K protein to F1F0-ATPase in the presence of 15K protein in yeast mitochondria." J Biochem **108**(1): 17-20.
- He, S. and T. D. Fox (1999). "Mutations affecting a yeast mitochondrial inner membrane protein, *pnt1p*, block export of a mitochondrially synthesized fusion protein from the matrix." Mol Cell Biol **19**(10): 6598-6607.
- Helfenbein, K. G., T. P. Ellis *et al.* (2003). "ATP22, a nuclear gene required for expression of the F0 sector of mitochondrial ATPase in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **278**(22): 19751-19756.
- Hell, K., W. Neupert *et al.* (2001). "Oxa1p acts as a general membrane insertion machinery for proteins encoded by mitochondrial DNA." Embo J **20**(6): 1281-1288.

- Herrmann, J. M., M. W. Woellhaf *et al.* (2013). "Control of protein synthesis in yeast mitochondria: the concept of translational activators." Biochim Biophys Acta **1833**(2): 286-294.
- Hofmann, T. J., J. Min *et al.* (1993). "Formation of the 3' end of yeast mitochondrial mRNAs occurs by site-specific cleavage two bases downstream of a conserved dodecamer sequence." Yeast **9**(12): 1319-1330.
- Hollingsworth, M. J. and N. C. Martin (1986). "RNase P activity in the mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae* depends on both mitochondrion and nucleus-encoded components." Mol Cell Biol **6**(4): 1058-1064.
- Hong, S. and P. L. Pedersen (2002). "ATP synthase of yeast: structural insight into the different inhibitory potencies of two regulatory peptides and identification of a new potential regulator." Arch Biochem Biophys **405**(1): 38-43.
- Hutter, K. J. and H. E. Eipel (1979). "Microbial determinations by flow cytometry." J Gen Microbiol **113**(2): 369-375.
- Iino, R., R. Hasegawa *et al.* (2009). "Mechanism of inhibition by C-terminal alpha-helices of the epsilon subunit of *Escherichia coli* FoF1-ATP synthase." J Biol Chem **284**(26): 17457-17464.
- Jakobs, S. (2006). "High resolution imaging of live mitochondria." Biochim Biophys Acta **1763**(5-6): 561-575.
- Jang, S. H. and J. A. Jaehning (1991). "The yeast mitochondrial RNA polymerase specificity factor, MTF1, is similar to bacterial sigma factors." J Biol Chem **266**(33): 22671-22677.
- Jia, L., M. Dienhart *et al.* (2003). "Yeast Oxa1 interacts with mitochondrial ribosomes: the importance of the C-terminal region of Oxa1." Embo J **22**(24): 6438-6447.
- Jia, L., M. K. Dienhart *et al.* (2007). "Oxa1 directly interacts with Atp9 and mediates its assembly into the mitochondrial F1Fo-ATP synthase complex." Mol Biol Cell **18**(5): 1897-1908.
- Jiang, W. and R. H. Fillingame (1998). "Interacting helical faces of subunits a and c in the F1Fo ATP synthase of *Escherichia coli* defined by disulfide cross-linking." Proc Natl Acad Sci U S A **95**(12): 6607-6612.
- Jiang, X. and X. Wang (2004). "Cytochrome C-mediated apoptosis." Annu Rev Biochem **73**: 87-106.
- Kagawa, R., M. G. Montgomery *et al.* (2004). "The structure of bovine F1-ATPase inhibited by ADP and beryllium fluoride." Embo J **23**(14): 2734-2744.
- Karlok, M. A., S. H. Jang *et al.* (2002). "Mutations in the yeast mitochondrial RNA polymerase specificity factor, Mtf1, verify an essential role in promoter utilization." J Biol Chem **277**(31): 28143-28149.
- Kato-Yamada, Y., H. Noji *et al.* (1998). "Direct observation of the rotation of epsilon subunit in F1-ATPase." J Biol Chem **273**(31): 19375-19377.

- Koonin, E. V. (2010). "The origin and early evolution of eukaryotes in the light of phylogenomics." Genome Biol **11**(5): 209.
- Krause, K. and C. L. Dieckmann (2004). "Analysis of transcription asymmetries along the tRNAE-COB operon: evidence for transcription attenuation and rapid RNA degradation between coding sequences." Nucleic Acids Res **32**(21): 6276-6283.
- Kucharczyk, R., M. Zick *et al.* (2009). "Mitochondrial ATP synthase disorders: molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches." Biochim Biophys Acta **1793**(1): 186-199.
- Kun, E., E. Kirsten *et al.* (1979). "Stabilization of mitochondrial functions with digitonin." Methods Enzymol **55**: 115-118.
- Kunkele, K. P., S. Heins *et al.* (1998). "The preprotein translocation channel of the outer membrane of mitochondria." Cell **93**(6): 1009-1019.
- Laemmli, U. K. (1970). "Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4." (0028-0836 (Print)).
- Lai-Zhang, J., Y. Xiao *et al.* (1999). "Epistatic interactions of deletion mutants in the genes encoding the F1-ATPase in yeast *Saccharomyces cerevisiae*." Embo J **18**(1): 58-64.
- Lane, N. and W. Martin (2010). "The energetics of genome complexity." Nature **467**(7318): 929-934.
- Lau, W. C. and J. L. Rubinstein (2012). "Subnanometre-resolution structure of the intact *Thermus thermophilus* H⁺-driven ATP synthase." Nature **481**(7380): 214-218.
- Lee, C., A. S. Tibbetts *et al.* (2009). "Yeast AEP3p is an accessory factor in initiation of mitochondrial translation." J Biol Chem **284**(49): 34116-34125.
- Lefebvre-Legendre, L., J. Vaillier *et al.* (2001). "Identification of a nuclear gene (FMC1) required for the assembly/stability of yeast mitochondrial F(1)-ATPase in heat stress conditions." J Biol Chem **276**(9): 6789-6796.
- Lefrancois, P., G. M. Euskirchen *et al.* (2009). "Efficient yeast ChIP-Seq using multiplex short-read DNA sequencing." BMC Genomics **10**: 37.
- Li, H. and H. P. Zassenhaus (1999). "Purification and characterization of an RNA dodecamer sequence binding protein from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*." Biochem Biophys Res Commun **261**(3): 740-745.
- Li, H. and H. P. Zassenhaus (2000). "Phosphorylation is required for high-affinity binding of DBP, a yeast mitochondrial site-specific RNA binding protein." Curr Genet **37**(6): 356-363.
- Lipinski, K. A., A. Kaniak-Golik *et al.* (2010). "Maintenance and expression of the *S. cerevisiae* mitochondrial genome--from genetics to evolution and systems biology." Biochim Biophys Acta **1797**(6-7): 1086-1098.
- Lowry, O. H., N. J. Rosebrough *et al.* (1951). "Protein measurement with the Folin phenol reagent." J Biol Chem **193**(1): 265-275.

- Mannella, C. A., M. Marko *et al.* (1997). "Reconsidering mitochondrial structure: new views of an old organelle." Trends Biochem Sci **22**(2): 37-38.
- Margossian, S. P. and R. A. Butow (1996). "RNA turnover and the control of mitochondrial gene expression." Trends Biochem Sci **21**(10): 392-396.
- Margulis, L. (1970). Origin of Eukaryotic Cells, Yale University Press.
- Martos, A. (2012). Relocalisation expérimentale de gènes mitochondriaux au noyau.
- Matsubara, H., T. Hase *et al.* (1981). "Amino acid sequence of an intrinsic inhibitor of mitochondrial ATPase from yeast." J Biochem **90**(4): 1159-1165.
- Matsubara, H., K. Inoue *et al.* (1983). "A stabilizing factor of yeast mitochondrial F1F0-ATPase-inhibitor complex: common amino acid sequence with yeast ATPase inhibitor and E. coli epsilon and bovine delta subunits." J Biochem **94**(1): 315-318.
- Matthies, D., L. Preiss *et al.* (2009). "The c13 ring from a thermoalkaliphilic ATP synthase reveals an extended diameter due to a special structural region." J Mol Biol **388**(3): 611-618.
- McMullin, T. W. and T. D. Fox (1993). "COX3 mRNA-specific translational activator proteins are associated with the inner mitochondrial membrane in *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **268**(16): 11737-11741.
- Meier, T., P. Polzer *et al.* (2005). "Structure of the rotor ring of F-Type Na⁺-ATPase from *Ilyobacter tartaricus*." Science **308**(5722): 659-662.
- Menz, R. I., J. E. Walker *et al.* (2001). "Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites: implications for the mechanism of rotary catalysis." Cell **106**(3): 331-341.
- Mesecke, N., N. Terziyska *et al.* (2005). "A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import." Cell **121**(7): 1059-1069.
- Michaelis, U., A. Korte *et al.* (1991). "Association of cytochrome b translational activator proteins with the mitochondrial membrane: implications for cytochrome b expression in yeast." Mol Gen Genet **230**(1-2): 177-185.
- Michon, T., M. Galante *et al.* (1988). "NH₂-terminal sequence of the isolated yeast ATP synthase subunit 6 reveals post-translational cleavage." Eur J Biochem **172**(3): 621-625.
- Milenkovic, D., T. Ramming *et al.* (2009). "Identification of the signal directing Tim9 and Tim10 into the intermembrane space of mitochondria." Mol Biol Cell **20**(10): 2530-2539.
- Min, J. and H. P. Zassenhaus (1993). "Identification of a protein complex that binds to a dodecamer sequence found at the 3' ends of yeast mitochondrial mRNAs." Mol Cell Biol **13**(7): 4167-4173.
- Mitchell, P. (1961). "Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism." Nature **191**: 144-148.

- Moore, K. J., C. M. Angevine *et al.* (2008). "The cytoplasmic loops of subunit a of Escherichia coli ATP synthase may participate in the proton translocating mechanism." J Biol Chem **283**(19): 13044-13052.
- Moore, K. J. and R. H. Fillingame (2008). "Structural interactions between transmembrane helices 4 and 5 of subunit a and the subunit c ring of Escherichia coli ATP synthase." J Biol Chem **283**(46): 31726-31735.
- Moore, K. J. and R. H. Fillingame (2013). "Obstruction of transmembrane helical movements in subunit a blocks proton pumping by F1Fo ATP synthase." J Biol Chem **288**(35): 25535-25541.
- Mulero, J. J. and T. D. Fox (1993). "Alteration of the Saccharomyces cerevisiae COX2 mRNA 5'-untranslated leader by mitochondrial gene replacement and functional interaction with the translational activator protein PET111." Mol Biol Cell **4**(12): 1327-1335.
- Naithani, S., S. A. Saracco *et al.* (2003). "Interactions among COX1, COX2, and COX3 mRNA-specific translational activator proteins on the inner surface of the mitochondrial inner membrane of Saccharomyces cerevisiae." Mol Biol Cell **14**(1): 324-333.
- Nakagawa, K., N. Morishima *et al.* (1991). "A maturase-like subunit of the sequence-specific endonuclease endo.SceI from yeast mitochondria." J Biol Chem **266**(3): 1977-1984.
- Neupert, W. and J. M. Herrmann (2007). "Translocation of proteins into mitochondria." Annu Rev Biochem **76**: 723-749.
- Noji, H., K. Hasler *et al.* (1999). "Rotation of Escherichia coli F(1)-ATPase." Biochem Biophys Res Commun **260**(3): 597-599.
- Noji, H., R. Yasuda *et al.* (1997). "Direct observation of the rotation of F1-ATPase." Nature **386**(6622): 299-302.
- Norais, N., D. Prome *et al.* (1991). "ATP synthase of yeast mitochondria. Characterization of subunit d and sequence analysis of the structural gene ATP7." J Biol Chem **266**(25): 16541-16549.
- Okamoto, K. and J. M. Shaw (2005). "Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes." Annu Rev Genet **39**: 503-536.
- Osinga, K. A., E. De Vries *et al.* (1984). "Processing of yeast mitochondrial messenger RNAs at a conserved dodecamer sequence." Embo J **3**(4): 829-834.
- Osman, C., C. Wilmes *et al.* (2007). "Prohibitins interact genetically with Atp23, a novel processing peptidase and chaperone for the F1Fo-ATP synthase." Mol Biol Cell **18**(2): 627-635.
- Ott, M. and J. M. Herrmann (2010). "Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins." Biochim Biophys Acta **1803**(6): 767-775.
- Ott, M., M. Prestele *et al.* (2006). "Mba1, a membrane-associated ribosome receptor in mitochondria." Embo J **25**(8): 1603-1610.

- Paschen, S. A., T. Waizenegger *et al.* (2003). "Evolutionary conservation of biogenesis of beta-barrel membrane proteins." Nature **426**(6968): 862-866.
- Paul, M. F., S. Ackerman *et al.* (1994). "Cloning of the yeast ATP3 gene coding for the gamma-subunit of F1 and characterization of atp3 mutants." J Biol Chem **269**(42): 26158-26164.
- Paul, M. F., A. Barrientos *et al.* (2000). "A single amino acid change in subunit 6 of the yeast mitochondrial ATPase suppresses a null mutation in ATP10." J Biol Chem **275**(38): 29238-29243.
- Paul, M. F., B. Guerin *et al.* (1992). "The C-terminal region of subunit 4 (subunit b) is essential for assembly of the F0 portion of yeast mitochondrial ATP synthase." Eur J Biochem **205**(1): 163-172.
- Paul, M. F., J. Velours *et al.* (1989). "The role of subunit 4, a nuclear-encoded protein of the F0 sector of yeast mitochondrial ATP synthase, in the assembly of the whole complex." Eur J Biochem **185**(1): 163-171.
- Paumard, P., J. Vaillier *et al.* (2002). "The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology." Embo J **21**(3): 221-230.
- Payne, M. J., P. M. Finnegan *et al.* (1993). "Characterization of a second nuclear gene, AEP1, required for expression of the mitochondrial OLI1 gene in *Saccharomyces cerevisiae*." Curr Genet **24**(1-2): 126-135.
- Payne, M. J., E. Schweizer *et al.* (1991). "Properties of two nuclear pet mutants affecting expression of the mitochondrial oli1 gene of *Saccharomyces cerevisiae*." Curr Genet **19**(5): 343-351.
- Pelissier, P., N. Camougrand *et al.* (1995). "NCA3, a nuclear gene involved in the mitochondrial expression of subunits 6 and 8 of the Fo-F1 ATP synthase of *S. cerevisiae*." Curr Genet **27**(5): 409-416.
- Pelissier, P. P., N. M. Camougrand *et al.* (1992). "Regulation by nuclear genes of the mitochondrial synthesis of subunits 6 and 8 of the ATP synthase of *Saccharomyces cerevisiae*." J Biol Chem **267**(4): 2467-2473.
- Pfaffl, M. W. (2001). "A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR." Nucleic Acids Res **29**(9): e45.
- Pogoryelov, D., O. Yildiz *et al.* (2009). "High-resolution structure of the rotor ring of a proton-dependent ATP synthase." Nat Struct Mol Biol **16**(10): 1068-1073.
- Prakash, S. and A. Matouschek (2004). "Protein unfolding in the cell." Trends Biochem Sci **29**(11): 593-600.
- Prescott, M., N. C. Bush *et al.* (1994). "Properties of yeast cells depleted of the OSCP subunit of mitochondrial ATP synthase by regulated expression of the ATP5 gene." Biochem Mol Biol Int **34**(4): 789-799.
- Preuss, M., K. Leonhard *et al.* (2001). "Mba1, a novel component of the mitochondrial protein export machinery of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*." J Cell Biol **153**(5): 1085-1096.

- Prokisch, H., C. Scharfe *et al.* (2004). "Integrative analysis of the mitochondrial proteome in yeast." PLoS Biol **2**(6): e160.
- Pullman, M. and G. C. Monroy "A naturally occurring inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphate." (0021-9258 (Print)).
- Rak, M., S. Gokova *et al.* (2011). "Modular assembly of yeast mitochondrial ATP synthase." Embo J **30**(5): 920-930.
- Rak, M., E. Tetaud *et al.* (2007). "Yeast cells lacking the mitochondrial gene encoding the ATP synthase subunit 6 exhibit a selective loss of complex IV and unusual mitochondrial morphology." J Biol Chem **282**(15): 10853-10864.
- Rak, M. and A. Tzagoloff (2009). "F1-dependent translation of mitochondrially encoded Atp6p and Atp8p subunits of yeast ATP synthase." Proc Natl Acad Sci U S A **106**(44): 18509-18514.
- Rak, M., X. Zeng *et al.* (2009). "Assembly of F0 in *Saccharomyces cerevisiae*." Biochim Biophys Acta **1793**(1): 108-116.
- Rastogi, V. K. and M. E. Girvin (1999). "Structural changes linked to proton translocation by subunit c of the ATP synthase." Nature **402**(6759): 263-268.
- Reichert, A. S. and W. Neupert (2004). "Mitochondriomics or what makes us breathe." Trends Genet **20**(11): 555-562.
- Rigoulet, M. and B. Guerin (1979). "Phosphate transport and ATP synthesis in yeast mitochondria: effect of a new inhibitor: the tribenzylphosphate." FEBS Lett **102**(1): 18-22.
- Rigoulet, M., A. Mourier *et al.* (2010). "Electron competition process in respiratory chain: regulatory mechanisms and physiological functions." Biochim Biophys Acta **1797**(6-7): 671-677.
- Robinson, G. C., J. V. Bason *et al.* (2013). "The structure of F(1)-ATPase from *Saccharomyces cerevisiae* inhibited by its regulatory protein IF(1)." Open Biol **3**(2): 120164.
- Rodel, G. (1986). "Two yeast nuclear genes, CBS1 and CBS2, are required for translation of mitochondrial transcripts bearing the 5'-untranslated COB leader." Curr Genet **11**(1): 41-45.
- Rogowska, A. T., O. Puchta *et al.* (2006). "Balance between transcription and RNA degradation is vital for *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: reduced transcription rescues the phenotype of deficient RNA degradation." Mol Biol Cell **17**(3): 1184-1193.
- Rubinstein, J. L., J. E. Walker *et al.* (2003). "Structure of the mitochondrial ATP synthase by electron cryomicroscopy." Embo J **22**(23): 6182-6192.
- Sambongi, Y., Y. Iko *et al.* (1999). "Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (F0F1): direct observation." Science **286**(5445): 1722-1724.

- Saracco, S. A. and T. D. Fox (2002). "Cox18p is required for export of the mitochondrially encoded *Saccharomyces cerevisiae* Cox2p C-tail and interacts with Pnt1p and Mss2p in the inner membrane." Mol Biol Cell **13**(4): 1122-1131.
- Schagger, H. and G. von Jagow (1987). "Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa." Anal Biochem **166**(2): 368-379.
- Schagger, H. and G. von Jagow (1991). "Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form." Anal Biochem **199**(2): 223-231.
- Schwem, B. E. and R. H. Fillingame (2006). "Cross-linking between helices within subunit a of *Escherichia coli* ATP synthase defines the transmembrane packing of a four-helix bundle." J Biol Chem **281**(49): 37861-37867.
- Schwerzmann, K. and P. L. Pedersen (1986). "Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex." Arch Biochem Biophys **250**(1): 1-18.
- Senior, A. E., S. Nadanaciva *et al.* (2002). "The molecular mechanism of ATP synthesis by F1F0-ATP synthase." Biochim Biophys Acta **1553**(3): 188-211.
- Sickmann, A., J. Reinders *et al.* (2003). "The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **100**(23): 13207-13212.
- Sideris, D. P., N. Petrakis *et al.* (2009). "A novel intermembrane space-targeting signal docks cysteines onto Mia40 during mitochondrial oxidative folding." J Cell Biol **187**(7): 1007-1022.
- Sikorski, R. S. and P. Hieter (1989). "A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*." Genetics **122**(1): 19-27.
- Simon, M. and G. Faye (1984). "Organization and processing of the mitochondrial *oxi3/oli2* multigenic transcript in yeast." Mol Gen Genet **196**(2): 266-274.
- Somlo, M. (1968). "Induction and repression of mitochondrial ATPase in yeast." Eur J Biochem **5**(2): 276-284.
- Soubannier, V., F. Rusconi *et al.* (1999). "The second stalk of the yeast ATP synthase complex: identification of subunits showing cross-links with known positions of subunit 4 (subunit b)." Biochemistry **38**(45): 15017-15024.
- Spannagel, C., J. Vaillier *et al.* (1997). "The subunit f of mitochondrial yeast ATP synthase--characterization of the protein and disruption of the structural gene ATP17." Eur J Biochem **247**(3): 1111-1117.
- Steed, P. R. and R. H. Fillingame (2008). "Subunit a facilitates aqueous access to a membrane-embedded region of subunit c in *Escherichia coli* F1F0 ATP synthase." J Biol Chem **283**(18): 12365-12372.
- Steed, P. R. and R. H. Fillingame (2009). "Aqueous accessibility to the transmembrane regions of subunit c of the *Escherichia coli* F1F0 ATP synthase." J Biol Chem **284**(35): 23243-23250.

- Steed, P. R. and R. H. Fillingame (2014). "Residues in the polar loop of subunit c in *Escherichia coli* ATP synthase function in gating proton transport to the cytoplasm." J Biol Chem **289**(4): 2127-2138.
- Steele, D. F., C. A. Butler *et al.* (1996). "Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation." Proc Natl Acad Sci U S A **93**(11): 5253-5257.
- Stephens, A. N., M. A. Khan *et al.* (2003). "The molecular neighborhood of subunit 8 of yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase probed by cysteine scanning mutagenesis and chemical modification." J Biol Chem **278**(20): 17867-17875.
- Stepien, P. P., S. P. Margossian *et al.* (1992). "The yeast nuclear gene *suvs3* affecting mitochondrial post-transcriptional processes encodes a putative ATP-dependent RNA helicase." Proc Natl Acad Sci U S A **89**(15): 6813-6817.
- Stock, D., C. Gibbons *et al.* (2000). "The rotary mechanism of ATP synthase." Curr Opin Struct Biol **10**(6): 672-679.
- Stock, D., A. G. Leslie *et al.* (1999). "Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase." Science **286**(5445): 1700-1705.
- Straffon, A. F., M. Prescott *et al.* (1998). "The assembly of yeast mitochondrial ATP synthase: subunit depletion *in vivo* suggests ordered assembly of the stalk subunits b, OSCP and d." Biochim Biophys Acta **1371**(2): 157-162.
- Stribinskis, V., G. J. Gao *et al.* (1996). "Yeast mitochondrial RNase P RNA synthesis is altered in an RNase P protein subunit mutant: insights into the biogenesis of a mitochondrial RNA-processing enzyme." Mol Cell Biol **16**(7): 3429-3436.
- Symersky, J., V. Pagadala *et al.* (2012). "Structure of the c(10) ring of the yeast mitochondrial ATP synthase in the open conformation." Nat Struct Mol Biol **19**(5): 485-491, S481.
- Szyrach, G., M. Ott *et al.* (2003). "Ribosome binding to the Oxa1 complex facilitates co-translational protein insertion in mitochondria." Embo J **22**(24): 6448-6457.
- Tetaud, E., F. Godard *et al.* (2014). "The depletion of F1 subunit {varepsilon} in yeast leads to an uncoupled respiratory phenotype that is rescued by mutations in the proton-translocating subunits of F0." Mol Biol Cell **25**(6): 791-799.
- Tzagoloff, A., A. Barrientos *et al.* (2004). "Atp10p assists assembly of Atp6p into the F0 unit of the yeast mitochondrial ATPase." J Biol Chem **279**(19): 19775-19780.
- Tzagoloff, A. and A. M. Myers (1986). "Genetics of mitochondrial biogenesis." Annu Rev Biochem **55**: 249-285.
- Vaillier, J., G. Arselin *et al.* (1999). "Isolation of supernumerary yeast ATP synthase subunits e and i. Characterization of subunit i and disruption of its structural gene ATP18." J Biol Chem **274**(1): 543-548.
- Valach, M., L. Tomaska *et al.* (2008). "Preparation of yeast mitochondrial DNA for direct sequence analysis." Curr Genet **54**(2): 105-109.

- Valiyaveetil, F. I. and R. H. Fillingame (1997). "On the role of Arg-210 and Glu-219 of subunit a in proton translocation by the Escherichia coli F₀F₁-ATP synthase." J Biol Chem **272**(51): 32635-32641.
- van der Giezen, M. (2009). "Hydrogenosomes and mitosomes: conservation and evolution of functions." J Eukaryot Microbiol **56**(3): 221-231.
- Velours, J., P. Durrens *et al.* (1988). "ATP4, the structural gene for yeast F₀F₁ ATPase subunit 4." Eur J Biochem **170**(3): 637-642.
- Velours, J., P. Paumard *et al.* (2000). "Organisation of the yeast ATP synthase F₀: a study based on cysteine mutants, thiol modification and cross-linking reagents." Biochim Biophys Acta **1458**(2-3): 443-456.
- Venard, R., D. Brethes *et al.* (2003). "Investigation of the role and mechanism of IF1 and STF1 proteins, twin inhibitory peptides which interact with the yeast mitochondrial ATP synthase." Biochemistry **42**(24): 7626-7636.
- Vik, S. B. and B. J. Antonio (1994). "A mechanism of proton translocation by F₁F₀ ATP synthases suggested by double mutants of the a subunit." J Biol Chem **269**(48): 30364-30369.
- Vogtle, F. N., S. Wortelkamp *et al.* (2009). "Global analysis of the mitochondrial N-proteome identifies a processing peptidase critical for protein stability." Cell **139**(2): 428-439.
- Vollmar, M., D. Schlieper *et al.* (2009). "Structure of the c14 rotor ring of the proton translocating chloroplast ATP synthase." J Biol Chem **284**(27): 18228-18235.
- Wach, A., A. Brachat *et al.* (1994). "New heterologous modules for classical or PCR-based gene disruptions in Saccharomyces cerevisiae." Yeast **10**(13): 1793-1808.
- Walker, J. E. (2013). "The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown." Biochem Soc Trans **41**(1): 1-16.
- Walker, J. E. and V. K. Dickson (2006). "The peripheral stalk of the mitochondrial ATP synthase." Biochim Biophys Acta **1757**(5-6): 286-296.
- Walker, J. E., I. M. Fearnley *et al.* (1985). "Primary structure and subunit stoichiometry of F₁-ATPase from bovine mitochondria." J Mol Biol **184**(4): 677-701.
- Walker, J. E., M. J. Runswick *et al.* (1982). "Subunit equivalence in Escherichia coli and bovine heart mitochondrial F₁F₀ ATPases." FEBS Lett **146**(2): 393-396.
- Wallis, M. G., O. Groudinsky *et al.* (1994). "The NAM1 protein (NAM1p), which is selectively required for cox1, cytb and atp6 transcript processing/stabilisation, is located in the yeast mitochondrial matrix." Eur J Biochem **222**(1): 27-32.
- Wang, Z. G. and S. H. Ackerman (2000). "The assembly factor Atp11p binds to the beta-subunit of the mitochondrial F₁-ATPase." J Biol Chem **275**(8): 5767-5772.
- Wang, Z. G., D. Sheluho *et al.* (2000). "The alpha-subunit of the mitochondrial F₁ ATPase interacts directly with the assembly factor Atp12p." Embo J **19**(7): 1486-1493.

- Watt, I. N., M. G. Montgomery *et al.* (2010). "Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria." Proc Natl Acad Sci U S A **107**(39): 16823-16827.
- Westermann, B. (2010). "Mitochondrial dynamics in model organisms: what yeasts, worms and flies have taught us about fusion and fission of mitochondria." Semin Cell Dev Biol **21**(6): 542-549.
- Wiedemann, N., V. Kozjak *et al.* (2003). "Machinery for protein sorting and assembly in the mitochondrial outer membrane." Nature **424**(6948): 565-571.
- Wiesenberger, G. and T. D. Fox (1997). "Pet127p, a membrane-associated protein involved in stability and processing of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondrial RNAs." Mol Cell Biol **17**(5): 2816-2824.
- Williams, K. P., B. W. Sobral *et al.* (2007). "A robust species tree for the alphaproteobacteria." J Bacteriol **189**(13): 4578-4586.
- Yamamoto, H., M. Esaki *et al.* (2002). "Tim50 is a subunit of the TIM23 complex that links protein translocation across the outer and inner mitochondrial membranes." Cell **111**(4): 519-528.
- Yamano, K., Y. Yatsukawa *et al.* (2008). "Tom20 and Tom22 share the common signal recognition pathway in mitochondrial protein import." J Biol Chem **283**(7): 3799-3807.
- Yang, D., Y. Oyaizu *et al.* (1985). "Mitochondrial origins." Proc Natl Acad Sci U S A **82**(13): 4443-4447.
- Yasuda, R., H. Noji *et al.* (1998). "F1-ATPase is a highly efficient molecular motor that rotates with discrete 120 degree steps." Cell **93**(7): 1117-1124.
- Yoshida, Y., T. Sato *et al.* (1990). "Isolation of a gene for a regulatory 15-kDa subunit of mitochondrial F1F0-ATPase and construction of mutant yeast lacking the protein." Eur J Biochem **192**(1): 49-53.
- Zassenhaus, H. P., N. C. Martin *et al.* (1984). "Origins of transcripts of the yeast mitochondrial var 1 gene." J Biol Chem **259**(9): 6019-6027.
- Zeng, X., M. H. Barros *et al.* (2008). "ATP25, a new nuclear gene of *Saccharomyces cerevisiae* required for expression and assembly of the Atp9p subunit of mitochondrial ATPase." Mol Biol Cell **19**(4): 1366-1377.
- Zeng, X., A. Hourset *et al.* (2007a). "The *Saccharomyces cerevisiae* ATP22 gene codes for the mitochondrial ATPase subunit 6-specific translation factor." Genetics **175**(1): 55-63.
- Zeng, X., R. Kucharczyk *et al.* (2007b). "The leader peptide of yeast Atp6p is required for efficient interaction with the Atp9p ring of the mitochondrial ATPase." J Biol Chem **282**(50): 36167-36176.
- Zeng, X., W. Neupert *et al.* (2007c). "The metalloprotease encoded by ATP23 has a dual function in processing and assembly of subunit 6 of mitochondrial ATPase." Mol Biol Cell **18**(2): 617-626.

- Zhang, D. and S. B. Vik (2003). "Close proximity of a cytoplasmic loop of subunit a with c subunits of the ATP synthase from *Escherichia coli*." J Biol Chem **278**(14): 12319-12324.
- Zhu, H., I. G. Macreadie *et al.* (1987). "RNA processing and expression of an intron-encoded protein in yeast mitochondria: role of a conserved dodecamer sequence." Mol Cell Biol **7**(7): 2530-2537.
- Ziaja, K., G. Michaelis *et al.* (1993). "Nuclear control of the messenger RNA expression for mitochondrial ATPase subunit 9 in a new yeast mutant." J Mol Biol **229**(4): 909-916.

Titre : ATP synthase mitochondriale : fonction de la sous-unité ϵ et biogenèse du F_0 .

Résumé :

Dans un premier temps, je me suis intéressé à la sous-unité ϵ de l'ATP synthase mitochondriale chez la levure, un organisme qui se prête bien à l'étude des fonctions mitochondriales. Cette protéine fait partie d'un élément de l'ATP synthase appelé la tige centrale. Celui-ci permet de coupler le domaine translocateur de protons de cette enzyme (F_0) à son secteur catalytique (F_1) où l'ATP est synthétisé. En utilisant un système d'expression régulable (répressible par la doxycycline), j'ai montré qu'en l'absence de la sous-unité ϵ les secteurs F_1 et F_0 ne sont plus couplés, avec pour résultat des fuites massives de protons à travers la membrane interne des mitochondries. J'ai ensuite montré que l'absence de la sous-unité ϵ peut être compensée par des mutations ralentissant l'activité du F_0 . Ces données permettent de conclure que la sous-unité ϵ est nécessaire au maintien de l'intégrité physique de l'ATP synthase lors de son fonctionnement. Dans un second temps, j'ai cherché à identifier de nouveaux facteurs intervenant dans la biogenèse du F_0 . Pour cela, j'ai utilisé un crible génétique où la survie des cellules de levure est conditionnée à des mutations inactivation le F_0 . Un millier d'isolats a été analysé. Les mutations ont été localisées dans les génomes mitochondrial et nucléaire. Dix-huit clones, issus de mutations n'affectant pas des facteurs connus pour être nécessaires à l'expression de l'ATP synthase, ont été entièrement séquencés. Plusieurs nouveaux systèmes cellulaires potentiellement impliqués dans la biogenèse du F_0 ont été identifiés.

Mots clés : ATP synthase, biogenèse mitochondriale, sous-unité ϵ

Title : Mitochondrial ATP synthase : function of the ϵ subunit and biogenesis of F_0 .

Abstract :

At first, I am interested in the ϵ subunit of mitochondrial ATP synthase in yeast, an organism that is well suited for the study of mitochondrial functions. This protein is a part of the ATP synthase called central stalk. This allows the coupling of proton translocator domain of this enzyme (F_0) to its catalytic domain (F_1) where ATP is synthesized. Using a tetO expression system, I showed that in the absence of the ϵ subunit, F_1 and F_0 domains are no longer coupled. It results in a massive proton leakage across the inner membrane of mitochondria. I then showed that the absence of the ϵ subunit can be compensated by mutations slowing the activity of F_0 . These data allow to conclude that the ϵ subunit is necessary to maintain the physical integrity of the ATP synthase for oxydative phosphorylation. Later, I tried to identify new factors involved in the biogenesis of the F_0 . For this, I used a genetic screen where the survival of yeast cells is conditioned by mutations inactivating the F_0 . About a thousand clones were analyzed. The mutations were localized in mitochondrial and nuclear genomes. Eighteen clones with mutations in genes encoding not yet known ATP synthase expression factors were completely sequenced. Several new cellular systems that are potentially involved in the biogenesis of F_0 were identified.

Keywords : ATP synthase, mitochondrial biogenesis, ϵ subunit