



HAL
open science

Étude du rôle métabolique du peptide inhibiteur de l'ATP synthase IF1, en conditions physiologique et pathologique

Orane Lerouley

► **To cite this version:**

Orane Lerouley. Étude du rôle métabolique du peptide inhibiteur de l'ATP synthase IF1, en conditions physiologique et pathologique. Médecine humaine et pathologie. Université de Bordeaux, 2024. Français. NNT : 2024BORD0220 . tel-04887979

HAL Id: tel-04887979

<https://theses.hal.science/tel-04887979v1>

Submitted on 15 Jan 2025

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.

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

ÉCOLE DOCTORALE SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTÉ
SPÉCIALITÉ BIOCHIMIE

Par **Orane LEROULEY**

née le 20 novembre en 1996 à Brest

**Étude du rôle métabolique
du peptide inhibiteur de l'ATP synthase IF1,
en conditions physiologique et pathologique.**

Sous la direction de : **Marie-France GIRAUD** et **Arnaud MOURIER**

Soutenue le 23 octobre 2024

Membres du jury

M. BENARD Giovanni , Directeur de recherche, INSERM, Bordeaux	Président
Mme DUJARDIN Geneviève , Directrice de recherche émérite, CNRS, Paris	Rapporteuse
Mme MARECHAL Amandine , Associate Professor, University College London	Rapporteuse
M. HARAUX Francis , Retraité Directeur de recherche, CNRS, Paris	Examineur

Invités

Mme GIRAUD Marie-France , Chargé de recherche, CNRS, Bordeaux	Directrice de thèse
M. MOURIER Arnaud , Chargé de recherche, CNRS, Bordeaux	Directeur de thèse

*« Travaille dur en silence
et laisse ton succès faire du bruit »*

Frank Ocean

Étude du rôle métabolique du peptide inhibiteur de l'ATP synthase IF1 en conditions physiologique et pathologique.

La F_1F_0 ATP-synthase est une machinerie multi-protéique permettant la transduction de l'énergie d'un gradient électrochimique en énergie chimique sous forme d'ATP. Ce complexe protéique est enchâssé dans la membrane interne mitochondriale de par son domaine F_0 , lui-même physiquement associé à un secteur catalytique intra-mitochondrial, le domaine F_1 . Cette enzyme mitochondriale joue un rôle primordial dans le métabolisme énergétique. L'ATP synthase de levure, comme celle du mammifère, sont des enzymes réversibles dont l'activité hydrolytique est régulée par un inhibiteur endogène : IF1. Un deuxième peptide inhibiteur, STF1, a été identifié, uniquement chez la levure. L'inhibition de l'ATP synthase par IF1/STF1 est dépendante du pH, par conséquent ces inhibiteurs sont inactifs dans des conditions physiologiques où la mitochondrie est polarisée, mais sont actifs dans des conditions pathologiques de dépolarisation. Pour autant, l'importance métabolique et physiopathologique d'IF1/STF1 a été remise en question par les modèles levures et murins démontrant que la perte de cet inhibiteur n'a quasiment aucune incidence sur le métabolisme ou la physiologie de ces organismes. Mon travail de thèse a permis d'étudier des mécanismes d'action de cet inhibiteur sur l'ATP synthase associés ou non à des stress énergétiques affectant l'état de polarisation mitochondrial. Mon travail a permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme d'action d'IF1/STF1 dans la stabilité et la maintenance du sous-assemblage de l'ATP synthase, le F_1 libre (domaine soluble F_1 non associé au domaine F_0). La présence de ce domaine catalytique déconnecté de la force protomotrice, constitue une réelle menace énergétique. En effet, la toxicité énergétique potentielle du F_1 libre est donc soit inhibée par l'action directe d'IF1/STF1, soit prévenue en absence d'IF1/STF1 par l'instabilité et la disparition physique de ce sous-complexe. Mes travaux de thèse ont de plus permis de définir que l'action d'IF1/STF1 était particulièrement cruciale dans des conditions métaboliques dites glyco-oxydatives spécifiquement observées en milieu glycérol. Dans ces conditions, la prolifération cellulaire et la maintenance du potentiel phosphate sont placées sous la co-dépendance de l'ATP synthase et des phosphorylations par le substrat des kinases glycolytiques.

Mots clés: Inhibitory factor 1, Mitochondries, ATP synthase, Bioénergétique

Study of the metabolic role of the ATP synthase inhibitor peptide IF1, under physiological and pathological conditions.

F_1F_0 ATP synthase is a multi-protein machinery that converts the energy of an electrochemical gradient into chemical energy in the form of ATP. This protein complex is anchored in the mitochondrial inner membrane by its F_0 sector, which is itself physically associated with an intra-mitochondrial F_1 catalytic sector. This mitochondrial enzyme plays a key role in energy metabolism. Yeast and mammalian ATP synthase, are reversible enzymes and this hydrolytic activity is regulated by an endogenous inhibitor: IF1. In yeast, another inhibitor peptide, STF1, has been identified. Inhibition of ATP synthase by IF1/STF1 is pH-dependent, so these inhibitors are inactive under physiological conditions where mitochondria are polarised, but IF1/STF1 are particularly active under pathological conditions of depolarisation. Intriguingly, the metabolic and pathophysiological importance of IF1/STF1 has been challenged by yeast and mouse models showing that the loss of this inhibitor has almost no detectable impact on the metabolism or physiology of these organisms. My thesis work investigated the mechanisms of action of these inhibitors on ATP synthase, associated or not with energy stresses affecting the mitochondrial polarization state. My work has highlighted a new mechanism of action for IF1 by demonstrating that it controls the stability and maintenance of the ATP synthase sub-assembly, the free F_1 (soluble F_1 sector not associated with the F_0 sector). The presence of this catalytic sector, disconnected from the proton motor force, represents a serious energetic threat. The potential energetic toxicity of free F_1 is annihilated through two mechanisms: (i) the direct canonical inhibition of IF1/STF1, or (ii) the instability and physical disappearance of free F_1 in absence of IF1/STF1. My thesis work also defined that the action of IF1/STF1 was particularly crucial under mitochondrial depolarization stress conditions in glyco-oxidative metabolism observed in glycerol medium. Under these conditions, the phosphate potential is co-dependent on ATP synthase and substrate phosphorylation of glycolytic kinases, and cell proliferation under depolarisation stress relies on IF1/STF1 activity.

Keywords: Inhibitory factor 1, Mitochondria, ATP synthase, Bioenergetic

Remerciements

Tout d'abord, je tiens à remercier les membres du jury qui ont accepté de prendre de leur temps pour évaluer mon travail de thèse. Je remercie aussi les membres qui ont pu se déplacer pour assister à ma soutenance et je comprends tout à fait ceux qui n'ont pu le faire.

Je tiens à remercier ma directrice de thèse, **Marie-France Giraud**. Tu m'as ouvert les portes de la recherche lors de mon tout premier stage en master 1. Nos discussions très riches, grâce à ta connaissance approfondie de la bibliographie, m'ont beaucoup instruite. Je te remercie de m'avoir soutenue et accompagnée lors du concours de l'école doctorale. Je me souviens de tes mots d'encouragement, évoquant ton expérience personnelle des concours, qui m'ont permis de tenir bon et de décrocher la bourse de thèse ministérielle. Merci pour ta patience et ta souplesse face à mon caractère bien trempé, comme tu le dis. Tes encouragements et tes compliments sur mon travail m'ont beaucoup soutenue durant ma thèse.

Je tiens à remercier mon directeur de thèse, **Arnaud Mourier**, pour avoir cru en moi dès le début, malgré nos premiers échanges en anglais, laborieux dû à mon niveau. Je suis reconnaissante pour le temps que tu as investi tout au long de ma formation. Tu n'as jamais rien laissé au hasard, que ce soit en recherche ou en communication scientifique, orale et écrite. Ton exigence a parfois été source de discussions vives, mais cela m'a appris qu'il est toujours possible de repousser ses limites. Merci pour ta patience et nos longues discussions, car je ne « lâchais parfois pas le morceau si toutes les cases n'étaient pas remplies », selon tes dires. Grâce à toi, j'ai pu obtenir une quatrième année de thèse, nécessaire pour mener à bien ce projet dont je suis fière. Tu m'as aussi appris l'esprit critique, les (nombreux) contrôles et la remise en question. Je tiens à te remercier pour ta sincérité et aussi pour tes nombreuses expressions françaises, charentaises, voire même de famille (pour ne pas dire inconnues), toujours très imagées. Tu as également été d'un grand soutien moral tout au long de cette thèse pleine de rebondissements, me répétant « échecs après échecs jusqu'à la victoire ».

À toi, **Isabelle Larrieu**, qui a été ma première encadrante de stage. Tu m'as laissé poser toutes mes questions (index levé) toutes les 5 minutes pendant 3 mois, chapeau bas ! Avec le temps, tu es bien sûr devenue plus qu'une maîtresse de stage, une amie. Ton savoir et ta technique m'ont énormément apporté tout le long de ma formation. Je tiens également à te remercier pour ton authenticité et ces nombreux fous rires. Un grand merci aussi pour avoir bataillé afin que je puisse obtenir un super anticorps fonctionnel, indispensable pour mon projet de thèse.

Je tiens également à remercier **Benoît Pinson**, qui a participé activement à ce projet de recherche. J'ai adoré travailler avec toi ; le débit d'informations que tu peux fournir à la minute m'a permis d'en apprendre énormément sur la génétique et le métabolisme. Je suis reconnaissante pour le temps que tu m'as accordé pour me transmettre un peu de ton savoir-faire, de ta connaissance, et pour avoir répondu à mes nombreuses questions. Merci aussi pour ta bienveillance.

Je souhaite également remercier toute l'équipe BioDynaMit. Merci à **Manuel Rojo** de m'avoir accueilli dans l'équipe à bras ouverts. Je remercie **Philippe Pasdois** pour sa disponibilité et son oreille attentive, que ce soit pour la science ou pour d'autres sujets. Merci à tous les deux

d'avoir partagé votre expertise et pour vos retours sur mon travail, qui ont permis de faire avancer mon projet de recherche. Je tiens à remercier **Chloé Barsa** pour sa gentillesse, sa générosité et les moments de rigolade. Merci aussi à Flash et Pops, **Rose Bernadet** et **Camille Evain**, pour avoir animé le laboratoire chaque jour, vous m'avez fait beaucoup rire.

Je souhaite remercier tout particulièrement **Claudine David**, ou comme disait Thibaut, la « maman du labo » (et je suis tout à fait d'accord). Merci pour ta disponibilité, ta serviabilité, et d'avoir partagé tes connaissances et ton grand savoir-faire. Grâce à toi, j'avais quelqu'un avec qui parler de « mon caillou », ce qui m'a beaucoup apporté moralement. Tu as toujours été là pour écouter nos bêtises, et même y participer parfois, il faut le dire. J'ai eu la chance de travailler avec quelqu'un comme toi.

Je tiens à remercier tout particulièrement mon acolyte, **Guillaume Duranthon**, alias Pascal, « saluuuut les filles ». Je ne sais pas si on ferait une bonne équipe pour les expériences, vu le résultat du seul gel natif que nous avons fait ensemble. Ce qui est certain, c'est que tu as été un vrai soutien, surtout avec ces petites tapes dans le dos. Grâce à toi, même les jours les plus difficiles et compliqués pouvaient devenir de sacrées journées de rigolade. Merci de m'avoir appris tant de choses propres à la France métropolitaine, moi qui ne parle parfois pas bien « la France ». Bien évidemment, nos après-midis aux Oroboros à se marcher dessus et à débattre sur la vie vont me manquer (mais sûrement pas ta musique). Le point positif de mon départ, c'est que tu peux maintenant relâcher les abdos et ne plus rentrer ton ventre.

Je tiens à remercier **Tom Ducrocq** pour sa disponibilité, surtout quand je m'aventurais dans la génétique, mais pas seulement. Tu m'as aidée pour tellement de choses. Je te demandais ton avis pour chaque présentation, chaque poster et même parfois pour remplir mes plaques 96 quand j'étais en retard (comme d'habitude) pour nos sessions de badminton. Je dois aussi avouer que tu m'as appris à faire du vélo à Bordeaux, un sport « extrême ». Tu as toujours été là pour écouter (parfois en boucle) mes mésaventures de thèse et je te remercie pour ce soutien moral. On nous a sûrement beaucoup entendu rigoler à l'autre bout du couloir, on ne perdait jamais une occasion. Merci pour tout, Tomytom DucrocqUE.

Je tiens à exprimer ma sincère gratitude aux équipes de recherche de **Déborah Tribouillard-Tanvier** et de **Muriel Priault** pour avoir ouvert les portes de vos laboratoires à notre équipe durant les travaux de réhabilitation du bâtiment. J'ai énormément apprécié la possibilité de travailler à vos côtés. Vous avez toujours été disponibles pour fournir le matériel nécessaire, qu'il s'agisse d'anticorps, de produits chimiques et même pour des conseils précieux. Votre générosité a été inestimable pour moi, la levuriste du laboratoire de mammifères.

Je souhaite remercier aussi l'équipe d'**Anne Devin** et de **Derek McCusker** pour m'avoir donné l'accès aux matériels qui était nécessaire pour ma recherche.

Je souhaite remercier chaleureusement toutes les personnes qui ont pris le temps de discuter avec moi pour m'aider dans mes travaux. Je pense notamment à **Alain Dautant**, **Stephen Manon**, **Sabine Vaur**, **Guy Lanquin**, **Patrick Paumard**, **Stéphane Duvezin-Caubet** et **François Godard**.

Merci aux personnes de l'administration qui font tant pour nous permettre de nous consacrer pleinement à notre recherche. Je fais un petit clin d'œil à **Martine Pano** et **Killian Audoux**. Un

grand merci également à **Catherine Alves-Magalhaes** et **Isabelle Nicolas**, avec qui j'ai eu le plaisir de partager mon bureau. Cela m'a permis de constater l'ampleur de la sollicitation intensive à laquelle vous êtes confrontées, en plus de vos tâches quotidiennes.

À toi, **Corinne Sanchez**, qui as été mon enseignante, ma collègue, puis ma maîtresse de stage pendant deux mois (merci la crise sanitaire) et très rapidement mon amie. Il n'est pas étonnant pour une artiste de scène de savoir porter toutes ces casquettes. Merci pour ton savoir scientifique, ton soutien, ton énergie et les rires.

Merci à **Victoria Lublin**. Dès nos premiers jours ensemble au labo, j'ai su que nous allions bien nous entendre. Tu as été la force calme durant les moments difficiles que nous avons traversés main dans la main pendant notre thèse. J'ai toujours été impressionnée par ta capacité à mener ta barque comme une cheffe. Merci pour ta bienveillance et ces précieux moments de partage.

Je souhaite également remercier le duo de choc, **Antonio Pagano Zottola** et **Claire Larrieu**, qui m'ont tant manqué dans le bureau pendant ces deux dernières années de thèse. Que d'aventures nous avons vécues : la boîte au 4^{ème} étage en guise de bureau où nous étions six, les nombreux déménagements et les retournements de situation. Merci pour votre soutien, le temps que vous avez pris pour m'aider à trouver des solutions, les longues discussions sur tout et n'importe quoi, les verres, les poutines, les commérages, les danses sur Rihanna et les chants sur Céline Dion, et ces rires encore et encore. Vous avez été le bébé soleil des Télétubbies de ma thèse. Merci à tous les deux.

Je souhaite remercier **Claire Almyre** pour m'avoir fourni tant d'eau stérile et pour toutes ces discussions et débats (comme le fameux $n=3$). J'ai eu la chance, pendant quelques mois, d'avoir ma paillasse (bien rangée) juste à côté de la tienne (pas rangée du tout), c'était magique. Merci aussi pour ces moments de rire et de confidences sur les aléas de la thèse. Sache que, moi, je ne t'appelais que rarement « Claire la méchante ».

Merci à toi, **Landry Peyran**, toujours présent pour me rendre service et papoter. Je souhaite également te remercier pour cet accent 'portugais', dont je suis fan et qui enchantait tous nos midis.

À ces belles rencontres : **Baptiste Leray**, le sportif toujours avec une nouvelle blessure ou foulure ; **Daniel García**, originaire de cette région du sud des Pyrénées ; et toi, **Mélanie Martins Pinto**, avec qui j'ai partagé mon premier congrès européen.

Je remercie **mes parents** du fond du cœur pour m'avoir donné l'opportunité et les moyens de poursuivre mes études en métropole. Merci **Maman**, d'être toujours là pour répondre à n'importe quelle heure malgré le décalage horaire, d'avoir corrigé ma thèse en un week-end et pour tes mots doux d'encouragement et de réconfort. Je te remercie aussi d'avoir parcouru 22 000 km chaque année pour m'apporter de la douceur durant les hivers rudes. Comme tu le dis si bien, « on a toujours besoin d'une petite maman chez soi ». Je sais que tu es très déçue de ne pas pouvoir être physiquement présente à ma soutenance, mais comme on dit « loin des yeux, près du cœur ». Merci à toi, **Papa**, d'avoir toujours été à l'écoute, d'être curieux de ma recherche, de m'aider dès que je crie au secours pour n'importe quel problème et pour

t'inquiéter (peut-être un peu trop) pour tes filles. J'ai hâte de voir ce que tu prépares pour mes 30 ans, toi le roc (physiquement, je parle, car ma sensibilité vient bien de toi). Merci pour la fierté et l'amour que vous m'offrez au quotidien depuis petite. Sachez que je suis fière d'avoir des parents comme vous.

Je remercie **mes sœurs** qui sont toujours là dès que j'ai besoin d'elles. Merci pour cette complicité et pour tous ces moments de bonheur, avec notre humour décalé. Merci à toi, **Zouzou**, pour répondre toujours à toutes mes questions, même si c'est parfois pour te contredire au final. Je te remercie pour tous les moments partagés qui nous ont permis de nous soutenir mutuellement en métropole. Merci à toi, **Sousou**, pour m'avoir toujours emmenée avec toi depuis petite, malgré notre différence d'âge. J'ai tellement de souvenirs mémorables que je ne pourrais tous les énumérer ici. Vous êtes des femmes fortes dont je m'inspire chaque jour.

À toi, **Louis**. Merci de m'avoir tant donné dès le début, d'avoir écouté mes histoires de labo un peu trop longues tous les soirs et d'avoir attendu pour manger tard le soir quand j'avais des problèmes techniques. Merci de veiller à ce que je sorte tous les week-ends pour ne pas tourner en rond. Je tiens aussi à te remercier de me suivre à travers la France pour me permettre de réaliser mes projets professionnels. Merci pour ton soutien moral et pour le bonheur que tu m'offres au quotidien. Tu es une personne formidable et j'ai la chance de vivre à tes côtés.

Je remercie aussi **Élisabeth** pour son soutien avec ces bons petits plats et pour m'aider à l'organisation de mon pot de thèse.

Merci à mes beaux-parents, **Isabelle** et **François**, pour leur soutien et leur accueil qui m'ont permis de changer d'air. Merci également à **François** pour la correction de ma thèse.

Merci à mes popinées, mes amis de longue date : **Sarah, Agathe, Julie, Marion, Lisa** et **Soizick**. Vous avez toujours été présentes depuis maintenant 12 ans et plus pour certaines (Taaang). Merci à toi, **Sarah**, celle que j'appelle en premier pour partager mes mésaventures, mes joies et mes bêtises. Merci pour ton coaching sans relâche depuis le début de mes études, pour tous ces repas de fête, ces soirées, ces virées, ces vacances, ces discussions et ces rires. Ton soutien moral à tous les niveaux est inestimable ; tu es mon soleil. À toi, **Agathe**, merci pour ton soutien, surtout lorsque je me suis réorientée et que je t'ai laissée seule avec ces soirées aux yeux humides devant les cours de PACES. Merci pour tous ces bons moments, pour être toujours là pour les moments importants, pour accepter que je vienne squatter à Paris ou à Pornic (pour le plus grand bonheur d'Arnaud). À nos différences qui nous rapprochent, à nos vacances à Tenerife (la pilote des routes en bord de falaise), à nos futurs voyages et à ta demande de témoin de mariage que je vais honorer comme il se doit, n'en doute pas. Tu es l'incarnation de la citation au début de ce manuscrit. Merci à toi, **Julie**, pour toutes ces soirées arrosées, ces restaurants, ta générosité, ces parties de jeux de société prises trop à cœur et ces quelques mois ensemble à Bordeaux qui ont eu un goût de trop peu. Vive ton énergie et ta bêtise ! À toi, **Marion**, qui as réussi à obtenir ton doctorat avant moi, je n'en reviens pas ! Merci pour ce tour d'Europe en mode aventurière (RIP à nos pieds et à ce train loupé). Tu es celle avec qui je peux parler de mon travail en toute compréhension. Tu es une force de la nature à tous niveaux (mais doucement sur la muscu). À toi, **Lisa**, qui as toujours été là pour chaque moment

important et qui m'as tant fait rire. Tu es la femme indépendante et courageuse que j'admire. **Soizick**, merci de m'avoir fait vivre la vie d'artiste grâce à ton magnifique spectacle. Merci pour ces soirées Ibiza « avec les pompiers ». Merci à vous toutes, les filles, pour ces rires qui rendent la vie si généreuse.

Je souhaite remercier **Hestia** pour sa générosité, sa bienveillance et tous ces rires partagés. À notre futur voyage ensemble ! Merci également à **Alan**, qui a toujours été présent et m'a encouragé tout au long de ce parcours universitaire. Je souhaite également remercier **Thomas** pour nos nombreuses discussions, qu'elles soient sérieuses ou non, ainsi que pour notre adoration commune des chats noirs et de l'horreur.

Merci à mes amis de master **Clémence, Alysson, Charlotte, Théo** et **Axel**, avec qui j'ai eu le plaisir de partager de sacrées soirées. Une mention spéciale à **Clémence** pour cette expérience enrichissante, mais tellement stressante, de « Ma thèse en 180 secondes ».

Je remercie toutes les personnes que j'aurais pu oublier et vous prie de m'excuser pour cet oubli. Un grand merci à chacun de ceux qui se sont déplacés pour assister à ma soutenance de thèse.

À tous ceux qui hésitent à réaliser une thèse, je vous la recommande vivement. C'est une expérience riche en apprentissage, en émotion, en rencontre et en partage. Le doctorat est bien plus qu'un diplôme, il permet une véritable évolution personnelle

Sommaire

I. INTRODUCTION	3
A. LA MITOCHONDRIE : LA CENTRALE ENERGETIQUE DE LA CELLULE	3
1. Généralités	3
2. Système des oxydations phosphorylantes (OXPHOS).....	6
a) La chaîne respiratoire	8
(1) Les déshydrogénases.....	8
(a) Les NADH déshydrogénases	8
(b) La succinate déshydrogénase (complexe II)	9
(c) Le glycerol-3-phosphate déshydrogénase	9
(d) Les lactates déshydrogénases.....	11
(2) Le pool d'ubiquinone	11
(3) L'ubiquinol-cytochrome c oxydoréductases (complexe III)	11
(4) Le cytochrome c	12
(5) La cytochrome c oxydase (complexe IV)	12
(6) Production d'espèces réactives de l'oxygène	13
b) Le système phosphorylant.....	14
(1) L'ATP synthase (complexe V)	15
(2) Les transporteurs : ANT et PiC	15
B. L'ATP SYNTHASE : UNE NANOMACHINE MOLECULAIRE	15
1. La structure.....	16
2. L'assemblage des sous-unités	20
3. L'organisation supramoléculaire	22
4. Le mécanisme de synthèse	24
5. Le mécanisme d'hydrolyse.....	27
C. IF1, L'INHIBITEUR DE L'ATP SYNTHASE	28
1. Structure de l'IF1	29
2. Le mécanisme d'inhibition.....	30
3. Régulation de l'activité d'inhibition par l'oligomérisation d'IF1	33
4. Rôles physiologiques d'IF1.....	34
a) Est-ce que l'IF1 est un régulateur de l'activité de synthèse de l'ATP synthase ?	35
b) IF1 et les sous-assemblages d'ATP synthase	36
5. Rôles pathologiques d'IF1	38
D. MODELE D'ETUDE : SACCHAROMYCES CEREVISIAE	39
1. Choix du modèle levure	39
a) Métabolisme respiro/fermentaire	39
b) Contexte $p^{-/0}$	40
2. Inhibiteurs homologues IF1 et STF1 chez la levure.....	41

E.	PROJET DE THESE	42
II.	MATERIELS ET METHODES	47
A.	SOUCHES	47
B.	CULTURES CELLULAIRES	49
1.	<i>Milieus de culture</i>	49
2.	<i>Cultures cellulaires</i>	50
3.	<i>Test en goutte</i>	51
4.	<i>Suivi de la prolifération cellulaire</i>	52
5.	<i>Traitement des cellules au carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone (CCCP)</i>	52
6.	<i>Traitement des cellules au cycloheximide</i>	53
C.	PREPARATION DE MITOCHONDRIES ISOLEES	53
D.	TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE	57
1.	<i>Constructions des souches</i>	57
a)	Stratégie.....	57
b)	Réaction de polymérisation en chaîne (PCR).....	58
c)	Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose	60
d)	Transformation des levures.....	61
e)	Sélection des clones	61
f)	Extraction d'ADN	62
g)	Vérification de la construction des mutants	62
2.	<i>Quantification de l'ADN mitochondrial par PCR quantitative</i>	63
E.	TECHNIQUES BIOCHIMIQUES	66
1.	<i>Obtention des échantillons protéiques</i>	66
a)	Technique d'extraction et de dosage protéique	66
b)	Technique de séparation de la fraction soluble de la fraction membranaire	67
c)	Technique de concentration des échantillons protéiques	67
2.	<i>Techniques de mesures des capacités bioénergétiques</i>	67
a)	Mesure du flux de consommation d'oxygène	67
(1)	A l'échelle des mitochondries isolées	69
(2)	A l'échelle cellulaire	69
b)	Mesure de l'ATP/O sur mitochondries isolées	70
c)	Activités des enzymes de la chaine respiratoire	70
(1)	Activité de la cytochrome c réductase	Erreur ! Signet non défini.
(2)	Activité de la cytochrome c oxidase.....	Erreur ! Signet non défini.
d)	Mesure de l'activité hydrolytique de l'ATP synthase	71
(1)	A l'échelle cellulaire	71
(2)	A l'échelle des mitochondries isolées	72
3.	<i>Techniques de séparation des protéines par électrophorèse</i>	72
e)	Électrophorèse en condition native	72
(1)	Préparation des échantillons.....	72
(2)	Conditions de migration.....	73
(3)	Détection des protéines par activité enzymatique dans le gel	73
(a)	Activité de la déshydrogénase	73
(b)	Activité de la cytochrome c oxydase	74
(c)	Activité de l'ATP synthase.....	74

f)	Électrophorèse en condition dénaturante	74
(1)	Électrophorèse unidimensionnelle	74
(a)	Préparations des échantillons.....	74
(b)	Réalisation du gel d'acrylamide	75
(c)	Condition de migration	75
(2)	Électrophorèse bidimensionnelle	75
g)	Détection des protéines par immunoblot	76
(1)	Conditions de transferts.....	76
(2)	Western blot.....	76
(3)	Anticorps	76
h)	Expression et purification d'IF1 et de STF1 pour la quantification par Western blot	78
4.	Quantification des métabolites : ATP, ADP et AMP	79
5.	Analyses statistiques	79
III.	RESULTATS ET DISCUSSION.....	83
A.	NOUVEAU MECANISME D'IF1 EMPECHANT L'HYDROLYSE DE L'ATP PAR LE SOUS-COMPLEXE DE L'ATP SYNTHASE CHEZ <i>SACCHAROMYCES CEREVISIAE</i> (LEROULEY ET AL., 2024)	83
1.	<i>Les inhibiteurs IF1/STF1 ne sont pas nécessaires à l'oligomérisation de l'ATP synthase</i>	84
2.	<i>Caractérisation du F1 libre détectable en BN-PAGE chez la souche contrôle</i>	85
3.	<i>Les inhibiteurs IF1/STF1 sont nécessaires pour maintenir le sous-complexe d'ATP synthase, le F1 libre.....</i>	87
4.	<i>Les inhibiteurs IF1/STF1 ainsi que le sous-complexe F1 libre sont dispensables pour la viabilité des levures ρ-0.....</i>	90
5.	<i>Le glycérol est un état métabolique glyco-oxydatif où l'équilibre énergétique repose sur la production d'ATP par la glycolyse et les OXPHOS.</i>	92
6.	<i>IF1/STF1 atténuent l'impact du stress dépolarisant mitochondrial sur la croissance en milieu glycérol.....</i>	94
7.	<i>Les homologues IF1 et STF1</i>	96
B.	LA SOUCHE <i>ATP18Δ</i> : UN MUTANT PRESENTANT UNE SEVERE DEFICIENCE DE L'ATP SYNTHASE ET UNE FORTE AUGMENTATION DU CONTENU MITOCHONDRIAL CELLULAIRE.	97
IV.	LIMITES ET PERSPECTIVES DE L'ETUDE	109
V.	CONCLUSIONS	115
VI.	ABREVIATIONS	119
VII.	BIBLIOGRAPHIE.....	121

Table des tableaux

<i>Tableau 1 : Nomenclature et stœchiométrie des sous-unités composantes de l'ATP synthase chez la levure et le mammifère.....</i>	<i>19</i>
<i>Tableau 2 : Nom et génotype des souches D273 utilisées dans cette étude</i>	<i>48</i>
<i>Tableau 3 : Nom et génotype des souches Euroscarf utilisées dans cette étude</i>	<i>49</i>
<i>Tableau 4 : Liste des plasmides et des couples d'amorce utilisées pour la construction des mutants.....</i>	<i>59</i>
<i>Tableau 5 : Programme du thermocycleur pour la construction et l'amplification de la cassette de délétion par PCR</i>	<i>60</i>
<i>Tableau 6 : Amorces utilisées pour vérifier l'insertion de la cassette au bon endroit dans le génome</i>	<i>63</i>
<i>Tableau 7 : Programme du thermocycleur pour la PCR quantitative</i>	<i>65</i>
<i>Tableau 8 : Liste des anticorps primaires utilisés dans cette étude.</i>	<i>77</i>
<i>Tableau 9 : Liste des anticorps secondaires conjugués à une HRP utilisés dans cette étude</i>	<i>78</i>

Table des figures

Figure 1 : Image par microscopie et schéma d'une mitochondrie	4
Figure 2 : Carte de l'ADN mitochondrial des cellules humaines et de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> 5	
Figure 3 : Illustration des OXPHOS localisées dans la membrane interne de la mitochondrie chez les mammifères (haut) et chez la levure <i>S. cerevisiae</i> (bas).....	7
Figure 4 : Illustration du fonctionnement de la navette redox glycérol-3-phosphate chez la levure. (réalisé avec Biorender).....	10
Figure 5 : Effets de l'agent découplant le SF6847 sur la respiration, le $\Delta\Psi$ et la production de H_2O_2 par les mitochondries de cœur de rat.....	14
Figure 6 : Représentation de la structure obtenue par cryo-ME de l'ATP synthase monomérique de <i>S. cerevisiae</i>	17
Figure 7 : Voie d'assemblage de l'ATP synthase chez <i>S. cerevisiae</i> et l'humain	20
Figure 8 : Illustration des réactions catalysées par le supercomplexe du respirasome chez le mammifère	22
Figure 9 : Les dimères d'ATP synthase localisés au sommet des crêtes participent à leur formation	23
Figure 10 : Carte du potentiel de charge de la sous-unité a et de la structure en ruban de l'anneau de c8 chez le porc.	25
Figure 11 : Illustration du modèle du mécanisme de synthèse et d'hydrolyse d'ATP par le F1 de l'ATP synthase (issu de (Nakamoto et al., 2008))	27
Figure 12 : Illustration de l'activité de synthèse et d'hydrolyse de l'ATP synthase en fonction du potentiel membranaire mitochondrial (réalisé avec Biorender)	29
Figure 13 : Alignement de séquences protéiques d'IF1	30
Figure 14 : Représentations de la structure et du mécanisme de liaison d'IF1 à l'ATP synthase	31
Figure 15 : Activité de l'IF1 en fonction du pH.....	33
Figure 16 : Représentation structurelle de l'oligomérisation d'IF1 chez le mammifère.....	34
Figure 17 : Structure en microscopie cryogénique des tétramères d'ATP synthase de porc.	35
Figure 18 : IF1 lié aux sous-assemblages d'ATP synthase chez le « knock-out » <i>Lrp1rc</i> spécifiquement dans le cœur de souris	37
Figure 19 : Alignement de séquence protéique d'IF1 et des homologues STF1 et STF2 chez la <i>S. cerevisiae</i>	42
Figure 20 : Poids sec cellulaire par unité de DO en mg.....	51
Figure 21 : Illustration du fonctionnement du découplage de la membrane interne mitochondriale par le protonophore CCCP.....	52
Figure 22 : Schéma du protocole d'isolation des mitochondries par digestion enzymatique à la zymolyase.....	56
Figure 23 : Schéma de la construction des mutants par la méthode de recombinaison homologue	57
Figure 24 : Exemples des résultats obtenus par PCR quantitative.	64
Figure 25 : Exemple de courbes de dissociation obtenue lors d'une PCR quantitative (issue du site d'internet de Merck®).	66

<i>Figure 26 : Illustration du fonctionnement d'une électrode de Clark (issue de la thèse d'Arnaud Mourier)</i>	<i>68</i>
<i>Figure 27 : Illustration du principe de l'électrophorèse bidimensionnelle (issue de (Fiala et al., 2011)).</i>	<i>75</i>
<i>Figure 28 : Structure du domaine FO dimérique de l'ATP synthase de S. cerevisiae.....</i>	<i>98</i>
<i>Figure 29 : Analyse structurale de l'ATP synthase des mitochondries de la souche sauvage (WT) et du mutant atp18Δ.....</i>	<i>99</i>
<i>Figure 30 : Energisation des mitochondries de la souche sauvage (WT) et du mutant atp18Δ, suivie par l'extinction de la fluorescence de la rhodamine 123.....</i>	<i>100</i>
<i>Figure 31 : La perte de la sous-unité i/j induit un défaut d'assemblage et d'activité de synthèse de l'ATP synthase sans affecter les capacités de la chaîne respiratoire</i>	<i>102</i>
<i>Figure 32 : La perte de sous-unité i/j induit une augmentation du contenu mitochondrial</i>	<i>104</i>

INTRODUCTION

I. Introduction

A. La mitochondrie : la centrale énergétique de la cellule

1. Généralités

Selon la théorie endosymbiotique développée par le Dr. Lynn Sagan en 1967 (Sagan, 1967), la mitochondrie dériverait de l'endosymbiose d'une alphaprotéobactérie au sein d'une cellule hôte apparentée aux archées d'Asgård (Spang et al., 2015; Wang and Wu, 2015; Zaremba-Niedzwiedzka et al., 2017). Au cours de l'évolution, elle est devenue une organelle essentielle aux cellules eucaryotes. La mitochondrie est constituée de deux compartiments. Le compartiment matriciel est délimité par la membrane interne mitochondriale (MIM) et le compartiment intermembranaire est délimité par la MIM et la membrane externe mitochondriale (MEM) (Figure 1). Ces deux membranes se distinguent par leur composition et leurs caractéristiques :

1. La MIM a une teneur élevée en protéine (80%) et une composition lipidique (20%) très riche en cardiolipide (Horvath and Daum, 2013). De par leur forme conique, les cardiolipides participent à des courbures négatives de la MIM nommées crêtes mitochondriales (Ikon and Ryan, 2017; Ren et al., 2014). La composition de la MIM lui confère une importante sélectivité aux ions (Horvath and Daum, 2013).
2. La MEM est peu sélective, elle comprend majoritairement des transporteurs qui permettent des échanges entre le compartiment cytosolique et l'espace intermembranaire.

De par son origine, la mitochondrie possède son propre matériel génétique, un ADN mitochondrial (ADNmt) présent en plusieurs exemplaires dans l'espace matriciel (Figure 1).

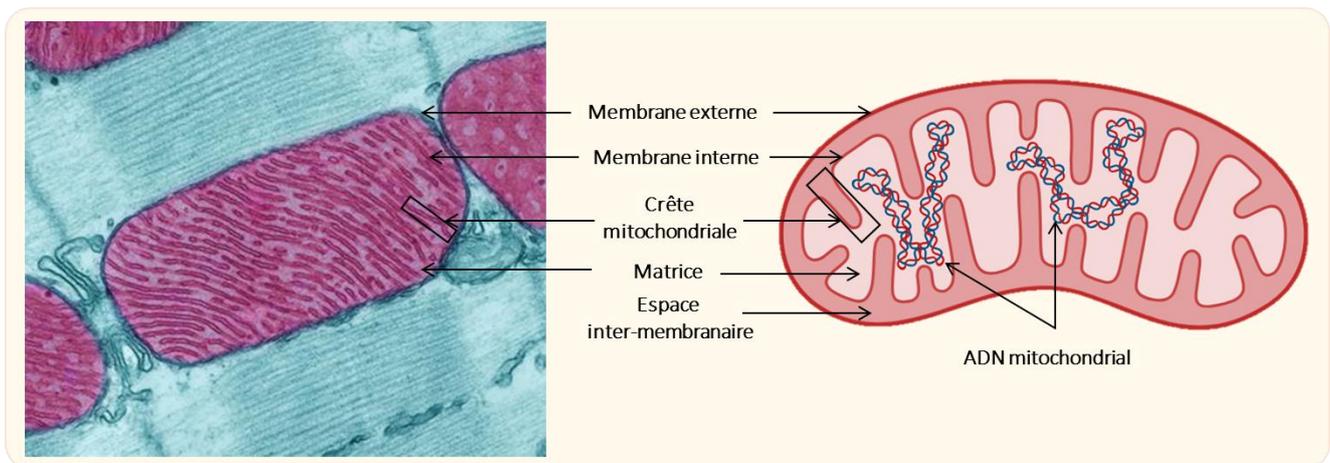


Figure 1 : Image par microscopie et schéma d'une mitochondrie

A gauche, l'image obtenue par analyse de microscopie électronique d'une cellule musculaire cardiaque de rat, où les mitochondries sont identifiées en rouge (d'après Thomas Deerinck - National Center for Microscopy and Imaging Research). A droite, le schéma d'une mitochondrie (réalisé avec Biorender). La mitochondrie est constituée d'un compartiment matriciel, délimité par la membrane interne mitochondriale, et d'un compartiment intermembranaire, délimité par la membrane interne et la membrane externe mitochondriales. La membrane interne réalise des invaginations nommées crêtes mitochondriales. La mitochondrie possède son propre génome, l'ADN mitochondrial. (réalisé avec Biorender)

L'ADNmt se compose de gènes codant pour des acides ribonucléiques (ARN) nécessaires à la traduction mitochondriale (ARN de transfert et ARN ribosomiques) et de plusieurs sous-unités protéiques constitutives du système des oxydations phosphorylantes (OXPHOS) et encodant chez *Saccharomyces cerevisiae* une protéine ribosomale var1 (Anderson et al., 1981; Foury et al., 1998). L'ADNmt de levure et de l'homme se différencient par leur taille, environ 78 kilo paires de base (Kpb) et 16 Kpb respectivement, et par les gènes codants (Figure 2).

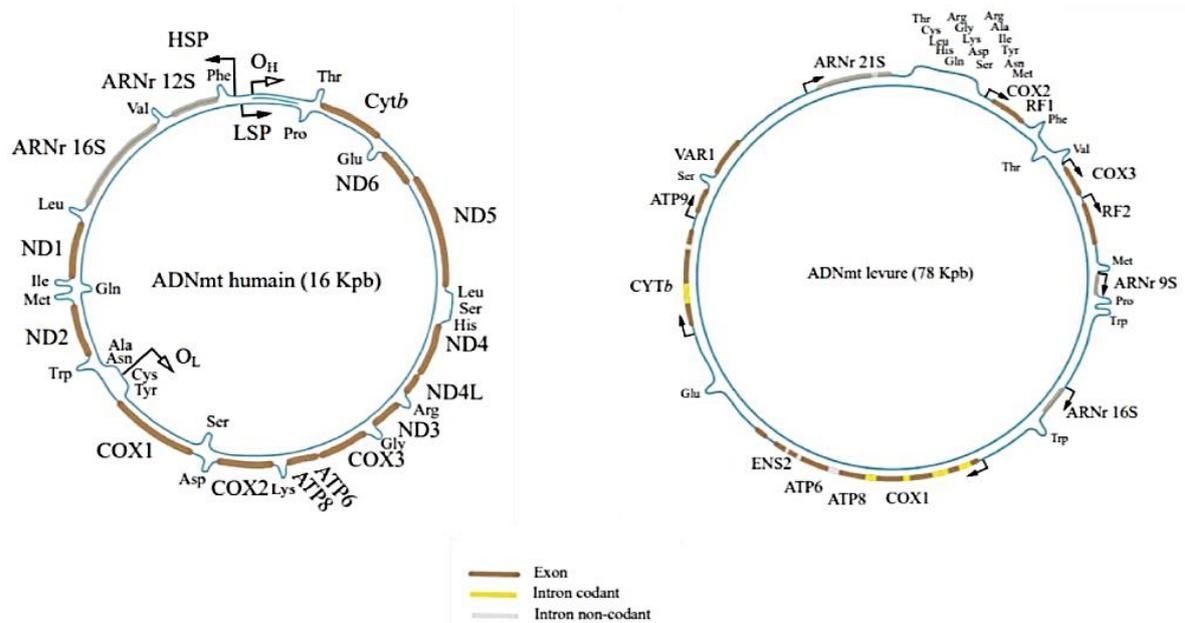


Figure 2 : Carte de l'ADN mitochondrial des cellules humaines et de *Saccharomyces cerevisiae*

Les gènes mitochondriaux codent chez les deux espèces pour des ARN de transfert et des ARN ribosomiques (ARNr), pour des sous-unités protéiques du système des oxydations phosphorylantes. Treize sous-unités des complexes du système des OXPHOS sont codées par l'ADNmt chez les cellules mammifères et seulement sept sous-unités chez *S. cerevisiae*. De plus, chez *S. cerevisiae* la protéine ribosomale *var1* est encodée par l'ADNmt. (Issu de la thèse de Cyrielle Bouchez, 2009)

Cependant, le protéome mitochondrial est composé d'environ 1 000 protéines chez la levure à un peu plus de 1 500 protéines chez l'homme (Pfanner et al., 2019). Par conséquent, le protéome mitochondrial est majoritairement (>99%) encodé par le génome nucléaire (ADNn). Cet organite peut s'organiser au sein de la cellule en embranchements dynamiques contrôlés par un équilibre entre les processus antagonistes de fusion et fission.

Le fonctionnement cellulaire nécessite une production et une consommation constante d'énergie. La mitochondrie est couramment définie comme « la centrale énergétique » car elle héberge les phosphorylations oxydatives couplant la respiration à la synthèse d'ATP qui constitue, une source d'énergie très importante (Chance, 1965; Nicholls and Ferguson, 2013). La mitochondrie est aussi le siège de nombreuses réactions enzymatiques et voies métaboliques telles que : le cycle de l'acide tricarboxylique (TCA) (ou le cycle de Krebs) (Krebs and Johnson, 1980), le métabolisme des lipides (β -oxydation)(Kunau et al., 1995),

l'homéostasie du calcium, l'apoptose (mort cellulaire), la biosynthèse des nucléotides, des hormones stéroïdes, des acides aminés (cycle de l'urée) et des centres Fer/Soufre.

Vous l'aurez compris, par son importance dans la bioénergétique, le métabolisme, l'homéostasie calcique et redox ainsi que son implication dans de nombreuses voies de signalisation, la mitochondrie est un organite clé, indispensable à la croissance, à la spécialisation fonctionnelle et à la survie de la cellule eucaryote. Par conséquent, de nombreuses pathologies sont associées à des dysfonctions mitochondriales, certaines ayant des origines génétiques (nucléaire ou mitochondriale). La mitochondrie a aussi été identifiée comme acteur pathogène impliqué dans plusieurs maladies telles que l'obésité, le diabète, les maladies cardiovasculaires et neurodégénératives, le cancer et probablement aussi le processus de vieillissement (Lasserre et al., 2015). Dans ce manuscrit, nous allons nous concentrer sur le rôle métabolique cellulaire de la mitochondrie via le système des OXPHOS.

2. Système des oxydations phosphorylantes (OXPHOS)

Le système des OXPHOS, localisé dans la MIM, se compose de la chaîne respiratoire et du système phosphorylant (Figure 3). Grâce à l'oxydation de substrat, la chaîne respiratoire transfère les protons de l'espace matriciel vers l'espace intermembranaire mitochondrial. La perméabilité de la MIM vis-à-vis des protons étant particulièrement faible, les protons vont s'accumuler créant une différence de potentiel électrochimique en protons de part et d'autre de la MIM. Ce potentiel électrochimique, aussi appelé force protonotrice (Δp ou $\Delta\mu_{H^+}$), génère à la fois une différence de pH (ΔpH) et une différence de potentiel électrique ($\Delta\Psi$), et se définit ainsi par la relation suivante :

$$\Delta p \text{ (en V)} = \Delta\Psi - Z \Delta pH$$

où Z est le facteur conventionnel $2,303 RT/F$ avec

R : constante des gaz parfaits ($8.314 \text{ J}\cdot\text{mol}^{-1}\cdot\text{K}^{-1}$) ; T : température en degrés Kelvin ;

F : constante de FARADAY ($96,485 \text{ C}\cdot\text{mol}^{-1}$)

La réaction de synthèse d'adénosine triphosphate (ATP) à partir d'adénosine biphosphate (ADP) et de phosphate inorganique (Pi) est une réaction défavorisée

thermodynamiquement. Elle nécessite d'être couplée à une réaction favorisée pour pouvoir se réaliser. Basé sur la théorie chimiosmotique énoncée par le Pr. Peter Mitchell, l'ATP synthase convertit l'énergie osmotique, générée par la chaîne respiratoire, à la synthèse d'ATP (Mitchell, 1961). Par conséquent, le système des OXPHOS permet de maintenir le potentiel phosphate ($[ATP]/[ADP/Pi]$) et également de maintenir l'équilibre entre les réactions de réduction et d'oxydation (la balance rédox) au sein de la cellule.

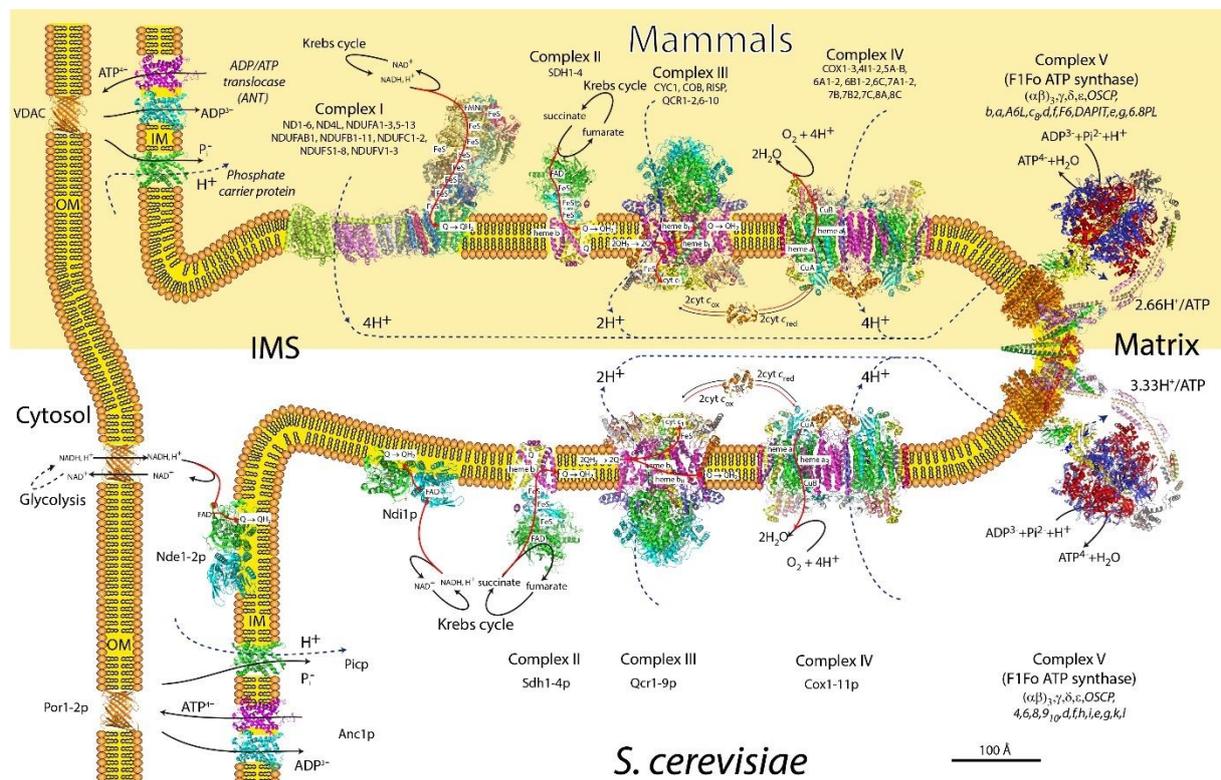


Figure 3 : Illustration des OXPHOS localisées dans la membrane interne de la mitochondrie chez les mammifères (haut) et chez la levure *S. cerevisiae* (bas)

Les OXPHOS font intervenir cinq complexes localisés dans la membrane interne mitochondriale. Le complexe I chez les mammifères et Ndi1p chez la levure permettent l'oxydation du NADH matriciel. Nde1-2p permet l'oxydation du NADH cytosolique chez la levure. Le complexe II permet l'oxydation du succinate. Les électrons produits sont transportés via des transporteurs mobiles (cytochrome c et coenzyme Q) au complexe III puis au IV. Le complexe IV est responsable de la réduction de l'oxygène, l'accepteur final d'électrons. Ce transfert d'électrons permet un transport actif de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire par les complexes I, III et IV. Ce gradient de proton créé permet la production d'ATP via l'ATP synthase (complexe V). Les dimères/oligomères d'ATP synthase sont localisés au sommet des crêtes mitochondriales. A noter que le dimère d'ATP synthase représenté ici est celui de *S. cerevisiae*. Les structures proviennent de PDB et sont à la même échelle (indiquée par la barre d'échelle). (modifié par Alain Dautant d'après (Lasserre et al., 2015))

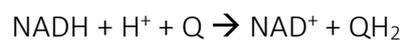
a) La chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire se compose de différents complexes protéiques : les déshydrogénases (Nde1-2p, Ndip ou complexe I, Gut2p/mG3Pdh, complexe II), l'ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase (complexe III) et la cytochrome c oxydase (complexe IV). L'oxydation des substrats par les déshydrogénases initie le transfert d'électrons qui seront transportés à travers les nombreux sites redox composant la chaîne respiratoire jusqu'à l'accepteur final d'électrons, l'oxygène. La chaîne respiratoire, à travers les complexes I, III et IV, couple le transfert d'électron à une translocation de protons de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire et ainsi génère une différence de potentiel électrochimique en protons de part et d'autre de la MIM. Cette force protomotrice est utilisée par l'ATP synthase afin de convertir cette énergie osmotique en énergie chimique par la synthèse d'ATP.

(1) Les déshydrogénases

(a) Les NADH déshydrogénases

Chez le mammifère, la NADH déshydrogénase (complexe I) est un complexe multiprotéique composé d'un domaine soluble exposé à la matrice et un domaine membranaire enchâssé dans la MIM (Vinothkumar et al., 2014). Au sein de son domaine soluble, elle possède un groupement prosthétique flavine mononucléotide (FMN) et plusieurs centres fer-soufre (Fe-S) qui permettent le transport d'électrons au sein du complexe protéique jusqu'à la poche de réduction de l'ubiquinone (Fiedorczuk et al., 2016). La NADH déshydrogénase catalyse la réduction de l'ubiquinone (coenzyme Q) par l'oxydation du NADH en NAD^+ :

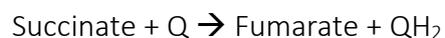


Cette réaction exergonique est couplée à l'extrusion de quatre protons de l'espace matriciel vers l'espace intermembranaire via le domaine membranaire du complexe I de mammifère. Cette réaction peut être inhibée par des inhibiteurs chimiques tels que la roténone ou la piéricidine A.

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, il y a deux types de NADH déshydrogénase associées à la membrane interne mitochondriale. Une exposée à la matrice, appelée la NADH déshydrogénase interne (Ndi1p), et deux exposées à l'espace intermembranaire, appelées NADH déshydrogénase externes (Nde1p et Nde2p) (de VRIES and Grivell, 1988; Small and McAlister-Henn, 1998). Les Nde1-2p permettent la réoxydation du NADH cytosolique, produit par la glycolyse. La Ndi permet la réoxydation du NADH mitochondrial produit par le cycle de Krebs et, lors d'une prolifération en présence d'éthanol, par l'alcool déshydrogénase et l'acétaldéhyde déshydrogénase mitochondriales (Boubekeur et al., 2001; Tessier et al., 1998). Contrairement au complexe I de mammifère, chez *S. cerevisiae* ces enzymes homodimériques sont encodées par l'ADNn. Chaque monomère possède un cofacteur flavine adénine dinucléotide (FAD) permettant l'oxydation du NADH. Ces déshydrogénases sont insensibles aux inhibiteurs du complexe I.

(b) *La succinate déshydrogénase (complexe II)*

La succinate déshydrogénase (complexe II) possède un domaine soluble exposé dans la matrice mitochondriale associé à un domaine membranaire enchâssé dans la MIM. Le domaine soluble comprend un cofacteur FAD et des centres Fe-S qui permettent le transfert des électrons jusqu'au domaine membranaire, le site de réduction de l'ubiquinone. Le domaine membranaire du complexe de mammifère possède un hème b contrairement à *S. cerevisiae*. Le complexe II ne p Le complexe II de la chaîne respiratoire oxyde le succinate en fumarate en transférant deux électrons à l'ubiquinone, et constitue une étape clé du cycle de Krebs (Singer et al., 1957).



Contrairement aux complexes I, III et IV, le complexe II ne transfère pas de protons.

(c) *Le glycérol-3-phosphate déshydrogénase*

La glycérol-3-phosphate déshydrogénase est une protéine homo-tétramérique orientée vers l'espace intermembranaire. Cette enzyme est annotée G3PDH mitochondriale pour le mammifère et Gut2p pour la levure. Elle catalyse la réduction de l'ubiquinone via un FAD en oxydant le glycérol-3-phosphate (G3P) en dihydroxyacétone phosphate (DHAP) :



Lorsque les G3P déshydrogénases mitochondriales fonctionnent de façon concertée avec leurs homologues cytosoliques, ces dernières permettent la réoxydation du NADH cytosolique en NAD⁺ (Figure 4). L'action concertée des G3P déshydrogénases cytosoliques et mitochondriales est appelée la navette redox G3P, permettant à la chaîne respiratoire de maintenir la balance redox (NADH/NAD⁺) cytosolique (Larsson et al., 1998; Pählman et al., 2001; Rønnow and Kielland-Brandt, 1993)

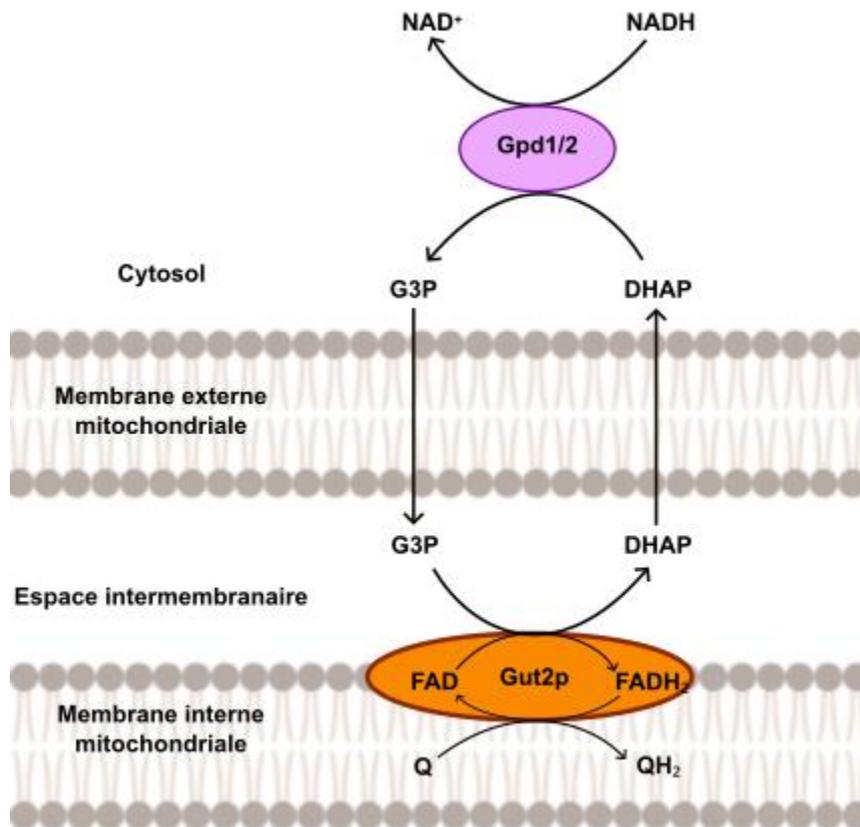


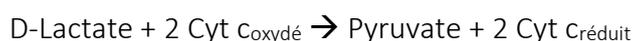
Figure 4 : Illustration du fonctionnement de la navette redox glycérol-3-phosphate chez la levure. (réalisé avec Biorender)

La déshydrogénase mitochondriale Gut2p catalyse la réduction de l'ubiquinone (Q) via un FAD en oxydant le glycérol-3-phosphate (G3P) en dihydroxyacétone phosphate (DHAP). Le DHAP est réduit en G3P par les déshydrogénases solubles cytosoliques Gpd1/2 en oxydant le NADH cytosolique en NAD⁺.

(d) Les lactates déshydrogénases

Contrairement au mammifère, l'activité principale permettant d'oxyder le lactate est assurée chez la levure par des L-lactate et D-lactate déshydrogénases transférant les électrons au cytochrome c.

La D-lactate déshydrogénase possède des centres zincs (Zn^{2+}) et un cofacteur FAD. Elle se situe sur la MIM orientée vers l'espace intermembranaire. Elle catalyse l'oxydation du lactate en pyruvate en réduisant le cytochrome c (Cyt c) qui transfère ensuite l'électron au complexe IV :



La L-lactate déshydrogénase réalise la même réaction que la D-Lactate déshydrogénase. Cependant elle possède un groupement FMN et un cytochrome-b2 et se situe dans l'espace intermembranaire mitochondrial.

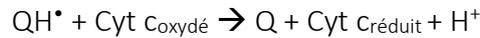
(2) Le pool d'ubiquinone

Les ubiquinones ou coenzyme Q (Q) sont constituées d'un cycle benzoquinone hydrophile, qui est la partie acceptant les électrons, et d'une chaîne carbonée isoprénique, hydrophobe. La chaîne isoprénique peut contenir entre une et dix unités d'isoprène (une structure de cinq carbones), variant selon les espèces. Par exemple, les ubiquinones de *S. cerevisiae* possèdent une chaîne de 6 unités d'isoprène (Q6), tandis que chez l'humain, elles en comptent 10 (Q10). De par cette chaîne liposoluble, les ubiquinones peuvent circuler librement entre les complexes au sein de la membrane interne. Les ubiquinones sont réduites (QH₂) par les déshydrogénases et oxydées par l'ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase, permettant le transport de deux électrons en même temps.

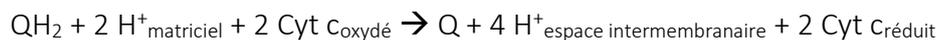
(3) L'ubiquinol-cytochrome c oxydoréductases (complexe III)

L'ubiquinol-cytochrome c oxydoréductase est un complexe multiprotéique transmembranaire fonctionnant obligatoirement en homodimère. Chaque monomère contient un cytochrome b (à deux hèmes b_H et b_L), un centre Fe-S et un cytochrome c1 (hème c1). Ce dernier permet le transfert des électrons jusqu'au cytochrome c. Chez le mammifère et *S. cerevisiae*, une seule sous-unité du complexe est encodée par l'ADNmt, les autres par l'ADNn. Ce complexe permet de passer d'un transporteur bi-électronique (QH₂) à un transporteur

mono-électronique (Cyt c), par conséquent, le transfert d'électron au niveau du complexe III se fait de façon séquentielle.



A ce jour, seul le complexe III de la chaîne respiratoire est décrit comme fonctionnant comme une « boucle de Mitchell » et non pas comme une pompe à protons. La réduction des ubiquinones sur la face matricielle et l'oxydation des ubiquinones sur la face externe, permet le transfert d'électrons et l'extrusion de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire par une entité physique, l'ubiquinone pour le complexe III. Cette spécificité permet au complexe III d'avoir une stœchiométrie fixe de deux électrons transférés au cytochrome c pour deux protons transloqués.



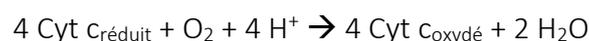
Le complexe III peut être inhibé chimiquement par l'antimycine A.

(4) Le cytochrome c

Le cytochrome c est une petite protéine diffusant sur la face externe de la membrane interne. Il contient un hème c permettant le transfert d'un électron du complexe III au dernier complexe de la chaîne respiratoire, le complexe IV.

(5) La cytochrome c oxydase (complexe IV)

La cytochrome c oxydase est un complexe membranaire. Chez le mammifère et *S. cerevisiae*, les sous-unités de ce complexe sont codées par l'ADNn et l'ADNmt. Quatre cytochrome c sont nécessaires pour réduire le dioxygène en eau par le complexe IV. Les électrons sont transférés un par un du cytochrome c à un premier centre cuivre CuA. Puis, via l'hème a, les électrons sont transférés au centre de réduction de l'oxygène, composé d'un hème a3 et d'un atome de cuivre CuB.



Comme les complexes I et III, le complexe IV couple ce transfert d'électrons à l'extrusion de protons. La stœchiométrie « électrons transférés/protons extrudés » communément pour ce complexe est de quatre électrons pour quatre protons. Il est intéressant de noter que l'activité du complexe IV peut être régulée par la fixation de l'ADP permettant ainsi d'adapter l'activité

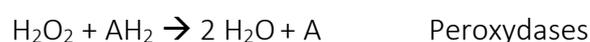
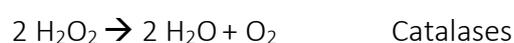
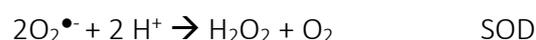
de la chaîne respiratoire en fonction des besoins énergétiques de la cellule via le potentiel phosphate ($[ATP]/([ADP][Pi])$) (Beauvoit and Rigoulet, 2001; Frank and Kadenbach, 1996). Le cyanure de potassium (KCN) est un inhibiteur chimique du complexe IV en empêchant la fixation de l'oxygène (Cooper and Brown, 2008).

(6) Production d'espèces réactives de l'oxygène

Le dioxygène pourtant nécessaire pour les organismes aérobies est connu pour être une source de production d'espèces radicalaires toxiques pour la cellule. Le dioxygène a la capacité de capturer des électrons célibataires et ainsi se transformer en espèces réactives d'oxygène (EROs) ou ROS en anglais. La chaîne respiratoire est l'une des principales sources de production des EROs (Boveris et al., 1972) à cause des nombreux transporteurs d'électrons qui la composent tels que les flavoprotéines, les protéines avec des centres Fe-S, les ubiquinones et les cytochromes. Thermodynamiquement, sous leur forme réduite tous ces transporteurs d'électrons peuvent transférer les électrons à l'oxygène directement. De nombreux travaux ont mis en évidence chez les mitochondries de mammifères que les complexes I, II et III produisent des EROs (Galkin and Brandt, 2005; Messner and Imlay, 2002; Sun and Trumpower, 2003). Chez la levure, il a été démontré qu'il était possible que les NADH déshydrogénases produisent des EROs (Fang and Beattie, 2003). La réduction du dioxygène par un électron produit l'anion superoxyde ($O_2^{\bullet-}$), une ERO très toxique. A son tour, la réduction de l'anion superoxyde par un électron produit du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2), une autre ERO qui n'est pas toxique et qui a même été identifiée nécessaire pour des processus biologiques (Stone and Yang, 2006). Cependant, sa réduction par certains métaux comme le fer produit un ion hydroxyle OH^- et un radical hydroxyle OH^{\bullet} , que l'on appelle la réaction de FENTON.



Ces radicaux libres très instables sont toxiques pour la cellule. Afin de lutter contre cette toxicité, la cellule a des enzymes telles que les superoxydes dismutases (SOD), des catalases et peroxydases permettant l'élimination de ces EROs.



De nombreux articles mettent en évidence que des défauts du système des OXPHOS entraînent une augmentation de la production de EROs (Houšťek et al., 2006). Une étude a mis en évidence en traitant les mitochondries de cœur de rat avec un agent protonophore, que la diminution de la formation de H_2O_2 est proportionnelle à la diminution du potentiel membranaire (Figure 5) (Korshunov et al., 1997). Ces travaux ont confirmé le concept proposé par le Dr. Skulachev selon lequel une hyperpolarisation des mitochondries (comme à l'état non phosphorylant), peut être source de formation de EROs et être dangereux pour la cellule (Korshunov et al., 1997; Skulachev, 1996).

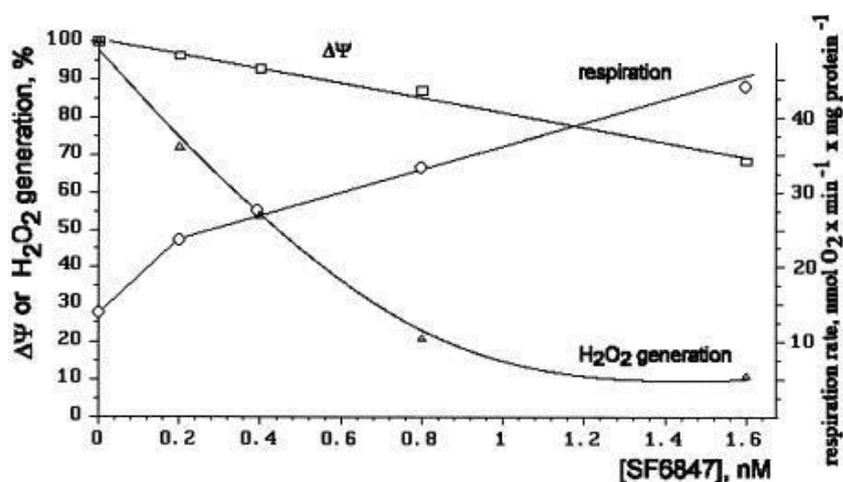


Figure 5 : Effets de l'agent découplant le SF6847 sur la respiration, le $\Delta\Psi$ et la production de H_2O_2 par les mitochondries de cœur de rat.

Mélange d'incubation : 250 mM de saccharose, 1 mM d'EGTA, 10 mM de KCl, 10 mM de MOPS (pH 7,3), 6 mM de succinate, mitochondries de cœur de rat (0,8 mg de protéines/ml), 16 μM de safranine O, 1,6 μM de scopolétine, peroxydase de raifort (10 U). Pour les mesures de production de H_2O_2 , la safranine O a été omise, et la protéine mitochondriale était de 1 mg/ml. La production de H_2O_2 et les niveaux de $\Delta\Psi$ dans les échantillons sans SF6846 ont été considérés comme étant de 100 % .(issu de (Korshunov et al., 1997))

b) Le système phosphorylant

Le système phosphorylant permet de coupler la force protomotrice, générée par la chaîne respiratoire, à la synthèse d'ATP. Il se compose de l'ATP synthase et de deux transporteurs, le transporteur de nucléotides adényliques (ANT) et le transporteur du phosphate inorganique (PiC).

(1) L'ATP synthase (complexe V)

L'ATP synthase, appelée aussi F1-FO ATPase ou complexe V des OXPHOS, est une protéine hétéro-oligomère qui consomme la force protomotrice pour synthétiser l'ATP à partir d'ADP et de Pi. Les protons, accumulés dans l'espace intermembranaire, passent au travers de deux semi-canaux aqueux à l'interface entre l'anneau de sous-unités 9/c (appellation levure/mammifère) et la sous-unité 6/a, engendrant une rotation de l'anneau et par conséquent un changement conformationnel du domaine catalytique orienté vers la matrice. C'est ce changement conformationnel qui permet de mobiliser l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP. Une description détaillée de la structure, l'assemblage et le fonctionnement de l'ATP synthase est faite dans une seconde partie de cette introduction.

(2) Les transporteurs : ANT et PiC

Le transporteur de nucléotide adénylique (ANT) est un anti-port électrogénique qui permet d'échanger un ADP^{3-} contre un ATP^{4-} . L'acide bongkréique (BA) et le carboxyatractyloside (CAT) inhibent l'ANT.

Le transporteur du phosphate inorganique (PiC) est un symport électroneutre, permettant l'entrée d'un phosphate inorganique (Pi) et d'un proton.

B. L'ATP synthase : une nanomachine moléculaire

Malgré sa complexité structurale, l'ATP synthase est remarquablement conservée dans de nombreux organismes très différents du point de vue évolutif. L'ATP synthase est présente, entre autres, dans la membrane plasmique des bactéries, la membrane thylacoïdale des chloroplastes et la membrane interne des mitochondries. En 1974, le Pr. Paul D. Boyer a présenté une théorie expliquant le fonctionnement de l'ATP synthase. La résolution de la structure cristallographique de l'ATP synthase en 1994, grâce aux travaux de John E. Walker, a permis de corroborer le mécanisme d'action proposé par le Dr. Boyer (Abrahams et al., 1994; Boyer, 1993). Cette découverte a valu la moitié du prix Nobel de chimie de 1997 à Paul D. Boyer et John E. Walker « pour l'élucidation des mécanismes enzymatiques sous-jacents à la synthèse de l'adénosine triphosphate (ATP) » ; l'autre moitié a été remise à Jens C. Skou pour sa

découverte de l'enzyme Na^+ , K^+ -ATPase. Depuis cette découverte, de nombreuses études ont permis d'en apprendre davantage sur la structure, l'organisation, l'activité de synthèse et d'hydrolyse de l'ATP synthase. Cependant, il reste de nombreux mystères à résoudre afin de mieux appréhender les pathologies qui sont liées à l'ATP synthase et au système des OXPHOS.

1. La structure

L'ATP synthase de *S. cerevisiae* et de mammifère, est composée de 17 sous-unités différentes (Figure 6). Sa structure se compose de deux domaines définis selon leur solubilité : le domaine F1 soluble, exposé côté matriciel, et le domaine FO membranaire (Collinson et al., 1994; Walker et al., 1985). Ces deux domaines comportent une partie mobile (rotor) et une partie immobile (stator).

Le domaine catalytique, F1 comprend :

1. Le stator, est le site de synthèse d'ATP, qui se compose d'un assemblage de trois hétérodimères ($\alpha\beta$).
2. La partie rotor ou tige centrale qui se compose des sous-unités γ , δ et ϵ permettant la liaison entre le F1 et le FO.

Le domaine FO comprend :

1. Le stator du FO ou pied périphérique qui est constitué des sous-unités 6/a (appellation levure/mammifère), 8/A6L, 4/b, d, h/F6, OSCP (pour « oligomycin sensitivity conferring protein » et i ou j/6.8PL (pour « 6.8 kDa proteolipid »). Il permet de stabiliser la tête catalytique lors de la rotation du rotor grâce à son insertion dans la membrane.
2. La partie rotor du domaine FO qui comprend l'anneau de sous-unité c (c_{10} chez la levure et c_8 chez le mammifère). Il constitue le canal à protons avec les sous-unités a et 8.

Contrairement à *Escherichia coli*, l'ATP synthase de *S. cerevisiae* et de mammifère comporte des sous-unités surnuméraires dans le domaine FO composantes du dimère d'ATP synthase : e, g, i/j/6.8PL et k/DAPIT (pour « Diabetes-associated protein in insulin-sensitive tissues »). Les sous-unités i/j/6.8PL et 8/A6L permettent de stabiliser l'ATP synthase et participent comme les sous-unités f, g et DAPIT à la dimérisation de l'ATP synthase (Arnold et al., 1998; Paumard et al., 2002; Wagner et al., 2010).

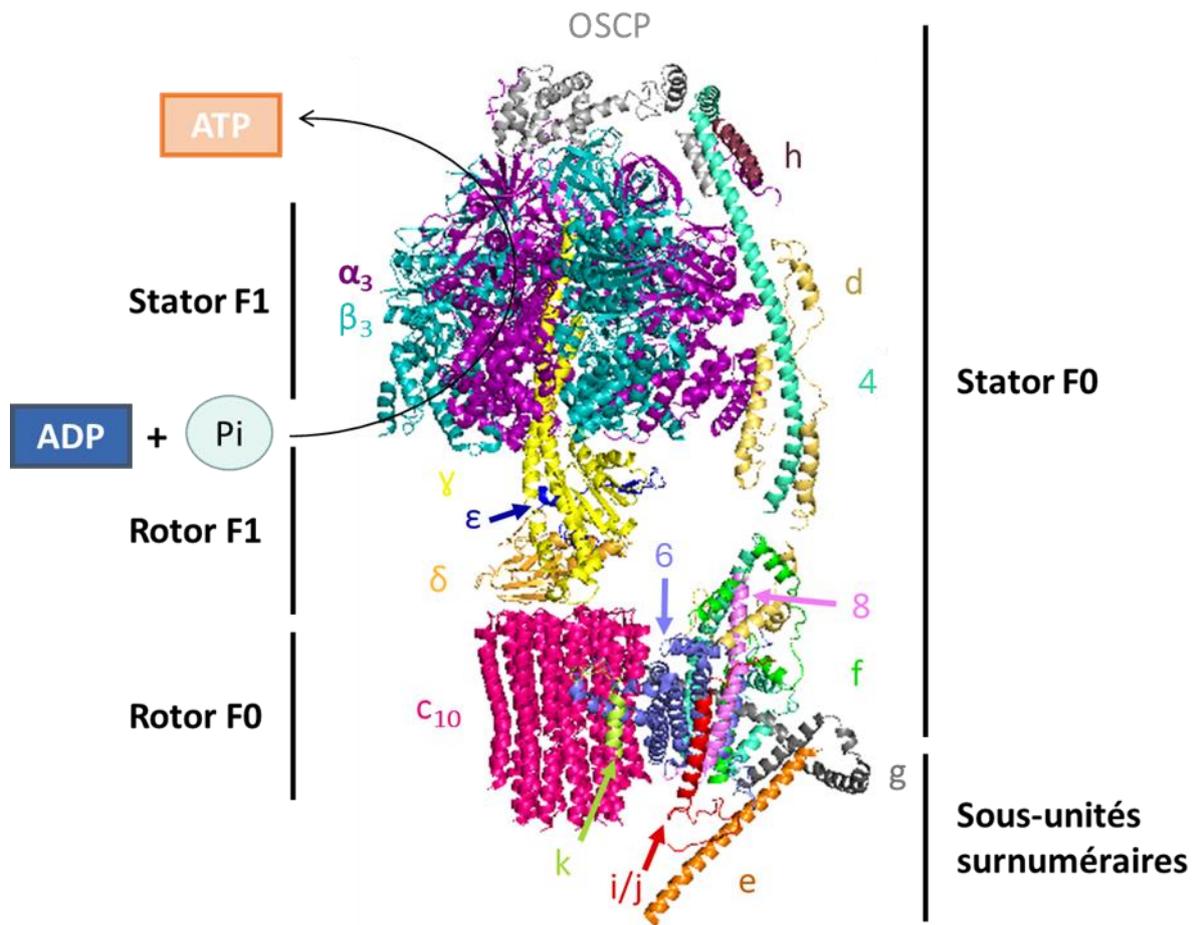


Figure 6 : Représentation de la structure obtenue par cryo-ME de l'ATP synthase monomérique de *S. cerevisiae*.

Le domaine F1 se compose d'un stator ($\alpha_3\beta_3$) et d'une tige centrale (γ, δ, ϵ) et le domaine F0 d'un rotor (c_{10}) et d'un pied périphérique (6, 8, 4, d, h, f et OSCP). L'ATP synthase compte aussi des sous-unités surnuméraires (e, g, i/j, k). PDB : 6B8H (H. Guo et al., 2017). Réalisé à l'aide du logiciel Pymol.

L'ATP synthase a la particularité, comme certains complexes de la chaîne respiratoire d'être composée de sous-unités codées par l'ADN mitochondrial et nucléaire. La majorité des sous-unités sont codées par l'ADNn, hormis les sous-unités a et 8 codées par l'ADNmt chez les mammifères et *S. cerevisiae*. Trois gènes nucléaires codent pour la sous-unité c chez l'homme, tandis que cette sous-unité est codée par un seul gène mitochondrial chez la levure. Par conséquent, l'assemblage de l'ATP synthase est un processus complexe impliquant l'association coordonnée de sous-unités d'origine mitochondriale et nucléaire.

Au cours des dernières années, grâce aux avancées technologiques en cryo-microscopie électronique (Cryo-ME) (Pinke et al., 2020; Srivastava et al., 2018), les sous-unités d'ATP synthase homologues chez les différents organismes ont pu être identifiées. Il serait aujourd'hui judicieux que les groupes de recherche s'accordent sur une nomenclature des sous-unités homologues dans les différents organismes pour éviter toute confusion. En attendant, vous trouverez dans le [Tableau 1](#) le récapitulatif des sous-unités de l'ATP synthase avec la nomenclature pour la levure et le mammifère ainsi que leur origine génétique mitochondriale ou nucléaire.

Tableau 1 : Nomenclature et stœchiométrie des sous-unités composantes de l'ATP synthase chez la levure et le mammifère

Les sous-unités codées par l'ADN mitochondrial sont identifiées en orange, les autres sont codées par l'ADNn.

	Levure	Mammifère
Stator F1	α_3	α_3
	β_3	β_3
Rotor F1	γ	γ
	δ	δ
	ϵ	ϵ
Rotor FO	9_{10} ou c_{10}	c_8
Stator FO	6	a
	8	A6L
	4	b
	OSCP	OSCP
	d	d
	f	f
	h	F6
Sous-unités surnuméraires	g	g
	e	e
	i/j	6.8PL
	k	DAPIT

2. L'assemblage des sous-unités

De récentes découvertes ont permis de proposer des mécanismes d'assemblage de l'ATP synthase d'humain et de levure (Figure 7). Il existerait trois modules d'assemblage : la partie F1, l'anneau de c et le stator du FO. Cependant, la chronologie des étapes d'assemblage ainsi que la conservation au cours de l'évolution de ce mécanisme selon les organismes modèles restent aujourd'hui encore extrêmement débattues.

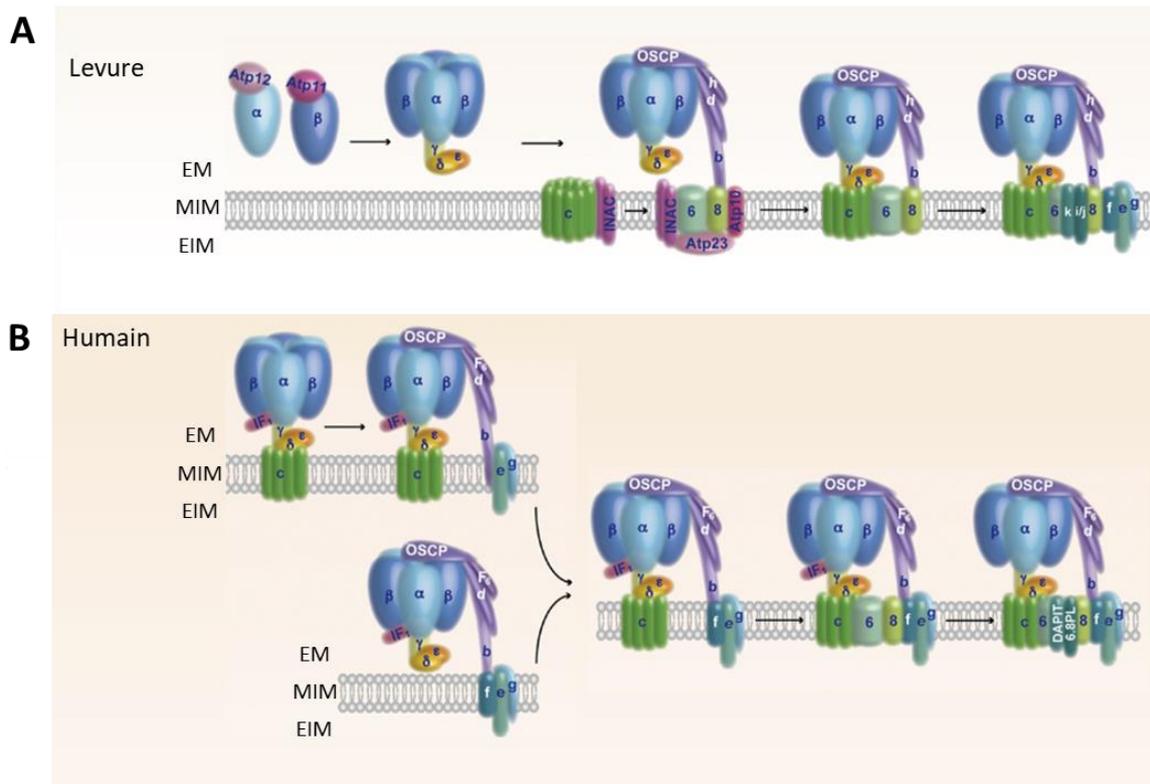


Figure 7 : Voie d'assemblage de l'ATP synthase chez *S. cerevisiae* et l'humain

(A) Chez *S. cerevisiae*, la première étape d'assemblage est la formation de la tête catalytique impliquant deux protéines chaperon Atp11 et Atp12. Deuxièmement, le domaine F1 s'assemble à un intermédiaire constitué du pied périphérique (su6, su8, b, d, h et OSCP) et des facteurs d'assemblage Atp23 et Atp10. Troisièmement, l'anneau de c et su6, présent sur l'anneau de c, permet une association coordonnée des deux sous-unités. La dernière étape est la liaison des sous-unités e, f, g, 6.8PL et DAPIT. (B) Chez l'humain, la première étape d'assemblage est la liaison de l'intermédiaire F1-c8 au pied périphérique (b, d, F6 et OSCP). Deuxièmement, les sous-unités e et g s'ajoutent au complexe puis la sous-unité f se lie. Cependant, l'anneau de c peut aussi se lier à l'intermédiaire F1 - pied périphérique déjà assemblé aux protéines e et g. Troisièmement, les sous-unités a (notée 6) et A6L (notée 8) s'ajoutent au complexe. La sous-unité 6.8PL permet de stabiliser la liaison des sous-unités ATP6 et ATP8 qui s'ajoutent au complexe. La dernière étape est l'assemblage de la sous-unité DAPIT. EM : Espace matriciel, MIM : Membrane mitochondriale interne, EIM : Espace intermembranaire. (modifié de (Song et al., 2018))

Chez *S. cerevisiae*, l'assemblage du domaine F1 nécessite deux protéines chaperonnes Atp11 et Atp12 (Song et al., 2018). Elles empêchent la formation d'agrégats de sous-unité α et β (Ackerman, 2002). Le domaine F1 se lie à un assemblage intermédiaire constitué du pied périphérique (6, 8, b, d, h et OSCP) et des facteurs de maturation Atp10 et Atp23. Le complexe INAC (pour « inner membrane assembly complex ») est lié d'une part à l'anneau de c_{10} et d'autre part à la sous-unité 6 localisée dans l'assemblage intermédiaire. INAC et la protéine Oxa1p permettent une association coordonnée des sous-unités pour la formation du canal à protons (Bonnefoy et al., 2009; Jia et al., 2007). Cette étape est primordiale car une mauvaise insertion du canal à protons au sein de l'ATP synthase peut provoquer une dissipation du gradient de protons au travers de la membrane interne. L'étape finale est l'assemblage des sous-unités f, e, g, i/j et k.

He et ses collègues ont proposé un modèle de la voie d'assemblage de l'ATP synthase (He et al., 2018). Premièrement, l'intermédiaire d'assemblage F1- c_8 s'associe au pied périphérique (b, d, F6 et OSCP). Deuxièmement, les sous-unités e et g s'additionnent au complexe soit en même temps ou séparément dans un ordre indéterminé. L'anneau de c pourrait aussi se lier à l'intermédiaire F1-pied périphérique déjà assemblé aux protéines e et g. Troisièmement, les sous-unités a et 8 s'assemblent au complexe soit en même temps ou séparément dans un ordre indéterminé. L'assemblage de la sous-unité 6.8PL permet de stabiliser la fixation des sous-unités a et 8. La dernière étape est l'addition de la sous-unité DAPIT au complexe.

Malgré une composition similaire en sous-unités, la voie d'assemblage de l'ATP synthase *S. cerevisiae* diffère de celle de l'homme. Chez la levure, l'assemblage de la sous-unité a à l'intermédiaire du F1-pied périphérique se fait avant la fixation de l'anneau de c. De plus, l'addition des protéines non essentielles constitue la dernière étape de la voie assemblage alors que chez l'homme les sous-unités e, f et g se lient au complexe avant les sous-unités a, 8 et 6.8PL. Récemment, des facteurs d'assemblages du domaine F1 homologues à ceux de la levure ont été identifiés chez le mammifère, Atpaf1 et Atpaf2 (Zhou et al., 2021).

La synchronisation de l'assemblage des domaines, les régulations ou comment les composantes sont adressées à la membrane, sont encore inconnues à ce jour.

3. L'organisation supramoléculaire

Des analyses structurales et la microscopie électronique ont pu mettre en évidence que les complexes du système des OXPHOS s'organisent en supercomplexes (Figure 8). Les complexes de la chaîne respiratoire s'associent entre eux, les complexes III et IV chez *S. cerevisiae*, ou entre les complexes I, III et IV chez les mammifères, formant ainsi ce que l'on appelle le respirasome (Davies et al., 2018; R. Guo et al., 2017; Hartley et al., 2019; Schägger and Pfeiffer, 2000). Cette organisation en supercomplexes permettrait d'améliorer la cinétique du transfert électronique au sein de la chaîne respiratoire en limitant la diffusion des transporteurs d'électrons mobiles (ubiquinone et cytochrome c) et par conséquent pourrait diminuer la production de EROs et tout en favorisant les électrons provenant d'une voie métabolique plutôt qu'une autre (Hackenbrock et al., 1986; Molinié et al., 2022; Trouillard et al., 2011).

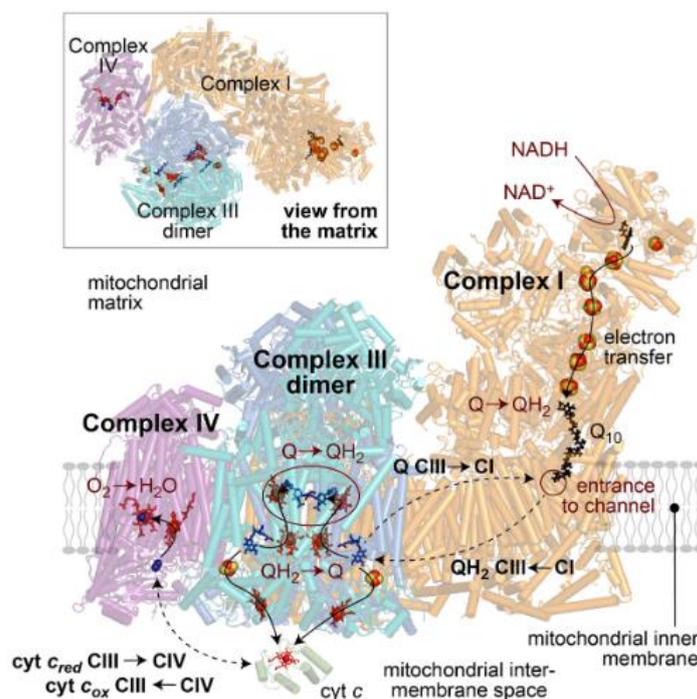


Figure 8 : Illustration des réactions catalysées par le supercomplexe du respirasome chez le mammifère

Le respirasome se compose des complexes I, III et IV. Le complexe I catalyse l'oxydation du NADH couplée à la réduction de l'ubiquinone (Q₁₀) en ubiquinol. Le complexe III (sous forme dimérique) catalyse la réoxydation de l'ubiquinol et la réduction du cytochrome c. Ce dernier est oxydé par le complexe IV, permettant la réduction du dioxygène en eau. La même structure est représentée dans l'encadré vue du côté de la matrice mitochondriale. Structure obtenue par cryo-ME du respirasome de mitochondries de cœur de porc d'après (Gu et al., 2016). Illustration reconstituée à partir des structures de plus haute résolution : complexe I PDB: 6G2J ; complexe III lié à un inhibiteur PDB: 1PPJ ; cytochrome c de bovin PDB: 6FF5 (issu de (Hirst, 2018))

L'ATP synthase n'a jamais été observée associée aux complexes de la chaîne respiratoire mais des oligomères d'ATP synthase ont été localisés aux sommets de crêtes mitochondriales. Deux monomères d'ATP synthase interagissent au niveau de leur domaine FO pour former un dimère (Arnold et al., 1998; Schägger and Pfeiffer, 2000). De même, un dimère peut interagir avec un autre dimère et former un tétramère, le tétramère peut à son tour interagir et former un hexamère, et ainsi de suite. Contrairement au respirasome, dont l'organisation a un effet de coopérativité, en augmentant l'efficacité et l'activité des complexes, l'intérêt des oligomères d'ATP synthase, est abordé dans la littérature comme une rôle de structuration de la membrane interne (Figure 9) (Blum et al., 2019; Davies et al., 2012; Habersetzer et al., 2013; Paumard et al., 2002; Strauss et al., 2008). Une étude chez la levure a montré que la délétion des sous-unités e et g indispensables à la dimérisation de l'ATP synthase, engendre des structures de la membrane interne en forme d'oignon (Paumard et al., 2002). Le repliement de la membrane interne mitochondriale permet d'augmenter le volume disponible pour le système des OXPHOS et favorise le confinement des protons au sein de crêtes.

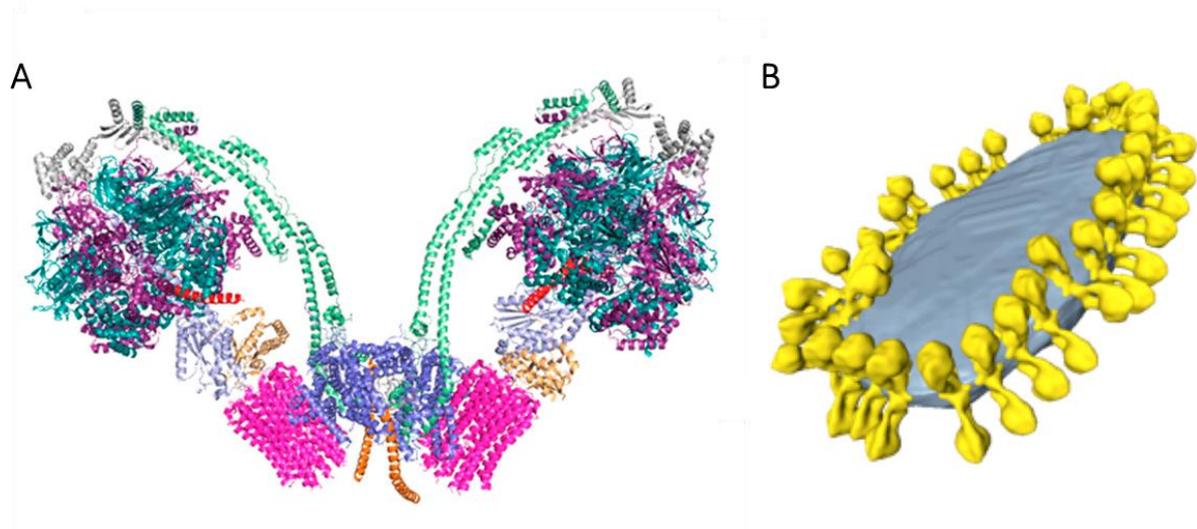


Figure 9 : Les dimères d'ATP synthase localisés au sommet des crêtes participent à leur formation

(A) Structure obtenue par cryo-ME du dimère d'ATP synthase de bœuf. Le domaine F1 soluble est composé du stator avec les sous-unités (α_3 en violet, β_3 en bleu) et de la tige centrale (γ en bleu clair, et δ , ϵ en jaune clair). Le domaine FO membranaire se compose de l'anneau de sous-unités c (rose) et du pied périphérique (a en bleu clair, b, d et F6 en vert clair, OSCP en gris). Les sous-unités surnuméraires comprennent e en orange, f, g, A6L, 6.8PL et DAPIT en bleu clair. (d'après (Domínguez-Zorita and Cuezva, 2023)) PDB : 7AJD (Spikes et al., 2021) (B) Vésicule de la membrane interne de la mitochondrie montrant l'organisation des dimères d'ATP synthase. (d'après (Davies et al., 2012))

4. Le mécanisme de synthèse

Les avancées en cryo-ME ont permis de comprendre à l'échelle moléculaire le fonctionnement de la synthèse d'ATP par l'ATP synthase. Cette catalyse peut être décrite en trois grandes étapes :

1. La rotation de l'anneau de sous-unité c par l'entrée de protons (Figure 10)

Les zones de contacts entre les sous-unités membranaires 6/a et c constituent deux demi-canaux chargés négativement et ouverts sur l'espace matriciel et l'espace intermembranaire (Gu et al., 2019). Dans le demi-canal ouvert sur l'espace intermembranaire, un proton est neutralisé par le groupe carboxylate d'un résidu acide localisé sur une sous-unité c (Pogoryelov et al., 2009; Vik and Antonio, 1994). Ce résidu se déplace par un mouvement brownien vers un environnement plus hydrophobe de la bicouche lipidique, générant une rotation (Junge et al., 1997). La rotation se fait dans un sens horaire vu depuis la partie FO. Cette rotation permet d'apporter un nouveau groupement carboxylate d'une autre sous-unité c voisine dans le même demi-canal. Après plusieurs rotations, le proton est libéré dans le demi-canal ouvert sur l'espace matriciel grâce à l'attraction du groupe carboxyle par une arginine de la sous-unité 6/a (Fillingame et al., 2003; Vik and Antonio, 1994). Pour une rotation de 360° de l'anneau de c, il faut autant de protons que de sous-unités c.

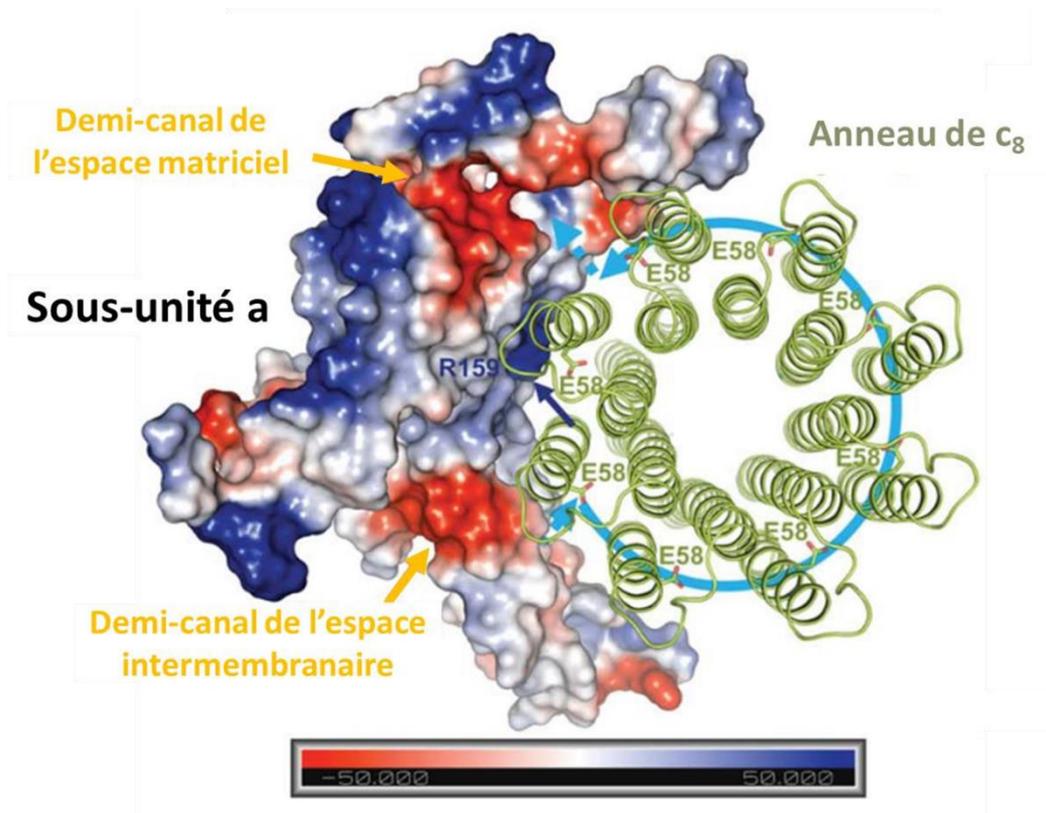


Figure 10 : Carte du potentiel de charge de la sous-unité a et de la structure en ruban de l'anneau de c_8 chez le porc.

Vue depuis le pied de la tige centrale le long de l'axe de la sous-unité 6.8PL. Structure déterminée par cryo-ME. Le demi-canal ouvert sur l'espace inter-membranaire permet l'entrée de protons grâce à un environnement chargé négativement au sein de la sous-unité a. Le proton est neutralisé par le groupement carbonyle de l'acide glutamique 58 (E58) d'une sous-unité c. Ce résidu se déplace par un mouvement brownien vers un environnement plus hydrophobe de la bicouche lipidique, générant une rotation dont le sens est indiqué par une flèche semi-circulaire bleue. Cette rotation permet d'apporter un nouveau résidu E58 d'une autre sous-unité c dans le demi-canal. Après plusieurs rotations, le proton est libéré dans le demi-canal ouvert sur l'espace matriciel grâce à une ionisation du groupe carboxyle du résidu E58 par l'arginine 159 (R159) de la sous-unité a. Code PDB : 6J5K. (modifié de (Gu et al., 2019))

2. La rotation de la tige centrale entraînée par la rotation de l'anneau de sous-unité c

L'anneau de sous-unité c est connecté à l'hexamère $(\alpha\beta)_3$ via les sous-unités γ , δ et ϵ . La rotation de l'anneau de c entraîne la rotation de la sous-unité γ engendrant un changement conformationnel de la tête catalytique (Sambongi et al., 1999). Les sous-unités du stator FO (6/a, 8/A6L, 4/b, d, h/F6 et OSCP) empêchent que la partie catalytique soit entraînée avec la rotation de γ afin qu'elle puisse subir des changements conformationnels.

3. La rotation de la tige centrale entraîne un changement conformationnel du domaine catalytique permettant la synthèse d'ATP

Les trois sous-unités β de l'hexamères $(\alpha\beta)_3$ ont chacune trois conformations possibles (Figure 11) (Abrahams et al., 1994; Boyer, 1993; Cabezón et al., 2003) :

- β DP : la conformation dite « Tight » ou « T » pour tendue, permet la fixation de l'ion magnésium (Mg^{2+}), de l'ADP et du Pi.
- β TP : la conformation dite « Loose » ou « L » pour relâchée, permet la synthèse l'ATP à partir d'ADP et de Pi.
- β E : la conformation dite « Open » ou « O » pour ouverte, ne permettant pas de lier de nucléotide favorise la libération de l'ATP nouvellement synthétisé.

Une rotation à 120° de la tige centrale (γ , δ et ϵ) dans le sens horaire vue du FO permet de convertir le site β E en β DP, où l'ADP et le Pi se lient. Une deuxième rotation permet de convertir β DP en β TP, permettant la synthèse de l'ATP. La dernière rotation libère l'ATP et régénère la forme β E. L'ion magnésium (Mg^{2+}) est un co-substrat essentiel à l'activité de l'ATP synthase et se lie aux sous-unités β .

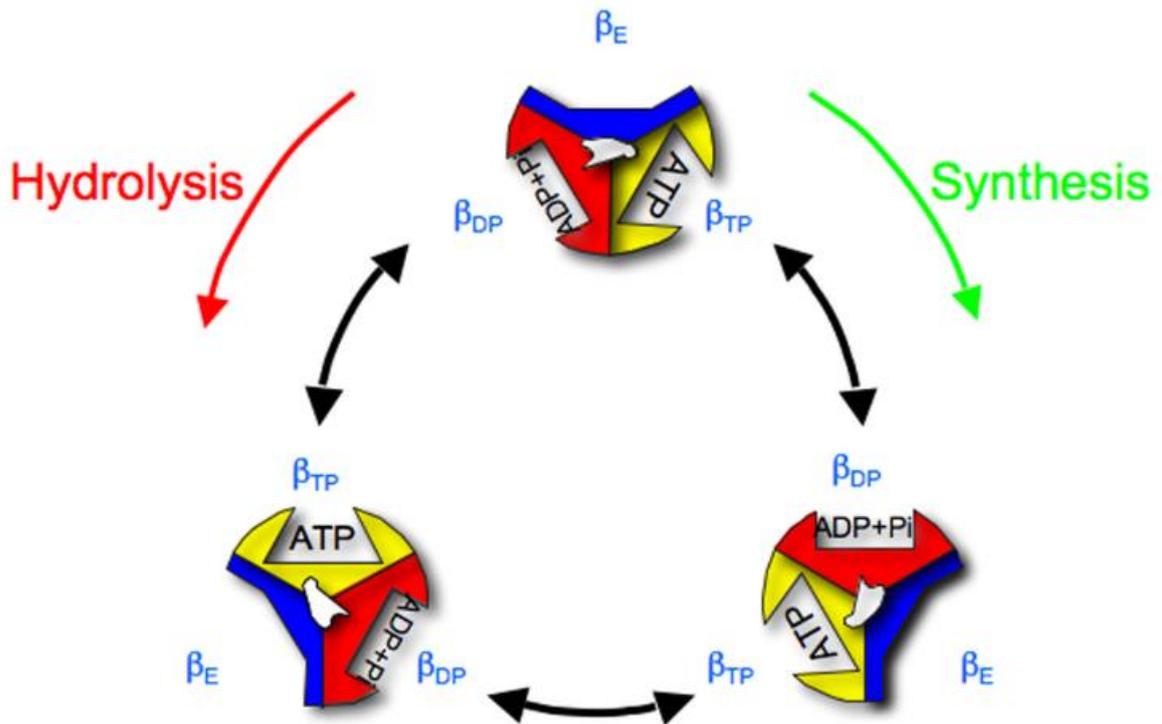


Figure 11 : Illustration du modèle du mécanisme de synthèse et d'hydrolyse d'ATP par le F1 de l'ATP synthase (issu de (Nakamoto et al., 2008))

Si l'on regarde depuis le FO, la rotation de la sous-unité γ se fait dans le sens inverse des aiguilles d'une montre pour l'hydrolyse de l'ATP et dans le sens des aiguilles d'une montre pour la synthèse de l'ATP. Notons que l'ordre des conformations dans l'hydrolyse est $\beta_E \rightarrow \beta_{TP} \rightarrow \beta_{DP}$ et dans la synthèse est $\beta_E \rightarrow \beta_{DP} \rightarrow \beta_{TP}$.

L'activité de synthèse peut être inhibée par des inhibiteurs chimiques tels que le DCCD et l'oligomycine.

5. Le mécanisme d'hydrolyse

L'ATP synthase a la capacité d'inverser son activité et d'hydrolyser l'ATP lorsque le potentiel membranaire est faible. Ce dernier peut être affaibli ou aboli dans une condition de stress chimique (hypoxie/anoxie) ou dans une condition génétique affectant l'activité de la chaîne respiratoire. Des expériences sur mitochondries isolées ont mis en évidence que l'ATP synthase couple l'hydrolyse d'ATP à la translocation des protons de l'espace matriciel vers l'espace intermembranaire générant un potentiel membranaire mitochondrial (Sambongi et al., 1999).

Le mécanisme d'hydrolyse est similaire à celui de la synthèse d'ATP, il se fait aussi en trois grandes étapes (Figure 11) (Baylis Scanlon et al., 2007; Rees et al., 2012; Bowler et al., 2007):

1. Le Mg^{2+} et l'ATP entrent dans la sous-unité β en conformation βE et induisent une rotation de la tige centrale de 120° dans le sens antihoraire, vue du FO. Le site βE est converti en βTP permettant l'entrée de l'ATP dans le site de liaison nucléotidique.
2. Une seconde rotation de 120° de la tige centrale permet de convertir βTP en βDP . Une molécule d'eau piégée effectue une attaque nucléophile sur le phosphate terminal de l'ATP produisant de l'ADP et du P_i .
3. La dernière rotation de 120° permet de libérer l'ADP, le Mg^{2+} et le P_i et de régénérer la forme βE .

Tout comme l'activité de synthèse, l'activité d'hydrolyse de l'ATP synthase peut être inhibée par l'oligomycine. Cependant, cette drogue cible l'anneau de sous-unité c du domaine FO, ce qui permet l'inhibition des F1-FO ATP synthases assemblées uniquement. Aujourd'hui, aucune substance n'a été identifiée permettant d'inhiber le domaine F1 libre.

C. IF1, l'inhibiteur de l'ATP synthase

La réversibilité de l'ATP synthase peut être dangereuse pour la cellule, son activité hydrolytique est donc régulée par un peptide inhibiteur endogène IF1 (pour facteur d'inhibition 1). IF1 interagit physiquement avec l'ATP synthase, empêchant la consommation futile d'ATP lorsque le potentiel membranaire est affaibli (Figure 12) (Campanella et al., 2009; Rouslin and Pullman, 1987; Solaini and Harris, 2005). Cet inhibiteur a été découvert pour la première fois dans les mitochondries de cœur de bœuf par Pullman et Monroy en 1963 (Pullman and Monroy, 1963). Par la suite, ce peptide a été caractérisé chez plusieurs autres organismes tels que : le rat (Cintrón and Pedersen, 1979), la souris (Yamada et al., 1997), la pomme de terre (Norling et al., 1990), le ver (Ichikawa et al., 2006), la levure (Matsubara et al., 1981) et l'homme (Ichikawa and Ogura, 2003). Depuis sa découverte, l'interaction entre IF1 et l'ATP synthase a fait l'objet de nombreuses études.

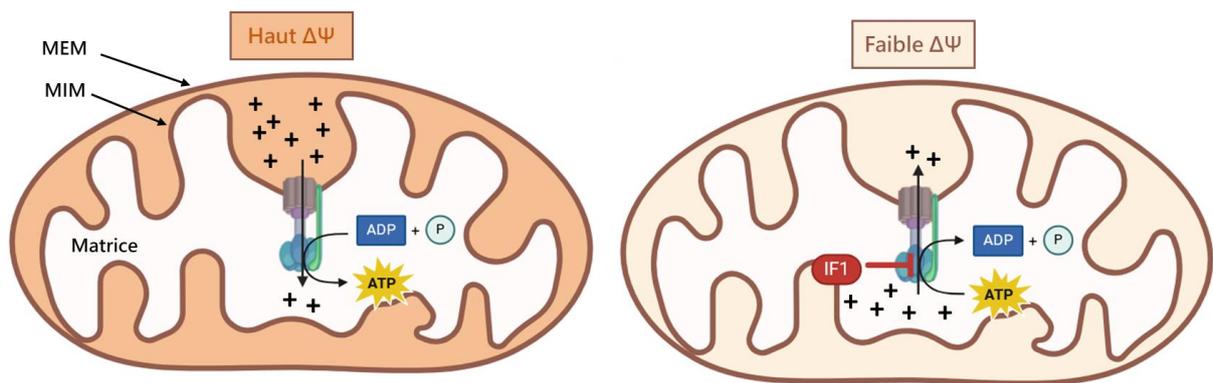


Figure 12 : Illustration de l'activité de synthèse et d'hydrolyse de l'ATP synthase en fonction du potentiel membranaire mitochondrial (réalisé avec Biorender)

A gauche, dans la condition à haut potentiel membranaire ($\Delta\Psi$) l'ATP synthase couple la force motrice à la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de Pi. A droite, dans la condition à faible potentiel membranaire, l'ATP synthase hydrolyse l'ATP en ADP et Pi couplé à un transport de proton de l'espace matriciel vers l'espace intermembranaire et cette activité est inhibée par IF1. MEM : membrane externe mitochondriale ; MIM : Membrane interne mitochondriale.

1. Structure de l'IF1

IF1 est un petit peptide codé par l'ADNn (gène *INH1* chez la levure et *ATIF1* chez le mammifère). Afin d'être adressé à la mitochondrie, IF1 présente à son extrémité N-terminale une pré-séquence de 22 acides aminés chez la levure et 25 chez le bœuf. Cependant, le mécanisme impliqué dans le transport d'IF1 vers la mitochondrie n'a pas encore été résolu. L'IF1 mature a une longueur de 63 résidus (~7 kDa) chez *S. cerevisiae* (Matsubara et al., 1981) et de 84 résidus (~10 kDa) chez le bœuf (Frangione et al., 1981). Ce petit peptide est très conservé, les séquences protéiques d'IF1 murin, bovin et humain présentent ~60% d'identité entre elles et ~30% d'identité avec l'IF1 de levure (Figure 13). Le segment le mieux conservé correspond à une longue hélice α (17 à 36 chez la levure et 21 à 50 chez le bœuf)(Sun et al., 2015). La région inhibitrice, présente en N-terminal, interagit avec le domaine F1 de l'ATP synthase. La séquence inhibitrice minimale d'IF1 a été définie comme la région 17-28 chez la levure (Ichikawa et al., 2001) et la région 14-47 chez le bœuf (van Raaij et al., 1996).

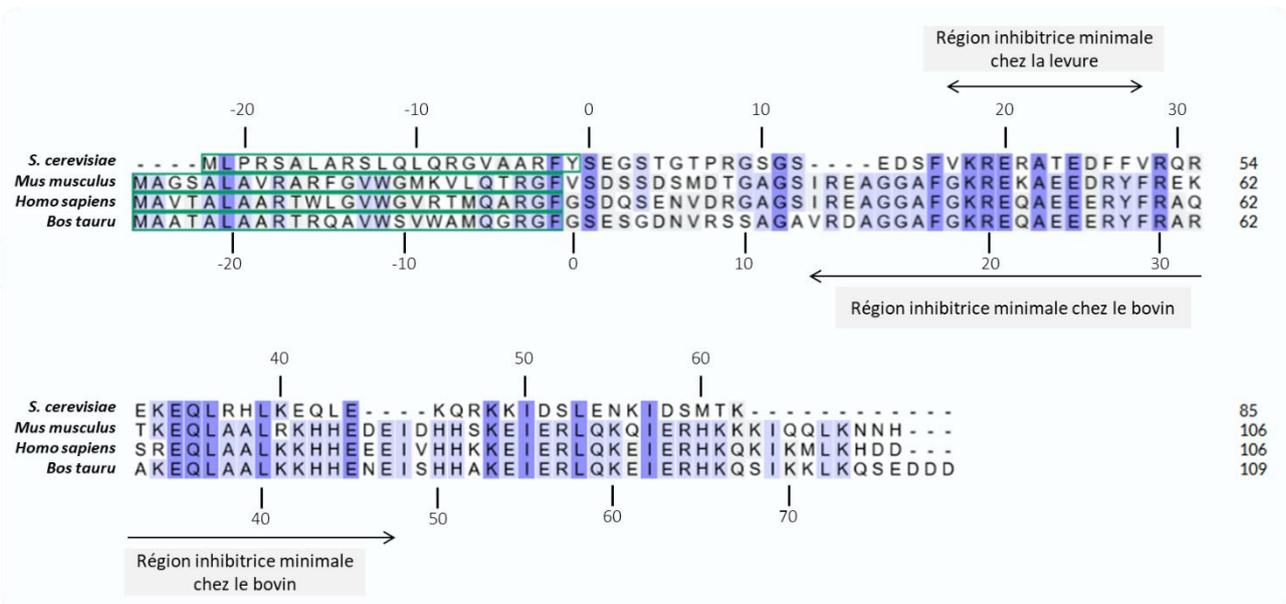


Figure 13 : Alignement de séquences protéiques d'IF1

Séquences d'IF1 de *S. cerevisiae* (Matsubara et al., 1981), d'*Homo Sapiens* (Ichikawa et al., 1999), de *Mus Musculus* (Yamada et al., 1997) et de *Bos taurus* (Frangione et al., 1981). Identification du peptide signal par un encadrement vert. La région inhibitrice minimale est indiquée pour l'IF1 de *S. cerevisiae* et de *Bos taurus*. (réalisé avec BLAST)

2. Le mécanisme d'inhibition

Grâce aux données obtenues en biochimie et cristallographie, le mécanisme d'inhibition de l'ATP synthase par IF1 a pu être mis en évidence. L'hélice α de la région N-terminale de l'inhibiteur a été localisée dans la fente entre les domaines C-terminaux des sous-unités α et β de l'ATP synthase à l'état conformationnel L (Figure 14A) chez le bœuf (Cabezón et al., 2003; Gledhill et al., 2007) puis chez *S. cerevisiae* (Robinson et al., 2013). Une étude biochimique chez la levure a mis en évidence que la partie N-terminale ne joue pas de rôle dans la reconnaissance de la protéine mais permet de stabiliser le complexe F1-IF1 (Andrianaivomananjaona et al., 2011). IF1 inhiberait l'activité hydrolytique en empêchant le changement conformationnel des sous-unités β (Andrianaivomananjaona et al., 2011) et l'interactions des sous-unités α et β avec la sous-unité γ pourraient contribuer au verrouillage d'IF1 au sein du domaine F1 (Wu et al., 2014).

Un modèle des étapes du mécanisme d'inhibition de l'ATP synthase par IF1 a été proposé (Figure 14B) (Cabezón et al., 2003) :

1. L'ATP se lie à la sous-unité en conformation βE (ou « O »).
2. Une rotation de la tige a lieu induisant un changement de conformation de la sous-unité O en un état intermédiaire entre celles des sous-unités en conformation βDP et βE , nommée « L' ». En même temps, un ATP au site adjacent est hydrolysé. Cette conformation L' permet de lier IF1.
3. Une rotation de la tige permet la libération de l'ADP et du P_i .
4. Une deuxième molécule d'ATP se lie au site βE (« O ») nouvellement formé.
5. Une rotation de la tige entraîne un nouveau cycle, l'hydrolyse d'un second ATP et la libération de l'ADP et P_i .
6. L'inhibiteur bloque la conversion du site intermédiaire « L' » en un site catalytique incompetent, même si un ATP se lie au site ouvert vacant.

L'ensemble des expériences réalisées a montré la nécessité de la présence de Mg^{2+} et d'ATP pour la fixation d'IF1 à l'ATP synthase (Horstman and Racker, 1970). Corvest *et al.* ont étudié, chez la levure, le lien entre l'occupation des sites catalytiques du F1 par les nucléotides et le taux de liaison d'IF1 au F1 (Corvest *et al.*, 2007, 2005). Ils ont pu proposer un modèle qui suggère que l'IF1 se lie rapidement, mais de manière lâche au F1 avant d'être bloqué grâce à l'hydrolyse de l'ATP par le F1. D'après ce modèle l'hydrolyse d'un seul ATP serait nécessaire (Corvest *et al.*, 2007, 2005).

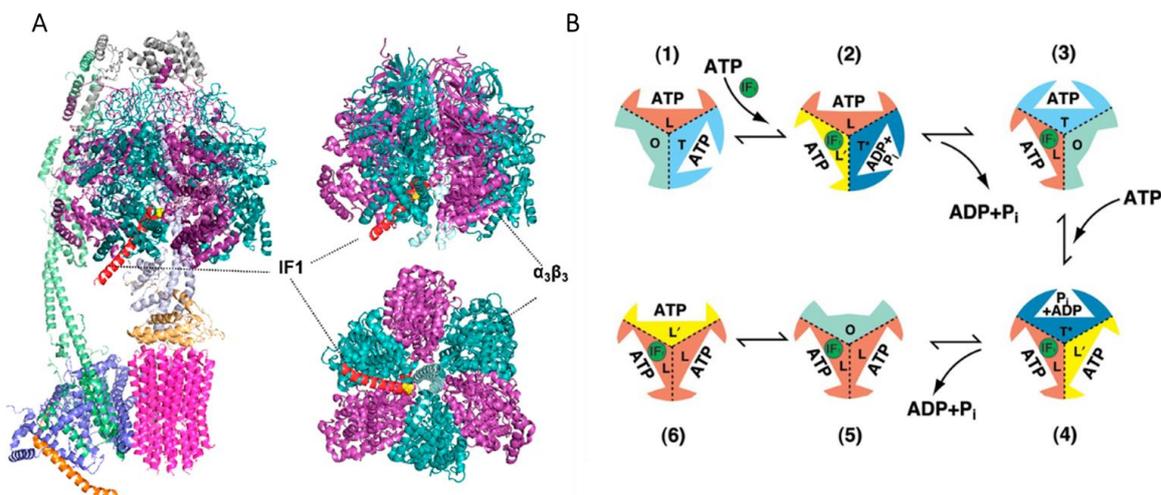


Figure 14 : Représentations de la structure et du mécanisme de liaison d'IF1 à l'ATP synthase

(A) Structure obtenue par cryo-ME de l'interaction de l'ATP synthase de porc avec l'IF1. A gauche, IF1 lié au monomère d'ATP synthase et à droite IF1 localisé entre les sous-unités α et β vue latérale (haut) et vue inférieure (en bas). PDB : 6J5K (Gu et al., 2019), 1OHH (Cabezón et al., 2003). Le domaine F1 soluble est composé du stator (α_3 en violet, β_3 en bleu) et de la tige centrale (γ en bleu clair, et δ , ϵ en jaune clair). Le domaine FO membranaire se compose de l'anneau de sous-unités c (rose) et du pied périphérique (a en bleu clair, b, d et F6 en vert clair, OSCP en gris). Les sous-unités surnuméraires sont colorées comme suit : e en orange, f, g, A6L, 6.8PL et DAPIT en bleu clair). (issu de (Domínguez-Zorita and Cuezva, 2023))

(B) Modèle des étapes d'inhibition de l'activité hydrolytique de l'ATP synthase par l'IF1. (1) L'ATP et IF1 se lie à la sous-unité βE (« O »); (2) Une rotation de la tige a lieu induisant un changement de conformation de la sous-unité βE en un état intermédiaire entre celles des sous-unités βDP et βE (« L' »). En même temps, un ATP est hydrolysé. (3) Une rotation de la tige permet la libération de l'ADP et du Pi. (4) Une deuxième molécule d'ATP se lie au site βE (« O ») nouvellement formé. (5) Une rotation de la tige entraîne un nouveau cycle, l'hydrolyse d'un second ATP et la libération de l'ADP et Pi. (6) L'inhibiteur bloque la conversion du site intermédiaire « L' » en un site catalytique compétent, même si un ATP se lie au site ouvert vacant. (issu de (Cabezón et al., 2003))

La composition, la structure et le mécanisme d'action d'IF1 sont très conservés tel que l'IF1 de levure est capable d'inhiber l'ATP synthase de bœuf et inversement, avec néanmoins une efficacité moindre (Cabezon et al., 2002). Il a été découvert un mécanisme d'inhibition similaire pour certaines ATP synthases de bactérie, la sous-unité ϵ a la capacité de se replier et de s'insérer entre les sous-unités α et β afin d'inhiber l'activité hydrolytique de l'ATP synthase (Tsunoda et al., 2001). Chez les plantes un autre mécanisme d'inhibition de l'activité hydrolytique a été mis en évidence. La nuit, elles doivent bloquer l'activité de l'ATP synthase, pour empêcher l'hydrolyse d'ATP lorsque le potentiel redox du chloroplaste est trop faible (Junesch and Gräber, 1987). Dans ces conditions d'oxydation, un pont disulfure se forme au sein de la sous-unité γ , induisant des changements de conformation de celle-ci et également la sous-unité ϵ (Nalin and McCarty, 1984). Ceci augmente le seuil d'activation de l'ATP synthase par la force protomotrice.

Tous ces mécanismes d'inhibition de l'activité hydrolytique de l'ATP synthase sont réversibles. En ce qui concerne celle par l'IF1, les travaux de Rouslin et Pullman ont montré qu'après réénergisation des mitochondries de cœur de bœuf ayant subi une ischémie peuvent de nouveau avoir une activité de synthèse après libération d'IF1 (Rouslin and Pullman, 1987). L'éjection de l'inhibiteur est induite par la rotation de la sous-unité γ de l'ATP synthase dans le sens de la synthèse (Kobayashi et al., 2023; Van De Stadt et al., 1973; Venard et al., 2003).

3. Régulation de l'activité d'inhibition par l'oligomérisation d'IF1

Dès les premiers travaux, l'activité d'IF1 a été caractérisée dépendante du pH (Figure 15) (Pullman and Monroy, 1963). L'inhibiteur est actif à un pH matriciel acide, corrélé à une chute du potentiel membranaire mitochondrial, et inactif à pH supérieur à 8 (Pullman and Monroy, 1963; Schwerzmann and Pedersen, 1986). C'est une histidine (position 39 pour la levure et 49 pour le bœuf) et une glutamine (21 pour la levure et position 26 pour le bœuf) qui confèrent la dépendance au pH à l'état actif d'IF1 (Ando and Ichikawa, 2008; Fujii et al., 1983; Schnizer et al., 1996).

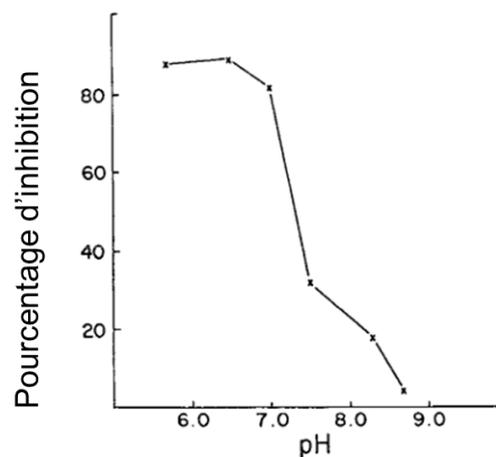


Figure 15 : Activité de l'IF1 en fonction du pH

L'inhibiteur (2,2 µg) a été incubé pendant 10 minutes à 30°C avec 6,2 µg d'ATPase et un tampon Tris-imidazole de 2,5 mM, ajusté au pH approprié avec 1 N H₂SO₄ ou 1 N KOH. Le pH du mélange d'incubation final a été mesuré sur un double du mélange réactionnel. Après 10 minutes, l'activité résiduelle de l'ATPase a été mesurée avec 2,0 ml de 5 N H₂SO₄ contenant 2,5% de molybdate d'ammonium, et Pi a été déterminé sur l'ensemble du mélange réactionnel. (modifié de (Pullman and Monroy, 1963))

D'après les études de structure, un pH basique favorise l'oligomérisation d'IF1 rendant inaccessible le site actif de l'inhibiteur. Chez le bœuf, IF1 est actif sous sa forme dimérique en dessous d'un pH < 6,5 (Cabezón et al., 2000; Fujii et al., 1983). Deux monomères d'IF1 peuvent s'associer en une super hélice antiparallèle par leur région C-terminale (Cabezón et al., 2000; Cabezón et al., 2001). La cristallisation d'IF1 chez le bœuf démontre que deux dimères d'IF1 peuvent s'associer en tétramère inactif en masquant la région inhibitrice ce qui empêcherait IF1 de se lier à l'ATP synthase à pH élevé (Figure 16) (Cabezón et al., 2001).

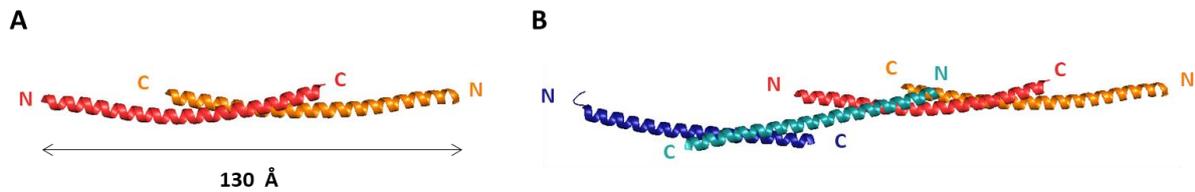


Figure 16 : Représentation structurale de l'oligomérisation d'IF1 chez le mammifère.

Structure obtenue en cryo-ME du dimère (à gauche) et du tétramère (à droite) d'IF1 chez le bœuf. Les terminaisons C et N sont indiquées pour chaque monomère. PDB : 1GMJ (Cabezón et al., 2001). Réalisé à partir du logiciel Pymol.

Comme chez le bœuf, l'IF1 de levure est actif à pH<6,5 (Fujii et al., 1983). L'IF1 de levure peut se dimériser mais ne peut pas former de tétramère. Il a été démontré que la forme monomérique est la forme active de l'IF1 de levure (Cabezon et al., 2002). La forme dimérique de l'IF1 de levure est considérée comme la forme inactive car une étude a montré que l'interface de dimérisation implique la région centrale du peptide (Le Breton et al., 2016). Les états actif et inactif d'IF1 chez les deux organismes sont encore débattus dans la littérature.

Il faut noter, qu'un autre mécanisme de régulation d'IF1 a été découvert chez des tumeurs humaines implantées chez la souris. Il a été montré que la phosphorylation, par une protéine kinase A, d'une sérine d'IF1 inhibe son activité d'inhibition (García-Bermúdez et al., 2015; Zhao et al., 2011). Cependant le mécanisme de régulation de la phosphorylation et de la déphosphorylation n'a pas été défini.

4. Rôles physiologiques d'IF1

L'étude du rôle métabolique physiologique d'IF1 est très complexe par le manque d'approche permettant de suivre extemporanément la réversibilité de l'ATP synthase et l'hydrolyse d'ATP *in vivo*. Pour autant, les organismes génétiquement modifiés n'exprimant plus IF1 ne semblent pas développer de phénotype délétère comme observé chez la levure (Ichikawa et al., 1990; Lu et al., 2001), la souris (Nakamura et al., 2013) ou chez *Caenorhabditis elegans* (Fernández-Cárdenas et al., 2017). Cependant certaines hypothèses sur le rôle physiologique d'IF1 ont été émises, fondées sur les résultats obtenus depuis la découverte de cet inhibiteur.

a) Est-ce que l'IF1 est un régulateur de l'activité de synthèse de l'ATP synthase ?

Pendant longtemps le rôle d'IF1 a été limité à réguler l'activité inhibitrice de l'ATP synthase du fait de ses propriétés dépendantes du pH. Cependant, plusieurs études chez le mammifère montrent une régulation de l'activité de synthèse de l'ATP synthase par IF1. La dimérisation d'IF1 pourrait participer à l'oligomérisation de l'ATP synthase (García et al., 2006) favorisant la formation des crêtes mitochondriales. Il a été observé par microscopie électronique sur des cellules humaines, que la surexpression ou l'absence d'IF1 augmentait ou diminuait, respectivement, le pourcentage du volume mitochondrial occupé par les crêtes mitochondriales via la dimérisation de l'ATP synthase (Campanella et al., 2008; Faccenda et al., 2017). De plus, deux études récentes de Cryo-ME mettent en évidence que le dimère d'IF1 permettrait de ponter et potentiellement de stabiliser la juxtaposition de deux dimères d'ATP synthase au sein du tétramère chez le mammifère (Figure 17) (Gu et al., 2019; Pinke et al., 2020). Cependant, un autre pan de la littérature reste imperméable aux arguments, certes encore très fragiles, soutenant qu'IF1 ne régulerait pas l'activité de synthèse de l'ATP synthase.

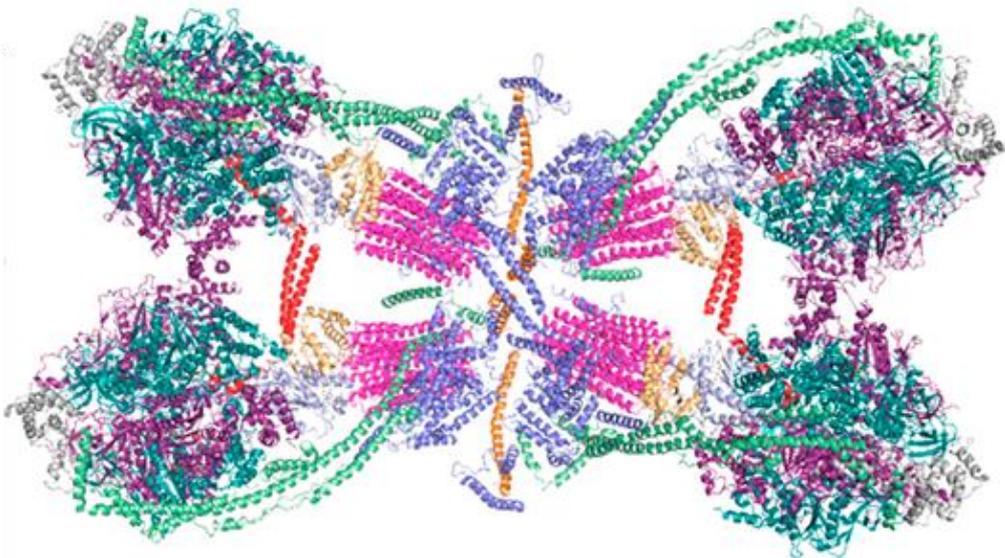


Figure 17 : Structure en microscopie électronique cryogénique des tétramères d'ATP synthase de porc.

Les dimères d'IF1 (rouges) sont liés à deux dimères d'ATP synthase antiparallèles adjacents. (issue de (Domínguez-Zorita and Cuezva, 2023) PDB : 6J5K (Gu et al., 2019)

D'après les premiers travaux sur IF1 de bœuf, il n'y a pas d'inhibition de l'activité de synthèse de l'ATP synthase (Pullman and Monroy, 1963). De nombreux travaux ont depuis lors

montré qu'en absence d'IF1 (Barbato et al., 2015; Fujikawa et al., 2012; Tomasetig et al., 2002) ou en sur-exprimant IF1 (Kahancová et al., 2020) aucun changement morphologique mitochondriale n'était observé. De plus, il a été démontré, que l'absence d'IF1 n'engendrait aucune modification sur l'état dimérique de l'ATP synthase (Tomasetig et al., 2002; Wittig and Schägger, 2008). Une récente étude sur des cellules HeLa a montré que la surexpression de l'IF1 constitutivement actif (IF1-H49K) impactait l'organisation spatio-temporelle de l'ATP synthase et par conséquent impactait les crêtes mitochondriales mais sans impacter la dimérisation de l'ATP synthase (Weissert et al., 2021). L'ensemble de ces études a été réalisé chez le mammifère, une seule étude a été réalisée chez la levure démontrant l'absence de régulation d'IF1 sur l'état dimérique de l'ATP synthase (Dienhart et al., 2002).

Vous l'aurez compris, contrairement au rôle d'inhibiteur de l'activité hydrolytique, le potentiel rôle physiologique d'IF1 dans la régulation de l'activité de synthèse est encore très débattu et reste à être investigué dans d'autres organismes.

b) IF1 et les sous-assemblages d'ATP synthase

Comme énoncé précédemment, le processus d'assemblage des sous-unités de l'ATP synthase est complexe du fait de leur origine mitochondriale ou nucléaire. Les sous-complexes intermédiaires d'assemblage peuvent présenter un risque pour la préservation de l'ATP cellulaire. Le domaine F1, composé de sous-unités d'origine nucléaire (α , β , γ , δ , ϵ) peut hydrolyser l'ATP tant qu'il n'est pas lié au potentiel membranaire mitochondrial via le canal à protons constitué de sous-unités d'origine mitochondriale (a/6, anneau de c). Par conséquent, l'activité d'inhibition d'IF1 pourrait être nécessaire lors du processus complexe d'assemblage des sous-unités de l'ATP synthase en condition physiologique. Cette hypothèse est soutenue par deux études montrant IF1 associé à des sous-assemblages d'ATP synthase.

La première étude porte sur les patients atteints de la variante canadienne française du syndrome de Leigh (FCLS) présentant des mutations pathogènes dans le gène de la « Leucine-Rich Pentatricopeptide Repeat Containing protein » (LRPPRC) qui est inactive spécifiquement dans le cœur. La protéine LRPPRC permet la stabilité des ARN messagers codés par l'ADNmt. Mourier *et al.*, ont pu mettre en évidence, chez des souris présentant le FCLS, des sous-complexes d'ATP synthase incapables de synthétiser l'ATP néanmoins à même de l'hydrolyser

(Mourier et al., 2014). De plus, ils ont observé une augmentation du niveau d'IF1 corrélée à l'apparition de sous-assemblages d'ATP synthase et l'aggravation de la cardiomyopathie. De façon surprenante, la quasi-totalité des protéines IF1 sont associées aux sous-assemblages d'ATP synthase (Figure 18).

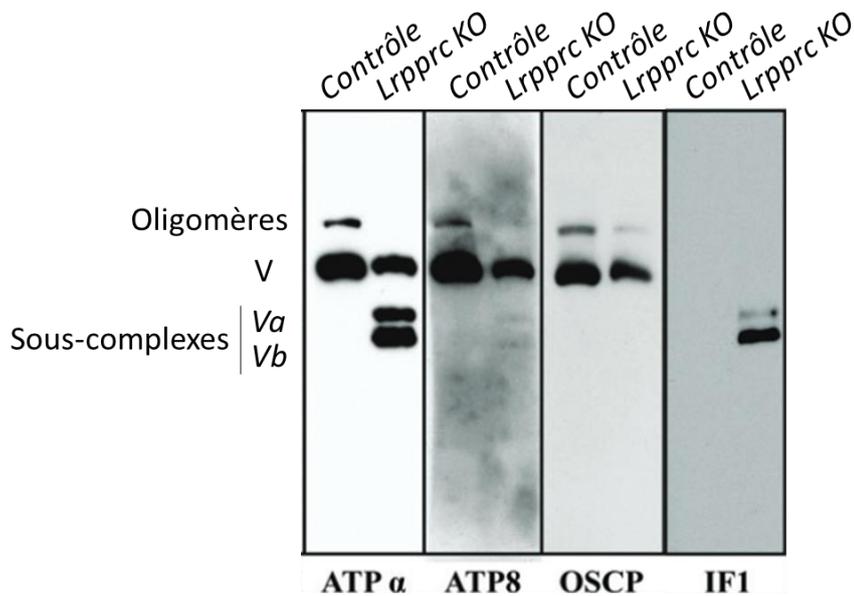


Figure 18 : IF1 lié aux sous-assemblages d'ATP synthase chez le « knock-out » Lrpprc spécifiquement dans le cœur de souris

Analyse par électrophorèse sur gel de polyacrylamide natif bleu de mitochondries cardiaques extraites avec un rapport (1 g/g) de digitonine sur les protéines mitochondriales de souris « knock-out » (KO) Lrpprc et de souris témoins à l'âge de 12 semaines. Immunodétection de ATP α , ATP8, OSCP et IF1 après transfert des protéines du BN-PAGE à la membrane PVDF. La position des oligomères, du monomère (V) d'ATP synthase monomère et des sous-complexes de l'ATP synthase (Va, Vb) est indiquée sur le côté gauche. (modifié de (Mourier et al., 2014))

La seconde étude, réalisée par He *et al.*, porte sur l'étude de la voie d'assemblage de l'ATP synthase (He et al., 2020, 2018). Ils ont généré des cellules humaines simple « knock-out » (KO) des gènes codants pour les sous-unités d, F6, e, f, g, 6.8PL ou DAPIT. La composition des sous-assemblages d'ATP synthase chez les différents KO a été analysée par spectrométrie de masse. Une augmentation d'IF1 est observée chez tous les KO comparé au contrôle à l'exception du KO pour la sous-unité DAPIT, la dernière sous-unité qui serait assemblée.

L'hypothèse émise est qu'IF1 pourrait être lié à l'ATP synthase jusqu'à son assemblage complet afin d'empêcher l'hydrolyse futile d'ATP. IF1 inhiberait l'activité hydrolytique des intermédiaires d'assemblage d'ATP synthase qui ne peuvent pas fonctionner dans le sens de la

synthèse à cause de l'absence des sous-unités permettant le couplage au potentiel membranaire.

5. Rôles pathologiques d'IF1

A défaut de connaître le rôle physiologique d'IF1, son rôle a été mis en évidence dans plusieurs organismes dans des conditions de stress empêchant le maintien du potentiel membranaire mitochondrial par la chaîne respiratoire (Buchet and Godinot, 1998; Rouslin and Broge, 1996; Sgarbi et al., 2018; Venard et al., 2003). De plus, de nombreuses études ont associé IF1 à des maladies humaines sévères telles que les troubles mitochondriaux, les maladies cardiaques et le cancer (Gore et al., 2022). De par sa fonction protectrice du niveau d'ATP en condition d'anoxie et hypoxie, il n'est pas étonnant qu'IF1 joue un rôle lors d'une ischémie myocardique ou d'un accident vasculaire cérébral ischémique. D'après la littérature, IF1 est fortement surexprimé dans différents types de cancer (colon, poumon, sein, ovaire et foie) (Gore et al., 2022). Son rôle pro-cancéreux serait lié à son activité d'inhibition de la synthèse d'ATP favorisant le phénotype Warburg des cellules cancéreuses. L'effet Warburg est la capacité des cellules cancéreuses à changer leur métabolisme oxydatif en métabolisme glycolytique (Warburg, 1956). Enfin, son rôle dans le maintien des crêtes mitochondriales, via l'oligomérisation de l'ATP synthase, permettrait de séquestrer le cytochrome c empêchant la signalisation de la mort cellulaire (Cogliati et al., 2016).

Après la lecture de cette introduction détaillée sur ce petit peptide, vous comprendrez qu'IF1 pourrait être à la fois un outil de diagnostic mais aussi une cible thérapeutique. C'est pourquoi il est important de mieux appréhender son rôle au sein de la mitochondrie et du métabolisme cellulaire.

D. Modèle d'étude : *Saccharomyces cerevisiae*

1. Choix du modèle levure

La levure est utilisée par les hommes depuis 3,000 à 14,000 ans avant Jésus-Christ pour produire de la bière et du pain. Il faudra attendre le 19^{ème} siècle, pour que Louis Pasteur mette en évidence que la production d'alcool n'est pas une réaction chimique spontanée mais nécessite un organisme vivant, la levure. Une fois *Saccharomyces cerevisiae* isolée, elle devient rapidement un modèle de recherche avantageux. Sa petite taille, son temps de division rapide (~90 min) et son milieu de croissance peu complexe permettent de cultiver cet organisme facilement au sein d'un laboratoire. En 1996, *S. cerevisiae* est le premier eucaryote dont le génome est entièrement séquencé. Grâce à cette avancée et à la manipulation génétique aisée par le mécanisme de recombinaison homologue de la levure, une banque de mutants a été générée. Ceci a permis de comprendre la fonction de nombreux gènes. Malgré environ 1 milliard d'années d'évolution les séparant, un tiers du génome de la levure est homologue chez l'homme, permettant l'étude de nombreux processus biologiques conservés (Vanderwaeren et al., 2022).

a) Métabolisme respiro/fermentaire

La levure a la capacité de s'adapter afin de métaboliser de nombreuses sources carbonées différentes. Louis Pasteur a caractérisé cet organisme unicellulaire comme un eucaryote aérobic facultatif, ceci signifie qu'il peut consommer des sucres en présence ou en absence de dioxygène. En présence d'une forte concentration de glucose, la levure privilégie cette source carbonée au détriment des autres. Cela se traduit par une réduction de l'expression des gènes codants pour les protéines mitochondriales, ce processus est appelé répression catabolique (Hedges et al., 1995; Santangelo, 2006). En anaérobic ou aérobic, la levure réalise, en présence de sucre, de la fermentation alcoolique. Elle métabolise les sucres permettant la production d'ATP par la voie glycolytique via des kinases. Le produit final de cette fermentation, l'éthanol, est délivré dans le milieu environnant. Lorsque la quantité de sucre disponible devient faible, la répression catabolique est levée et la levure métabolise l'éthanol produit pour synthétiser de l'ATP par la voie oxydative en condition aérobic. Cette redirection métabolique est caractérisée par une croissance biphasique avec un shift diauxique caractéristique d'une forte induction des enzymes mitochondriales et par une augmentation

du contenu mitochondrial (DeRisi et al., 1997). Les sources carbonées fermentescibles métabolisables par la levure sont le raffinose, le galactose, le mannose et le fructose. La levure peut métaboliser d'autres sources carbonées dites non-fermentaires telles que l'éthanol, le glycérol, l'acétate et le lactate. Grâce à ce métabolisme très modulable, la levure est un bon modèle d'étude pour étudier le rôle des protéines au sein du métabolisme oxydatif sans que cela ne soit létal pour la cellule.

b) Contexte $\rho^{-/0}$

En milieu fermentescible, la levure a la capacité de perdre partiellement (ρ^-) ou intégralement (ρ^0) son ADNmt de façon spontanée. Par conséquent, les complexes comprenant des sous-unités codées par l'ADNmt tels que les complexes III, IV et V, ne sont plus assemblés mais les cellules $\rho^{-/0}$ présentent néanmoins un F1 libre assemblé et fonctionnel dans le sens de l'hydrolyse. Les cellules $\rho^{-/0}$ sont caractérisées par un faible potentiel membranaire mais possèdent une alternative pour maintenir le potentiel membranaire nécessaire à l'import des protéines, à la directionalité des transports électrogéniques et au maintien des fonctions de la mitochondrie. Des études ont montré que l'ANT, l'antiport électrogénique d' $\text{ADP}^{3-}/\text{ATP}^{4-}$, permet de maintenir un potentiel membranaire suffisant, dans ce contexte $\rho^{-/0}$ (Dupont et al., 1985). L'activité d'ATPases matricielles participerait, en produisant de l' ADP^{3-} , l'entrée d' ATP^{4-} dans la matrice via l'ANT, générant ainsi un potentiel membranaire. Des hypothèses présentent le F1 libre d'ATP synthase comme partenaire majeur de l'ANT via son activité ATPase dans le maintien du potentiel membranaire dans un contexte $\rho^{-/0}$. Une étude a mis en évidence que le défaut d'assemblage du F1 chez le mutant $\rho^{-/0}$ délété de la sous-unité δ engendrait un défaut de croissance comparé au WT (Giraud and Velours, 1997). De plus, d'autres études ont été réalisées sur *Kluyveromyces lactis*, qui contrairement à *S. cerevisiae*, n'a pas la capacité de perdre son ADNmt spontanément. Seuls certains mutants présentant des mutations dans les gènes dits MGI (pour intégrité du génome mitochondrial), gènes codant pour les sous-unités du domaine F1 (α , β et γ), ont la capacité de perdre l'ADNmt (Chen and Clark-Walker, 1993). D'après les auteurs, ces mutations pourraient augmenter l'activité hydrolytique du F1 permettant de maintenir un potentiel membranaire via l'ANT. Ces deux études, soutiennent l'hypothèse selon laquelle l'activité hydrolytique du F1 libre chez les levures $\rho^{-/0}$ serait essentielle pour la capacité de perdre le génome mitochondrial et pour la croissance des

cellules $\rho^{-/0}$. Par conséquent, la levure $\rho^{-/0}$ est un bon modèle d'étude de la régulation d'IF1 vis-à-vis de l'activité hydrolytique du F1 libre.

2. Inhibiteurs homologues IF1 et STF1 chez la levure

Les protéines STF1 et STF2, pour « STabilizing Factor », ont été copurifiées avec le complexe ATP synthase-IF1 (Hashimoto et al., 1983). STF1 se compose de 63 résidus (~9 kDa) et STF2 de 84 (~15 kDa). STF1 présente une forte similarité de séquence protéique avec IF1 (Matsubara et al., 1983), contrairement à STF2 dont la similarité avec IF1 se restreint à la région C-terminal (Yoshida et al., 1990). STF1 et STF2 présentent un pourcentage d'identité avec IF1 de ~45% et ~13%, respectivement (Figure 19). La démonstration *in vitro* de leur capacité à potentialiser l'action inhibitrice d'IF1 a abouti à la conclusion que STF1 et STF2 pourraient être des protéines stabilisatrices de ce complexe permettant d'améliorer l'inhibition de l'ATP synthase par IF1 (Hashimoto et al., 1984). Cependant, d'autres expériences réalisées sur particules submitochondriales (SMP), ont mis en évidence une activité inhibitrice de STF1 moindre qu'IF1 à différents pH (Venard et al., 2003). De plus, STF1 a le même mécanisme de liaison à l'ATP synthase qu'IF1, nécessitant aussi la présence d'ATP et de Mg^{2+} pour se lier (T. Hashimoto et al., 1990; Venard et al., 2003). Néanmoins, STF1 se lie à l'ATP synthase à un pH plus élevé qu'IF1 (Cabezon et al., 2002). Malgré un potentiel rôle redondant, l'absence d'une des deux protéines inhibitrices n'affecte pas l'abondance de l'autre (Venard et al., 2003). Contrairement à STF1, STF2 n'a aucune activité d'inhibition de l'activité d'hydrolytique de l'ATP synthase. Les expériences sur la souche *stf2* Δ ont pu mettre en évidence une activité hydrolytique de l'ATP synthase plus importante en absence de STF2 comparé au WT (Yoshida et al., 1990). Cela suggère que STF2 permettrait de stabiliser le complexe ATP synthase-IF1 (T Hashimoto et al., 1990; Yoshida et al., 1990).

Par la suite la protéine STF3 a été identifiée lors de la recherche des fonctions de nombreux cadres de lecture ouverts (ORF) présents chez la levure (Winzeler et al., 1999). D'après les analyses à partir du gène, la prédiction de séquence protéique comprend 86 acides aminés (9,8 kDa) et présente une identité de 65% et une similarité de 84% avec la séquence protéique de STF2 (Hong and Pedersen, 2002). La délétion du gène STF3 n'a engendré aucun phénotype comparé au WT.

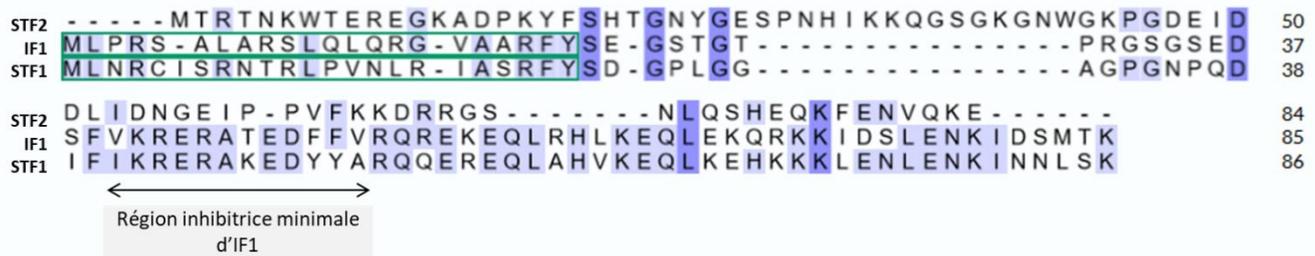


Figure 19 : Alignement de séquence protéique d'IF1 et des homologues STF1 et STF2 chez la *S. cerevisiae*.

Identification du peptide signal par un encadrement vert. La région inhibitrice minimale d'IF1 est indiquée. Réalisé avec BLAST.

Donc d'après l'ensemble des recherches, uniquement l'homologue STF1 pourrait présenter une potentielle activité inhibitrice de l'activité hydrolytique de l'ATP synthase contrairement aux deux autres protéines STF2 et STF3. Les deux homologues IF1 et STF1 ont le même mécanisme de liaison et d'inhibition mais l'ATP synthase lie préférentiellement IF1 par conséquent le rôle principal de STF1 chez la levure reste encore inconnu. Aujourd'hui, contrairement à la levure, aucun homologue d'IF1 a été identifié chez le mammifère.

E. Projet de thèse

Jusqu'à ce jour, de nombreuses études ont été réalisées sur enzymes ou mitochondries purifiées afin d'élucider la structure, la régulation et le mécanisme d'inhibition d'IF1. Le rôle d'IF1 a aussi été étudié dans des contextes pathologiques néanmoins le rôle physiologique d'IF1 est encore très débattu. Durant ce travail de recherche, j'ai apporté des outils permettant d'étudier le rôle d'IF1 dans un contexte physiologique et pathologique, permettant ainsi de découvrir un nouveau rôle d'IF1.

Mon travail de thèse a eu trois objectifs majeurs :

- Caractériser plus avant la relation structure-fonction entre IF1 et l'ATP synthase en déterminant : (i) l'importance structurelle d'IF1 dans l'organisation supramoléculaire de l'ATP synthase de levure et (ii) sa capacité fonctionnelle à interagir et inhiber les différents assemblages de l'ATP synthase.

- Évaluer l'incidence de la perte d'IF1 sur la croissance et la bioénergétique mitochondriale dans différentes conditions métaboliques.
- Déterminer le rôle d'IF1 dans des conditions de déficience mitochondriales induites par un stress de découplage des OXPHOS ou dans une situation de perte du génome mitochondrial.

Pour réaliser cette étude j'ai généré un mutant *inh1Δ stf1Δ* n'exprimant aucun des deux inhibiteurs de l'ATP synthase identifiés chez *S. cerevisiae*.

MATERIELS ET METHODES

II. Matériels et méthodes

A. Souches

Dans cette étude, la souche *Saccharomyces cerevisiae* D273-10B/A/H/U (MAT α , met6, ura3, his3) est utilisée comme souche de référence et sera nommée wild type (WT) (Paul et al., 1989). Les mutants issus de la souche D273 ont été obtenus par recombinaison homologue d'une cassette de délétion, dans la souche WT. Le gène d'intérêt a été délété entièrement par un gène de sélection permettant la synthèse de l'histidine (HIS3-MX6) ou un gène de résistance à la nourseothricine (NATR). Les plasmides utilisés pour la cassette HIS3-MX6 et la cassette NATR sont respectivement pFA6a-His3MX6 et pUG-natNT2. Les souches $\rho^{-/0}$ WT et mutants ont été obtenues après que les cellules aient été cultivées sur un milieu riche avec 2% de glucose pendant deux jours avant d'être étalées sur un milieu riche avec 0,5% de glucose. Les colonies $\rho^{-/0}$ ont été identifiées et comptées après une réplique velours sur milieu glycérol 2% où seules les colonies ρ^{+} ont pu se développer. Le nom, le génotype des souches et le plasmide utilisés pour la construction des différents mutants sont énumérés dans le [Tableau 2](#) [Tableau 3](#).

Tableau 2 : Nom et génotype des souches D273 utilisées dans cette étude

Nom	Génotype	ADN mitochondrial	Plasmides	Produites par
D273 WT	MAT α , met6, ura3, his3	rho ⁺		Souche dérivée de la souche D273-10 B/A (PAUL M.F. et coll(1992)
D273 <i>inh1</i> Δ	MAT α , met6, ura3, his3, <i>inh1::HIS3-MX6</i>		pFA6a-His3MX6	Orane Lerouley
D273 <i>stf1</i> Δ	MAT α , met6, ura3, his3, <i>stf1::NATR</i>		pUG-natNT2	
D273 <i>inh1</i> Δ <i>stf1</i> Δ	MAT α , met6, ura3, his3, <i>stf1::NATR</i> , <i>inh1::HIS3-MX6</i>		pUG-natNT2 ; pFA6a-His3MX6	
D273 <i>atp18</i> Δ	MAT α , met6, ura3, his3, <i>atp18::HIS3-MX6</i>		pFA6a-His3MX6	
D273 <i>atp18</i> Δ <i>inh1</i> Δ	MAT α , met6, ura3, his3, <i>inh1::HIS3-MX6</i> , <i>atp18::NATR</i>		pFA6a-His3MX6 ; pUG-natNT2	Isabelle Larrieu
D273 WT rho ⁻	MAT α , met6, ura3, his3	rho ⁻		Orane Lerouley
D273 <i>inh1</i> Δ <i>stf1</i> Δ rho ⁻	MAT α , met6, ura3, his3, <i>stf1::NATR</i> , <i>inh1::HIS3-MX6</i>			

Afin de gagner du temps pour une expérience, j'ai fait appel à Euroscarf®, un centre de collecte dans le cadre du projet mondial de délétion de gènes de levure. Ce centre donne accès à de nombreux mutants avec des fonds génétiques différents. J'ai commandé chez Euroscarf la souche WT BY4741 (MAT α ; his3 Δ 1 ; leu2 Δ 0 ; met15 Δ 0 ; ura3 Δ 0). Le nom et le génotype des souches WT et mutantes Euroscarf utilisées dans cette étude sont résumées dans le [Tableau 3](#).

Tableau 3 : Nom et génotype des souches Euroscarf utilisées dans cette étude

Nom de la souche dans le manuscrit	Orf	Acc. No.	Souche	Génotype	Informations
BY WT		Y00000	BY4741	MAT α ; his3 Δ 1 ; leu2 Δ 0 ; met15 Δ 0 ; ura3 Δ 0	
<i>pyk1Δ</i>	YAL038W	Y40615	TSA34	BY4741 ; MAT a ; his3 Δ 1 ; leu2 Δ 0 ; met15 Δ 0 ; ura3 Δ 0 ; cdc19-1:kanMX (lethal à 37°C)	Souche délétée du gène codant pour la pyruvate kinase 1
<i>atp18Δ</i>	YML081c-a	Y06068		MAT a ; his3 Δ 1 ; leu2 Δ 0 ; met15 Δ 0 ; ura3 Δ 0 ; YML081c-a::kanMX4	Souche délétée de la sous-unité i/j de l'ATP synthase

Toutes les souches sont conservées dans une solution stérile à 50% de glycérol diluée dans de la Milli-RO et stockées dans des tubes cryogéniques à -80°C.

B. Cultures cellulaires

1. Milieux de culture

Ci-dessous les différents milieux de cultures utilisés pour ce projet de recherche. Les pourcentages indiquent des rapports masse (g) /volume (100 mL) (p/v).

La composition du milieu riche ajusté à pH 5,5 est la suivante :

1. 1% d'extrait de levure
2. 0,12% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
3. 0,1% de KH_2PO_4
4. 2% de D(+)-galactose, glycérol ou acide D,L-lactate ou 0,5% de glucose
5. 2% d'agar Difco est ajouté pour obtenir un milieu solide.

La composition du milieu pauvre ajusté à pH 5,5 est la suivante :

1. 0,175% de base azotée de levure sans acides aminés ni sulfate d'ammonium
2. 5% de $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$
3. 0,1% de KH_2PO_4
4. 2% de D(+)-galactose, glycérol ou acide D,L-lactate ou 0,5% de glucose
5. 2% bacto agar
6. Après la stérilisation (110°C, 30 min) du milieu une solution filtrée de 0,2% caséine et d'acides aminées nécessaires selon les autotrophies des souches (leucine 100 mg/L, histidine 20 mg/L, méthionine 20 mg/L, uracile 20 mg/L) sont ajoutés.

Si l'on souhaite étudier le système des OXHPOS, 0,5% de glucose permet d'éviter les phénomènes de répression catabolique des enzymes mitochondriales provoqués par la concentration élevée en glucose (Ibrahim et al., 1973). C'est pour cela que l'on utilise une concentration plus faible en glucose comparé aux autres sources carbonées.

2. Cultures cellulaires

Les cellules conservées à -80°C sont étalées sur un milieu solide riche avec 2% de glucose, afin de favoriser leur prolifération. Pour s'affranchir des éventuelles souches $\rho^{0/-}$, les cellules sont repiquées sur un milieu respiratoire solide riche avec 2% de glycérol. Une colonie isolée provenant de cette boîte, estensemencée dans un milieu de culture liquide pour obtenir la pré-culture. Cette dernière permet d'inoculer les cellules à une DO précise pour débiter les expériences. Les cellules ont été cultivées en aérobose à 28°C avec une agitation de 180 rpm (rotation par minute). Afin d'avoir une oxygénation du milieu optimale, un ratio de dix est respecté entre le volume erlenmeyer et le volume milieu de culture. Les pré-cultures, les

cultures et la collecte des cellules sont toujours réalisées lors de la prolifération exponentielle, hormis les suivis de prolifération qui nécessitent d'atteindre l'état stationnaire.

La prolifération cellulaire a été suivie par la mesure de la densité optique (DO) à 550 nm avec un spectrophotomètre Jasco-760. Afin de vérifier que la mesure par DO n'incluait pas de biais (taille ou forme des cellules différentes), il a été vérifié que le poids sec par unité de DO (UDO) était similaire entre les différentes souches (Figure 20). Pour ce faire, 20, 30 et 40 unités de DO de cellules lavées sont filtrées sur un filtre (0,45 µm) préalablement pesé. Le filtrat est rincé à l'eau distillée puis séché 4 jours à 37°C. Une fois sec, les filtres sont pesés afin de déterminer le poids sec des cellules par unité de DO.

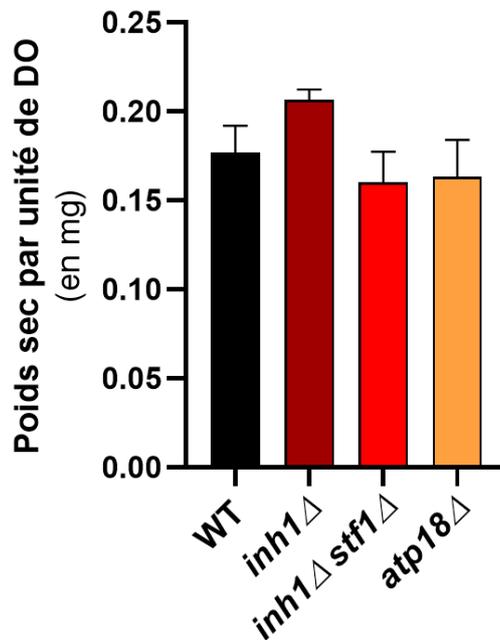


Figure 20 : Poids sec cellulaire par unité de DO

3. Test en goutte

Le test en goutte permet d'observer simultanément la mort cellulaire et les différences de vitesse de prolifération. Pour cela, la pré-culture est diluée pour obtenir 10 000 cellules dans une goutte (3,5 µl) dans une plaque 96 puits stérile en sachant qu'une unité de DO correspond à $1,2 \cdot 10^7$ cellules dans ces conditions de mesure (550 nm). Puis quatre dilutions d'un facteur dix sont réalisées successivement afin de pouvoir déposer sur un milieu solide, à l'aide d'une pipette multicanaux, des gouttes contenant 10 000, 1 000, 100 ou 10 cellules. Les boîtes de cultures sont photographiées trois et six jours après dépôt.

4. Suivi de la prolifération cellulaire

Afin de déterminer l'impact sur le métabolisme cellulaire dans différentes conditions, des suivis de croissance ont été réalisés. A partir de la même pré-culture, deux cultures sont ensemencées à 0,1 DO finale à 12h d'intervalle afin de pouvoir suivre la prolifération sur 24h. La DO est mesurée toutes les heures.

5. Traitement des cellules au carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP)

Afin d'étudier le rôle des inhibiteurs de l'ATP synthase, il a été nécessaire de trouver des conditions favorisant l'activité hydrolytique de l'ATP synthase. Pour cela j'ai utilisé un agent découplant mitochondrial : le carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazine (CCCP). C'est un protonophore amphiphile. Le CCCP diffuse dans la mitochondrie en fonction de son gradient de concentration. Dans la matrice mitochondriale, à pH basique, la molécule de CCCP se dissocie en $\text{CCCP}^- + \text{H}^+$. De par sa charge, le CCCP^- est attiré dans l'espace intermembranaire sous l'effet du potentiel membranaire. Dans l'espace intermembranaire, à pH acide, le CCCP^- s'associe avec un H^+ puis retourne dans l'espace matriciel. Ainsi ce cycle futile permet de transporter les protons de l'espace intermembranaire à la matrice et par conséquent de diminuer le potentiel membranaire mitochondrial (Figure 21).

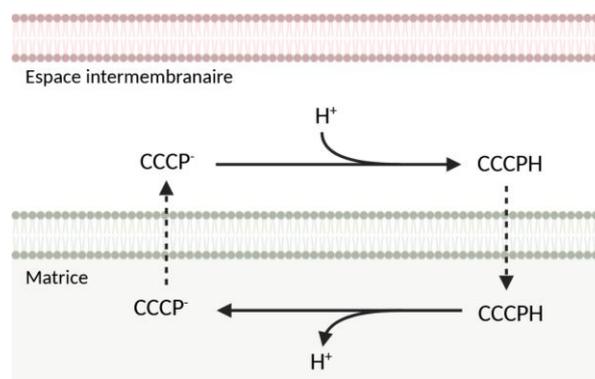


Figure 21 : Illustration du fonctionnement du découplage de la membrane interne mitochondriale par le protonophore CCCP

Pour les cultures liquides, le CCCP est ajouté, au milieu de culture thermostaté à 28°C, quelques minutes avant d'inoculer les cellules à 0,1 DO finale. Du fait de la forte sensibilité des levures vis-à-vis du CCCP, la reproductibilité de son effet sur la prolifération est difficile. Pour

lutter contre ce problème technique, une gamme de concentration de CCCP a été réalisée pour chaque expérience et condition (entre 1,25 et 2 μ M final). Pour les milieux solides, le CCCP est ajouté dans le milieu de culture tiède juste avant de couler les boîtes. Les milieux solides contenant du CCCP doivent être utilisés le jour même car l'agent découplant est peu stable dans le temps dans ces conditions.

6. Traitement des cellules au cycloheximide

Afin d'observer la stabilité dans le temps des différentes entités de l'ATP synthase, la traduction a été inhibée au cycloheximide. Cette molécule, produite par la bactérie *Streptomyces griseus*, interagit avec l'enzyme translocase eEF2 interférant l'étape de translocation et bloque également le site A des ribosomes. Le cycloheximide (250 μ g/ml) est ajouté dans la culture à environ 3 de DO. Un prélèvement de 100 unités de DO de cellules est réalisé juste avant l'ajout du cycloheximide et deux autres prélèvements à 30 et 90 min d'incubation.

C. Préparation de mitochondries isolées

L'intérêt d'isoler les mitochondries est d'augmenter la résolution de certaines techniques du fait d'un enrichissement du contenu mitochondrial en s'affranchissant du contenu cytosolique (Western blot, électrophorèse native...). Cette technique permet aussi de caractériser fonctionnellement les mitochondries car certains substrats (NADH, ADP), nécessaires pour alimenter les OXPHOS, ne peuvent pas traverser la membrane cellulaire et la paroi de la levure. C'est une technique très délicate du fait de la fragilité des mitochondries vis-à-vis de l'osmolarité et des pressions physiques. Il existe plusieurs techniques d'isolation de mitochondries, dans cette étude j'ai utilisé la digestion enzymatique de la paroi cellulaire par la zymolyase (Figure 22 :) (Guérin et al., 1979).

Les cellules sont cultivées en présence de lactate 2%. Cette source carbonée, dite respiratoire, permet d'avoir beaucoup de matériel grâce à une quantité importante de mitochondries par cellule.

1. Récolte et lavages des cellules : Les cellules d'une culture de 500 ml à environ 6 de DO sont récoltées à 5 000 rpm pendant 10 min à 4°C. Le culot de cellules est lavé deux fois à l'eau distillée froide.

2. Fragilisation de la paroi cellulaire : Après centrifugation le culot de cellules et repris dans 20 ml de tampon SH¹ par g de poids sec de levure (1 DO = 0,14 g * ml de culture) et incubé 10 min à 32°C. La réaction est arrêtée par ajout d'un grand volume de tampon KCl². Les cellules sont récoltées à 5000 rpm 5 min à 4°C et les traces de tampon SH sont éliminées par deux lavages au tampon KCl.
3. Digestion enzymatique de la paroi à la zymolyase : Les cellules sont récoltées et incubées à 32°C avec 10 ml de tampon de digestion³ par g de poids sec de levure contenant 1,5 mg/ml de zymolyase®-20T (nacalai tesque®, référence 07663-04). La digestion de la paroi cellulaire est suivie par DO, elle dure entre 15 et 30 min. La digestion est arrêtée lorsque que la DO est diminuée à 90%. Une fois les protoplastes (levure sans paroi) obtenus, la réaction est rapidement stoppée par ajout d'un grand volume de tampon de lavage protoplastes⁴. La zymolyase résiduelle est éliminée par deux lavages des protoplastes récoltés par centrifugation à 10 000 rpm pendant 5 min à 4°C. A partir de cette étape, il est indispensable de toujours garder les échantillons dans la glace et de travailler à 4°C.
4. Homogénéisation : Les protoplastes sont repris dans le tampon d'homogénéisation⁵ et homogénéisés à l'aide d'un Potter afin de casser les cellules et libérer les mitochondries. Puis, l'homogénat est réparti dans plusieurs tubes SS34 en complétant avec le tampon d'homogénéisation.
5. Isolation des mitochondries par centrifugations différentielles : Une première centrifugation à basse vitesse (2 000 rpm, 7min, 4°C) permet d'éliminer les débris cellulaires se trouvant dans le culot et de récupérer les mitochondries dans le surnageant. L'étape 4 peut être répétée sur ce culot récolté puis les deux surnageants obtenus à basse vitesse sont regroupés. Une seconde centrifugation à haute vitesse (10 000 rpm, 10min, 4°C) est réalisée sur le surnageant permettant de faire tomber les mitochondries dans le culot. Les culots sont groupés et repris dans un 1 ml de tampon de récupération⁵ et sont homogénéisés très délicatement à l'aide d'un Potter avant

d'être répartis de nouveau dans les tubes SS34. Des centrifugations à basse vitesse puis à haute vitesse sont réalisées de nouveau.

6. Conservation des mitochondries : Pour finir, 200 μ L de tampon de récupération⁶ sont ajoutés sur les culots de mitochondries décollés doucement à l'aide du pilon. Les culots sont mis en commun puis homogénéisés dans un petit Potter. 5 μ L de l'homogénat est récupéré afin de faire la quantification protéique. L'homogénat est projeté à l'aide d'une seringue dans un bain d'azote liquide afin de congeler les mitochondries sous forme de billes (cela permet de décongeler de faibles quantités et éviter le gaspillage). Les billes sont placées dans un tube de cryoconservation à -80°C et peuvent être conservées durant de nombreux mois.

¹Tampon SH : Tris base 0,1 M, 2-mercaptoethanol 0,5 M, pH 9,3.

²Tampon KCl : KCl 0,5 M, Tris base 10 mM, pH 7,0.

³Tampon de digestion : Sorbitol 1,38 M, EGTA 0,1 M, acide citrique 10 mM, phosphate disodique hydrate ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 12\text{H}_2\text{O}$) 30 mM, pH 6,8.

⁴Tampon de lavage des protoplastes : Sorbitol 0,75 M, Mannitol 0,4 M, Tris-maléate 10 mM, KH_2PO_4 10 mM, BSA sans acide gras libre 0,1%, pH 6,8.

⁵Tampon d'homogénéisation : Mannitol 0,5 M, EGTA 2 mM, Tris-maléate 10 mM, KH_2PO_4 10 mM, sérum d'albumine de bœuf (SAB) sans acide gras libre 0,2%, pH 6,8.

⁶Tampon de récupération : Mannitol 0,6 M, EGTA 2 mM, Tris-maléate 10 mM, KH_2PO_4 10 mM, pH 6,8.

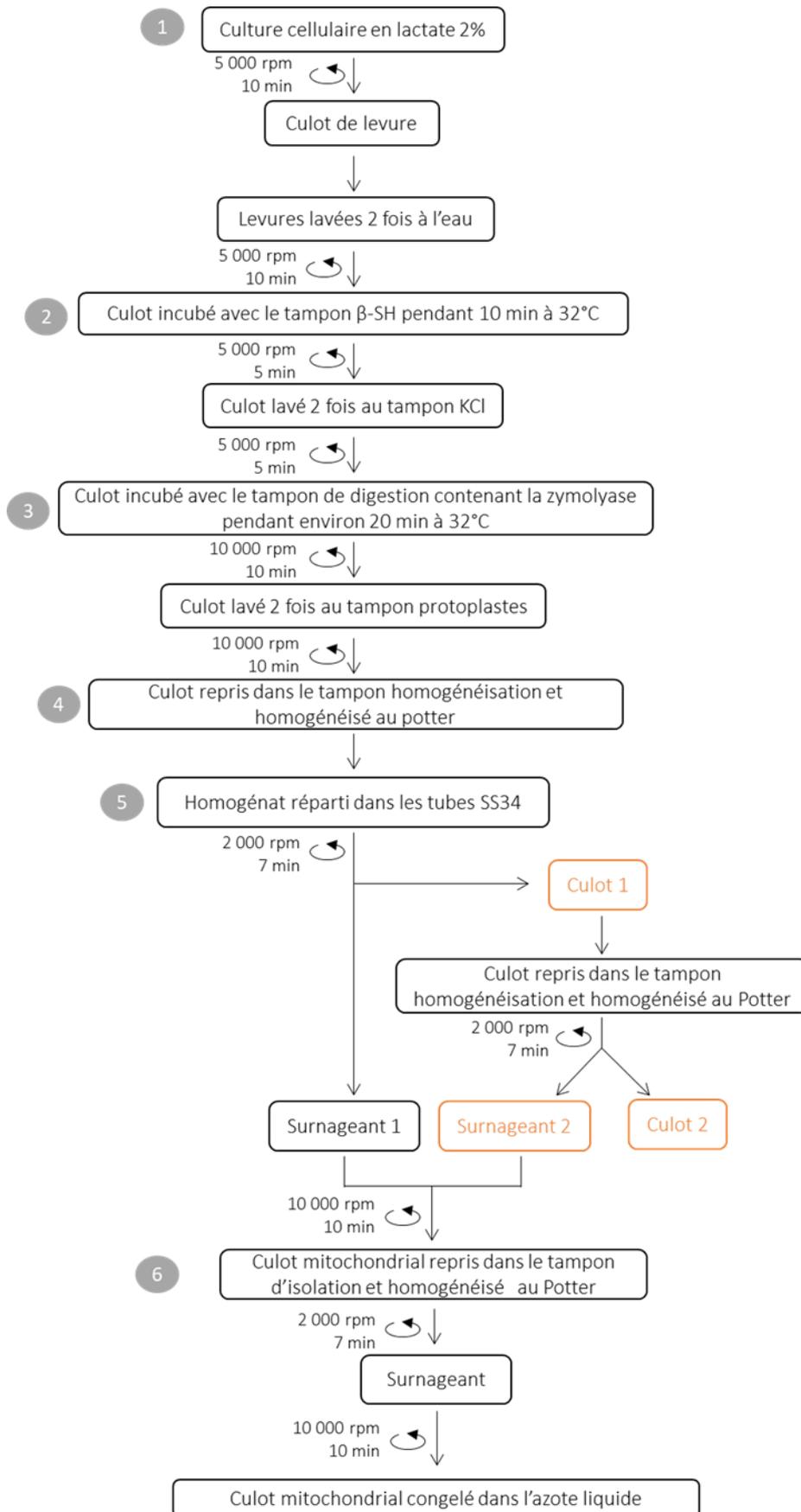


Figure 22 : Schéma du protocole d'isolation des mitochondries par digestion enzymatique à la zymolyase

D. Techniques de biologie moléculaire

1. Constructions des souches

a) Stratégie

Comme énoncé précédemment, les mutants issus de la souche D273 ont été construits par recombinaison homologue d'une cassette de délétion. La recombinaison homologue est une recombinaison génétique qui a lieu spontanément chez la levure où les séquences de nucléotides sont échangées entre des molécules d'ADN identiques. La technique par recombinaison homologue est réalisée en quatre étapes (Figure 23) :

1. Construction et amplification de la cassette par réaction de polymérisation en chaîne (PCR)
2. Transformation
3. Sélection clonale grâce à la cassette de délétion
4. Vérification par PCR

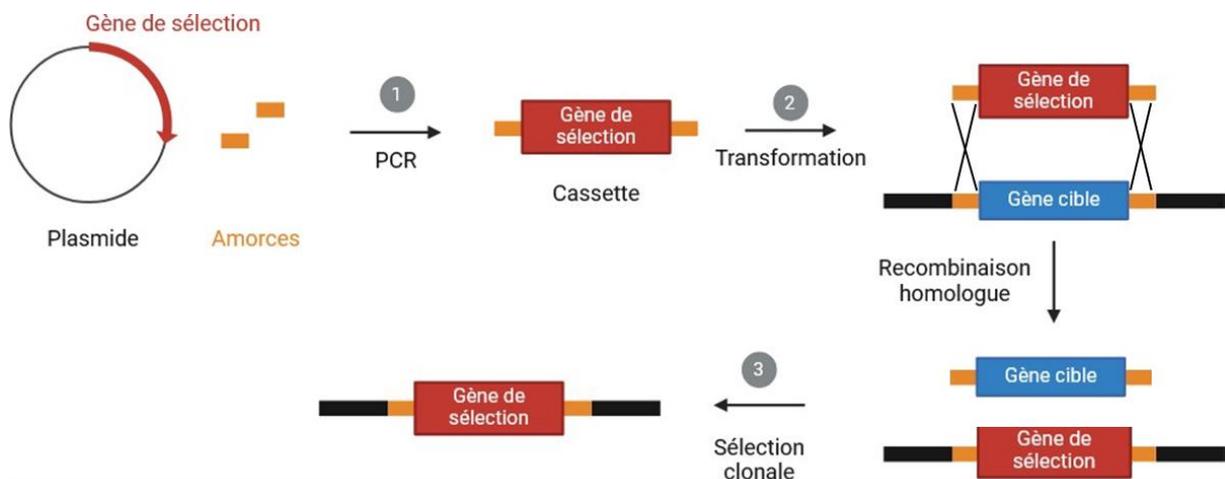


Figure 23 : Schéma de la construction des mutants par la méthode de recombinaison homologue

b) Réaction de polymérisation en chaîne (PCR)

La PCR permet d'obtenir, *in vitro*, un grand nombre de segments d'ADN identiques, à partir d'une séquence nucléotidique initiale définie. Pour cela, dans un tube à PCR sont ajoutés : le tampon HF (1X final), les dNTPs (0,2 mM), 1 µL de polymérase phusion ADN (Thermo®), les oligomères sens et anti-sens (0,5 mM), 50 ng de plasmide matrice, le volume final est ajusté à 200 µl avec de l'eau sans nucléase.

Dans le [Tableau 4](#) ci-dessous sont répertoriés les couples d'amorces et les plasmides utilisés pour chaque gène remplacé par une cassette de délétion par recombinaison homologue. Les oligomères sont conçus afin que les extrémités internes s'hybrident à la matrice du plasmide, pour l'amplification de la cassette de sélection, et que les extrémités externes soient identiques aux séquences encadrant le gène à déléter, pour qu'il y ait recombinaison homologue.

Tableau 4 : Liste des plasmides et des couples d'amorce utilisées pour la construction des mutants

Gène délété	Plasmide	Espèce de provenance du gène de sélection	Taille du plasmide en pb	Couple d'amorces de construction et d'amplification de la cassette (séquence dans le sens 5'→3')	Taille du fragment amplifié en paire de bases
<i>inh1</i>	pFA6a-His3MX6	<i>S. kluyveri</i>	3825	GCTTCTGCGGAAACGCATGATTA TTTGGTCATCGAGTCAATTTTAGC CAGCTGAAGCTTCGTACGC ; ATTTTACACGCATTACTACAGCA CACTTTTATACAGTTCCACAATA GAATCATAGGCCACTAGTGGATCTG	1525
<i>stf1</i>	pUG-natNT2	<i>Streptomyces noursei</i>	3849	AGCACTTTCACCCAGTCATCCAACCAA ACACGCTATCAATATGTTAAACCTGTT TAGCTTGCCTCGTCC ; TACGTACAAAACGTGTCTGCAGAACCT TTAGCCTTAACAATGACCAATCAGAGC TCGATTACAACAGGTG	1384
<i>atp18</i>	pFA6a-His3MX6	<i>Saccharomyces kluyveri</i>	3825	GTA TAGTAGCTGTCATCATCACCTACAAAT GTGTTTGTCTAGCATTATCCGCATAGGCCA CTAGTGGATCTG ; CGTTAGTTTAAACATACGACGACAGATTAAT TGATTGGATTGTA CTGCCCCGCCAGCTGAA GCTTCGTACGC	1534

<i>atp18</i>	pUG-natNT2	<i>Streptomyces noursei</i>	3849	GTACTAGTAGCTGTCATCATCACCTAC AAATGTGTTTGCCTAGCATTATCCGC ATAGGCCACTAGTGGATCTG ; CGTTAGTTTAACATACGACGACAGATT AATTGATTGGATTGTACTGCCCCGCCA GCTGAAGCTTCGTACGC	1337
--------------	------------	-----------------------------	------	--	------

Le thermocycleur est programmé comme indiqué dans le [Tableau 5](#).

Tableau 5 : Programme du thermocycleur pour la construction et l'amplification de la cassette de délétion par PCR

Nombre de cycle	Température	Temps	Informations
1	98°C	30 s	
32	98°C	10 s	Dénaturation : séparation des deux brins d'ADN
	62°C	20 s	Hybridation des oligomères : température déterminée selon leur composition en acides nucléiques (définis à l'aide du logiciel « thermo calculator – Phusion »)
	72°C	45 s	Elongation : température optimale pour cette polymérase 30 s/1 kb
1	72°C	5 min	Terminaison de toutes les élongations

c) Electrophorèse d'ADN sur gel d'agarose

Les segments d'ADN amplifiés au cours d'une PCR sont ensuite vérifiés par leur taille grâce à une électrophorèse d'ADN sur gel d'agarose. Environ 1 µl du produit de PCR et 5 µl du

marqueur de taille GeneRuler 1 kb DNA ladder® sont chargés sur un gel à 1,5% d'agarose. L'agarose est solubilisée dans du tampon commercial Tris-acétate-EDTA (TAE) 0,5X final contenant du Gel RED dilué au 10 000^{ème}. La migration est réalisée dans un tampon TAE 0,5X final à 100 V. Les bandes sont détectées par exposition du gel aux rayons UV avec l'Image Quant 800 (Amersham®).

d) Transformation des levures

Les levures sont transformées avec la cassette de délétion obtenue pour qu'il y ait recombinaison homologue. Cependant, l'échantillon résultant de la PCR contient la cassette recombinante mais aussi le plasmide. Afin de ne pas avoir de faux positifs (des clones avec le plasmide sans cassette recombinée), le plasmide préalablement méthylé est digéré par l'enzyme DpnI qui ne reconnaît que l'ADN méthylé. Pour cela, les échantillons sont incubés avec 1 µl DpnI à 37°C pendant 1h avant de dénaturer l'enzyme par un bain sec à 80°C pendant 5 min. Ensuite, les levures d'une culture en glucose 2% sont récoltées en phase exponentielle par centrifugation à 3 000 rpm 5 min. Les cellules sont lavées à l'eau ultrapure puis centrifugées à 8 000 rpm pendant 2 min. Le culot est lavé dans un tampon filtré (0,2 µm) d'acétate de Lithium (0,1 M), Tris-EDTA 1X final. La même centrifugation est réalisée afin de reprendre le culot dans 200 µl du tampon précédent. 10 µl d'ADN de sperme de saumon (10 mg/ml) et 0,1 à 0,2 µg de produit de PCR sont ajoutés aux 100 µl de levure. Le volume est divisé en deux afin d'avoir un témoin sans ajout de produit de PCR. Puis 600 µl de tampon filtré (0,2 µm) d'acétate de Lithium (0,1 M), Tris-EDTA 1X final et 50% polyéthylène glycol sont ajoutés. L'échantillon est agité lentement à l'aide d'une roue tournante pendant 30 min à 28°C. Puis, l'échantillon subit un choc thermique à 42°C pendant 15 min puis un second choc à 4°C pendant 10 min. Les cellules sont centrifugées et reprises dans 1 ml de milieu glucose 2%. Les cellules sont agitées sur une roue tournante pendant 1h à 28°C.

e) Sélection des clones

Après la transformation des cellules avec la cassette de délétion, les cellules sont récoltées par centrifugation à 8 000 rpm pendant 2 min. Le culot de cellules est lavé deux fois à l'eau distillée stérile. Les cellules sont ensuite étalées sur une boîte contenant un milieu minimum sélectif complété avec les acides aminés correspondant aux auxotrophies à part celui de sélection. Les clones sont sélectionnés après plusieurs jours à 28°C.

f) Extraction d'ADN

L'extraction d'ADN a été nécessaire pour confirmer par PCR la construction des souches et pour réaliser la PCR quantitative.

Les cellules ont été lavées à l'eau distillée stérile froide puis suspendues dans 200 µl de tampon de lyse : Tris 10 mM, EDTA 1 mM, NaCl 100 mM, Triton X-100 2 % (v/v), SDS 1 % (v/v), pH 8,0. Un volume de 200 µl de billes de verre (0,4 mm de diamètre) et 200 µl de tampon chloroforme/phénol (1:1) sont ajoutés avant d'être vortexé 1 min. 400 µl de Tris 10 mM et d'EDTA 1 mM sont ajoutés puis l'échantillon est vortexé pendant 5 min. Le surnageant a été mélangé à un volume égal de chloroforme pendant 1 min et centrifugé à 12 000xg pendant 5 min. Le surnageant a été mélangé dans un volume deux fois plus grand d'éthanol glacial puis centrifugé à 12 000xg pendant 10 min. Le culot a été séché à température ambiante avant d'être remis en suspension dans de l'eau sans nucléase.

g) Vérification de la construction des mutants

Afin de confirmer que la recombinaison homologue de la cassette de délétion a bien eu lieu au niveau du gène cible, une PCR sur l'ADN extrait des clones sélectionnés a été réalisée. La taille des segments amplifiés pour le WT et pour le mutant est vérifiée par une électrophorèse d'ADN. Les amorces utilisées pour la PCR de vérification et les tailles des segments attendues sont rassemblées dans le [Tableau 6](#) ci-dessous.

Tableau 6 : Amorces utilisées pour vérifier l'insertion de la cassette au bon endroit dans le génome

Gène délété	Cassette de sélection	Amorces de vérification (séquence dans le sens 5' -> 3')	Taille entendue chez le WT en pb	Taille entendue chez le mutant en pb
<i>inh1</i>	HIS3-MX6	GGAGGGGTTTCATAACTTGAC ; TTAGTCAGACAGACAAGAGG	575	1772
<i>stf1</i>	NATR	GGGGGAATTCGGTGTTTAAGTACTGGCG ; GGGGGGATCCCTCCTTCGCGCGACACGC	979	2017
<i>atp18</i>	HIS3-MX6	GCGCGGAATTCACGGATAAATCTCCGAGGG ; GCGCGGAATTCAGAAGGAAGATAGGCATAGTG	508	1763
<i>atp18</i>	NATR	GCGCGGAATTCACGGATAAATCTCCGAGGG ; GCGCGGAATTCAGAAGGAAGATAGGCATAGTG	508	1787

2. Quantification de l'ADN mitochondrial par PCR quantitative

La quantification de l'ADN (qPCR) s'appuie sur la technique de PCR de base tout en permettant de suivre le doublement de quantité d'ADN à chaque cycle d'amplification. La quantité d'ADN obtenue au bout d'un certain nombre de cycle dépend de la quantité d'ADN de départ (Figure 24). Le colorant contenu dans le mélange réactionnel d'amplification d'ADN s'intercale dans les brins d'ADN et par conséquent le signal fluorescent émis est proportionnel à la quantité d'ADN.

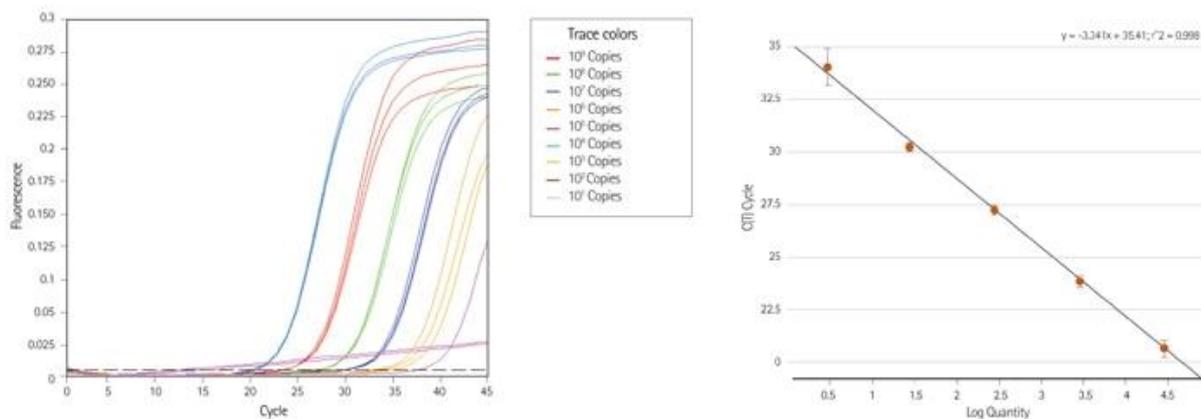


Figure 24 : Exemples des résultats obtenus par PCR quantitative.

A gauche, mesure de la fluorescence en fonction du nombre de cycle de PCR pour différents nombres de copies d'ADN. A droite, la relation linéaire entre le nombre de cycle seuil et la quantité d'ADN de départ. (Issue du site internet de Merck ®)

J'ai déterminé la quantité d'ADN mitochondrial contenu dans les cellules des différentes souches. La quantité d'ADN mitochondrial mesurée est normalisée à la quantité d'ADN nucléaire. La PCR quantitative a été réalisée avec qPCRBIO SyGreen Blue Mix Lo-ROX Eurobioscientific®. Selon les instructions du fabricant, 0,1 ng d'ADN génomique a été ajouté à 10 µl de réactif avec 400 nM final d'amorces avec un volume final ajusté à 20 µl avec de l'eau sans nucléase. Deux couples d'amorces différents ont été utilisés pour quantifier l'ADNmt et l'ADN nucléaire.

Couple d'amorces pour l'ADN nucléaire :

1. Cible une région du gène *ACT1*
 Sens : 5'-CACCTGTTCTTGACTGA-3'
 Anti-sens : 5'-CATAGAAGGCTGGAACGTTG-3'
2. Cible une région du gène *GAL1*
 Sens : 5'-TGCTTTGTCAAATGGATCATATGG-3'
 Anti-sens : 5'-CCTGGAACCAAGTGAACACTACTAC-3'

Couple d'amorces pour l'ADN mitochondrial :

1. Cible une région du gène *COX3*
 Sens : 5'-TTGAAGCTGTACAACCTACC-3'
 Anti-sens : 5'-CCTGCGATTAAGGCATGATG-3'

2. Cible une région du gène *ATP9*

Sens : 5'-AACAAATTGGTTTATTAGAGCAGGTATTGG-3'

Anti-sens: 5'-TATACACCGAATAATAAGAATGAAAC-3'

Le thermocycleur est programmé comme indiqué dans le [Tableau 7](#) et le produit de PCR est vérifié par gel d'agarose.

Tableau 7 : Programme du thermocycleur pour la PCR quantitative

Nombre de cycle	Température	Temps	Information
1	95°C	2 min	
40	95°C	5 s	Dénaturation : séparation des deux brins d'ADN
	60°C	30 s	Hybridation et élongation
1	65°C to 95°C		Courbe de fusion

A chaque expérience, une gamme du standard (WT), allant de 10 ng à $10 \cdot 10^{-4}$ ng est réalisée afin d'être certain d'être dans la linéarité de détection du signal fluorescent.

Pour chaque PCR quantitative réalisée, les paramètres suivants sont vérifiés :

1. L'efficacité (doit être entre 90 et 110%) : elle détermine si pour une gamme d'ADN génomique on a bien une proportionnalité entre la quantité d'ADN de départ et le nombre de cycle nécessaire pour arriver à la même quantité d'ADN final (exemple : un doublement du nombre de cycle pour une quantité d'ADN de départ deux fois moins importante).
2. Le RSeq (doit être proche de 1) : il détermine si pour chaque cycle on a bien un doublement de la quantité d'ADN.
3. La courbe de dissociation (doit avoir un seul pic) : elle permet de savoir si la production d'un segment d'ADN a été réalisée à partir d'un seul couple d'amorce ([Figure 25](#)).

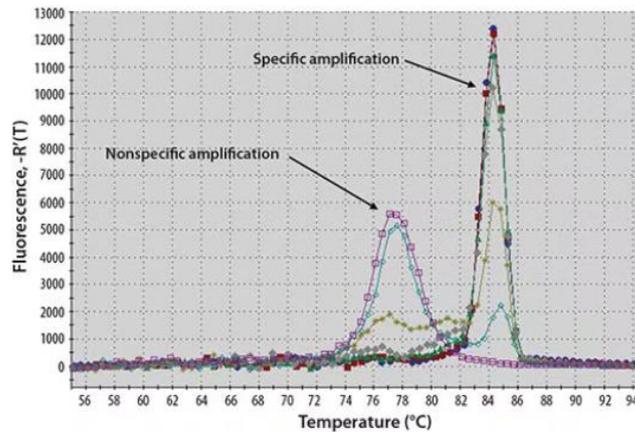


Figure 25 : Exemple de courbes de dissociation obtenue lors d'une PCR quantitative (issue du site d'internet de Merck®).

E. Techniques biochimiques

1. Obtention des échantillons protéiques

Tous les échantillons sont obtenus en conditions natives afin de pouvoir à partir d'un même échantillon faire différentes expériences nécessitant des enzymes fonctionnelles ou non.

a) Technique d'extraction et de dosage protéique

Les protéines ont été extraites par une méthode de casse mécanique de la paroi cellulaire aux billes de verre. Pour cela, 100 unités de DO de cellules sont récoltées puis lavées à l'eau distillée froide. Elles sont ensuite reprises dans 250 µl de tampon d'extraction (Bis-Tris 10 mM pH 6,4, l'EDTA 1 mM, un mélange d'inhibiteurs de protéases Complete avec EDTA Roche®). Les cellules suspendues sont transvasées dans des tubes Eppendorf à vis et un volume égal de billes de verre (0,4 mm de diamètre) est ajouté. Enfin, les cellules sont cassées par agitation vigoureuse pendant 4 min.

La concentration en protéines a été déterminée par dosage DC (Bio-Rad®) à partir de deux volumes différents pour un même échantillon à chaque fois.

b) Technique de séparation de la fraction soluble de la fraction membranaire

Pour obtenir la fraction membranaire et soluble, l'extrait cellulaire a été centrifugé à 30 000xg à 4°C pendant 30 min. Le surnageant a été mesuré et conservé comme fraction soluble. Le culot a été suspendu dans le tampon d'extraction (Bis-Tris 10 mM, EDTA 1 mM, inhibiteurs de protéases Complete avec EDTA Roche®, pH 6,4) avec le même volume mesuré pour le surnageant. La concentration en protéines de chaque fraction a été déterminée.

c) Technique de concentration des échantillons protéiques

Afin d'augmenter la quantité protéique chargée sur gel sans affecter l'activité des protéines d'intérêt (ici l'ATP synthase : monomère ~600 kDa), j'ai utilisé un concentrateur centrifuge (Corning® Spin-X® UF 500 µL) avec une membrane d'exclusion de masse moléculaire de 100 kDa.

Après solubilisation des échantillons protéiques, une centrifugation à 30 000xg pendant 30 min à 4°C est réalisée. Cette étape permet de ne pas saturer la membrane du concentrateur avec des débris cellulaires. Le surnageant obtenu est ensuite concentré d'un facteur 10 environ par centrifugation à 12 000xg pendant 10 min à 4°C dans le concentrateur préalablement rincé à l'eau ultrapure.

2. Techniques de mesures des capacités bioénergétiques

a) Mesure du flux de consommation d'oxygène

La consommation d'oxygène des cellules en culture et des mitochondries isolées a été mesurée à l'aide d'un oxygraphe de haute résolution : Oxygraph-2 k (OROBOROS INSTRUMENTS®, Innsbruck, Autriche). Les deux chambres hermétiques de 2,1 mL sont thermostatées à 28°C et l'agitation à 750 rpm permet une homogénéité de l'oxygène dans la chambre. L'oxygraphe comprend une électrode de Clark permettant de mesurer l'oxygène du milieu (Figure 26). Celle-ci est composée d'une anode en argent et d'une cathode en platine immergées dans une solution de KCl demi-saturée. La cathode, exposée à la cuve, est revêtue

d'une membrane en téflon. Les propriétés physico-chimiques du téflon rendent la membrane spécifiquement perméable à l'oxygène et étanche à l'eau, permettant à l'oxygène de diffuser librement entre la chambre de mesure et l'électrode de Clark. La tension de l'électrode de Clark maintenue à 0,7 V permet la réduction du dioxygène. Il est réduit deux fois par la cathode de platine, une première fois en H_2O_2 , puis en $2 \text{H}_2\text{O}$. La réduction du dioxygène génère une dépolarisation de la cathode. Le courant qui en résulte est proportionnel à la quantité d'oxygène dissous dans l'électrolyte de l'électrode de Clark et donc par extension à l'oxygène présent dans la cuve de mesure.

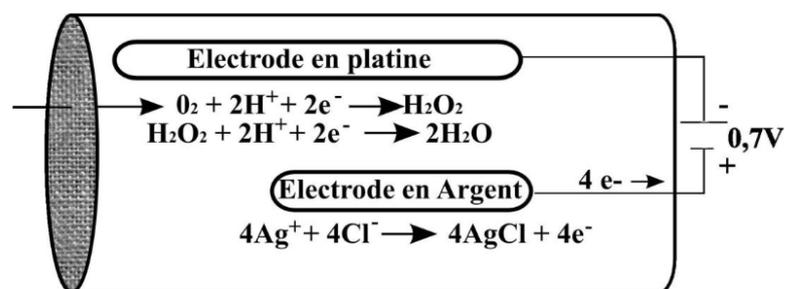


Figure 26 : Illustration du fonctionnement d'une électrode de Clark (issue de la thèse d'Arnaud Mourier)

Le flux de consommation d'oxygène est mesuré à trois états :

1. L'état phosphorylé permet de mesurer la respiration couplée à la synthèse d'ATP grâce à l'ajout en excès des substrats de l'OXPHOS (NADH, succinate, ADP, Pi et éthanol chez la levure)
2. L'état non phosphorylé permet de mesurer la respiration basale, non couplée à la synthèse d'ATP par inhibition de l'ATP synthase (oligomycine, triéthylétain (TET))
3. L'état découplé, permet de mesurer la respiration maximale en abolissant le potentiel membranaire grâce à l'ajout d'un agent découplant (CCCP). En dissipant le potentiel membranaire mitochondrial, le découplant permet de lever les contraintes thermodynamiques contraignant le flux de consommation d'oxygène. L'ajout de ce découplant se fait par titration, car en excès il peut affecter les capacités de la chaîne respiratoire. Afin d'éviter les contrôles cinétiques par l'approvisionnement en substrats de la chaîne respiratoire, la mesure de l'état découplé se fait en présence de substrat en excès.

Il est nécessaire de mesurer les flux à un état stationnaire. Le 100% d'oxygène dissout dans la cuve contenant du tampon de respiration thermostaté à 28°C est calibré sur l'enregistreur à chaque début d'expérience.

(1) A l'échelle des mitochondries isolées

Les mitochondries sont incubées dans 2,1 ml de tampon de respiration contenant du mannitol 0,65 mM, EGTA 1mM, Tris 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, MgCl₂ 1 mM et sérum d'albumine de bovin (SAB) sans acide gras 0,02% (w/v) pH 6,8. Le flux de consommation d'oxygène des mitochondries a été mesuré successivement comme suit :

1. Etat phosphorylé avec ajout d'ADP (1 mM), de NADH (2 mM) ou d'éthanol (85 mM)
2. Etat non phosphorylé avec ajout d'oligomycine (0,6 µg/ml)
3. Etat découplé par l'ajout successif de CCCP titré (environ 1,5 µM)

L'éthanol traversant librement les membranes, contrairement au NADH, peut approvisionner la chaîne respiratoire indirectement grâce aux alcools déshydrogénases qui produisent du NADH à partir d'éthanol. Les flux mesurés sur mitochondries isolées sont normalisés à la quantité protéique.

(2) A l'échelle cellulaire

Le flux de consommation d'oxygène des cellules a été mesuré directement sur un prélèvement de 2,1 ml de la culture cellulaire et successivement dans les conditions suivantes :

1. Condition endogène
2. Condition endogène en présence d'éthanol (85 mM),
3. Etat non phosphorylé avec l'addition de triéthylétain (environ 25 µM)
4. Etat découplé par l'ajout successif de CCCP titré (environ 2,5 µM)

Comme l'oligomycine, le triéthylétain (TET) est un inhibiteur de l'ATP synthase. Il se lie de façon non covalente au domaine F₀ en inhibant le passage des protons vers la matrice mitochondriale (Cain and Griffiths, 1977). L'avantage du TET est de passer rapidement la paroi cellulaire contrairement à l'oligomycine qui est très hydrophobe. Pour être certain que le TET n'affecte pas les capacités de la chaîne respiratoire, une titration est réalisée à chaque début

d'expérience afin d'utiliser une concentration minimum. De plus, à chaque fois une mesure à l'état découplé est faite sans ajout de TET préalablement.

Lorsque le flux de consommation d'oxygène est trop important par rapport à la quantité d'oxygène disponible dans la cuve hermétique de l'oxygraphe et le temps nécessaire pour la mesure, les cellules ont été diluées avec le milieu de la culture. Les flux mesurés sur cellules sont normalisés à l'unité de DO dans la cuve.

b) Mesure de l'ATP/O sur mitochondries isolées

La mesure de l'ATP/O permet de rendre compte du rendement du système OXPHOS. C'est-à-dire, qu'il permet de définir l'efficacité du couplage entre la consommation d'oxygène et la quantité d'ATP synthétisé. Pour cela, le flux de consommation d'oxygène et de synthèse d'ATP doivent être mesurés simultanément. L'ADP (0,8 mM) et l'éthanol (85 mM) ou le NADH (2 mM) sont ajoutés dans la chambre de l'oxygraphe contenant le tampon de respiration (mannitol 0,65 mM, EGTA 1 mM, Tris 20 mM, KH₂PO₄ 10 mM, MgCl₂ 1 mM et SAB sans acide gras 0,02% (w/v)). 35 µg/ml de mitochondries isolées sont ajoutées puis la chambre est fermée. Une fois le flux respiratoire mesuré à l'état stationnaire, la chambre est réouverte. 150 µl de prélèvement sont collectés toutes les 20 s et précipités dans 50 µl d'une solution d'acide pyrrolidone-carboxylique (7% p/v) et d'EDTA (25 mM). L'échantillon est ensuite centrifugé à 13 000xg pendant 10 min à 4°C. Le surnageant est récolté et le pH est neutralisé avec une solution de KOH (2 M) et MOPS (0,5 M) pour stabiliser la molécule d'ATP. Les extraits sont ensuite dilués au 10^{ème} dans l'eau ultrapure puis la teneur en ATP a été déterminée par bioluminescence (hv) avec le kit ATPlite 1step de Revvity (Health Sciences®).



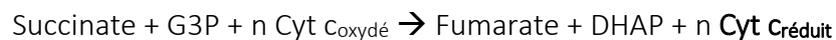
Le flux de synthèse non oxydative de l'ATP a été déterminé comme énoncé précédemment mais en incubant les mitochondries 1 min avec de l'oligomycine (0,6 µg/ml) avant le premier prélèvement.

c) Activité de la cytochrome c réductase

Les mesures d'activité sont réalisées grâce à des accepteurs ou donneurs d'électrons dont l'intensité d'absorbance à une longueur d'onde donnée change en fonction de leur état

réduit ou oxydé. L'absorbance suivie au cours du temps permet de définir une vitesse de réaction de l'enzyme d'intérêt. L'ensemble des mesures a été effectué dans une cuve en quartz thermostatée à 28°C sous agitation à 1 000 rpm avec un spectrophotomètre Jasco-760. Pour chaque condition, la mesure est réalisée sur trois quantités protéiques différentes afin de confirmer la proportionnalité et la linéarité du signal à la quantité de protéine.

L'activité de la cytochrome c réductase (complexe III) a été déterminée par l'augmentation de l'absorbance de la forme réduite du cytochrome c mesurée à 550 nm. Comme pour la mesure de l'activité du G3P, le complexe IV doit d'être inhibé. Dans une cuve 2 ml de tampon KH_2PO_4 (50 mM, pH 7,4) contenant KCN (0,5 mM), succinate (10 mM), G3P (10 mM) et du cytochrome c de cœur boeuf (200 $\mu\text{g}/\text{ml}$) sont ajoutés. Puis, 250 μg d'extrait cellulaire sont ajoutés dans la cuve avant l'ajout de succinate (10 mM) et de G3P (50 mM). Le NADH absorbe aussi à 550 nm donc il ne peut pas être utilisé comme substrat. La mesure peut être faite sur des ajouts successifs d'une même quantité d'extrait cellulaire. Afin de confirmer que cette activité est dépendante du complexe III, une mesure est faite en présence d'un inhibiteur de l'enzyme, l'antimycine A (0,1 mM).



d) Mesure de l'activité hydrolytique de l'ATP synthase

L'ATP synthase hydrolyse l'ATP en ADP et P_i lorsque le potentiel électrochimique membranaire est aboli. Cette mesure faite sur mitochondries isolées ou extraits cellulaires est réalisée en présence d'alaméthicine. Cette dernière se loge dans les membranes et forme un canal permettant la dissipation du gradient de proton et la circulation libre de l'ATP (Ritov et al., 1992). Le P_i produit au cours du temps est quantifié à 750 nm et une gamme de phosphate est réalisée à chaque quantification afin de convertir l'absorbance en nmole de P_i .

(1) A l'échelle cellulaire

La mesure a été déterminée à 28°C sous agitation à 750 rpm dans un thermomixeur. 0,8 mg d'extrait cellulaire sont ajoutés à 1 ml du tampon d'activité hydrolytique (triéthanolamine 75 mM, MgCl_2 5 mM pH 9 ou pH 6,4). L'alaméthicine est ajoutée à 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$. La réaction commence par l'addition d'ATP (5 mM). 75 μl d'échantillon sont prélevés toutes les 2 min (ou 6 min pour les souches *atp18Δ* et ρ^-) et ajoutés à 375 μl de tampon de quantification du phosphate (acide sulfurique 0,38 M, heptamolybdate d'ammonium tétrahydraté 5 μM , sulfate

de fer (II) heptahydraté 29 μM). L'échantillon est vortéxé avant d'être stocké dans la glace. La même expérimentation a été réalisée après une incubation de 2 min avec de l'olygomycine (19 $\mu\text{g/ml}$).

(2) A l'échelle des mitochondries isolées

La mesure a été déterminée à 28°C sous agitation à 750 rpm dans une cuve d'Oroboros. 0,035 mg de mitochondries sont ajoutés à 2 ml de tampon d'activité hydrolytique (triéthanolamine 75 mM, MgCl_2 5 mM pH 9,0 ou pH 6,4). L'alaméthicine est ajoutée à 1 $\mu\text{g/ml}$. La réaction commence par l'addition d'ATP (5 mM). 150 μl d'échantillon sont prélevés toutes les 30 s et ajoutés à 750 μl de tampon de quantification du phosphate (acide sulfurique 0,38 M, heptamolybdate d'ammonium tétrahydraté 5 μM , sulfate de fer (II) heptahydraté 29 μM). L'échantillon est vortéxé avant d'être stocké dans la glace. La même expérimentation a été réalisée après une incubation de 2 min avec de triéthylétain (4 ng/ml).

3. Techniques de séparation des protéines par électrophorèse

e) Électrophorèse en condition native

L'électrophorèse en gel de polyacrylamide (PAGE) en condition native permet de séparer les complexes protéiques en fonction de leur taille et de leur encombrement stérique, en conservant les liaisons non covalentes. Les détergents non-ioniques (digitonine, dodécyl- β -D-maltoside ou glyco-diosgenin), permettent la solubilisation des complexes protéiques membranaires en conservant, selon le rapport mg détergent/mg protéine, leur structure multimérique, leur organisation supramoléculaire et leur activité enzymatique.

Il existe deux types de native PAGE. La condition « clear » (CN-PAGE) permet de faire migrer les protéines en fonction de leur charge négative endogène. La condition « blue » (BN-PAGE) permet, grâce à l'ajout d'un tampon additif bleu dans le tampon de migration, de charger négativement sans dénaturer les protéines qui ne présentent pas de charge endogène suffisante pour la migration.

(1) Préparation des échantillons

100 ou 200 μg d'extrait protéique sont ajoutés à un volume de tampon d'extraction (10 mM de Bis-Tris, 1 mM d'EDTA et un mélange d'inhibiteurs de protéase Complete EDTA-free™,

Roche®, pH 6,4) pour une concentration finale protéique souhaitée. De la nucléase (0,0125 kU/μl) et de la digitonine de haute pureté avec un ratio de 1,5 g digitonine par g de protéine sont ajoutées (ou 0,5 à 6 g/g pour la gamme de digitonine). Les membranes sont solubilisées en vortexant pendant 30 min à 4°C. L'échantillon est ensuite incubé à température ambiante pendant 10 min pour une meilleure activité de la nucléase. Les protéines solubilisées sont récupérées dans le surnageant après une centrifugation à 30 000xg pendant 30 min à 4°C. Le tampon de charge est ajouté à l'échantillon à 1X final. Sa composition varie selon la technique. En CN-PAGE, il contient de l'acide 6-aminohexanoïque (0,15 M) et en BN-PAGE il contient de l'acide 6-aminohexanoïque (0,15 M), un colorant bleu brillant de Coomassie G-250 (0,0125 % (p/v)) et du glycérol (20 % (p/v)).

(2) Conditions de migration

Les protéines sont chargées sur un gel Bis-Tris Invitrogen™ Novex™ NativePAGE™ gradient d'acrylamide 3-12% dont les puits sont préalablement nettoyés à l'aide d'une pipette. Pour le BN-PAGE du tampon additif cathodique bleu NativePAGE™ est ajouté à 1X final dans du tampon de migration NativePAGE™. Le gel migre à 10 mA pendant environ 3h à 4°C avec un maximum de voltage à 300 V. Aux trois quarts de la migration, le tampon de migration BN-PAGE est retiré et remplacé par un tampon de migration clair pour éliminer la coloration bleue du gel qui peut gêner les révélations par activité « in gel » par la suite.

(3) Détection des protéines par activité enzymatique dans le gel

Les complexes protéiques séparés par BN ou CN-PAGE sont détectés grâce à leur activité enzymatique dans le gel. Deux molécules, l'iodonitrotétrazolium (INT) et le 3,3'-diaminobenzidine (DAB), forment un précipité coloré lorsqu'elles sont réduites par l'activité enzymatique des complexes protéiques.

(a) *Activité de la déshydrogénase*

Pour révéler les déshydrogénases, le gel natif est incubé avec un tampon d'activité contenant du KH₂PO₄ (50 mM, pH 7,4) et de l'INT (0,5 mg/ml). Le tampon a été complété par l'ajout de NADH (400 μM), de succinate (50 mM) ou de G3P (50 mM) pour révéler respectivement l'activité des NADH déshydrogénases, des succinates déshydrogénases ou des G3P déshydrogénases. Les bandes rouges qui apparaissent correspondent à l'INT réduit traduisant la présence de déshydrogénases.

(b) Activité de la cytochrome c oxydase

La révélation de la cytochrome c oxydase est réalisée en incubant le gel natif dans le tampon suivant : KH_2PO_4 (50 mM, pH 7,4), DAB (0,5 mg/ml) et cytochrome c de cœur de boeuf (1 mg/ml). Les bandes marron qui apparaissent correspondent au DAB réduit traduisant la présence de la cytochrome c oxydase.

(c) Activité de l'ATP synthase

Pour révéler l'ATP synthase, le gel natif est incubé dans le tampon suivant : glycine (50 mM), acétate de plomb (1,32 mM), Triton X100 (0,1 % p/v). Au dernier moment du MgSO_4 (5 mM) et de l'ATP (4 mM, pH 7) sont ajoutés au tampon avant d'ajuster le pH à 9. Le Pi produit par l'activité hydrolytique de l'ATP synthase précipite avec l'acétate de plomb. Les bandes de précipité peuvent être fixées en incubant le gel natif dans une solution d'éthanol 30%. Le précipité est éliminé avec quelques gouttes d'acide chlorhydrique avant de colorer les protéines dans le gel avec la solution colorante suivante : bleu de Coomassie 0,125% (p/v), éthanol 50% (v/v), acide acétique 10% (v/v). Après 45 min d'incubation, le gel a été décoloré avec une solution composée d'éthanol 25% (v/v) et d'acide acétique 8% (v/v).

Les gels ont été enregistrés après révélation de l'activité « in gel » par densitométrie optique à l'aide d'un ImageQuant (Amersham®).

f) Électrophorèse en condition dénaturante

L'électrophorèse en conditions dénaturantes nécessite l'utilisation de détergents ioniques, tel que le dodécylsulfate de sodium (SDS), permettant de dénaturer et charger négativement les protéines afin de les séparer en fonction de leur taille.

(1) Électrophorèse unidimensionnelle

(a) Préparations des échantillons

Pour les analyses quantitatives par Western-blot, 50 ug d'extraits de protéines sont solubilisés avec un tampon RIPA (NaCl 150 mM, Tris-base 25 mM, NP40 1% p/v, SDS 1% p/v, désoxycholate 0,25% p/v et EGTA 1 mM, pH 8,0). Un volume de tampon d'extraction (Bis-Tris 10 mM, EDTA 1 mM, et un mélange d'inhibiteurs de protéases Complete avec EDTA Roche®, pH 6,4) est ajouté pour ajuster la concentration finale en protéine. Les protéines sont solubilisées en vortexant 30 min à 4°C. La solution de bleu de charge (Tris 0,3 M, glycérol 50%

p/v, thioglycérol 30% v/v, SDS 10% p/v, bleu de bromophénol 0,05% p/v, pH 6,8) est ajoutée aux échantillons avant une incubation à 75°C pendant 5 min.

(b) Réalisation du gel d'acrylamide

Pour séparer les petites protéines telles que IF1 et STF1, un gel Schägger a été réalisé (Schägger and von Jagow, 1987). Le gel de concentration et le gel de séparation se composent tous deux du tampon gel (Tris-HCl 1 M, SDS 0,1% w/v, pH 8,5), de l'APS 0,033 % (p/v) et du TEMED 0,033 % (v/v). Leur composition se différencie en pourcentage d'acrylamide, avec 3,8% (v/v) d'acrylamide/bisacrylamide (29:1) pour le gel de concentration et 15% (v/v) pour le gel de séparation. La particularité du gel Schägger est la présence de glycérol (13 % p/v) dans le gel de séparation.

(c) Condition de migration

Les protéines et un marqueur de taille PageRuler™ Plus (10 à 250 kDa) sont chargés sur le gel d'acrylamide. Le tampon cathodique est composé de Tris base 0,1 M, Tricine 0,1 M, SDS 0,1% (w/v), pH 8,2 et le tampon anodique de Tris base 20 mM, pH 8,9. La migration est effectuée à 100V constants pendant environ 2h15.

(2) Électrophorèse bidimensionnelle

L'électrophorèse bidimensionnelle (2D-BN ou CN/SDS-PAGE) permet de séparer les composantes d'un complexe multiprotéique. Les complexes multiprotéiques sont séparés par une première électrophorèse en condition native (Figure 27). La seconde électrophorèse dénaturante se fait dans un sens perpendiculaire à la première électrophorèse (Figure 27).

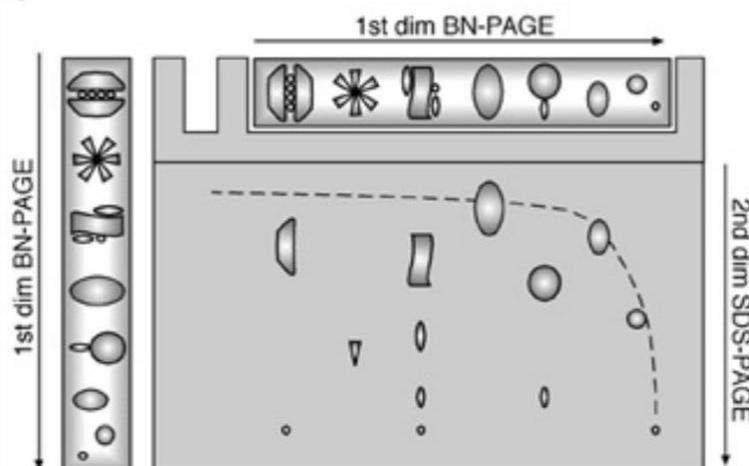


Figure 27 : Illustration du principe de l'électrophorèse bidimensionnelle (issue de (Fiala et al., 2011)).

Pour l'électrophorèse bidimensionnelle (2D-BN ou CN/SDS-PAGE), la bande obtenue en 1D native PAGE est incubée dans une première solution contenant du SDS 1% (v/v) et β -mercaptoéthanol 1% (v/v) pH 6,4, et dans une seconde solution contenant SDS 1% (v/v) pH 6,4, chaque bain durant 15 min. La bande 1D est insérée dans un gel Bis-Tris Invitrogen™ Novex™ NuPAGE™ gradient d'acrylamide 4-12%. Une solution d'acrylamide 3,8% est coulée sur la bande 1D. Un marqueur de taille PageRuler™ Plus (10 à 250 kDa) est chargé sur le gel. Le tampon de migration MES (Acide 2-morpholino éthanesulfonique monohydraté) Novex™ est utilisé car il permet de séparer les très petites protéines. La migration est réalisée à 100 V constants pendant 1h30 environ.

g) Détection des protéines par immunoblot

(1) Conditions de transferts

Les protéines sont transférées sur une membrane de nitrocellulose (0,2 μ m) Protran Premium (Amersham®). La membrane est colorée avec une solution de ponceau (2 mg/ml avec de l'acide acétique 31% (v/v)) et enregistrée par Gel documentation (Amersham®). La membrane est ensuite bloquée avec une solution de lait écrémé 5% (p/v) diluée dans un tampon PBS (NaH_2PO_4 10 mM, NaCl 0,14 M, Tween-20 0,1 % w/v, pH 7,2). La membrane est parfois découpée afin d'incuber simultanément avec différents anticorps, cela permet de diminuer les bandes aspécifiques et de gagner du temps.

(2) Western blot

Pour l'immunodétection, les membranes sont incubées avec un anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt puis incubée avec un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire. Après chaque incubation la membrane est lavée trois fois par des bains de tampon PBS de 10 min. L'anticorps secondaire est conjugué à une peroxydase de raifort (HRP). Le réactif Clarity ECL (Bio-Rad®) est déposé de façon homogène sur la membrane. Ce réactif, composé d'une solution basique de luminol et de H_2O_2 , est catalysé par la HRP permettant la production d'une molécule instable qui produit de la luminescence à 425 nm. Les signaux ont été enregistrés par chimiluminescence à l'aide d'un ImageQuant (Amersham®), puis le logiciel ImageJ a été utilisé pour l'analyse des profils densitométriques.

(3) Anticorps

Tous les anticorps primaires utilisés dans cette étude sont répertoriés dans le [Tableau 8](#).

Tableau 8 : Liste des anticorps primaires utilisés dans cette étude.

Protéine cible	Type d'anticorps	Hôte	Fournisseur et référence
Phosphoglycérate kinase 1 (PGK1)	Monoclonal	Souris	CiteAb 459250
Sous-unité COX2 (MTCO2)	Monoclonal	Souris	Thermo Fisher 12C4F12
Sous-unité β de l'ATP synthase	Polyclonal	Lapin	Dr. M.F. GIRAUD (Bordeaux, France)
Sous-unité α de l'ATP synthase			
Sous-unité γ de l'ATP synthase			
Sous-unité d de l'ATP synthase			
Sous-unité 4 de l'ATP synthase			
Sous-unité i/j de l'ATP synthase			
IF1			Dr. K. Tagawa (Osaka, Japan)
STF1			Produit pour cette étude par Isabelle Larrieu

Pour cette étude, l'anticorps primaire dirigé contre STF1 a été commandé auprès de la société Covalab®. Pour ce faire la protéine purifiée, produite par Isabelle Larrieu, a été envoyé

à la société. Le gène 6HIS-STF1 a été cloné dans le plasmide pIVEX2.3. La protéine résultante (MAGSHHHHDGPLGGAGPGNPQDIFIKRERAKEDYARQEREQLAHVKEQLKEHKKLENLENKINNLSK*) a été produite dans un système *in vitro*, tel que décrit dans (Schwarz et al., 2007), et purifiée par chromatographie d'affinité avec des billes de Ni-NTA-agarose (Qiagen, référence 30210). La protéine résultante, a permis à la société Covalab de produire des anticorps polyclonaux de lapin selon le protocole suivant : 3 injections (jour 0, 14 et 28) et sérum final prélevé au jour 67. Les anticorps secondaires utilisés sont conjugués à la peroxydase de raifort (Tableau 9).

Tableau 9 : Liste des anticorps secondaires conjugués à une HRP utilisés dans cette étude

Anticorps cible	Type d'anticorps	Hôte	Fournisseur et référence
Souris	IgG Cy5	Chèvre	GE Healthcare PA45009
Lapin	IgG Cy5	Chèvre	GE Healthcare PA45011

h) Expression et purification d'IF1 et de STF1 pour la quantification par Western blot

Les protéines pures d'IF1 et STF1 permettent de quantifier de façon relative les deux inhibiteurs en ramenant le signal luminescent à la quantité de protéine IF1 et STF1 connues. Les protéines pures d'IF1 et STF1 ont été produites *in vitro* par Marie-France Giraud.

L'IF1 a été exprimé et purifié comme mentionné dans (Corvest et al., 2007), sauf que le His-tag n'a pas été enlevé. Le gène STF1 a été amplifié par PCR en utilisant l'amorce 5'-CGCGCGATGGCTGCTCATCATCACGACGGTCCTCGTGTGTGCCGG-3' forward pour introduire un His-tag N-terminal et l'amorce 5'-CGCGCGATGGCTGCTCATCATCACGACGGTCCTCGTGTGTGTGCCGG-3' reverse. Le produit PCR, digéré par Nco1 et BamH1, a été inséré dans le vecteur pIVEX2.3, digéré avec les mêmes enzymes de restriction. La protéine a été produite dans un système d'expression acellulaire (Larrieu et al., 2017). Après 18h de production à 28°C, le mélange réactionnel a été centrifugé

(10 min, 12 000xg, 4°C) et le surnageant contenant STF1 a été dilué 10 fois et chargé sur une colonne Nickel NTA. La colonne a été lavée avec 25 CV de tampon de lavage 1 (150 mM NaCl, 10 mM imidazole, 20 mM Tris-HCl pH 8,0, contenant des inhibiteurs de protéases Pierce®) et 20 CV de tampon de lavage 2 (150 mM NaCl, 20 mM imidazole, 20 mM Tris-HCl pH 8,0) et éluée avec 4 CV de tampon d'élution (150 mM NaCl, 250 mM imidazole, 20 mM Tris-HCl pH 8,0 contenant des inhibiteurs de protéases Pierce®).

Un master mix contenant IF1 et STF1 (6,2 µg/ml) pures a été chargé sur un gel coloré au bleu de Coomassie afin de quantifier les deux inhibiteurs. Puis une gamme protéique du master mix a été réalisée par Western blot, afin de définir une quantité d'inhibiteurs proche de celle des extraits cellulaires pour ne pas saturer le signal. 100 ng de master mix IF1 et STF1 sont chargés par piste.

4. Quantification des métabolites : ATP, ADP et AMP

Avec l'aide du Dr Benoît Pinson, nous avons quantifié l'ATP, l'ADP et l'AMP cellulaire. Les cellules ont été cultivées pendant 12h avant d'ajouter le traitement CCCP à la culture à 1 DO. Après 1h de traitement, la taille et le nombre de cellules ont été définis à l'aide d'un instrument multisizer. 20 ml de culture ont été filtrés et pour arrêter toutes les réactions, le filtre a été rincé rapidement avec de l'eau distillée froide deux fois. Le filtre a été incubé avec un tampon d'extraction (HEPES 20 mM pH 7,2 dans de l'éthanol) à 80°C pendant 3 min. Lorsque le tampon a été complètement évaporé, l'extrait a été remis en suspension dans de l'eau. Les métabolites ont été identifiés et quantifiés par HPIC avec injection de 50 µL sur Carbopac PA1 (2*250 mm) avec un gradient d'acétate de sodium 50-800 mM dans NaOH 50 mM 30°C. L'absorbance a été enregistrée de 190 à 400 nm par le détecteur UV DAD 3000-RS. Les aires des métabolites ont été normalisées avec une gamme comme suit : 19,2 ATP, 16,8 ADP, 19,4 AMP en nmol/unité d'air de pic. Les charges énergétiques adényliques ont été calculées comme suit : $[(ATP+0,5*ADP)]/[(ATP+ADP+AMP)]$.

5. Analyses statistiques

Les données sont présentées sous forme de moyenne SEM. Le nombre d'échantillon et de répétitions expérimentales sont indiqués dans les figures. Les données ont été analysées à l'aide du logiciel Prism (GraphPad, San Diego, CA) en utilisant le test t de Student non apparié, l'ANOVA à une voie ou l'ANOVA à deux voies. Une valeur p de 0,05 a été considérée comme

statistiquement significative et les significativités sont représentées sur les figures de la manière suivante : * : $p < 0,05$; ** : $p < 0,01$ et *** : $p < 0,001$.

RESULTATS ET DISCUSSION

III. Résultats et discussion

A. Nouveau mécanisme d'IF1 empêchant l'hydrolyse de l'ATP par le sous-complexe de l'ATP synthase chez *Saccharomyces cerevisiae* (Lerouley *et al.*, 2024)



==REVIEW COMMONS MANUSCRIPT==

IMPORTANT:

- Manuscripts submitted to Review Commons are peer reviewed in a journal-agnostic way.
- Upon transfer of the peer reviewed preprint to a journal, the referee reports will be available in full to the handling editor.
- The identity of the referees will NOT be communicated to the authors unless the reviewers choose to sign their report.
- The identity of the referee will be confidentially disclosed to any affiliate journals to which the manuscript is transferred.

GUIDELINES:

- For reviewers: <https://www.reviewcommons.org/reviewers>
- For authors: <https://www.reviewcommons.org/authors>

CONTACT:

The Review Commons office can be contacted directly at: office@reviewcommons.org

Novel If1 mechanism preventing ATP hydrolysis by the ATP synthase subcomplex in *Saccharomyces cerevisiae*.

Orane Lerouley¹, Isabelle Larrieu¹, Tom Louis Ducrocq¹, Benoît Pinson^{1,2}, Marie-France Giraud³ and Arnaud Mourier^{1*}

¹ University of Bordeaux, CNRS, IBGC, UMR 5095, 33000 Bordeaux, France.

² Metabolic Analyses Service, TBMCore-Université de Bordeaux-CNRS UAR 3427-INSERM US005, Bordeaux, France.

³ Univ. Bordeaux, CNRS, Bordeaux INP, CBMN, UMR 5248, F-33600 Pessac, France

Orane Lerouley 0009-0000-2514-0964
Benoît Pinson 0000-0003-2936-9058
Tom Louis Ducrocq 0009-0009-6148-4057
Marie-France Giraud. 0000-0002-6238-667X
Arnaud Mourier 0000-0002-5413-611X

* For correspondence

Arnaud Mourier
1, rue Camille Saint-Saëns
33077 Bordeaux
arnaud.mourier@ibgc.cnrs.fr

1 **Abstract**

2 The mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase is crucial for maintaining the ATP/ADP
3 balance which is critical for cell metabolism, ion homeostasis, cell division, proliferation
4 and motility. This enzyme, conserved across evolution, is found in the mitochondria or
5 chloroplasts of eukaryotic cells and the plasma membrane of bacteria. *In vitro* studies have
6 shown that the mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase is reversible, capable of hydrolyzing
7 instead of synthesizing ATP. *In vivo*, its reversibility is inhibited by the endogenous peptide
8 If1 (Inhibitory Factor 1), which specifically prevents ATP hydrolysis in a pH-dependent
9 manner. Despite its presumed importance, the loss of If1 in various model organisms does
10 not cause severe phenotypes, suggesting its role may be confined to specific stress or
11 metabolic conditions yet to be discovered. In this study, we explored the structural and
12 physiological importances of If1 inhibitory peptides in *Saccharomyces cerevisiae*. Our
13 analyses indicate that inhibitory peptides are crucial in mitigating metabolic adverse
14 outcomes caused by mitochondrial depolarizing stress under glyco-oxidative metabolic
15 conditions. Under glyco-oxidative metabolic state, the energy maintenance relies both on
16 glycolysis and oxidative phosphorylation. Additionally, we found that the absence of If1
17 destabilizes the nuclear-encoded free F_1 subcomplex. This novel mechanism of action
18 highlights the role of If1 in preventing harmful ATP wastage, offering new insights into its
19 function under physiological and pathological conditions.

20

21 Introduction

22 The mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase is among the most advanced molecular enzymatic
23 nanomachines in the living world. This enzyme is highly evolutionary conserved (Sinha and
24 Wideman, 2023), and ubiquitous in the mitochondria or chloroplasts of eukaryotic cells, as
25 well as in the plasma membrane of bacteria (Lau et al., 2008; Hahn et al., 2018; Gu et al.,
26 2019; Pinke et al., 2020; Yang et al., 2020; Courbon and Rubinstein, 2022). This
27 multisubunit enzyme is a cornerstone of the oxidative phosphorylation system (OXPHOS)
28 as it transduces the proton electrochemical gradient ($\Delta\mu H^+$) generated by the respiratory
29 chain, to synthesize ATP from ADP and inorganic phosphate (Mitchell, 1961; Boyer et al.,
30 1973; Stock et al., 1999; Watt et al., 2010). In *Saccharomyces cerevisiae*, this 600 kDa
31 enzyme comprises a catalytic domain F_1 ($\alpha_3\beta_3\gamma_1\delta_1\epsilon_1$) and a F_0 region, divided into a
32 membranous rotor (subunit (su) 9_{10} -ring) and a peripheral stalk (su 4, su 6, su 8, su f,
33 OSCP, su d, su h, su i/j) that connects the catalytic head to the rotor ring. Three additional
34 subunits, su e, su g and su k are involved in enzyme dimerization. Proton translocation
35 across two hemi-channels at the interface of su 6 and the membranous ring induces ring
36 rotation, that triggers the rotation of a central stalk (γ, δ, ϵ) inside the two catalytic subunits
37 (α and β), enabling conformational changes required for ATP synthesis. The eukaryotic
38 F_1F_0 -ATP synthases are composed of 17 different subunits, encoded by the nuclear
39 (nDNA) or mitochondrial genome (mtDNA) (Senior, 1988; Kühlbrandt, 2019). The dual
40 genetic origin of the F_1F_0 -ATP synthase implies that gene expression from both genomes
41 must be tightly coordinated to ensure proper biogenesis and assembly of the enzyme.
42 Nevertheless, in cells presenting defective mitochondrial genome levels and expression or
43 impaired ATP synthase assembly, F_1 is commonly found assembled as a stable
44 subcomplex capable of ATP hydrolysis (Tzagoloff, 1969; Carrozzo et al., 2006; Wittig et
45 al., 2010). The F_1F_0 -ATP synthase, along with glycolysis and other pathways that allow
46 substrate-level phosphorylation, is critical in maintaining the ATP/ADP balance, which is
47 required for cell metabolism, ion homeostasis, cell division, proliferation and motility. In
48 multicellular organisms, mitochondrial ATP synthesis is finely adjusted to sustain
49 specialized functions of differentiated cells, and in humans, defective OXPHOS-driven
50 ATP synthesis causes multiple and severe diseases frequently affecting high-energy
51 demanding tissues such as cardiac and skeletal muscles, as well as the nervous system
52 (Galber et al., 2021).

53 Interestingly, the mitochondrial F_1F_0 -ATP synthase is fully reversible and *in vitro*
54 experiments performed on purified enzymes or functional mitochondria demonstrated that
55 ATP hydrolysis could be coupled to proton translocation, generating a proton

56 electrochemical potential across the inner mitochondrial membrane (Boyer et al., 1973;
57 Pietrobon et al., 1983; Mourier et al., 2010). However, the reversibility of the F_1F_0 -ATP
58 synthase is, under physiological conditions, prevented by the membrane potential
59 generated by the respiratory chain and is only observed when the respiratory chain is
60 blocked (chemical inhibitor or anoxia), or when the proton electrochemical membrane
61 potential is abolished. The reversibility of the F_1F_0 -ATP synthase is also regulated by a
62 nuclear encoded inhibitory peptide, so called inhibitory factor 1 (If1), which can physically
63 interact and inhibit the F_1 catalytic domain (Pullman and Monroy, 1963). Since its
64 discovery, homologs of If1 were found and characterized in other species (Cintrón and
65 Pedersen, 1979; Hashimoto et al., 1981; Matsubara et al., 1981; Norling et al., 1990;
66 Ichikawa and Ogura, 2003). The If1 amino acid sequences are well conserved across
67 evolution, and for yet unclear reasons, two homologous inhibitory peptides, namely If1 and
68 Stf1 (Stabilizing Factor 1), presenting redundant activity were identified in *S. cerevisiae*
69 (Hashimoto et al., 1987; Cabezon et al., 2002; Venard et al., 2003). If1 and Stf1 proteins
70 are encoded respectively by *INH1* and *STF1* nuclear gene in *S. cerevisiae*. An important
71 wealth of experiments on independent eukaryote models have contributed to characterize
72 the mechanism of action (Pullman and Monroy, 1963; Hashimoto et al., 1981, 1984;
73 Cabezon et al., 2000, 2002; Venard et al., 2003), as well as the structural interaction of
74 these peptide inhibitors with the F_1F_0 -ATP synthase (Cabezón et al., 2001; Robinson et al.,
75 2013; Boreikaite et al., 2019; Gu et al., 2019; Mühleip et al., 2021; Romero-Carramiñana
76 et al., 2023). One of the most remarkable and evolutionary conserved features of If1
77 inhibition is its regulation by pH, being optimal under neutral or slightly acidic pH conditions
78 and inactive at pH above 8.0 (Pullman and Monroy, 1963; Hashimoto et al., 1987). The
79 pH-dependent If1 inhibition of F_1F_0 -ATP synthase strikingly aligns and supports its
80 function, potentiating its capacity to prevent ATP hydrolysis under depolarization when the
81 Δ pH is abolished. Interestingly, the importance of If1 under genetic or chemical stress
82 preventing maintenance of the membrane potential by the respiratory chain has been
83 confirmed in various model organisms (Buchet and Godinot, 1998; Rouslin and Broge,
84 1996; Sgarbi et al., 2018; Venard et al., 2003).

85 The Cryo-EM structures of oligomeric F_1F_0 -ATP synthases demonstrated that If1 dimers,
86 could bridge adjacent F_1F_0 -ATP synthase dimers, suggesting that If1 could stabilize
87 oligomers (Cabezón et al., 2000; Pinke et al., 2020; Gu et al., 2019). Functional
88 investigations in mammalian cells and mouse models supported the idea that If1 regulates
89 F_1F_0 -ATP synthase oligomerization (Domínguez-Zorita et al., 2023) and even suggested
90 that If1 could also regulate ATP synthesis (García-Bermúdez et al., 2015; Sánchez-Cenizo
91 et al., 2010). However, the role of If1 in controlling F_1F_0 -ATP synthase oligomerization and

92 ATP synthesis activity remains debated and needs to be confirmed in other model
93 organisms (Dienhart et al., 2002; Lucero et al., 2021; Gatto et al., 2022; Carroll et al.,
94 2024; Galkina et al., 2022). The current controversy over the role of If1 in energy
95 metabolism partly arises from the lack of methods to monitor, *in vivo*, ATP hydrolysis by
96 the mitochondrial ATP synthase operating in reverse. Furthermore, the absence of major
97 phenotypes associated with If1 loss in many organisms suggests that its action may be
98 limited to specific stress or metabolic conditions that remain to be discovered (Ichikawa et
99 al., 1990; Nakamura et al., 2013; Fernández-Cárdenas et al., 2017).

100 The goal of our study was to clarify the structural and physiological roles of
101 inhibitory peptide If1/STF1 in the yeast *S. cerevisiae*. Our analyses demonstrate that the
102 If1/Stf1 activity is dispensable to sustain the growth of yeast under 'respiro-fermentative' or
103 'respiratory strict' carbon sources. However, we observed that inhibitory peptides are key
104 in sustaining growth of yeast subjected to mitochondrial depolarizing stress under glyco-
105 oxidative metabolic conditions. We also hereby demonstrate that loss of inhibitory peptides
106 does not impact high supramolecular organization of the yeast F₁F₀-ATP synthase but
107 surprisingly destabilizes the free F₁ subcomplex. This discovery prompted us to revisit the
108 role of the free F₁ subcomplex to sustain the ability for *S. cerevisiae* to grow in total or
109 partial absence of mitochondrial genome ($\rho^{-/o}$).

110 **Results**

111 **If1/Stf1 inhibitors are required to maintain the ATP synthase free F₁ subcomplex.**

112 Independent works have previously established that *S. cerevisiae* expresses two F₁F₀-ATP
113 synthase inhibitory peptides named If1 and Stf1, respectively encoded by the genes *INH1*
114 and *STF1* (Ichikawa et al., 1990; Hashimoto et al., 1990). Therefore, to investigate the role
115 of F₁F₀-ATP synthase endogenous inhibitory peptides on yeast energy producing system
116 and metabolism, we generated an *inh1Δ stf1Δ* double knockout strain. The complete loss
117 of If1 and Stf1 was validated by Western blot analyses performed on total protein extracts
118 from yeast harvested during exponential growth on non-fermentable carbon source
119 (glycerol 2%) (Figure 1A). We observed that the individual or combined loss of the peptide
120 inhibitors did not affect the growth on respiratory strict carbon sources such as lactate
121 (2%) (Figure 1B). This unaltered growth on lactate carbon source, which depends on
122 mitochondrial OXPHOS content and activity (Devin et al., 2006), suggested that the loss of
123 If1 and Stf1 did not strongly affect OXPHOS capacities under physiological conditions. We
124 then performed classical native polyacrylamide gel electrophoresis (PAGE) to characterize
125 the supramolecular assembly of the F₁F₀-ATP synthase in *inh1Δ stf1Δ* purified
126 mitochondria (Figure 1C). The in-gel ATPase activity demonstrated that, in line with

127 previous reports (Dienhart et al., 2002), the F₁F₀-ATP synthase monomers (V) and dimers
128 were unchanged in *inh1Δ stf1Δ*. Interestingly, our native PAGE experiments demonstrate
129 that levels of higher F₁F₀-ATP synthase oligomers were not impacted by the combined
130 loss of both If1 and Stf1 (Figure 1C). However, in contrast to the F₁F₀-ATP synthase
131 oligomers, we noticed that the free F₁ subcomplex level was almost undetectable in *inh1Δ*
132 *stf1Δ*. The free F₁ subcomplex used to be frequently interpreted as a degradation or
133 destabilization byproduct of the F₁F₀-ATP synthase monomers or dimers, potentially
134 occurring during mitochondrial isolation or detergent solubilization. To minimize the risk of
135 degradation, we decided to characterize the F₁F₀-ATP synthase supramolecular
136 organization on total soluble protein extract bypassing potential mitochondrial degradation
137 inherent to the fastidious mitochondrial isolation procedure. Despite dampening the
138 resolution and characterization of high molecular weight complexes, blue native PAGE
139 (BN-PAGE) performed on total cell extracts confirmed that free F₁ subcomplex was
140 present in control yeast but lost in *inh1Δ stf1Δ* (Figure 1D). Intriguingly, in contrast to the
141 F₁F₀-ATP synthase monomers and oligomers levels, the free F₁ subcomplex was clearly
142 detected in WT under BN-PAGE and hardly visible under clear native PAGE (CN-PAGE)
143 conditions. This observation prompted us to determine if the free F₁ subcomplex observed
144 in BN-PAGE could result from (i) the potential impact of the Coomassie brilliant blue on
145 destabilization of the fully assembled complexes (V and oligomers) or (ii) the fact that
146 migration of the free F₁ relies on its binding to the charged Coomassie dye. To this end we
147 performed CN or BN-PAGE to characterize the F₁F₀-ATP synthase assemblies present in
148 digitonin solubilized proteins in (i) total cell extracts, (ii) total cell membrane extracts and
149 (iii) total cell soluble fraction (Figure 1E). As expected, the membrane and soluble
150 fractionation could efficiently separate the membrane-anchored fully assembled ATP
151 synthase from the membrane-free F₁ subcomplex, confirming that the free F₁ subcomplex
152 is a soluble entity. Moreover, the absence of the free F₁ subcomplex in the solubilized
153 membrane extracts demonstrated that this subcomplex is not a destabilization byproduct
154 of the fully assembled ATP synthase post solubilization. Our conclusion, supporting that
155 free F₁ subcomplex is not a destabilization byproduct was strengthened by the titration of
156 the ratio between digitonin and mitochondrial protein (Figure S1A and B). We observed
157 that the progressive increase in digitonin to protein ratio gradually destabilized oligomers,
158 but did not impact the levels of free F₁ subcomplex detected in WT or in *inh1Δ stf1Δ*.
159 Consequently, the faint level of free F₁ observed in all extracts subjected to CN-PAGE
160 suggested that the migration of the soluble free F₁ subcomplex is heavily conditioned by
161 the Coomassie-conferred charge (Figure 1E). In line with the result obtained previously
162 (Figure 1D-F), BN-PAGE analysis of total protein showed that the F₁ subcomplex level

163 was more severely reduced in *inh1*Δ than in *stf1*Δ, and was hardly detected in *inh1*Δ *stf1*Δ
164 (Figure 1D-F). Altogether, our analyses clearly indicate that the amounts of free soluble F₁
165 subcomplex rely on If1 and to a lower extent on Stf1.

166

167 **If1 binds and inhibits ATP synthase oligomers, monomers and free F₁ subcomplex.**

168 The intriguing interdependency between If1/Stf1 and free F₁ subcomplex prompted us to
169 further investigate the interplay between these factors. First, to gain structural insights into
170 the interaction between If1 and the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase, we performed two-
171 dimensional electrophoresis *i.e* BN-PAGE followed by a second dimensional gel,
172 denaturing SDS-PAGE (Figure 2A). The Western blot experiments confirmed that the
173 entities identified so far through their in-gel ATPase activities (Figure 1C-F), were indeed
174 the mitochondrial F₁F₀-ATP synthase complexes and subcomplexes (Figure 2A) and
175 confirmed the drastic loss of free F₁ in *inh1*Δ *stf1*Δ. Beyond some specific F₁F₀-ATP
176 synthase subunits, we also managed to localize If1 proteins and confirmed that If1
177 physically interacts with the different F₁F₀-ATP synthase assemblies (Figure 2A and B).
178 Interestingly, the densitometric signal quantification demonstrated that If1 exhibits an even
179 binding capacity toward the different F₁F₀-ATP synthase assemblies (Figure 2B). However,
180 we could not detect or visualize Stf1 in the second dimension. The previously reported
181 lower binding efficiency and affinity of Stf1 for F₁F₀-ATP synthase compared to If1 (Venard
182 et al., 2003), could likely explain the undetectable level of Stf1 following the digitonin
183 extraction and BN-PAGE procedures. Next, we functionally characterized the interplay
184 between If1/Stf1 and F₁F₀-ATP synthase assemblies on non-solubilized samples (Figure
185 2C-E). The ATP hydrolysis flux measurement performed on total yeast protein extracts
186 confirmed that the pH-dependent inhibition of the ATPase activity was completely
187 abolished in *inh1*Δ *stf1*Δ (Figure 2C). Furthermore, our analyses demonstrated that the
188 oligomycin-sensitive ATPase activity, associated with fully assembled F₁F₀-ATP synthase,
189 assessed in WT and *inh1*Δ *stf1*Δ samples were identical (Figure 2D). In contrast, the
190 oligomycin-insensitive ATPase activity, mainly related to free F₁ subcomplex, was
191 drastically reduced in the *inh1*Δ *stf1*Δ strain (Figure 2D). The complete oligomycin
192 insensitivity of the ATP hydrolysis activity assessed in the soluble fraction (Figure 2E),
193 containing exclusively free F₁ subcomplexes (Figure 1E), confirmed that the oligomycin-
194 resistance was inherent to free F₁ subcomplexes. Interestingly, the oligomycin-resistant
195 ATPase activity of free F₁ subcomplexes was fully inhibited by If1/Stf1 through their
196 characteristic pH-dependent inhibition (Figure 2E), confirming their capacity to physically
197 and functionally interact (Figure 2A and B). This functional characterization nicely
198 corroborates the structural observation showing that WT and *inh1*Δ *stf1*Δ present similar

199 levels of F₁F₀-ATP synthase monomers and oligomers (Figure 1C and D). Altogether,
200 native PAGE (Figure 1C-F and Figure 2 A-B) and functional analyses (Figure 2D and E)
201 demonstrate that the oligomycin-insensitive free F₁ subcomplex is severely reduce in
202 *inh1Δ stf1Δ*.

203

204 **If1/Stf1 are specifically involved in free F₁ subcomplex stabilization**

205 To further investigate the interplay between the inhibitory peptides If1/Stf1 and the free F₁
206 subcomplex, we decided to evaluate the stability of the different F₁F₀-ATP synthase
207 assemblies in the *inh1Δ stf1Δ* strain. To this end, we characterized the fate of the different
208 ATP synthase assemblies in WT and *inh1Δ stf1Δ* strains grown in complete medium
209 containing glycerol (2%) and subjected to a cycloheximide treatment inhibiting cytosolic
210 translation (Buchanan et al., 2016). This experiment clearly showed that a 90-minute
211 treatment did not affect the steady state levels of the inhibitory peptides If1/Stf1 but
212 severely affected, with distinct kinetics, the levels of F₁F₀-ATP synthase assemblies
213 (Figure 3A and B). Interestingly, the destabilization profile of F₁F₀-ATP synthase
214 monomers and oligomers in *inh1Δ stf1Δ* was comparable to WT, and the loss of these
215 different entities was not followed by any detectable increase in the free F₁ subcomplex
216 level. To further investigate the importance of If1/Stf1 and free F₁ subcomplex interplay,
217 we decided to investigate how loss of If1 impacts the phenotype of the *atp18Δ* strain
218 lacking the F₁F₀-ATP synthase subunit i/j. This strain was previously characterized and
219 presents a perturbed assembly and fragilized supramolecular organization of the F₁F₀-ATP
220 synthase associated with a profound deficiency in enzyme activity. Loss of subunit i/j was
221 also associated with an increased free F₁ subcomplex and oligomycin-insensitive activity
222 (Vaillier et al., 1999; Wagner et al., 2010). The CN and BN-PAGE performed on the
223 solubilized ATP synthase from total protein cell extracts of the *atp18Δ* mutant confirmed
224 previous observations demonstrating that the levels of F₁F₀-ATP synthase oligomers were
225 severely destabilized whereas the levels of free F₁ subcomplex were strongly increased
226 (Figure 3C). Interestingly, in contrast to the loss of *stf1*, loss of *If1* in the *atp18Δ* strain
227 affected drastically the level of the free F₁ subcomplex without affecting the levels of the
228 monomeric F₁F₀-ATP synthase (Figure 3C, D and E). The predominant role of *If1* on F₁F₀-
229 ATP synthase stability compared to *Stf1* was also observed on purified mitochondria
230 where we confirmed that the isolated loss of *If1* was sufficient to almost completely abolish
231 the pH-dependent inhibition of F₁F₀-ATP synthase (Figure S3A). As expected, F₁F₀-ATP
232 synthase dimers deficiency drastically impaired *atp18Δ* growth on medium containing
233 glycerol (2%) a non-fermentable carbon source (Figure 3F). Interestingly, the combined
234 loss of the inhibitory peptides, which drastically reduced the level of the free F₁

235 subcomplex, severely hampered the growth of *atp18Δ* mutant on glycerol (Figure 3F and
236 G).

237

238 **If1/Stf1 mitigate the impact of mitochondrial depolarizing stress on glycerol**
239 **medium.**

240 To further evaluate the metabolic importance of If1/Stf1, we took advantage of the great
241 metabolic flexibility of *S. cerevisiae* and characterized the phenotype of the *inh1Δ stf1Δ*
242 strain grown under various carbon sources. To this end, we compared different carbon
243 sources promoting respiro-fermentative (glucose 0.5% or galactose 2%) and non-
244 fermentative conditions (glycerol 2% or lactate 2%). The respective capacity to metabolize
245 these carbon sources and produce biomass were assessed using drop tests and growth
246 curves (Figures 4A and B). In parallel, the cellular respiration of yeast grown on different
247 carbon sources was recorded using high-resolution respirometer O2K oxygraph under
248 endogenous conditions; or in presence of ethanol alleviating potential kinetic controls
249 under endogenous, non-phosphorylating (triethyltin (TET)) and uncoupled (CCCP titration)
250 states (Figure 4C). These combined approaches assessing the growth of the *inh1Δ stf1Δ*
251 strain in various metabolic conditions demonstrated that the loss of the inhibitory peptides
252 did not affect growth (Figure 4 A and B). The cellular respiration assessed during
253 exponential phase demonstrated that OXPHOS capacities are strongly adjusted in
254 response to the carbon sources. As expected, the overall respiration rates as well as the
255 part of the respiration devoted to ATP synthesis (respiration loss in response to triethyltin),
256 were low in the highly glycolytic glucose medium, intermediate in galactose and glycerol
257 and high in the highly oxidative lactate medium. Interestingly, the *inh1Δ stf1Δ* strain grown
258 under galactose, glycerol or lactate, consistently exhibited a significantly higher respiration
259 compared to the WT strain. These results indicate that the combined loss of If1/Stf1 is
260 linked to an increased OXPHOS activity (Figure 4C).

261 The enhanced OXPHOS activity of the *inh1Δ stf1Δ* strain prompted us to evaluate its
262 capacity to respond to OXPHOS uncoupling stress induced by the mitochondrial
263 depolarizing agent CCCP. To this end, yeast cultures were supplemented with the minimal
264 CCCP concentration abolishing cellular respiration responses to triethyltin or CCCP
265 validating that mitochondria are fully uncoupled (Figure 4C). The CCCP treatment did not
266 affect the growth of the *inh1Δ stf1Δ* or WT strains under fermentable carbon sources as
267 glucose (0.5%) or galactose (2%) (Figure 4A and B). However, the CCCP treatment
268 differentially impacted the growth of the two strains under non fermentable carbon sources
269 *i.e.* glycerol (2%) or lactate (2%) (Figure 4A and B). The mitochondrial uncoupling stress,
270 under lactate (2%) medium, almost completely prevented the growth of both strains

271 (Figure 4A and B) causing severe deficiency of cellular respiration (Figure 4C). In contrast,
272 the *inh1Δ stf1Δ* and WT strains cultivated under glycerol (2%) strongly differ in their ability
273 to tolerate the uncoupling stress (Figure 4A and B). Our analyses clearly demonstrate that
274 the If1/Stf1 inhibitors are essential to mitigate the impact of OXPHOS uncoupling stress on
275 cell growth (Figure 4A, B and S4A) and respiration (Figure 4C).

276

277 **Glycerol is a glyco-oxidative metabolic condition where the energy balance relies on**
278 **ATP production from both glycolysis and OXPHOS.**

279 To further investigate the If1/Stf1 mediated mechanism involved in the OXPHOS
280 uncoupling stress response, we first quantified If1 and Stf1 levels in different growth
281 conditions. Western blot analyses performed on total protein extracts from WT yeast
282 grown under various carbon sources demonstrated that the levels of both If1 and Stf1
283 normalized to the F_1F_0 -ATP synthase subunit β , were almost doubled under the different
284 non-fermentable conditions compared to glucose or galactose conditions (Figure 5A and
285 B). Our results also showed that the increased levels of both inhibitors in glycerol and
286 lactate were not associated with specific changes in the free F_1 subcomplex (Figure S5A).
287 Also, the levels of If1 and Stf1 were not impacted during the OXPHOS uncoupling stress
288 (Figure S5B). The uniform expression of If1 and Stf1 under lactate and glycerol conditions
289 indicated that the WT strain's resistance toward uncoupling stress in glycerol media was
290 not merely due to changes in If1/Stf1 expression levels (Figure 5A and B). We then
291 decided to challenge the assumed metabolic homogeneity between glycerol or lactate
292 conditions, commonly defined as non-fermentable carbon sources relying on OXPHOS
293 activity. To determine the dependency of energy toward the OXPHOS or glycolytic
294 produced ATP, we followed the growth of genetically engineered yeast mutants presenting
295 altered glycolysis or OXPHOS driven ATP production (Figure 5C). The previously
296 generated and characterized mutant yeast strains *cdc19Δ* and *atp18Δ* (Sprague, 1977;
297 Vaillier et al., 1999), respectively suppressed of pyruvate kinase 1 and subunit i/j of ATP
298 synthase protein. This mutants were selected to decipher the growth dependency toward
299 these different energy producing pathways. The drop test analyses performed with these 2
300 strains (Figure 5C) and other mutants abolishing the ATP synthase assembly and activity
301 (Figure S5C-F), nicely confirmed that the growth on glucose or galactose media almost
302 exclusively relied on the glycolysis-driven ATP production (insensitive to OXPHOS ATP
303 production defects). Conversely, the growth on lactate medium almost exclusively relied
304 on the OXPHOS-driven ATP production (insensitive to defective glycolytic ATP production)
305 (Figure 5C and S5C-E). However, the drop test experiment unexpectedly demonstrated
306 that the growth on glycerol medium is hindered either by defects in OXPHOS or glycolysis-

307 driven ATP production (Figure 5C and S5C-E). This strongly confirms the ability of glycerol
308 metabolism by-products such as glycerol-3-phosphate (G3P) and dihydroxyacetone
309 phosphate (DHAP) to fuel both OXPHOS from Gut2p and glycolysis from the triose
310 phosphate intermediates (Figure 5D).

311 To further investigate the metabolic importance of the alternative glycolytic-driven ATP
312 production in response to uncoupling stress, we measured, using HPIC method, the
313 adenylic energy charge of *inh1Δ stf1Δ* and WT strains cultivated under glycerol medium
314 (Figure 5E). The adenylate energy charge measurement demonstrated that, in the WT
315 strain, the glycolytic-driven ATP production pathway could preserve the cells' energy
316 status from OXPHOS uncoupling stress. The fact that adverse energetic outcomes
317 associated with the loss of If1/Stf1 only appeared under depolarization stress strongly
318 suggests that the drop in adenylate energy charge is caused by the un-prevented ATP
319 hydrolysis from the reversed mitochondrial F₁F₀-ATP synthase assemblies. Further
320 analyses demonstrated that this acute energy crisis occurring within the first hour of
321 treatment (Figure 5E), affected cellular respiration at later time points (Figure 4C).
322 Interestingly, the respiration defects were associated with decreased levels and activities
323 of complex III, IV and V (Figure 5F and G), but the OXPHOS deficiencies were not linked
324 to mitochondrial genome deficiency (Figure 5H) or loss of complex IV subunits (Figure 5I).
325 Altogether, our analyses demonstrate that the canonical role of If1/Stf1 in preventing ATP
326 hydrolysis and safeguarding energy metabolism under mitochondrial depolarization stress
327 is unmasked under the very specific glyco-oxidative metabolic condition *i.e.* where yeast
328 energy metabolism relies both on glycolysis and OXPHOS activities.

329

330 **The If1/Stf1 inhibitors as well as F₁F₀-ATP synthase free F₁ subcomplex are both** 331 **dispensable for the viability of $\rho^{-/o}$ yeasts**

332 According to several reports, the ATPase activity of the free F₁ subcomplex coupled to the
333 electrogenic activity of the adenine nucleotide translocator (ANT), is crucial to support
334 mitochondrial membrane potential and growth of yeast lacking their mitochondrial genome
335 ($\rho^{-/o}$ cells) (Clark-Walker, 2007; Giraud and Velours, 1997; Kominsky et al., 2002). The
336 improved growth capacity of $\rho^{-/o}$ cells lacking If1 also strongly endorsed the importance of
337 the free F₁ subcomplex ATPase activity in supporting the growth of mtDNA deprived cells
338 (Liu et al., 2021). These previous works supporting that free F₁ subcomplexes could be
339 more active in the absence of If1 in the context of $\rho^{-/o}$, would contrast with the
340 interdependence between If1/Stf1 and free F₁ subcomplex we observed (Figure 1 and 2).
341 Therefore, we decided to characterize the interplay between If1/Stf1 and free F₁
342 subcomplex in the context of $\rho^{-/o}$ cells. First, during the stationary growth phase of WT and

343 *inh1Δ stf1Δ*, we analyzed the proportion of cells undergoing $\rho^{-/o}$ conversion. In line with
344 previous works, we observed that the loss of If1/Stf1 activity was in fact favoring the loss of
345 mitochondrial genome and the conversion of yeast into $\rho^{-/o}$ cells (Figure 6A). Then, we
346 generated stable WT and *inh1Δ stf1Δ* $\rho^{-/o}$ cells and observed that the If1/ β ratio was
347 unchanged in WT $\rho^{-/o}$ whereas the Stf1/ β ratio, while not significant, tended to be reduced
348 (Figure 6B). While favoring the conversion into $\rho^{-/o}$ cells (Figure 6A), the loss of If1/Stf1 did
349 not impact the $\rho^{-/o}$ cells' growth rate under fermentative conditions (Figure 6C). Moreover,
350 our data demonstrated that the overall ATP hydrolysis activity (Figure 6D) as well as the
351 free F_1 subcomplex expression (Figure 6E) were barely detected in total extracts from WT
352 and *inh1Δ stf1Δ* $\rho^{-/o}$ cells. Interestingly, BN-PAGE experiments performed on highly
353 concentrated extracts from $\rho^{-/o}$ cells confirmed that the free F_1 subcomplex levels were,
354 like in the ρ^+ context (Figure 1D), severely reduced in the *inh1Δ stf1Δ* $\rho^{-/o}$ compared to the
355 WT $\rho^{-/o}$ cells. Collectively, our findings suggest that the deletion of If1/Stf1 is beneficial for
356 $\rho^{-/o}$ cells, but they also refute hypotheses supporting that this effect could be tightly linked
357 to an activation of the F_1 subcomplex driven ATP hydrolysis. Instead, our results
358 demonstrated that the loss of If1/Stf1 together with the free F_1 subcomplex favored the
359 conversion into $\rho^{-/o}$ and did not affect the growth of $\rho^{-/o}$ cells on fermentable carbon
360 sources (Figure 6).

361

362 **Discussion**

363 The present work confirmed that, in contrast to their mammalian homologs If1, the yeast
364 If1/Stf1 inhibitors are dispensable for the biogenesis and stability of F_1F_0 -ATP synthase
365 dimers and provides first evidence that If1/Stf1 are not required for the stability of F_1F_0 -
366 ATP synthase oligomers. The resolution of the F_1F_0 -ATP synthase tetramers' structures by
367 Cryo-EM, demonstrating that If1 dimers could bridge and likely stabilize adjacent dimers
368 (Gu et al., 2019; Pinke et al., 2020; Mühleip et al., 2021), has supported the previously
369 proposed role of If1 in the supramolecular organization of the mammalian F_1F_0 -ATP
370 synthase (Cabezón et al., 2000). The role of mammalian If1 in F_1F_0 -ATP synthase
371 supramolecular organization was recently strengthened, by single molecule tracking
372 microscopy and native electrophoresis performed on If1 knock-in and knock-out cell lines
373 (Romero-Carramiñana et al., 2023; Weissert et al., 2021). In contrast, the lack of cryo-EM
374 structures of yeast F_1F_0 -ATP synthase oligomers larger than dimers (Hahn et al., 2016),
375 along with previously characterized differences in If1 dimerization and function, has cast
376 doubts on the potential implication of If1/Stf1 inhibitors in the F_1F_0 -ATP synthase

377 supramolecular organization in yeast (Cabezón et al., 2002; Hong and Pedersen, 2002; Le
378 Breton et al., 2016). Our work confirms previous findings showing that the levels of F₁F₀-
379 ATP synthase dimers remained unchanged in *inh1Δ stf1Δ* (Dienhart et al., 2002), but also
380 demonstrates that loss of these inhibitory peptides does not preclude the assembly and
381 levels of higher molecular weight F₁F₀-ATP synthase oligomers (Figure 1C). Instead,
382 structural and functional investigations consistently demonstrated that If1 is required to
383 maintain the levels of the free F₁ subcomplex, which is functionally characterized by its
384 oligomycin insensitivity (Figure 1 and 2) (Wittig et al., 2007). Our findings also support
385 previous works demonstrating that ATP synthase dimers can form rows and induce
386 membrane curvature just from the intrinsic shape of the dimer without the need for If1
387 connecting neighbouring dimers together (Davies et al., 2012; Anselmi et al., 2018; Blum
388 et al., 2019).

389

390 The free F₁ subcomplex observed under native PAGE or density gradients used to be
391 considered as an artifact resulting from the destabilization of fully assembled F₁F₀-ATP
392 synthase (monomers and oligomers) by the action of detergent or improper sample
393 preparation and storage (Ackerman and Tzagoloff, 1990; Jänsch et al., 1996; Wittig et al.,
394 2007). The native PAGE and solubilization techniques development combined with the use
395 of milder detergents such as digitonin have since convincingly demonstrated that the free
396 F₁ subcomplexes were stable assembly intermediates formed independently from the ATP
397 synthase F₀ sectors (Li et al., 2012; Nijtmans et al., 1995). The native PAGE and
398 oligomycin-sensitive enzymatic analyses, have independently demonstrated that the ratio
399 between the free F₁ subcomplex and the fully assembled F₁F₀-ATP synthase was
400 impacted neither by the use of mild detergent nor by the BN-PAGE approach. Our findings
401 support that the free F₁ subcomplex is not a degradation by-product resulting from
402 digitonin treatment since no F₁ subcomplex could be detected in the digitonin-solubilized
403 membrane fraction containing fully assembled F₁F₀-ATP synthases (Figure 1C-E). Instead,
404 our work strongly supports previous reports claiming that the free F₁ subcomplex is a
405 stable intermediate assembly. This hypothesis is also strengthened by the enhanced
406 levels of free F₁ we observed in yeast presenting aberrant ATP synthase assembly such
407 as *atp18Δ* (Figure 3C) and $\rho^{-/o}$ (Figure 6E and F), corroborating independent observations
408 obtained in different model organisms (Carrozzo et al., 2006; Wittig et al., 2006, 2007;
409 Mourier et al., 2014; He et al., 2018). Our quantitative analyses substantiate independent
410 reports demonstrating that If1 binding affinity and inhibitory capacities are greater than Stf1
411 (Cabezón et al., 2002; Venard et al., 2003). Interestingly, we demonstrated that If1 evenly

412 binds the various ATP synthase assemblies (Figure 2A and B) and can very efficiently
413 inhibit their ATP hydrolysis activity in a characteristic pH-dependent manner (Figure 2C-E).
414

415 Several independent studies have previously demonstrated that the maintenance of
416 mitochondrial membrane potential and the ADP/ATP translocator were essential for the
417 survival and growth of yeast presenting long range deletion (ρ^-) or complete loss of their
418 mitochondrial genome (ρ^0) (Dupont et al., 1985; Kováčová et al., 1968; Subík et al., 1972).
419 This specific sensitivity prompted scientists to hypothesize that the F_1 subcomplex driven
420 ATP hydrolysis together with the electrogenic activity of the ADP/ATP translocator could
421 be key in maintaining the proton electrochemical potential across the mitochondrial inner
422 membrane and therefore essential for the growth and survival of ρ^-/ρ^0 yeast (Giraud and
423 Velours, 1997; Chen and Clark-Walker, 1999; Clark-Walker, 2007). Our analyses
424 demonstrated that the loss of If1/Stf1 associated with drastic loss of F_1 subcomplex does
425 not prevent the yeast to undergo ρ^-/ρ^0 conditions nor impact their growth under fermentative
426 carbon source (Figure 6). Consequently, our results corroborate original analyses from
427 Tzagaloff and Schatz (Tzagaloff et al., 1975) demonstrating that the loss of subunits
428 forming the F_1 sector did not preclude the conversion into ρ^-/ρ^0 cells.

429

430 For endogenous peptide inhibitors, the free F_1 subcomplex is a priority target because of
431 its potential toxicity for the cell's energy metabolism. In contrast to the fully assembled
432 F_1F_0 -ATP synthase, the toxicity of the free F_1 subcomplex stems from its lack of
433 thermodynamic feedback inhibition by the proton electrochemical potential. The novel
434 flf1/Stf1-mediated mechanism of action identified in the present work, elegantly
435 circumvents any potentially uncontrolled ATP hydrolysis from the yeast free F_1
436 subcomplex. Our present work demonstrates that in the presence of If1/Stf1 the free F_1
437 subcomplex is tightly regulated and inhibited, whereas in the absence of If1 the free F_1
438 subcomplex is not maintained (Figure 1 and 2). Altogether, our data suggest that the If1
439 binding to the free F_1 subcomplex is not only preventing potential toxic ATP hydrolysis, but
440 also stabilizing this assembly intermediate (Figure 3A). This peculiar interplay between If1
441 and the yeast free F_1 subcomplex is in agreement with the parallel increase in If1 and ATP
442 synthase subassemblies we previously characterized in cardiac-specific knockouts
443 developing a progressive cardiomyopathy associated with mitochondrial transcripts
444 instability (Mourier et al., 2014).

445

446 Interestingly, the loss of If1/Stf1 inhibition on the fully assembled F_1F_0 -ATP synthase was
447 associated with a mild stress increasing cellular respiration capacity, but without affecting

448 the growth rate (Figure 4). However, the CCCP-induced OXPHOS uncoupling stress
449 unmasks the crucial role played by If1/Stf1 under a very specific metabolic condition
450 associated with the glycerol carbon source. The systematic comparison of cellular
451 respiration of cells growing under fermentable (glucose 0.5%, galactose 2%) and non-
452 fermentable (glycerol 2%, lactate 2%) carbon sources demonstrated that mitochondrial
453 respiration alone was insufficient to comprehend the unique metabolic specificity of cells
454 metabolizing glycerol (Figure 4). In contrast to the glucose or lactate conditions presenting
455 striking differences in their respirations, it was impossible to discriminate, on the basis of
456 their endogenous respiration, yeast grown on galactose (non-fermentable) or glycerol
457 (fermentable) (Figure 4). This observation prompted us to develop a new screening tool
458 using genetically modified yeast presenting defective mitochondrial or glycolytic-driven
459 ATP production to decipher the respective implication of the two pathways in energy
460 balance and yeast growth (Figure 5C). This strategy demonstrated that in contrast to
461 lactate medium where yeast growth was exclusively dependent on the mitochondrial
462 pathway, growth on glycerol also relied on the pyruvate kinase 1 (Cdc19) glycolysis
463 activity. This observation demonstrated that glycerol, in contrast to lactate, is not a strict
464 'non-fermentable' carbon source strictly relying on mitochondrial energy metabolism. This
465 observation corroborates recent hypotheses based on transcriptomic and metabolomic
466 analyses and challenging the classification of glycerol as a 'non-fermentable' carbon
467 source (Aßkamp et al., 2019; Galkina et al., 2022; Xiberras et al., 2019). Assessing the
468 relative dependence of cell energy metabolism on glycolysis and oxidative phosphorylation
469 was more pertinent for understanding the role of If1/Stf1 in OXPHOS uncoupling stress in
470 glycerol, than simply characterizing metabolism through respiro-fermentative properties.
471 Accordingly, the specific If1/Stf1 dependency of cells under glycerol, redefined here as a
472 glyco-oxidative metabolic condition, suggests that preventing mitochondrial ATP hydrolysis
473 is crucial for cell growth only when energy metabolism evenly relies on both glycolysis and
474 OXPHOS processes (Figure 5 C-E). In contrast, the unrepressed ATPase activity did not
475 affect cell growth on highly glycolytic conditions (glucose or galactose) and conversely
476 could not be compensated under highly oxidative metabolic conditions (lactate). We
477 believe that this new approach deciphering the respective roles of glycolysis and OXPHOS
478 in cell energy balance applied to the mammalian context could help understand the
479 intriguing role of If1 in numerous tumors undergoing hypoxic stress and overexpressing
480 this inhibitory peptide (Sánchez-Aragó et al., 2013; Sgarbi et al., 2018).

481

_ Figure 1 _

482 **If1/Stf1 are required to maintain the F₁F₀-ATP synthase free F₁ subcomplex levels.**

483 (A) Western blot performed on total cell protein extracts purified from WT, *inh1*Δ, *stf1*Δ and
484 *inh1*Δ *stf1*Δ mutants, grown on glycerol 2% rich medium. (Representative of n = 5
485 independent experiments)

486 (B) Growth of WT (black) and *inh1*Δ *stf1*Δ (red) mutants on lactate 2% rich medium,
487 following the optical density of the culture at 550 nm. (n = 5 independent experiments).

488 (C) CN-PAGE (3-12%) performed with purified mitochondria from WT and *inh1*Δ *stf1*Δ cells
489 grown on lactate 2% rich medium, solubilized with glyco-diosgenin (GDN) at a GDN to
490 protein ratio of 0.5 g/g protein. The F₁F₀-ATP synthase assemblies were revealed by F₁F₀-
491 ATP synthase hydrolytic in-gel activity (CV IGA). (Representative of n = 3 independent
492 experiments)

493 (D) CN and BN-PAGE (3-12%) performed with total cell extracts from WT and *inh1*Δ *stf1*Δ
494 grown on glycerol 2% rich medium solubilized with digitonin at a digitonin to protein ratio of
495 1.5 g/g protein. The F₁F₀-ATP synthase assemblies were revealed by F₁F₀-ATP synthase
496 hydrolytic in-gel activity (CV IGA). (Representative of n = 3 independent experiments)

497 (E) CN and BN-PAGE (3-12%) performed with total cell extracts, membrane and soluble
498 fractions obtained after ultracentrifugation of WT cells grown on glycerol 2% rich medium
499 solubilized with digitonin at a digitonin to protein ratio of 1.5 g/g protein. The F₁F₀-ATP
500 synthase assemblies were revealed by F₁F₀-ATP synthase hydrolytic in-gel activity (CV
501 IGA). (Representative of n = 3 independent experiments)

502 (F) BN-PAGE (3-12%) performed with total cell extracts from WT, *inh1*Δ *stf1*Δ, *inh1*Δ and
503 *stf1*Δ, grown on glycerol 2% medium solubilized with digitonin at a digitonin to protein ratio
504 of 1.5 g/g protein. The F₁F₀-ATP synthase assemblies were revealed by F₁F₀-ATP
505 synthase hydrolytic in-gel activity (CV IGA). (Representative of n = 3 independent
506 experiments)

507

508

_ Figure 2 _

509 **If1 binds and inhibits ATP synthase oligomers, monomers and free F₁**
510 **subcomplexes.**

511 (A) Western blot following 2D-BN/SDS-PAGE performed with total cell extracts from WT
512 and the *inh1*Δ *stf1*Δ grown on glycerol 2% rich medium. During the extraction and
513 solubilization, the pH was conserved at 6.4 to preserve If1/Stf1 binding. (Representative of
514 n = 3 independent experiments)

515 (B) Densitometric quantification of western blot following 2D-BN/SDS-PAGE performed
516 with total cell extracts from WT cells grown on glycerol 2% rich medium. For each F₁F₀-
517 ATP synthase assembly, the western blot signal obtained with If1 signal was normalized to
518 the β or γ subunit.

519 (C) Measurement of the ATP hydrolysis flux performed on total cell extracts from WT
520 (black bars) and *inh1Δ stf1Δ* (red bars) grown on glycerol 2% rich medium by monitoring
521 the ATP induced phosphate production over several minutes. Experiments were
522 performed at pH 9.0 (inactive inhibitors) and pH 6.4 (active inhibitors). (n = 3 independent
523 experiments, unpaired t-test, error bars ± SEM **p<0.005)

524 (D) Measurement of the ATP hydrolysis flux performed on total cell extracts from WT
525 (black bars) and *inh1Δ stf1Δ* (red bars) grown on glycerol 2% rich medium by monitoring
526 the ATP induced phosphate production over several minutes. Experiments were
527 performed at pH 9.0 (inactive inhibitors) in absence or presence of oligomycin. (n = 3
528 independent experiments, unpaired t-test, error bars ± SEM *p<0.05)

529 (E) Measurement of the ATP hydrolysis flux performed on the soluble fraction purified from
530 total cell extracts from WT (black bars) and *inh1Δ stf1Δ* (red bars) grown on glycerol 2%
531 rich medium by monitoring the ATP induced phosphate production over several minutes.
532 Experiments were performed at pH 9.0 (inactive inhibitors) and pH 6.4 (active inhibitors), in
533 absence or presence of oligomycin. (n = 3 independent experiments, unpaired t-test, error
534 bars ± SEM)

535 _ Figure 3 _

536 **If1 and Stf1 are specifically involved in free F₁ subcomplex stabilization.**

537 (A) BN-PAGE (3-12%) performed with total cell extracts, from WT and *inh1Δ stf1Δ* grown
538 on glycerol 2% rich medium subjected to cycloheximide (250 μg/ml) during 0, 30 and 90
539 minutes. Samples were solubilized with digitonin at a digitonin to protein ratio of 1.5 g/g
540 protein. The F₁F₀-ATP synthase assemblies were revealed by F₁F₀-ATP synthase
541 hydrolytic in-gel activity (CV IGA). (Representative of n = 3 independent experiments)

542 (B) Western blot (left) and densitometric analysis (right) of the relative abundance of IF1
543 (black) and STF1 (grey) from total cell extracts from WT grown on glycerol 2% rich
544 medium subjected to cycloheximide (250 μg/ml) during 0, 30 and 90 minutes.
545 Densitometric signals were normalized to the t₀-condition without cycloheximide. The
546 ponceau staining as well as the Coomassie blue staining presented in the upper part
547 demonstrate (i) that samples are evenly loaded and (ii) that the tagged If1 and Stf1
548 produced *in vitro* and used for relative quantification levels are equally loaded in the
549 standard. (n = 3 independent experiments, 2-way ANOVA, error bars ± SEM)

550 (C) CN and BN-PAGE (3-12%) performed with total cell extracts, from WT, *inh1Δ stf1Δ*,
551 *atp18Δ* and *atp18Δ inh1Δ* cells grown on glycerol 2% rich medium solubilized with digitonin
552 at a digitonin to protein ratio of 1.5 g/g protein. The F₁F₀-ATP synthase assemblies were
553 revealed by F₁F₀-ATP synthase hydrolytic in-gel activity (CV IGA). (Representative of n = 4
554 independent experiments)

555 (D) BN-PAGE (3-12%) performed with total cell extracts, from WT, *atp18Δ*, *atp18Δ inh1Δ*
556 *stf1Δ*, *atp18Δ inh1Δ* and *atp18Δ stf1Δ* grown on glycerol 2% rich medium solubilized with
557 digitonin at a digitonin to protein ratio of 1.5 g/g protein. The F₁F₀-ATP synthase
558 assemblies were revealed by F₁F₀-ATP synthase hydrolytic in-gel activity (CV IGA).
559 (Representative of n = 3 independent experiments)

560 (E) Growth of WT (black circles), *atp18Δ* (orange circles), *atp18Δ inh1Δ* (brown circles)
561 and *atp18Δ inh1Δ stf1Δ* (purple circles) on glycerol 2% rich medium, following the optical
562 density of the culture at 550 nm. (n = 3 independent experiments)

563 (F) Drop test performed on WT, *atp18Δ*, *atp18Δ stf1Δ*, *atp18Δ inh1Δ* and *atp18Δ inh1Δ*
564 *stf1Δ* grown on glycerol 2% rich medium. (Representative of n = 3 independent
565 experiments)

566

567

_ Figure 4 _

568 **If1/Stf1 mitigate the impact of mitochondrial depolarizing stress on glycerol**
569 **medium.**

570 (A) Drop test performed on WT and *inh1Δ stf1Δ* grown on different fermentable (glucose
571 0.5%, galactose 2%) and non-fermentable (glycerol 2%, lactate 2%) culture rich media
572 supplemented or not with CCCP (Representative of n = 3 independent experiments)

573 (B) Growth of WT (black circles and black crosses when supplemented with CCCP), and
574 *inh1Δ stf1Δ* (red circles and red crosses when supplemented with CCCP) cells on different
575 fermentable (glucose 0.5%, galactose 2%) and non-fermentable (glycerol 2%, lactate 2%)
576 culture rich media supplemented (crosses) or not with CCCP (circles), following the optical
577 density of the culture at 550 nm. (n = 3 independent experiments)

578 (C) High resolution respirometry performed on WT (black bars and hatched black bars in
579 presence of CCCP) and *inh1Δ stf1Δ* cells (red bars and hatched red bars in presence of
580 CCCP), collected during exponential phase on different fermentable (glucose 0.5%,
581 galactose 2%) and non-fermentable (glycerol 2%, lactate 2%) culture rich media,
582 supplemented (hatched bars) or not (empty bars) with CCCP (9h incubation). The oxygen
583 consumption fluxes were normalized to optical density. Cellular respiration was measured
584 under endogenous state and in the presence of ethanol, under endogenous, non-

585 phosphorylating (triethyltin titration) and uncoupled (CCCP titration) states. ($n \geq 3$
586 independent experiments, two-way ANOVA, error bars \pm SEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$,
587 *** $p < 0.0005$)

588 _ Figure 5 _

589 **F₁F₀-ATP synthase peptide inhibitors activity is crucial to preserve energy**
590 **metabolism under glyco-oxidative metabolism.**

591 (A) Western blot and (B) densitometric analysis of the relative abundance of If1 and Stf1 in
592 regard to the F₁F₀-ATP synthase β subunit level. Denaturing electrophoresis was
593 performed using total cell extracts from WT grown on different fermentable (glucose 0.5%,
594 galactose 2%) and non-fermentable (glycerol 2%, lactate 2%) culture rich media.
595 Densitometric signals were normalized to the glycerol condition. The ponceau staining as
596 well as the Coomassie blue staining presented in the upper part demonstrate (i) that
597 samples are evenly loaded and (ii) that the tagged If1 and Stf1 produced *in vitro* and used
598 for relative quantification levels are equally loaded in the standard. ($n = 8$ independent
599 experiments, two-way ANOVA, error bars \pm SEM * $p < 0.05$, ** $p < 0.005$).

600 (C) Drop test performed on WT, *cdc19 Δ* thermosensitive (*ts*) mutant (37°) and *atp18 Δ*
601 mutant grown on different fermentable (glucose 0.5%, galactose 2%) and non-fermentable
602 (glycerol 2%, lactate 2%) culture minimum media. (Representative of $n = 3$ independent
603 experiments)

604 (D) Scheme of the main metabolic pathways involved in ATP/ADP maintenance
605 characterizing the so-called glyco-oxidative metabolism observed under glycerol 2%
606 conditions.

607 (E) HPIC quantification of adenylate energy charge in WT (black) and *inh1 Δ stf1 Δ* (red)
608 cells grown in the absence (circles) or presence (crosses) of CCCP (1 h incubation) on
609 glycerol 2% rich medium. ($n = 3$ independent experiments, one-way ANOVA, Error bars \pm
610 SEM *** $p < 0.0005$)

611 (F) BN-PAGE (3-12%) performed with total cell extracts from WT and *inh1 Δ stf1 Δ* grown
612 on glycerol 2% rich medium solubilized with digitonin at a digitonin to protein ratio of 1.5
613 g/g protein. NADH dehydrogenase, complex IV (CIV) and F₁F₀-ATP synthase (CV) in-gel
614 activities (IGA) were performed. (Representative of $n = 3$ independent experiments)

615 (G) Enzymatic activity of the respiratory chain complex III (CIII) performed on total cell
616 extracts from WT and *inh1 Δ stf1 Δ* cultivated on glycerol 2% rich medium, in the presence
617 or absence of CCCP (6h incubation). All the fluxes were normalized to WT condition
618 without CCCP. ($n \geq 9$ independent experiments, error bars \pm SEM (** $p < 0.005$))

619 (H) Quantitative PCR quantification of the mitochondrial DNA to nuclear DNA ratio
620 performed on total DNA extracted from WT and *inh1Δ stf1Δ* grown on glycerol 2%, in the
621 presence (hatched bars) or absence (solid bars) of CCCP (6 h incubation). (n = 3
622 independent experiments, 2-way ANOVA, error bars ± SEM)

623 (I) Western blot (left) and densitometric (right) analysis of the relative abundance of Cox2,
624 a complex IV subunit. Denaturing electrophoresis was performed using total cell extracts
625 from WT and *inh1Δ stf1Δ* grown on glycerol 2% rich medium in the presence or absence of
626 CCCP (6h incubation). Immunodetected signals were normalized to ponceau signal. (n = 3
627 independent experiments, one-way ANOVA, error bars ± SEM)

628 _ Figure 6 _

629 **The If1/Stf1 inhibitors as well as F₁F₀-ATP synthase free F₁ subcomplex are both**
630 **dispensable for the viability of ρ⁻ yeast**

631 (A) Percentage of WT and *inh1Δ stf1Δ* cells that spontaneously lost their mitochondrial
632 genome ρ⁻. (n = 8 independent experiments, unpaired t-test, error bars ± SEM
633 ***p<0.0005)

634 (B) Western blot (left) and densitometric analysis (right) of the relative abundance of If1
635 and Stf1 in regards to the F₁F₀-ATP synthase β subunit level. Denaturing electrophoresis
636 was performed on total cell extracts from WT (black) and WT ρ⁻ (grey) grown on glucose
637 0.5% rich medium. (n = 3 independent experiments, unpaired t-test, error bars ± SEM
638 *p<0.05)

639 (C) Growth of WT (black circles) or WT ρ⁻ (black triangles), *inh1Δ stf1Δ* (red circles) and
640 *inh1Δ stf1Δ* ρ⁻ (red triangles) cell on glucose 0.5% rich medium, following the optical
641 density of the culture at 550 nm. (n = 3 independent experiments)

642 (D) Measurement of the ATP hydrolysis flux performed on total cell extracts from WT
643 (black bars) and *inh1Δ stf1Δ* (red bars) and their ρ⁻ variants, grown on glucose 0.5% rich
644 medium by monitoring the ATP induced phosphate production over several minutes.
645 Experiments were performed at pH 9.0 (inactive inhibitors). (n = 3 independent
646 experiments, unpaired t-test, error bars ± SEM **p<0.005)

647 (E) BN-PAGE (3-12%) performed with total cell extracts from WT and *inh1Δ stf1Δ* and their
648 respective ρ⁻ variants, grown on glucose 0.5% rich medium. Cell extracts were
649 solubilized with digitonin at a digitonin to protein ratio of 1.5 g/g protein. NADH
650 dehydrogenase and F₁F₀-ATP synthase (CV) in-gel activities (IGA) were performed.
651 (Representative of n = 3 independent experiments)

652 (F) BN-PAGE (3-12%) performed with highly concentrated total cell extracts from WT, WT
653 ρ⁻ and *inh1Δ stf1Δ* ρ⁻ grown on glucose 0.5% rich medium. Cell extracts were

654 solubilized with digitonin at a digitonin to protein ratio of 1.5 g/g protein. The F₁F₀-ATP
655 synthase assemblies were revealed by ATP synthase hydrolytic in-gel activity (CV IGA).
656 (Representative of n = 3 independent experiments)

657

658 SUPPLEMENTAL

659 Supplemental Figure 1

660 BN-PAGE (3-12%) (A) and densitometric analysis (B) performed with total cell extracts,
661 from WT, *inh1Δ stf1Δ* and *atp18Δ* grown under glycerol 2% rich medium. Cell extracts
662 were solubilized with increasing digitonin to protein ratio ranging from 0.5 to 6 g/g protein.
663 The ATP synthase assemblies (O: oligomers; V: monomers; F₁: free F₁ subcomplex) were
664 revealed by F₁F₀-ATP synthase (CV) hydrolytic in-gel activity (IGA). (n = 4, two-way
665 ANOVA, error bars ± SEM *p<0.05)

666 Supplemental Figure 3

667 (A) Measurement of the ATP hydrolysis flux performed on purified mitochondria from total
668 cell extracts from WT (black bars) and *inh1Δ* (red bars) grown on lactate 2% rich medium
669 by monitoring the ATP induced phosphate production flux over several minutes.
670 Experiments were performed at pH 9.0 (inactive inhibitors) and pH 6.4 (active inhibitors).
671 (n ≥ 7 independent experiments, unpaired t-test, error bars ± SEM ***p<0.0005)

672 Supplemental Figure 4

673 (A) Determination of doubling time (hours) of WT (black bars) and *inh1Δ stf1Δ* (red bars)
674 grown on different fermentable (glucose 0.5%, galactose 2%) and non-fermentable
675 (glycerol 2%, lactate 2%) culture rich media supplemented or not with CCCP (1, 1.5 or 2
676 μM), following the optical density of the culture at 550 nm. *nd*: not determined *i.e* too slow
677 to determine the doubling time (n = 3 independent experiments, two-way ANOVA, error
678 bars ± SEM)

679 Supplemental Figure 5

680

681 (A) BN-PAGE (3-12%) performed with total cell extracts from WT grown on different
682 fermentable (glucose 0.5%, galactose 2%) and non-fermentable (glycerol 2%, lactate 2%)
683 culture rich media. Cell extracts were solubilized with digitonin at a digitonin to protein ratio
684 of 1.5 g/g protein. 150 μg of protein were loaded for glucose or galactose condition and
685 100 μg of protein were loaded for glycerol or lactate conditions. The F₁F₀-ATP synthase

686 assemblies were revealed by F_1F_0 -ATP synthase (CV) hydrolytic in-gel activity (IGA).
687 (Representative of $n = 2$ independent experiments)

688 (B) Western blot (left) and densitometric analysis (right) of the relative abundance of If1
689 and Stf1, using Pgk1 as loading control. Denaturing electrophoresis was performed with
690 total cell extracts grown on glycerol 2% rich medium supplemented or not with CCCP. The
691 Coomassie blue staining on the upper panel demonstrates the equal loading of tagged If1
692 and Stf1 produced *in vitro* and used for the relative quantification of inhibitors (* signal
693 remaining from anti-STF1 antibody). ($n = 3$ independent experiments, unpaired t-test, error
694 bars \pm SEM)

695 (C) Densitometric analysis of drop test performed on WT (black) and *atp18 Δ* (orange)
696 mutant grown on glycerol 2% culture minimum medium. ($n = 3$ independent experiments,
697 two-way ANOVA, error bars \pm SEM)

698 (D) Densitometric analysis of drop test performed on WT (black) and *cdc19 Δ* (*green*)
699 thermosensitive (*ts*) mutant (37°) mutant grown on glycerol 2% culture minimum medium.
700 ($n = 3$ independent experiments, two-way ANOVA, error bars \pm SEM)

701 (E) Densitometric analysis of drop test performed on WT (black) and *cdc19 Δ* (*green*)
702 thermosensitive (*ts*) mutant (37°) mutant grown on lactate 2% culture minimum medium. (n
703 = 3 independent experiments, two-way ANOVA, error bars \pm SEM)

704 (F) Drop test performed on WT, *atp5 Δ* , *atp7 Δ* and *atp14 Δ* mutant grown on different
705 fermentable (glucose 0.5%, galactose 2%) or non-fermentable (glycerol 2%, lactate 2%)
706 culture minimum media. (Representative of $n = 3$ independent experiments)

707
708

709 **Mat & meth**

710 **Yeast strains**

711 The *Saccharomyces cerevisiae* strain used in this study is the strain D273-
712 10B/A/H/U (MAT α , met6, ura3, his3) referred to as the wild type (WT)(Paul et al., 1989)
713 and strain BY4741 Euroscarf (MAT α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0). The mutants
714 D273 were obtained by homologous recombination of the following deletion cassette in the
715 wild type strain: D273 *inh1* Δ (MAT α , met6, ura3, his3, *inh1::HIS3-kanMX6*), D273 *stf1* Δ
716 (MAT α , met6, ura3, his3, *stf1::Nat^R*), D273 *inh1* Δ *stf1* Δ (MAT α , met6, ura3, his3,
717 *stf1::Nat^R*, *inh1::HIS3-KanMX6*), D273 *atp18* Δ (MAT α , met6, ura3, his3, *atp18::HIS3*),
718 D273 *atp18* Δ *inh1* Δ (MAT α , met6, ura3, his3, *atp18::Nat^R*, *inh1::HIS3-kanMX6*), D273
719 *atp18* Δ *stf1* Δ (MAT α , met6, ura3, his3, *atp18::HIS3-kanMX6*, *stf1::Nat^R*), D273 *atp18* Δ
720 *inh1* Δ *stf1* Δ (MAT α , met6, ura3, his3, *atp18::Nat^R*, *inh1::HIS3-kanMX6*, *stf1::Kan^R*). The
721 plasmids used for the cassette *HIS3-kanMX6* and nourseothricin resistance (*Nat^R*) were
722 pFA6a-*His3MX6* and pUG-natNT2 respectively. The generated mutants were validated by
723 PCR and Western blot. D273 $\rho^{-/o}$ strain was obtained after growing cells on rich medium
724 containing glucose 2% for two days before spreading on rich medium with 0.5% of
725 glucose. The $\rho^{-/o}$ colonies were identified and counted by comparing to a replica plate
726 containing glycerol rich medium where only the ρ^{+} colonies were able to grow. The wild
727 type and mutants strains BY4741 (MAT α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0), BY4742
728 (MAT α , lys2 Δ 0, ura3 Δ 0, his3 Δ 1, leu2 Δ 0) and BY4743 (MAT α /MAT α ; his3 Δ 1/his3 Δ 1;
729 leu2 Δ 0/leu2 Δ 0; LYS2/lys2 Δ 0; met15 Δ 0/MET15; ura3 Δ 0/ura3 Δ 0) were provided by
730 Euroscarf: BY4741 *atp18* Δ (MAT α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; YML081c-
731 *a::kanMX4*), BY4741 *cdc19* Δ (MAT α ; his3 Δ 1; leu2 Δ 0; met15 Δ 0; ura3 Δ 0; *cdc19*-
732 *1::kanMX4* (lethal at 37°C on glucose medium)), BY4742 *atp5* Δ (MAT α , lys2 Δ 0, ura3 Δ 0,
733 his3 Δ 1, leu2 Δ 0, *atp5::KAN^R*), BY4742 *atp7* Δ (MAT α , lys2 Δ 0, ura3 Δ 0, his3 Δ 1, leu2 Δ 0,
734 *atp7::KAN^R*), BY4742 *atp14* Δ (MAT α , lys2 Δ 0, ura3 Δ 0, his3 Δ 1, leu2 Δ 0, *atp14::KAN^R*).

735 **Yeast growth and media**

736 Cells were grown aerobically at 28°C with shaking at 180 rpm. Growth was followed by
737 measuring the optical density at 550 nm using a Jasco V-760 spectrophotometer. The
738 composition of rich medium was: 0.1% (w/v) KH₂PO₄ pH 5.5, 1% (w/v) yeast extract, 0.12%
739 (w/v) (NH₄)₂SO₄, 2% or 0.5% (w/v) carbon source and for solid medium 2% (w/v) bacto agar
740 was added. For some drop test, cells were grown in the following minimum medium: 0.1%
741 (w/v) KH₂PO₄ pH 5.5, 0.175% (w/v) yeast nitrogen base w/o amino acids and ammonium
742 sulfate, 0.5% (w/v) (NH₄)₂SO₄, 0.2% (w/v), 2% or 0.5% (w/v) carbon source, 2% (w/v) bacto

743 agar minimum medium, 0.2% (w/v) casein hydrolysate, 100 mg/l leucine, 20 mg/l histidine,
744 20 mg/l methionine, 20 mg/l uracil. A filtered solution of casein and amino acids was added
745 to the sterilized medium. Different carbon sources were used: D,L-lactic acid, glycerol,
746 D(+)-galactose or D(+)-glucose. The carbon source and the type of medium (rich or
747 minimum) selected for each experiment is indicated in the legends. The uncoupler agent
748 CCCP was added in the liquid culture medium, at 28°C, a few minutes before inoculating
749 the cells at 0.1 OD_{550nm} for growth curves and at 1 OD_{550nm} for HPIC experiments. For solid
750 culture medium CCCP was added in the tepid medium just before solidification of agar and
751 used within one day. A CCCP concentration titration (between 1.25 and 7.5 µM) was
752 performed for each experiment and condition. The inhibitor of cytosolic translation,
753 cycloheximide (250 µg/ml) was added in the culture medium, at 2 OD_{550nm} culture. Cells
754 were harvested during exponential growth.

755 **Mitochondria preparation**

756 Yeast cells grown in the presence of 2% (w/v) lactate were collected during the
757 exponential growth phase and mitochondria were prepared by enzymatic digestion of the
758 cell wall with Zymolyase®-20T (nacalai tesque®, reference 07663-04) according to
759 (Guérin et al., 1979).

760 **High-resolution oxygen consumption measurement on yeast cells and isolated** 761 **mitochondria.**

762 Oxygen consumption of cells harvested during the exponential growth phase on different
763 culture media was measured at 28°C using an Oxygraph-2k (OROBOROS
764 INSTRUMENTS, Innsbruck, Austria). Oxygen consumption rates of cells were measured
765 under endogenous state and in presence of 85 mM ethanol substrate under endogenous
766 conditions, under the non-phosphorylating state with addition of 25 µM TET and under the
767 uncoupled state by successive addition of CCCP titration (around 2.5 µM). When
768 necessary, cells were diluted with the culture medium.

769 **Protein extraction**

770 100 units of OD_{550nm} were harvested, pelleted and washed with cold water before being
771 broken by vigorous shaking for 4 min in 250 µl of extraction buffer containing 10 mM Bis-
772 Tris-HCl pH 6.4, 1 mM EDTA and a mixture of protease inhibitors (Complete EDTA-free™,
773 Roche) with an equal volume of glass beads (0.4 mm diameter). Protein concentrations
774 were then determined using the DC assay according to manufacturer's instructions (Bio-
775 Rad). To detect the free F₁ subcomplex in ρ^{-o}, we obtained concentrated solubilized cell

776 protein extracts using a centrifugal Concentrator (Corning® Spin-X® UF 500 µL, molecular
777 weight cut-off of 100 kDa). The supernatant was collected after centrifugation at 12,000g
778 for 10 min at 4°C. To obtain the membrane and soluble fractions, the total cell extract was
779 centrifuged at 30,000g during 30 min at 4°C. The supernatant (containing the soluble
780 fraction) and pellet (containing the membrane fraction), were collected and subjected to
781 protein quantification. The pellet was resuspended in a volume of extraction buffer
782 equivalent to that of the harvested supernatant.

783 **Enzymatic activities determination**

784 Cytochrome c reductase (complex III) activity was determined by the absorbance at 550
785 nm of reduced cytochrome c in the following buffer: 50 mM KH₂PO₄ pH 7.4, 0.5 mM KCN,
786 10 mM succinate, 10 mM G3P and 200 µg/ml bovine heart cytochrome c. The specificity of
787 the assay was validated by the addition of 0.5 µM antimycin A. Cytochrome c reductase
788 (complex III) activity being defined as the antimycin A sensitive flux. Enzymatic activity
789 measurements were performed with a Jasco V-760 spectrophotometer on 250 µg protein
790 in a quartz spectrophotometer cell at 28°C with stirring at 1,000 rpm.

791 The hydrolytic activity of ATP synthase (complex V) was determined with 0.8 mg protein
792 cell extracts at 28°C with shaking at 750 rpm with a thermomixer in the following buffer: 75
793 mM triethanolamine pH 9.0 or pH 6.4, 5 mM MgCl₂ with 2 µg/ml alamethicin. The reaction
794 was initiated with the addition of 5 mM ATP and every 2 min (or 6 min for ρ^-) an aliquot
795 was collected and added to the following solution: 0.38 M sulfuric acid, 5 µM ammonium
796 heptamolybdate tetrahydrate, 29 µM iron(II) sulfate heptahydrate. The Pi product was
797 quantified following changes in the absorbance assessed at 750 nm. The same
798 experiment was performed after a 2-min pre-incubation with 19 µg/ml oligomycin to assess
799 the oligomycin-insensitive ATP hydrolysis flux. The hydrolytic activity of ATP synthase
800 (complex V) on purified mitochondria (0.035 mg of mitochondrial protein) was determined
801 at 28°C with shaking at 750 rpm in an Oroboros chamber in the following buffer: 75 mM
802 triethanolamine pH 9.0 or 6.4, 5 mM MgCl₂ with 1 µg/ml alamethicin. The reaction was
803 initiated with the addition of 5mM ATP. Every 30 s an aliquot was collected and added to
804 the following solution: 0.38 M sulfuric acid, 5 µM ammonium heptamolybdate tetrahydrate,
805 29 µM iron(II) sulfate heptahydrate. The Pi product was quantified following changes in the
806 absorbance assessed at 750 nm. The same experiment was performed after a 2 min pre-
807 incubation with 4 ng/ml triethyltin to assess the oligomycin-insensitive ATP hydrolysis flux.

808 **BN-PAGE analyses and two-dimensional electrophoresis on total yeast cells protein** 809 **extracts**

810 For CN and BN-PAGE, 100 or 200 µg of total cell protein extracts were solubilized with
811 Glyco-diosgenin (GDN) (0.5g/g) or high-purity digitonin (1.5 g/g) in extraction buffer (see
812 above) with 0.0125 kU/µl of nuclease. Membranes were solubilized by vortexing for 30 min
813 at 4°C and incubated at room temperature for 10 min. Supernatants were collected after
814 centrifugation of the solubilized protein extract at 30,000g for 30 min. The loading buffer
815 containing 0.15 M 6-aminohexanoic acid was used for CN-PAGE and was supplemented
816 with 20% (w/v) glycerol and 0.0125 % (w/v) Coomassie brilliant blue G-250 for BN-PAGE.
817 Proteins samples were loaded on Bis-Tris Invitrogen™ Novex™ NativePAGE™ 3-12%
818 acrylamide gradient gels. Gel migration was performed at 10 mA, 3 h at 4°C. At three-
819 quarters of the migration, the BN-PAGE buffer was removed and replaced by a CN-PAGE
820 buffer to decrease the blue coloration of gel.

821 Protein complexes were detected by in-gel activity as previously described (Molinié et al.,
822 2022). Native gels were incubated with activity buffers containing 50 mM KH₂PO₄ pH 7.4
823 and 0.5 mg/ml idonitrotetrazolium. The buffer was complemented with 400 µM NADH pH
824 7.0 to reveal NADH dehydrogenases. For cytochrome c reductase in-gel activity, native
825 gels were incubated in the following buffer: 50 mM KH₂PO₄ pH 7.4, 75 mg/ml sucrose, 0.5
826 mg/ml 3,3'-Diaminobenzidine and 1 mg/ml cytochrome c. For ATP synthase in-gel activity,
827 native gels were incubated in the following buffer: 50 mM glycine, 1.32 mM lead acetate,
828 0.1 % (w/v) Triton X-100, and supplemented with 5 mM MgSO₄ and 4 mM ATP pH 7.0 to
829 start the reaction. After revelation of ATPase activity, native gels were incubated with 0.1%
830 (v/v) HCl to remove lead precipitate before Coomassie staining (0.125% (w/v) Coomassie,
831 50% (v/v) ethanol, 10% (v/v) acetic acid). After 45 min, gels were destained with a
832 destaining solution (25% (v/v) ethanol and 8% (v/v) acetic acid). After in-gel activity, Native
833 gels were imaged using ImageQuant (Amersham) and the Optical Density was determined
834 using FIJI analyzer.

835 For two-dimensional electrophoresis (2D-BN/SDS-PAGE), the first dimension BN-PAGE
836 bands were excised and incubated for 15 min in denaturing and reducing buffer containing
837 1% SDS and 1% β-mercaptoethanol pH 6.4, and then incubated in a second buffer
838 containing 1% SDS pH 6.4 for 15 min. Each lane was placed at the top of Bis-Tris
839 Invitrogen™ Novex™ NuPAGE™ 4–12% acrylamide gradient gels and a gel solution (4%
840 of acrylamide) was poured to seal the lane. PageRuler™ Plus (10 to 250 kDa) were
841 loaded as a MW ladder. The migration was performed at 100 V for 1h30 in Novex™ MES
842 running buffer according to the manufacturer recommendations.

843 **Quantitative Western-blot analyses**

844 For quantitative Western-blot analyses, 50 or 100 µg of protein extracts were solubilized in
845 standard RIPA buffer containing 150 mM NaCl, 25 mM Tris-base pH 8.0, 1% (w/v) NP40,
846 1% (w/v) SDS, 0.25% (w/v) deoxycholate and 1 mM EGTA for 30 min at 4°C. The loading
847 buffer containing 0.3 M Tris pH 6.8, 50% (w/v) glycerol, 30% (v/v) thioglycerol, 10% (w/v)
848 SDS, 0.05% (w/v) bromophenol blue was added to the samples before incubating them at
849 75°C for 5 min. To obtain a good separation of small proteins we performed a denaturing
850 Schagger gel using 15% of acrylamide gels as previously described (Schagger and von
851 Jagow, 1987). A molecular weight marker, PageRuler™ Plus (10 to 250 kDa), was loaded
852 on the gel. The denaturing electrophoresis was performed at 100 V for 2h. Proteins were
853 then transferred onto nitrocellulose Amersham Protran Premium membrane (Amersham)
854 (0.2 µm) with transfer buffer containing 25 mM Tris, 192 mM glycine, 0.1% (w/v) SDS at
855 100 V during 1h at 4°C. Membranes were stained with ponceau red solution containing 2
856 mg/ml ponceau red with 31% (v/v) acetic acid. After, membranes were incubated with
857 blocking buffer containing 5% (w/v) skimmed milk diluted in PBS-tween buffer containing
858 10 mM NaH₂PO₄ pH 7.2, 0,14 M NaCl, 0,1% (w/v) Tween-20. For immunodetection,
859 membranes were incubated with primary antibody diluted in PBS-tween and detected by a
860 peroxidase-conjugated secondary antibody Clarity ECL reagent (Bio-Rad). The
861 chemiluminescence signals were recorded using an ImageQuant (Amersham) and then
862 quantified using ImageJ software.

863 **If1 and Stf1 proteins were produced and purified to determine the relative**
864 **abundance of both inhibitors in cells.**

865 If1 was expressed and purified as mentioned in (Corvest et al., 2007), except that the His-
866 tag was not removed. The *STF1* gene was amplified by PCR using the 5' -
867 CGCGCGCCATGGCTGTTCTCATCATCATCACGACGGTCCTCGTGTGTGTGTGCC
868 GG - 3' forward primer to introduce a N-terminal His-tag and the 5'
869 CGCGCGCCATGGCTGTTCTCATCATCATCACGACGGTCCTCTCGTGTGTGTGTG
870 TGCCGG - 3' reverse primer. The PCR product, digested by *Nco1* and *BamH1*, was
871 inserted into the pVEX2.3 vector and digested with the same restriction enzymes. The
872 protein was produced in cell-free expression system (Larrieu et al., 2017). After 18 h of
873 production at 28°C, the reaction mix was centrifuged (10 min, 12,000xg, 4°C) and the
874 supernatant containing Stf1 was diluted 10-fold and loaded onto a Nickel NTA column. The
875 column was washed with 25 column volumes of washing buffer 1 containing 150 mM
876 NaCl, 10 mM imidazole, 20 mM Tris-HCl pH 8.0, containing EDTA-free protease inhibitors
877 (Pierce) and then with 20 column volumes of washing buffer 2 containing 150 mM NaCl,
878 20 mM imidazole, 20 mM Tris-HCl pH 8.0. The elution was performed with 4 column

879 volumes of elution buffer containing 150 mM NaCl, 250 mM Imidazole, 20 mM Tris-HCl pH
880 8.0 and EDTA-free protease inhibitors.

881 **Antibodies**

882 Primary antibodies: Pgk1 mouse monoclonal antibody 22C5D8 (CiteAb 459250), MTCO2
883 (Cox2) mouse monoclonal antibody (Thermo Fisher 12C4F12). Rabbit polyclonal
884 antibodies raised against purified subunits β , γ , and subunit 4 were obtained in the
885 laboratory. Rabbit polyclonal antibodies raised against the INDPRNPRFAKGGK peptide of
886 subunit i were purchased from Neosystem. Anti-Irf1 antibodies were kindly provided by K.
887 Tagawa (Osaka, Japan). The Stf1 protein produced *in vitro* was used by Covalab society
888 to raise polyclonal rabbit antibodies.

889 The secondary antibodies used were: Peroxidase AffiniPure™ Goat anti-rabbit IgG
890 (Jackson ImmunoResearch AB_2313567); Peroxidase AffiniPure™ Goat anti-mouse IgG
891 (Jackson ImmunoResearch AB_2338504)

892 **Metabolites quantifications**

893 Cells were cultured for 12 h before adding 1 μ M CCCP at 1 OD_{550nm}. After 1 h of
894 treatment, size and number of cells were defined with a multisizer instrument. 20 ml of
895 culture were filtered (Sartolon polyamid 0.45 μ m) and the filter was rapidly rinsed twice
896 with ice-cold water to stop reactions. Metabolites were extracted using an ethanol/20 mM
897 HEPES pH 7.2 (2/8 v/v) solution as described (Ceschin et al., 2014). Metabolites were
898 separated, detected and quantified on a High Performance Ion Chromatography (HPIC)
899 station as described (Pinson et al., 2023). The intracellular concentration of nucleotides
900 was determined using standard curves obtained with pure compounds. Adenylate energy
901 charge was defined as $AEC = [ATP] + \frac{1}{2} [ADP] / [ATP] + [ADP] + [AMP]$ (Atkinson and
902 Walton, 1967).

903 **Mitochondrial DNA quantification**

904 For DNA extraction, cells were washed and broken by shaking during 1 min with an equal
905 volume of glass beads (0.4 mm) in the following buffer: 10 mM Tris pH 8.0, 1 mM EDTA,
906 100 mM NaCl, 2% (v/v) Triton X-100, 1% (v/v) SDS and 50% (v/v) chloroform/phenol (1:1).
907 Equal volumes of 10 mM Tris pH 8.0 and 1 mM EDTA buffer were added and vortexed
908 during 5 min. The supernatant was mixed with an equal volume of chloroform during 1 min
909 and centrifuged at 12,000g. The supernatant was mixed with a double volume of glacial
910 ethanol and centrifuged at 12,000g. The pellet was dried at room temperature before being
911 resuspended in nuclease-free water.

912 Quantitative PCR for mtDNA content were performed with qPCRBIO SyGreen Blue Mix
913 Lo-ROX (Eurobio®). Based on the manufacturer's instructions, 0.1 ng of DNA was used to
914 quantify mtDNA and nuclear DNA with two different sets of primers. The first mtDNA
915 primer set (fw: TTGAAGCTGTACAACCTACC, rv: CCTGCGATTAAGGCATGATG)
916 targeted a region of COX3 gene, the second primer set
917 (fw: AACAATTGGTTTATTAGGAGCAGGTATTGG, rv:
918 TATACACCGAATAATAATAAGAATGAAACC) targeted a region of ATP9 gene. The first
919 nDNA primer set (fw: CACCCTGTTCTTTTGACTGA, rv: CATAGAAGGCTGGAACGTTG)
920 targeted a region of ACT1 gene, and the other primer set (fw:
921 TGCTTTGTCAAATGGATCATATGG, rv: CCTGGAACCAAGTGAACAGTAC) targeted a
922 region of GAL1 gene.

923 **Statistical analyses**

924 Data are presented as mean \pm SEM. Sample numbers (different culture) and experimental
925 repeats are indicated in legends. Data were analyzed with the GraphPad Prism software
926 using unpaired Student's t-test, one-way ANOVA or two-way ANOVA. A 0.05 p-value was
927 considered statistically significant.

928 **AUTHOR CONTRIBUTIONS**

929 Dr Orane Lerouley performed and analyzed experiments. Dr. Benoit Pinson determined
930 the quantification of metabolites. Isabelle Larrieu managed the production of the anti Stf1
931 antibody. Dr. Marie-France Giraud did the production and purification of IF1 and Stf1 for
932 quantitative Western blot. Tom Ducrocq assisted Dr Orane Lerouley in generating and
933 validating yeast mutant strains. Dr Arnaud Mourier and Dr Marie-France Giraud co-
934 supervised the project, interpreted results and provided funding. AM administered,
935 provided funding for the project and wrote the manuscript and all authors reviewed and
936 edited the manuscript.

937

938 **ACKNOWLEDGMENTS**

939 We thank Deborah Tribouillard-Tanvier's team, Muriel Priault's team, Anne Devin's team
940 and Derek McCusker's team for sharing advice, instruments, consumables and antibodies.
941 Sabine Vaur and all members of the IBGC support team. We thank Dr Mairead Aubert for
942 English proofreading of the manuscript. We thank also Claudine David for sharing precious
943 advice and expertise and for her important support. The authors thank the staff of the SAM

944 platform from TBMCore unit (University of Bordeaux - CNRS UAR 3427 - INSERM US05)
945 for quantification of nucleotides. The HPIC chromatography station used for nucleotide
946 determination was purchased with the financial support of both SIRIC BRIO (COMUCAN)
947 and the Region Nouvelle-Aquitaine (MetabOptic 2022-24564910, AAPPF2021-2020-
948 12000110). This work was supported by grants from ANR (DynaMitoPatho ANR-22-CE14-
949 0040) and University of Bordeaux.

950 **References**

- 951 Ackerman SH, Tzagoloff A. 1990. Identification of two nuclear genes (ATP11, ATP12) required
952 for assembly of the yeast F1-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**:4986–4990.
- 953 Anselmi C, Davies KM, Faraldo-Gómez JD. 2018. Mitochondrial ATP synthase dimers
954 spontaneously associate due to a long-range membrane-induced force. *J Gen Physiol* **150**:763–770.
955 doi:10.1085/jgp.201812033
- 956 Aßkamp MR, Klein M, Nevoigt E. 2019. *Saccharomyces cerevisiae* exhibiting a modified route for
957 uptake and catabolism of glycerol forms significant amounts of ethanol from this carbon source
958 considered as ‘non-fermentable.’ *Biotechnology for Biofuels* **12**:257. doi:10.1186/s13068-019-1597-
959 2
- 960 Atkinson DE, Walton GM. 1967. Adenosine triphosphate conservation in metabolic regulation. Rat
961 liver citrate cleavage enzyme. *J Biol Chem* **242**:3239–3241.
- 962 Blum TB, Hahn A, Meier T, Davies KM, Kühlbrandt W. 2019. Dimers of mitochondrial ATP
963 synthase induce membrane curvature and self-assemble into rows. *Proceedings of the National
964 Academy of Sciences* **116**:4250–4255. doi:10.1073/pnas.1816556116
- 965 Boreikaite V, Wicky BIM, Watt IN, Clarke J, Walker JE. 2019. Extrinsic conditions influence the
966 self-association and structure of IF1, the regulatory protein of mitochondrial ATP synthase. *Proc
967 Natl Acad Sci U S A* **116**:10354–10359. doi:10.1073/pnas.1903535116
- 968 Boyer PD, Cross RL, Momsen W. 1973. A New Concept for Energy Coupling in Oxidative
969 Phosphorylation Based on a Molecular Explanation of the Oxygen Exchange Reactions. *Proc Natl
970 Acad Sci U S A* **70**:2837–2839.
- 971 Buchanan BW, Lloyd ME, Engle SM, Rubenstein EM. 2016. Cycloheximide Chase Analysis of
972 Protein Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Vis Exp* 53975. doi:10.3791/53975
- 973 Buchet K, Godinot C. 1998. Functional F1-ATPase Essential in Maintaining Growth and
974 Membrane Potential of Human Mitochondrial DNA-depleted ρ^0 Cells*. *Journal of Biological
975 Chemistry* **273**:22983–22989. doi:10.1074/jbc.273.36.22983
- 976 Cabezón E, Arechaga I, Jonathan P, Butler G, Walker JE. 2000. Dimerization of bovine F1-ATPase
977 by binding the inhibitor protein, IF1. *J Biol Chem* **275**:28353–28355. doi:10.1074/jbc.C000427200
- 978 Cabezón E, Butler PJG, Runswick MJ, Carbajo RJ, Walker JE. 2002. Homologous and
979 heterologous inhibitory effects of ATPase inhibitor proteins on F-ATPases. *J Biol Chem*
980 **277**:41334–41341. doi:10.1074/jbc.M207169200
- 981 Cabezón E, Butler PJG, Runswick MJ, Walker JE. 2000. Modulation of the Oligomerization State
982 of the Bovine F1-ATPase Inhibitor Protein, IF1, by pH*. *Journal of Biological Chemistry*
983 **275**:25460–25464. doi:10.1074/jbc.M003859200
- 984 Cabezón E, Runswick MJ, Leslie AG, Walker JE. 2001. The structure of bovine IF(1), the
985 regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase. *EMBO J* **20**:6990–6996.
986 doi:10.1093/emboj/20.24.6990
- 987 Carroll J, Watt IN, Wright CJ, Ding S, Fearnley IM, Walker JE. 2024. The inhibitor protein IF1
988 from mammalian mitochondria inhibits ATP hydrolysis but not ATP synthesis by the ATP synthase
989 complex. *Journal of Biological Chemistry* **300**. doi:10.1016/j.jbc.2024.105690
- 990 Carrozzo R, Wittig I, Santorelli FM, Bertini E, Hofmann S, Brandt U, Schägger H. 2006.
991 Subcomplexes of human ATP synthase mark mitochondrial biosynthesis disorders. *Annals of
992 Neurology* **59**:265–275. doi:10.1002/ana.20729
- 993 Ceschin J, Saint-Marc C, Laporte J, Labriet A, Philippe C, Moenner M, Daignan-Fornier B, Pinson

994 B. 2014. Identification of yeast and human 5-aminoimidazole-4-carboxamide-1- β -d-ribofuranoside
995 (AICAr) transporters. *J Biol Chem* **289**:16844–16854. doi:10.1074/jbc.M114.551192

996 Chen XJ, Clark-Walker GD. 1999. α and β subunits of F1-ATPase are required for survival of petite
997 mutants in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet* **262**:898–908. doi:10.1007/s004380051156

998 Cintrón NM, Pedersen PL. 1979. A protein inhibitor of the mitochondrial adenosine triphosphatase
999 complex of rat liver. Purification and characterization. *J Biol Chem* **254**:3439–3443.

1000 Clark-Walker GD. 2007. The F1-ATPase inhibitor Inh1 (IF1) affects suppression of mtDNA loss-
1001 lethality in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Research* **7**:665–674. doi:10.1111/j.1567-
1002 1364.2006.00201.x

1003 Corvest V, Sigalat C, Haraux F. 2007. Insight into the Bind–Lock Mechanism of the Yeast
1004 Mitochondrial ATP Synthase Inhibitory Peptide. *Biochemistry* **46**:8680–8688.
1005 doi:10.1021/bi700522v

1006 Courbon GM, Rubinstein JL. 2022. CryoEM Reveals the Complexity and Diversity of ATP
1007 Synthases. *Front Microbiol* **13**. doi:10.3389/fmicb.2022.864006

1008 Davies KM, Anselmi C, Wittig I, Faraldo-Gómez JD, Kühlbrandt W. 2012. Structure of the yeast
1009 F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S*
1010 *A* **109**:13602–13607. doi:10.1073/pnas.1204593109

1011 Devin A, Dejean L, Beauvoit B, Chevtzoff C, Avéret N, Bunoust O, Rigoulet M. 2006. Growth
1012 yield homeostasis in respiring yeast is due to a strict mitochondrial content adjustment. *J Biol Chem*
1013 **281**:26779–26784. doi:10.1074/jbc.M604800200

1014 Dienhart M, Pfeiffer K, Schägger H, Stuart RA. 2002. Formation of the Yeast F1F0-ATP Synthase
1015 Dimeric Complex Does Not Require the ATPase Inhibitor Protein, Inh1*. *Journal of Biological*
1016 *Chemistry* **277**:39289–39295. doi:10.1074/jbc.M205720200

1017 Domínguez-Zorita S, Romero-Carramiñana I, Santacatterina F, Esparza-Moltó PB, Simó C, Del-
1018 Arco A, Núñez de Arenas C, Saiz J, Barbas C, Cuezva JM. 2023. IF1 ablation prevents ATP
1019 synthase oligomerization, enhances mitochondrial ATP turnover and promotes an adenosine-
1020 mediated pro-inflammatory phenotype. *Cell Death Dis* **14**:413. doi:10.1038/s41419-023-05957-z

1021 Dupont C-H, Mazat JP, Guerin B. 1985. The role of adenine nucleotide translocation in the
1022 energization of the inner membrane of mitochondria isolated from ρ^+ and ρ_0 strains of
1023 *saccharomyces cerevisiae*. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **132**:1116–
1024 1123. doi:10.1016/0006-291X(85)91922-9

1025 Fernández-Cárdenas LP, Villanueva-Chimal E, Salinas LS, José-Núñez C, Tuena de Gómez Puyou
1026 M, Navarro RE. 2017. *Caenorhabditis elegans* ATPase inhibitor factor 1 (IF1) MAI-2 preserves the
1027 mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) and is important to induce germ cell apoptosis. *PLoS One*
1028 **12**:e0181984. doi:10.1371/journal.pone.0181984

1029 Galber C, Carissimi S, Baracca A, Giorgio V. 2021. The ATP Synthase Deficiency in Human
1030 Diseases. *Life (Basel)* **11**:325. doi:10.3390/life11040325

1031 Galkina KV, Zubareva VM, Kashko ND, Lapashina AS, Markova OV, Feniouk BA, Knorre DA.
1032 2022. Heterogeneity of Starved Yeast Cells in IF1 Levels Suggests the Role of This Protein in vivo.
1033 *Front Microbiol* **13**:816622. doi:10.3389/fmicb.2022.816622

1034 García-Bermúdez J, Sánchez-Aragó M, Soldevilla B, Del Arco A, Nuevo-Tapióles C, Cuezva JM.
1035 2015. PKA Phosphorylates the ATPase Inhibitory Factor 1 and Inactivates Its Capacity to Bind and
1036 Inhibit the Mitochondrial H(+)-ATP Synthase. *Cell Rep* **12**:2143–2155.
1037 doi:10.1016/j.celrep.2015.08.052

1038 Gatto C, Grandi M, Solaini G, Baracca A, Giorgio V. 2022. The F1Fo-ATPase inhibitor protein IF1
1039 in pathophysiology. *Front Physiol* **13**:917203. doi:10.3389/fphys.2022.917203

1040 Giraud M-F, Velours J. 1997. The Absence of the Mitochondrial ATP Synthase α Subunit
1041 Promotes a Slow Growth Phenotype of Rho– Yeast Cells by a Lack of Assembly of the Catalytic
1042 Sector F1. *European Journal of Biochemistry* **245**:813–818. doi:10.1111/j.1432-1033.1997.00813.x

1043 Gu J, Zhang L, Zong S, Guo R, Liu T, Yi J, Wang P, Zhuo W, Yang M. 2019. Cryo-EM structure
1044 of the mammalian ATP synthase tetramer bound with inhibitory protein IF1. *Science* **364**:1068–
1045 1075. doi:10.1126/science.aaw4852

1046 Guérin B, Labbe P, Somlo M. 1979. [19] Preparation of yeast mitochondria (*Saccharomyces*
1047 *cerevisiae*) with good P/O and respiratory control ratios *Methods in Enzymology, Biomembranes*

1048 Part F: Bioenergetics: Oxidative Phosphorylation. Academic Press. pp. 149–159. doi:10.1016/0076-
1049 6879(79)55021-6

1050 Hahn A, Parey K, Bublitz M, Mills DJ, Zickermann V, Vonck J, Kühlbrandt W, Meier T. 2016.
1051 Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial
1052 Membrane Morphology. *Mol Cell* **63**:445–456. doi:10.1016/j.molcel.2016.05.037

1053 Hahn A, Vonck J, Mills DJ, Meier T, Kühlbrandt W. 2018. Structure, mechanism, and regulation of
1054 the chloroplast ATP synthase. *Science* **360**:eaat4318. doi:10.1126/science.aat4318

1055 Hashimoto T, Negawa Y, Tagawa K. 1981. Binding of intrinsic ATPase inhibitor to mitochondrial
1056 ATPase--stoichiometry of binding of nucleotides, inhibitor, and enzyme. *J Biochem* **90**:1151–1157.
1057 doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133567

1058 Hashimoto T, Yoshida Y, Tagawa K. 1990. Simultaneous bindings of ATPase inhibitor and 9K
1059 protein to F1F0-ATPase in the presence of 15K protein in yeast mitochondria. *J Biochem* **108**:17–
1060 20. doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123154

1061 Hashimoto T, Yoshida Y, Tagawa K. 1987. Binding properties of 9K protein to F1-ATPase: a
1062 counterpart ligand to the ATPase inhibitor. *J Biochem* **102**:685–692.
1063 doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a122106

1064 Hashimoto T, Yoshida Y, Tagawa K. 1984. Purification and properties of factors in yeast
1065 mitochondria stabilizing the F1F0-ATPase-inhibitor complex. *J Biochem* **95**:131–136.
1066 doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134576

1067 He J, Ford HC, Carroll J, Douglas C, Gonzales E, Ding S, Fearnley IM, Walker JE. 2018. Assembly
1068 of the membrane domain of ATP synthase in human mitochondria. *Proceedings of the National
1069 Academy of Sciences* **115**:2988–2993. doi:10.1073/pnas.1722086115

1070 Hong S, Pedersen PL. 2002. ATP synthase of yeast: structural insight into the different inhibitory
1071 potencies of two regulatory peptides and identification of a new potential regulator. *Archives of
1072 Biochemistry and Biophysics* **405**:38–43. doi:10.1016/S0003-9861(02)00303-X

1073 Ichikawa N, Ogura C. 2003. Overexpression, purification, and characterization of human and
1074 bovine mitochondrial ATPase inhibitors: comparison of the properties of mammalian and yeast
1075 ATPase inhibitors. *J Bioenerg Biomembr* **35**:399–407. doi:10.1023/a:1027383629565

1076 Ichikawa N, Yoshida Y, Hashimoto T, Ogasawara N, Yoshikawa H, Imamoto F, Tagawa K. 1990.
1077 Activation of ATP hydrolysis by an uncoupler in mutant mitochondria lacking an intrinsic ATPase
1078 inhibitor in yeast. *Journal of Biological Chemistry* **265**:6274–6278. doi:10.1016/S0021-
1079 9258(19)39321-4

1080 Jansch L, Kruff V, Schmitz UK, Braun HP. 1996. New insights into the composition, molecular
1081 mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *Plant J* **9**:357–368.
1082 doi:10.1046/j.1365-313x.1996.09030357.x

1083 Kominsky DJ, Brownson MP, Updike DL, Thorsness PE. 2002. Genetic and Biochemical Basis for
1084 Viability of Yeast Lacking Mitochondrial Genomes. *Genetics* **162**:1595–1604.
1085 doi:10.1093/genetics/162.4.1595

1086 Kováčová V, Irmleřová J, Kovác L. 1968. Oxidative phosphorylation in yeast. IV. Combination of
1087 a nuclear mutation affecting oxidative phosphorylation with cytoplasmic mutation to respiratory
1088 deficiency. *Biochim Biophys Acta* **162**:157–163. doi:10.1016/0005-2728(68)90097-2

1089 Kühlbrandt W. 2019. Structure and Mechanisms of F-Type ATP Synthases. *Annu Rev Biochem*
1090 **88**:515–549. doi:10.1146/annurev-biochem-013118-110903

1091 Larrieu I, Tolchard J, Sanchez C, Kone EY, Barras A, Stines-Chaumeil C, Odaert B, Giraud M-F.
1092 2017. Cell-Free Expression for the Study of Hydrophobic Proteins: The Example of Yeast ATP-
1093 Synthase Subunits In: Lacapere J-J, editor. Membrane Protein Structure and Function
1094 Characterization: Methods and Protocols. New York, NY: Springer. pp. 57–90. doi:10.1007/978-1-
1095 4939-7151-0_4

1096 Lau WCY, Baker LA, Rubinstein JL. 2008. Cryo-EM structure of the yeast ATP synthase. *J Mol
1097 Biol* **382**:1256–1264. doi:10.1016/j.jmb.2008.08.014

1098 Le Breton N, Adrianaivomananjaona T, Gerbaud G, Etienne E, Bisetto E, Dautant A, Guigliarelli B,
1099 Haraux F, Martinho M, Belle V. 2016. Dimerization interface and dynamic properties of yeast IF1
1100 revealed by Site-Directed Spin Labeling EPR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* **1857**:89–97.
1101 doi:10.1016/j.bbabbio.2015.10.010

1102 Li L, Carrie C, Nelson C, Whelan J, Millar AH. 2012. Accumulation of newly synthesized F1 in
1103 vivo in arabidopsis mitochondria provides evidence for modular assembly of the plant F1Fo ATP
1104 synthase. *J Biol Chem* **287**:25749–25757. doi:10.1074/jbc.M112.373506

1105 Liu Siqi, Liu Shanshan, He B, Li Lanlan, Li Lin, Wang J, Cai T, Chen S, Jiang H. 2021. OXPHOS
1106 deficiency activates global adaptation pathways to maintain mitochondrial membrane potential.
1107 *EMBO reports* **22**:e51606. doi:10.15252/embr.202051606

1108 Lucero R-A, Mercedes E-P, Thorsten L, Giovanni G-C, Michael F, Guadalupe Z, Pablo PJ,
1109 Federico M, Oscar F-H. 2021. Deletion of the natural inhibitory protein Inh1 in *Ustilago maydis* has
1110 no effect on the dimeric state of the F1FO-ATP synthase but increases the ATPase activity and
1111 reduces the stability. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1862**:148429.
1112 doi:10.1016/j.bbabi.2021.148429

1113 Matsubara H, Hase T, Hashimoto T, Tagawa K. 1981. Amino acid sequence of an intrinsic inhibitor
1114 of mitochondrial ATPase from yeast. *J Biochem* **90**:1159–1165.
1115 doi:10.1093/oxfordjournals.jbchem.a133568

1116 Mitchell P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-
1117 osmotic type of mechanism. *Nature* **191**:144–148. doi:10.1038/191144a0

1118 Molinié T, Cougouilles E, David C, Cahoreau E, Portais J-C, Mourier A. 2022. MDH2 produced
1119 OAA is a metabolic switch rewiring the fuelling of respiratory chain and TCA cycle. *Biochim*
1120 *Biophys Acta Bioenerg* **1863**:148532. doi:10.1016/j.bbabi.2022.148532

1121 Mourier A, Devin A, Rigoulet M. 2010. Active proton leak in mitochondria: a new way to regulate
1122 substrate oxidation. *Biochim Biophys Acta* **1797**:255–261. doi:10.1016/j.bbabi.2009.10.011

1123 Mourier A, Ruzzenente B, Brandt T, Kühlbrandt W, Larsson N-G. 2014. Loss of LRPPRC causes
1124 ATP synthase deficiency. *Hum Mol Genet* **23**:2580–2592. doi:10.1093/hmg/ddt652

1125 Mühleip A, Kock Flygaard R, Ovcariikova J, Lacombe A, Fernandes P, Sheiner L, Amunts A.
1126 2021. ATP synthase hexamer assemblies shape cristae of Toxoplasma mitochondria. *Nat Commun*
1127 **12**:120. doi:10.1038/s41467-020-20381-z

1128 Nakamura J, Fujikawa M, Yoshida M. 2013. IF1, a natural inhibitor of mitochondrial ATP
1129 synthase, is not essential for the normal growth and breeding of mice. *Biosci Rep* **33**:e00067.
1130 doi:10.1042/BSR20130078

1131 Nijtmans LGJ, Klement P, Houštěk J, van den Bogert C. 1995. Assembly of mitochondrial ATP
1132 synthase in cultured human cells: implications for mitochondrial diseases. *Biochimica et Biophysica*
1133 *Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* **1272**:190–198. doi:10.1016/0925-4439(95)00087-9

1134 Norling B, Tourikas C, Hamasur B, Glaser E. 1990. Evidence for an endogenous ATPase inhibitor
1135 protein in plant mitochondria. Purification and characterization. *Eur J Biochem* **188**:247–252.
1136 doi:10.1111/j.1432-1033.1990.tb15396.x

1137 Paul M-F, Velours J, ARSELIN de CHATEAUBODEAU G, Aigle M, Guerin B. 1989. The role of
1138 subunit 4, a nuclear-encoded protein of the F0 sector of yeast mitochondrial ATP synthase, in the
1139 assembly of the whole complex. *European Journal of Biochemistry* **185**:163–171.
1140 doi:10.1111/j.1432-1033.1989.tb15098.x

1141 Pietrobon D, Zoratti M, Azzone GF. 1983. Molecular slipping in redox and ATPase H⁺ pumps.
1142 *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **723**:317–321. doi:10.1016/0005-
1143 2728(83)90131-7

1144 Pinke G, Zhou L, Sazanov LA. 2020. Cryo-EM structure of the entire mammalian F-type ATP
1145 synthase. *Nat Struct Mol Biol* **27**:1077–1085. doi:10.1038/s41594-020-0503-8

1146 Pinson B, Moenner M, Saint-Marc C, Granger-Farbos A, Daignan-Fornier B. 2023. On-demand
1147 utilization of phosphoribosyl pyrophosphate by downstream anabolic pathways. *J Biol Chem*
1148 **299**:105011. doi:10.1016/j.jbc.2023.105011

1149 Pullman ME, Monroy GC. 1963. A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine
1150 Triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry* **238**:3762–3769. doi:10.1016/S0021-
1151 9258(19)75338-1

1152 Robinson GC, Bason JV, Montgomery MG, Fearnley IM, Mueller DM, Leslie AGW, Walker JE.
1153 2013. The structure of F1-ATPase from *Saccharomyces cerevisiae* inhibited by its regulatory
1154 protein IF1. *Open Biology* **3**:120164. doi:10.1098/rsob.120164

1155 Romero-Carramiñana I, Esparza-Moltó PB, Domínguez-Zorita S, Nuevo-Tapióles C, Cuezva JM.

1156 2023. IF1 promotes oligomeric assemblies of sluggish ATP synthase and outlines the heterogeneity
1157 of the mitochondrial membrane potential. *Commun Biol* **6**:1–16. doi:10.1038/s42003-023-05214-1
1158 Rouslin W, Broge CW. 1996. IF1 function in situ in uncoupler-challenged ischemic rabbit, rat, and
1159 pigeon hearts. *J Biol Chem* **271**:23638–23641. doi:10.1074/jbc.271.39.23638
1160 Sánchez-Aragó M, Formentini L, Martínez-Reyes I, García-Bermudez J, Santacatterina F, Sánchez-
1161 Cenizo L, Willers IM, Aldea M, Nájera L, Juarrán A, López EC, Clofent J, Navarro C, Espinosa E,
1162 Cuezva JM. 2013. Expression, regulation and clinical relevance of the ATPase inhibitory factor 1 in
1163 human cancers. *Oncogenesis* **2**:e46. doi:10.1038/oncsis.2013.9
1164 Sánchez-Cenizo L, Formentini L, Aldea M, Ortega AD, García-Huerta P, Sánchez-Aragó M,
1165 Cuezva JM. 2010. Up-regulation of the ATPase inhibitory factor 1 (IF1) of the mitochondrial H⁺-
1166 ATP synthase in human tumors mediates the metabolic shift of cancer cells to a Warburg
1167 phenotype. *J Biol Chem* **285**:25308–25313. doi:10.1074/jbc.M110.146480
1168 Schägger H, von Jagow G. 1987. Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel
1169 electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Analytical*
1170 *Biochemistry* **166**:368–379. doi:10.1016/0003-2697(87)90587-2
1171 Senior AE. 1988. ATP synthesis by oxidative phosphorylation. *Physiological Reviews* **68**:177–231.
1172 doi:10.1152/physrev.1988.68.1.177
1173 Sgarbi G, Barbato S, Costanzini A, Solaini G, Baracca A. 2018. The role of the ATPase inhibitor
1174 factor 1 (IF1) in cancer cells adaptation to hypoxia and anoxia. *Biochimica et Biophysica Acta*
1175 *(BBA) - Bioenergetics* **1859**:99–109. doi:10.1016/j.bbabi.2017.10.007
1176 Sinha SD, Wideman JG. 2023. The persistent homology of mitochondrial ATP synthases. *iScience*
1177 **26**:106700. doi:10.1016/j.isci.2023.106700
1178 Sprague GF. 1977. Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant deficient in
1179 pyruvate kinase activity. *J Bacteriol* **130**:232–241.
1180 Stock D, Leslie AGW, Walker JE. 1999. Molecular Architecture of the Rotary Motor in ATP
1181 Synthase. *Science* **286**:1700–1705. doi:10.1126/science.286.5445.1700
1182 Subík J, Kolarov J, Kovác L. 1972. Obligatory requirement of intramitochondrial ATP for normal
1183 functioning of the eucaryotic cell. *Biochem Biophys Res Commun* **49**:192–198. doi:10.1016/0006-
1184 291x(72)90028-9
1185 Tzagoloff A. 1969. Assembly of the mitochondrial membrane system. II. Synthesis of the
1186 mitochondrial adenosine triphosphatase. F1. *J Biol Chem* **244**:5027–5033.
1187 Tzagoloff A, Akai A, Needleman R. 1975. Assembly of the mitochondrial membrane system.
1188 Characterization of nuclear mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with defects in mitochondrial
1189 ATPase and respiratory enzymes. *Journal of Biological Chemistry* **250**:8228–8235.
1190 doi:10.1016/S0021-9258(19)40840-5
1191 Vaillier J, Arselin G, Graves P-V, Camougrand N, Velours J. 1999. Isolation of Supernumerary
1192 Yeast ATP Synthase Subunits e and i: CHARACTERIZATION OF SUBUNIT i AND
1193 DISRUPTION OF ITS STRUCTURAL GENE ATP18 *. *Journal of Biological Chemistry*
1194 **274**:543–548. doi:10.1074/jbc.274.1.543
1195 Venard R, Brêthes D, Giraud M-F, Vaillier J, Velours J, Haraux F. 2003. Investigation of the Role
1196 and Mechanism of IF1 and STF1 Proteins, Twin Inhibitory Peptides Which Interact with the Yeast
1197 Mitochondrial ATP Synthase. *Biochemistry* **42**:7626–7636. doi:10.1021/bi034394t
1198 Wagner K, Perschil I, Fichter CD, van der Laan M. 2010. Stepwise assembly of dimeric F(1)F(o)-
1199 ATP synthase in mitochondria involves the small F(o)-subunits k and i. *Mol Biol Cell* **21**:1494–
1200 1504. doi:10.1091/mbc.e09-12-1023
1201 Watt IN, Montgomery MG, Runswick MJ, Leslie AGW, Walker JE. 2010. Bioenergetic cost of
1202 making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria. *Proceedings of the National*
1203 *Academy of Sciences* **107**:16823–16827. doi:10.1073/pnas.1011099107
1204 Weissert V, Rieger B, Morris S, Arroum T, Psathaki OE, Zobel T, Perkins G, Busch KB. 2021.
1205 Inhibition of the mitochondrial ATPase function by IF1 changes the spatiotemporal organization of
1206 ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* **1862**:148322.
1207 doi:10.1016/j.bbabi.2020.148322
1208 Wittig I, Carozzo R, Santorelli FM, Schägger H. 2006. Supercomplexes and subcomplexes of
1209 mitochondrial oxidative phosphorylation. *Biochim Biophys Acta* **1757**:1066–1072.

1210 doi:10.1016/j.bbablo.2006.05.006
1211 Wittig I, Karas M, Schagger H. 2007. High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel
1212 Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complexes*. *Molecular &*
1213 *Cellular Proteomics* **6**:1215–1225. doi:10.1074/mcp.M700076-MCP200
1214 Wittig I, Meyer B, Heide H, Steger M, Bleier L, Wumaier Z, Karas M, Schagger H. 2010.
1215 Assembly and oligomerization of human ATP synthase lacking mitochondrial subunits a and A6L.
1216 *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 16th European Bioenergetics Conference
1217 2010 **1797**:1004–1011. doi:10.1016/j.bbablo.2010.02.021
1218 Xiberras J, Klein M, Nevoigt E. 2019. Glycerol as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* based
1219 bioprocesses – Knowledge gaps regarding the central carbon catabolism of this ‘non-fermentable’
1220 carbon source. *Biotechnology Advances*, Microbial Engineering Biotechnologies **37**:107378.
1221 doi:10.1016/j.biotechadv.2019.03.017
1222 Yang J-H, Williams D, Kandiah E, Fromme P, Chiu P-L. 2020. Structural basis of redox
1223 modulation on chloroplast ATP synthase. *Commun Biol* **3**:1–12. doi:10.1038/s42003-020-01221-8
1224

Figure 1

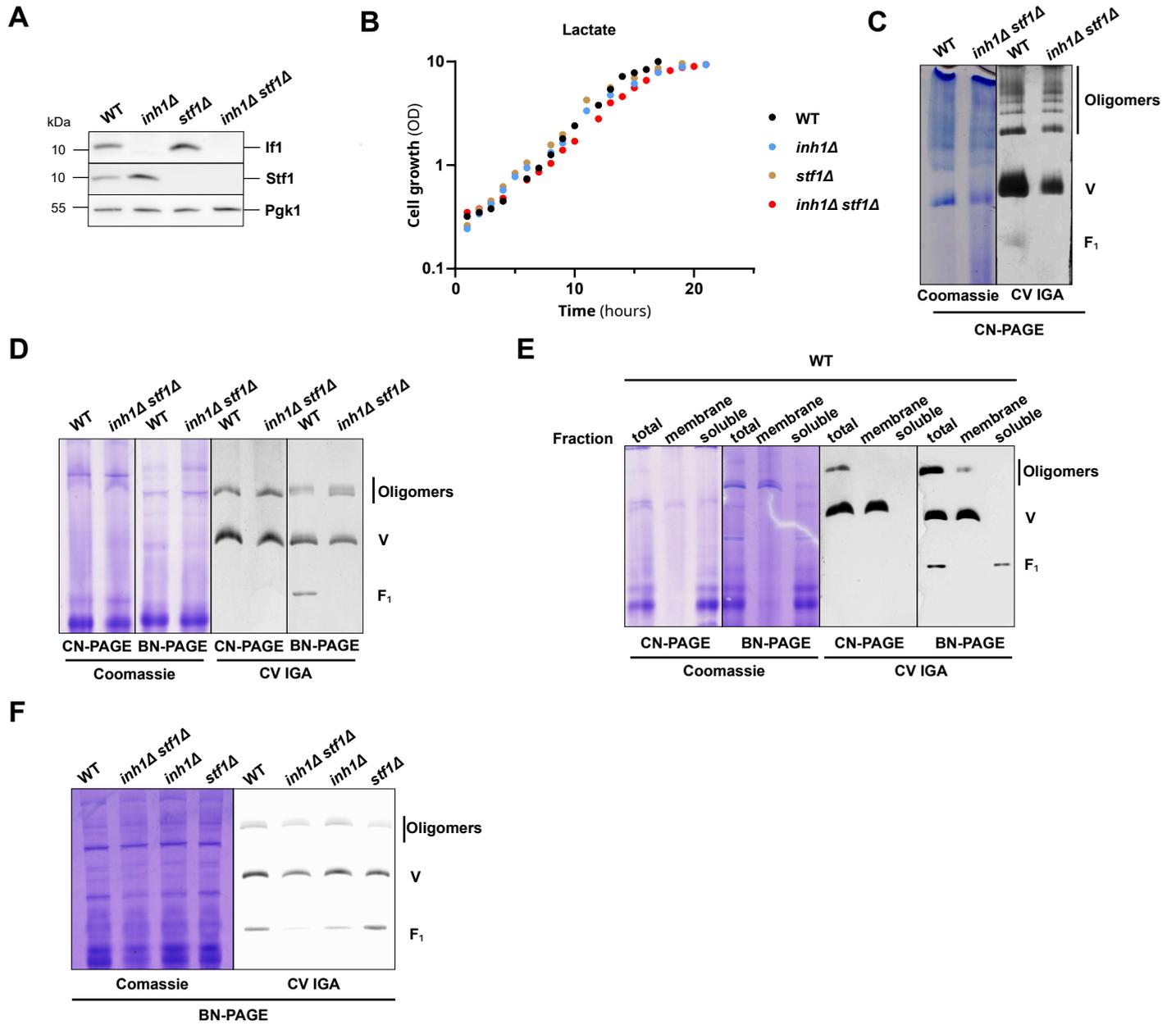


Figure 2

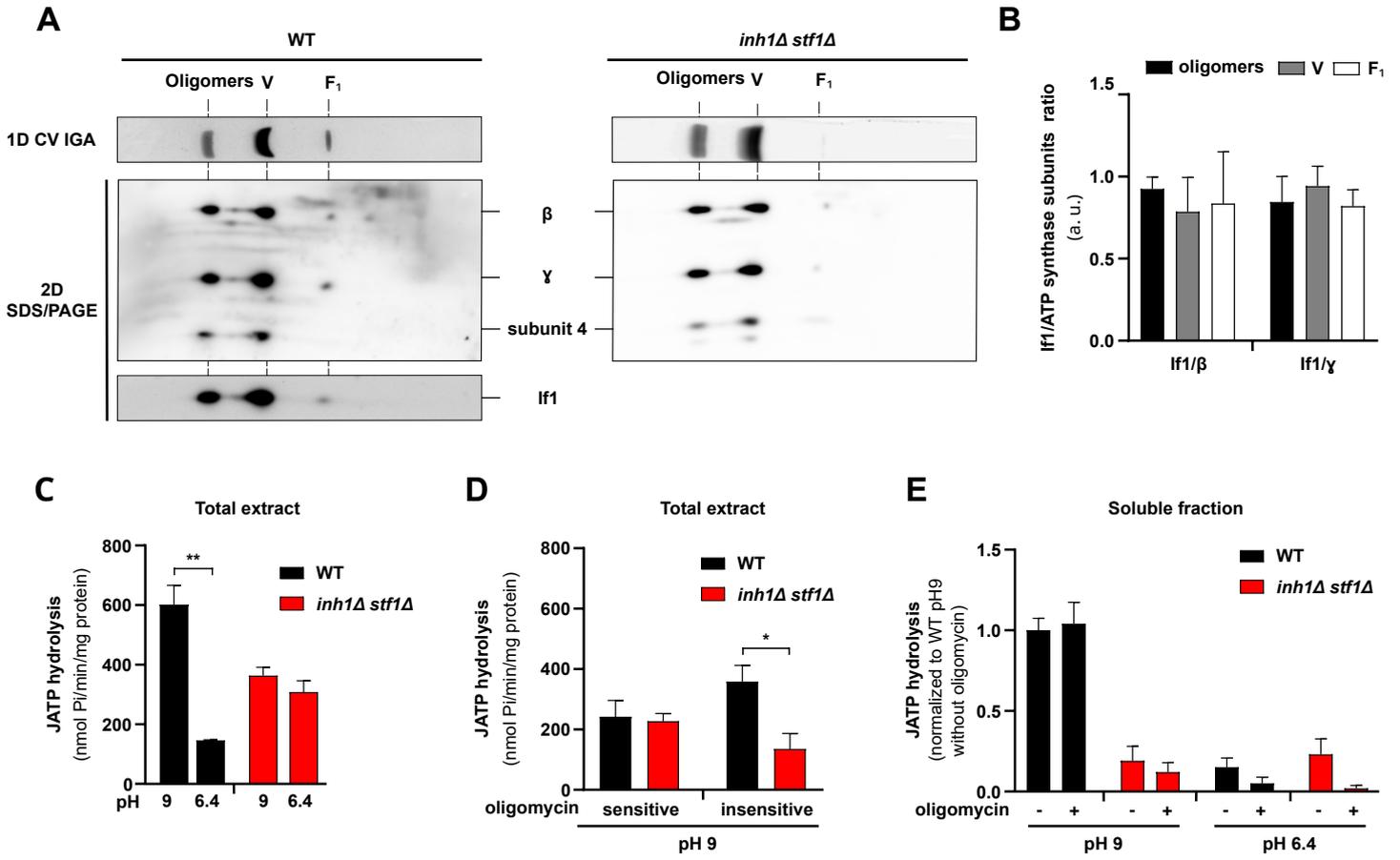


Figure 3

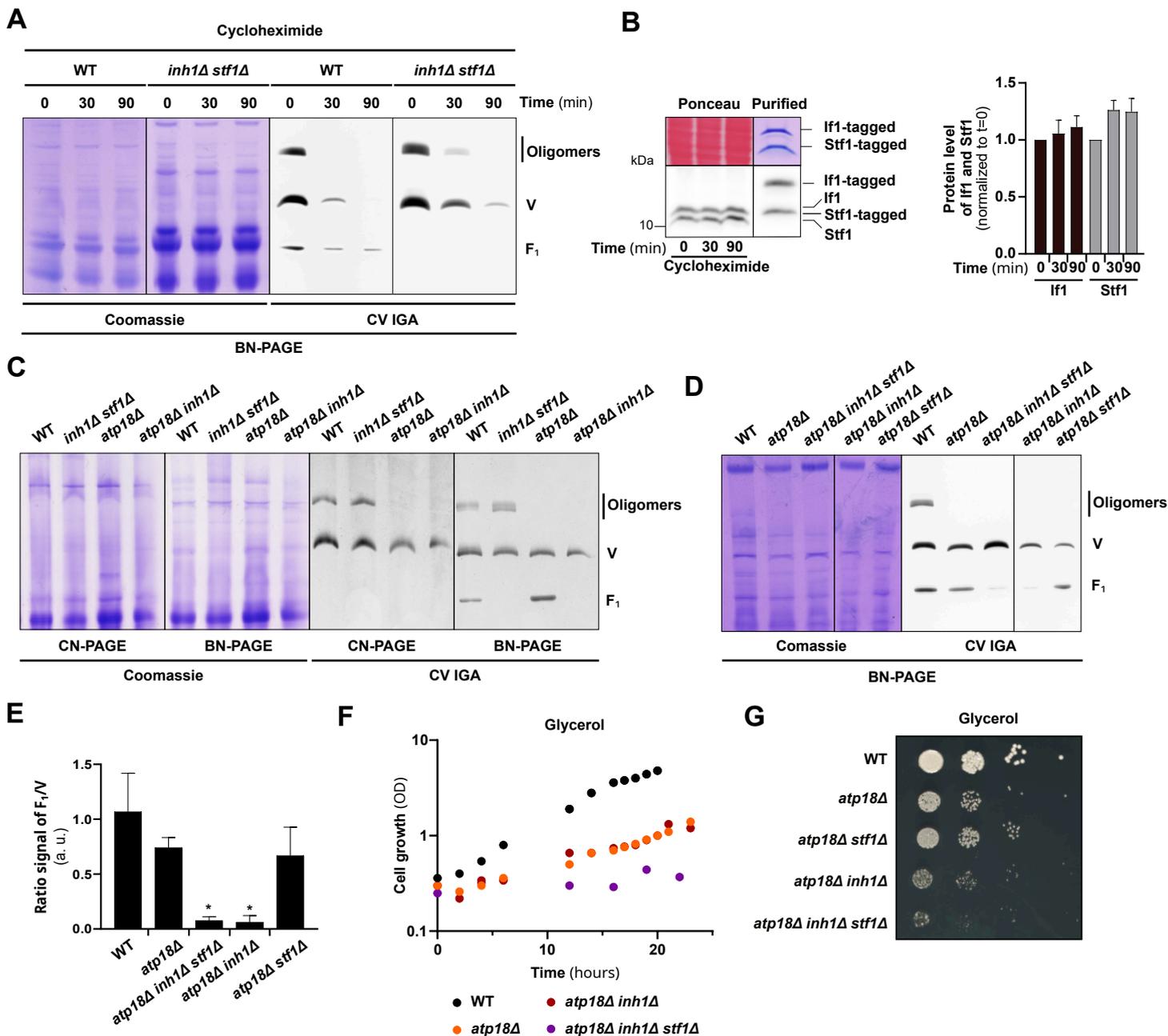
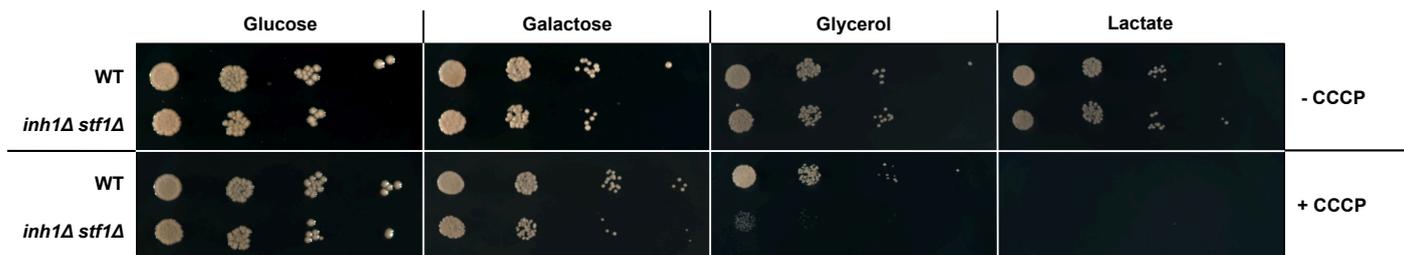
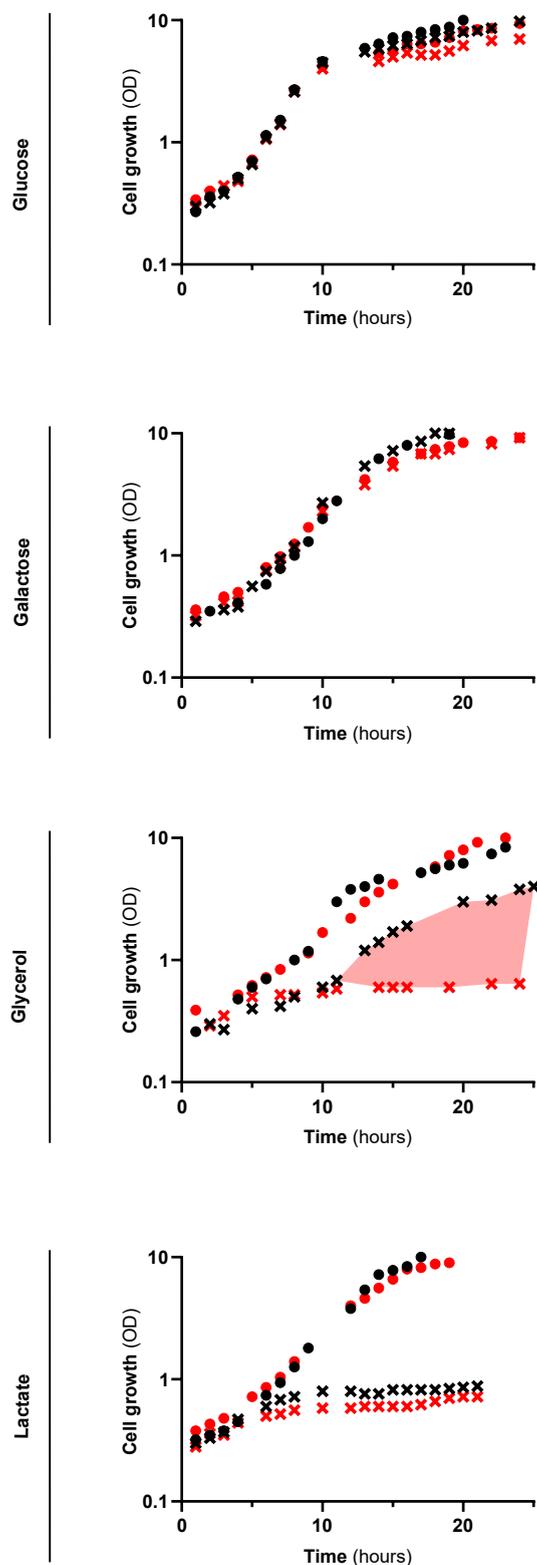


Figure 4

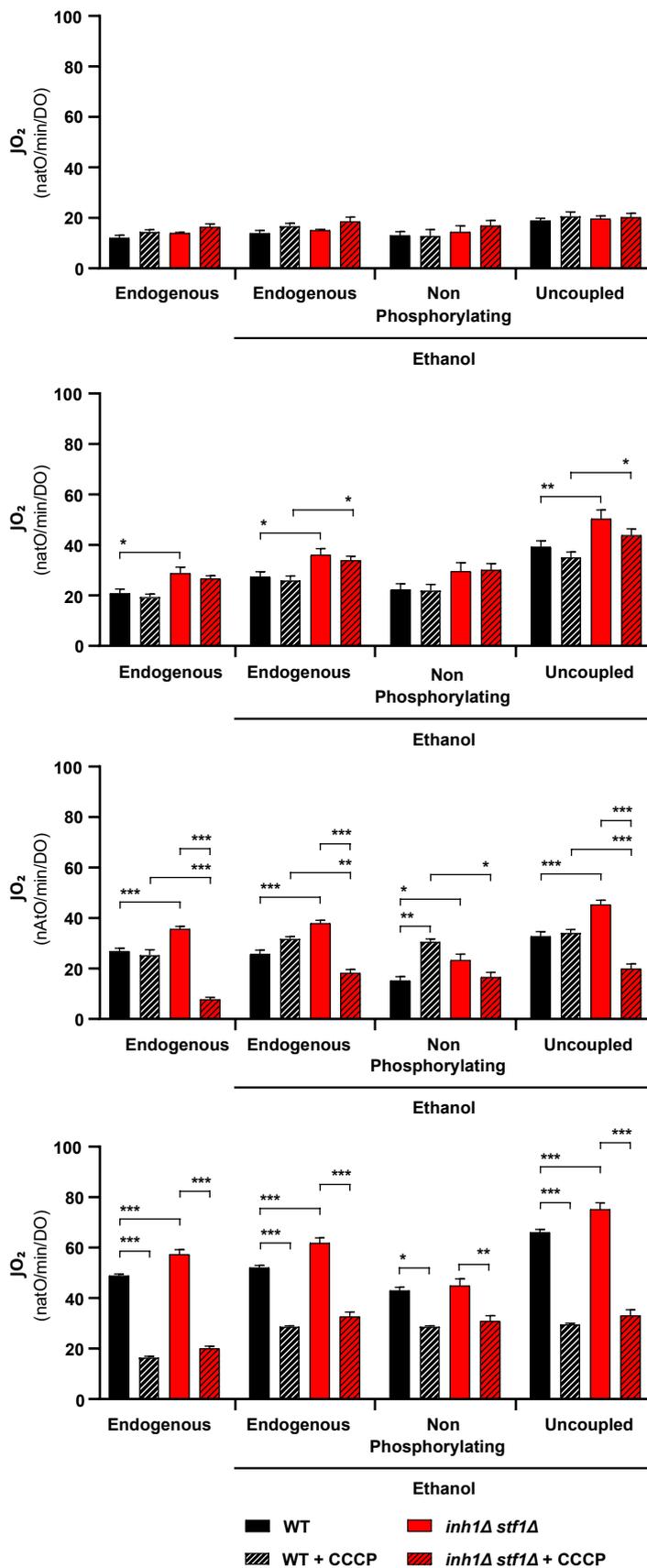
A



B



C



● WT ● *inh1Δ stf1Δ*
 × WT + CCCP × *inh1Δ stf1Δ* + CCCP

■ WT ■ *inh1Δ stf1Δ*
 ▨ WT + CCCP ▨ *inh1Δ stf1Δ* + CCCP

Figure 5

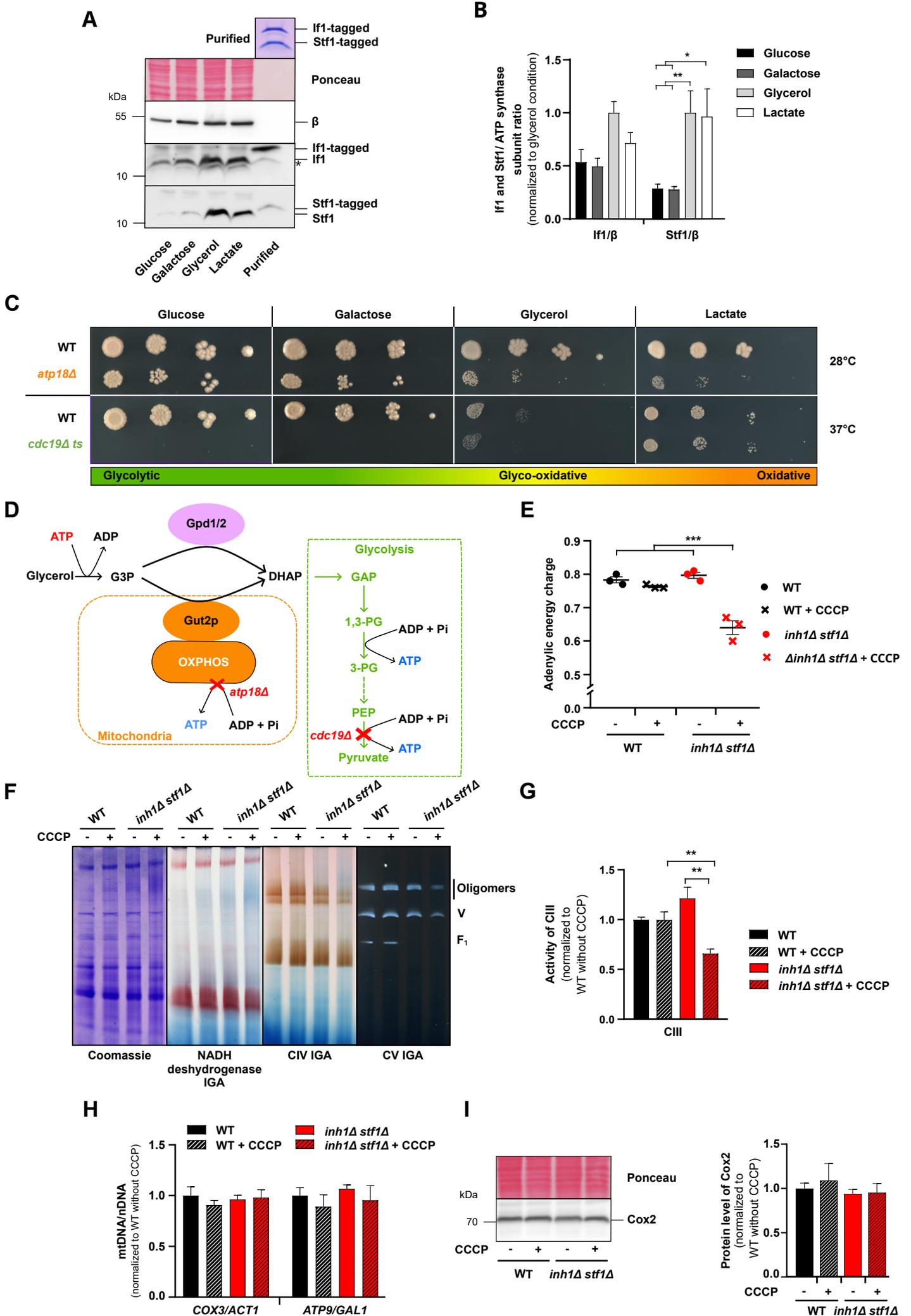
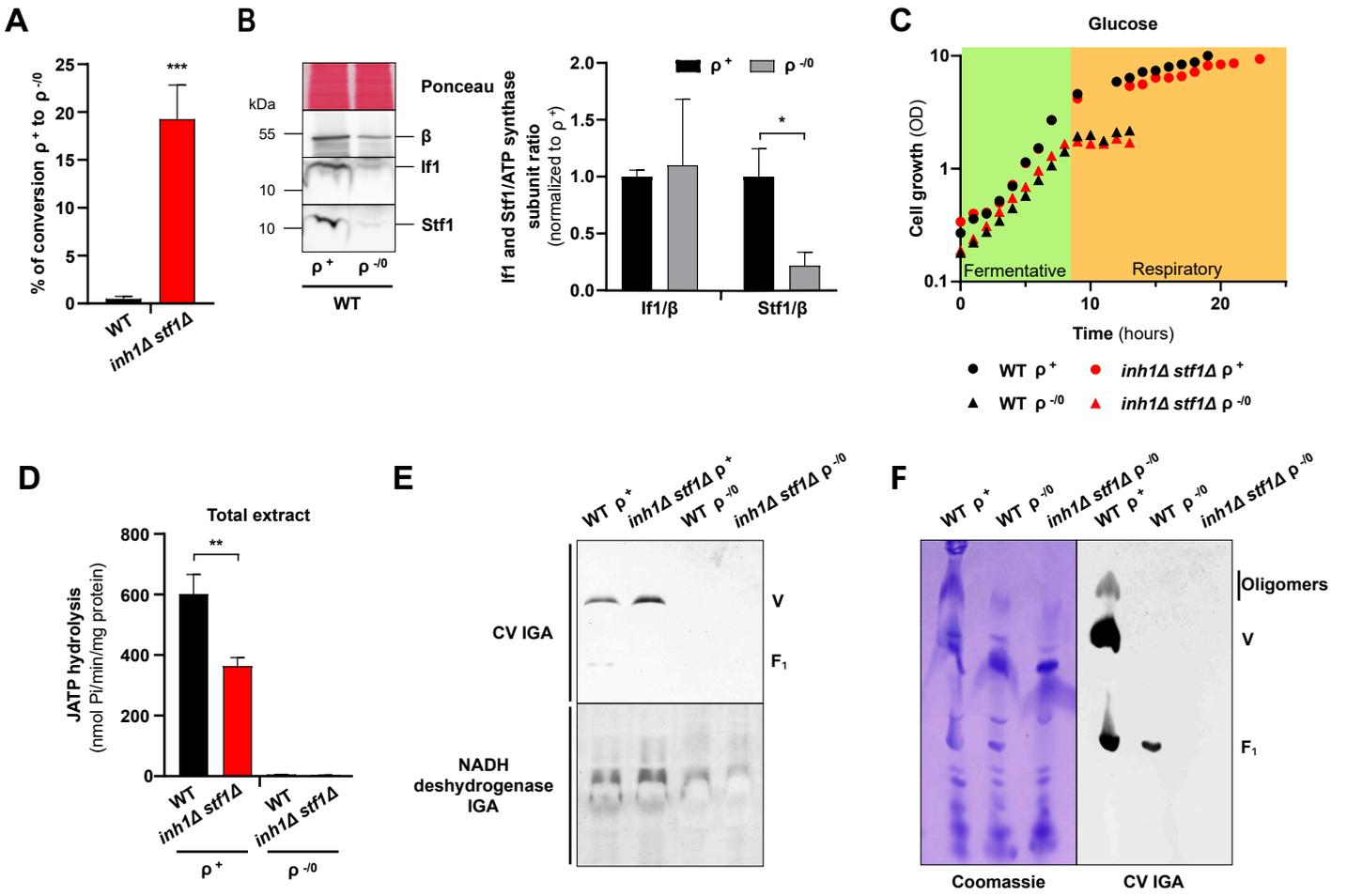
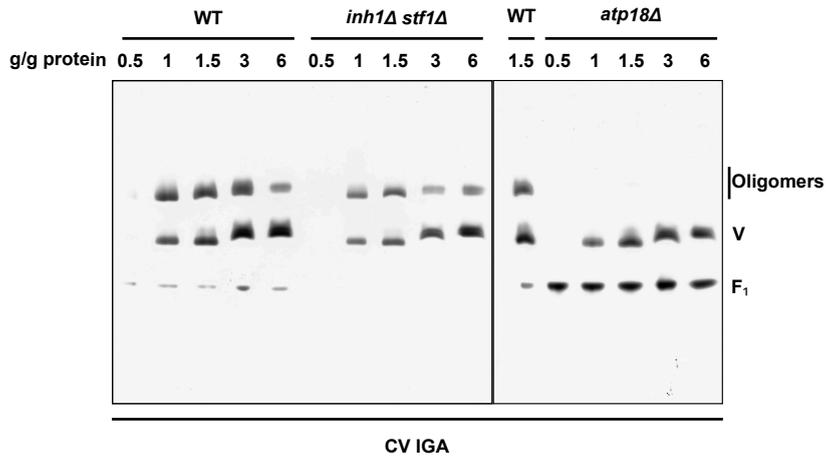


Figure 6

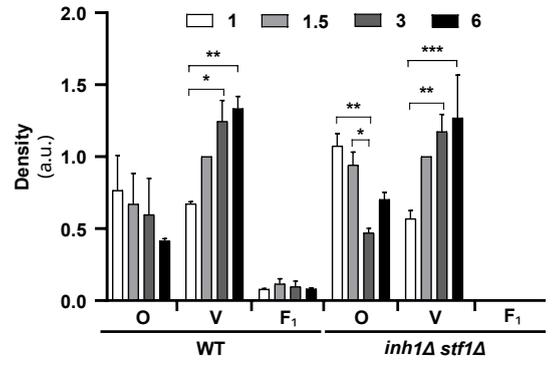


Supplemental Figure 1

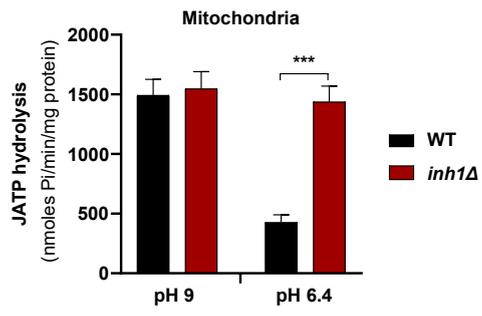
S1A



S1B

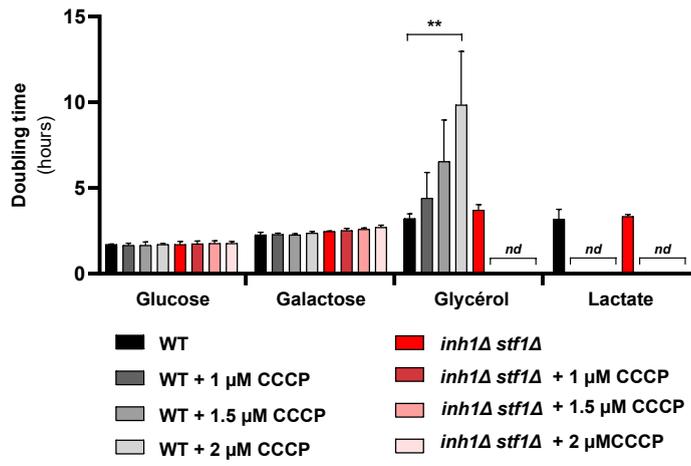


S3A

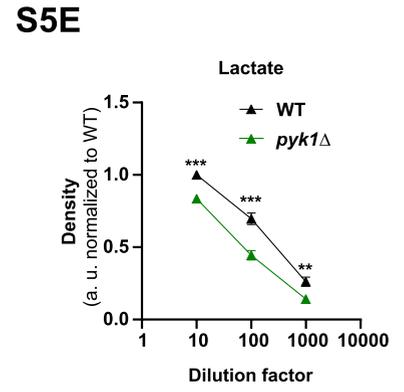
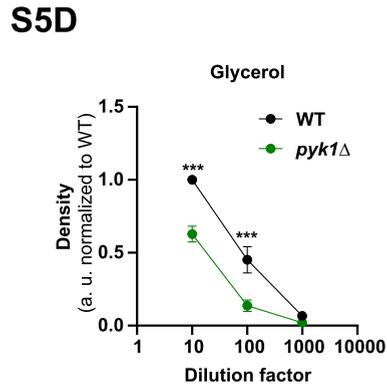
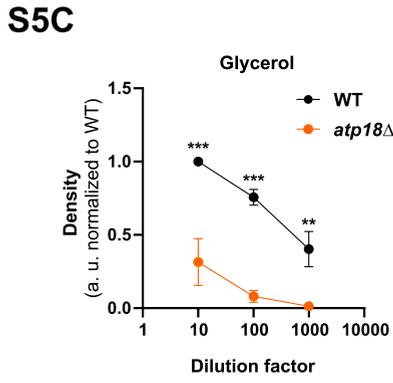
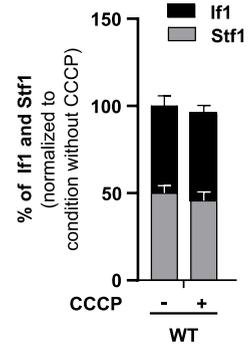
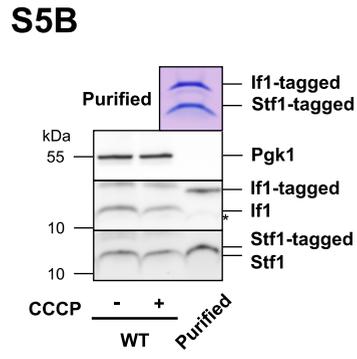
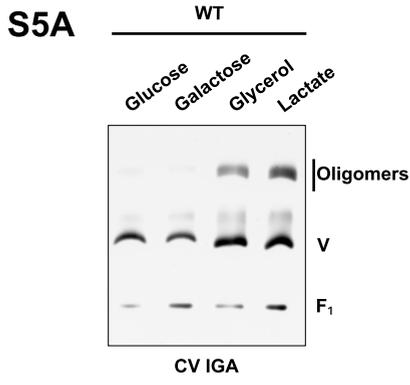


Supplemental Figure 4

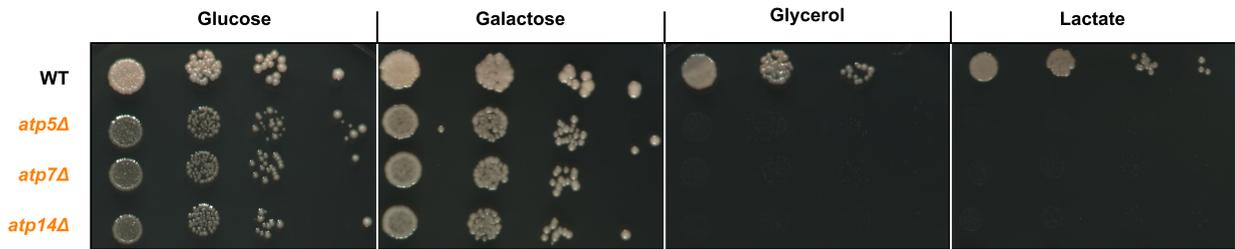
S4A



Supplemental Figure 5



S5F



1. Les inhibiteurs IF1/STF1 ne sont pas nécessaires à l'oligomérisation de l'ATP synthase

L'importance du pH sur l'activité d'IF1 (actif à pH 6,8 et inactif à pH 8,0) a été mise en évidence dès sa découverte dans les extraits de cœur de bœuf par Pullman et Monroy en 1963 (Pullman and Monroy, 1963). En 2000, Cabezon et ses collègues ont démontré *in vitro* que l'IF1 de bœuf peut s'oligomériser en fonction du pH (Cabezon et al., 2000). Le dimère antiparallèle d'IF1 est actif à un pH inférieur à 6,5, tandis qu'à un pH supérieur à 6,5, IF1 s'inactive progressivement en adoptant une structure tétramérique. Par la suite, la même équipe a mis en évidence toujours *in vitro* que le dimère d'IF1 peut, de par ses régions N-terminales inhibitrices en opposition, lier deux F1 libres d'ATP synthase (Cabezón et al., 2000). Cette capacité des dimères d'IF1 à lier simultanément deux domaines F1 a rapidement amené l'hypothèse que ces dimères pourraient stabiliser l'organisation supramoléculaire de l'ATP synthase. Cependant, deux ans plus tard, Tomasetig *et al.* ont montré, à partir de particules submitochondriales et d'extraits mitochondriaux de cœur de bœuf, que la modulation du contenu d'IF1 n'avait aucune incidence sur le rapport monomère/dimère d'ATP synthase (Tomasetig et al., 2002). Inversement, une étude a mis en évidence, à partir de particules submitochondriales de foie de rat et de cœur de bœuf, que la suppression d'IF1 diminuait le rapport dimère/monomère d'ATP synthase, soutenant la possibilité qu'IF1 participe à la stabilisation du dimère (García et al., 2006). Néanmoins, en se basant sur les structures d'ATP synthase dimériques de bœuf ou de levure obtenues par cryo-ME et cristallographie, la distance entre les deux F1 composant le dimère d'ATP synthase est trop importante, et donc incompatible avec la longueur d'un dimère d'IF1 permettant un pontage (H. Guo et al., 2017; Hahn et al., 2016). A ce stade, la communauté scientifique conçoit que le dimère d'IF1 de bœuf soit capable de lier deux F1 libres mais son rôle dans la dimérisation de l'ATP synthase reste débattue. Récemment, des structures d'ATP synthase tétramérique chez le bœuf et le porc ont été résolues et montrent deux dimères d'IF1 liés aux secteurs F1 de dimères adjacents à l'état d'inhibition, suggérant qu'IF1 stabilise le tétramère d'ATP synthase (Gu et al., 2019; Pinke et al., 2020). En parallèle, il a été démontré que l'oligomérisation de l'ATP synthase, localisée au sommet des crêtes mitochondriales, participe activement à leurs formations et, par conséquent, augmenterait indirectement le rendement des OXPHOS (Paumard et al., 2002; Stoldt et al., 2018). Il a été observé par microscopie électronique sur des cellules humaines,

que la surexpression ou l'absence d'IF1 augmentait ou diminuait, respectivement, le pourcentage du volume mitochondrial occupé par les crêtes mitochondriales via la dimérisation de l'ATP synthase (Campanella et al., 2008; Faccenda et al., 2017). Cependant, conceptuellement les incidences fonctionnelles attribuées à la stabilisation des oligomères d'ATP synthase par IF1 sont multiples et souvent contradictoires, pour certains cela permettrait indirectement d'augmenter le rendement des OXPHOS et pour d'autres cela inhiberait l'activité de synthèse de l'ATP synthase. Chez la levure, seule la structure du dimère d'ATP synthase a été résolue (Hahn et al., 2016) ce qui ne permet pas de mettre en évidence l'implication d'IF1 dans la formation ou la stabilité des tétramères et autres oligomères de haut poids moléculaire d'ATP synthase de levure.

Les analyses structurales par électrophorèse en conditions natives, que j'ai réalisées à partir de mitochondries isolées de levure, confirment et renforcent les résultats de Dienhart et ses collègues, qui indiquent que la perte d'IF1/STF1 n'affecte pas la dimérisation de l'ATP synthase chez la levure (Figure 1C) (Dienhart et al., 2002). De plus, mes résultats montrent pour la première fois qu'IF1/STF1 ne sont pas essentiels pour la formation des oligomères de plus haut poids moléculaire chez la levure (Figure 1C). Par conséquent, l'IF1 de levure et de mammifère diffère par leur importance dans l'oligomérisation de l'ATP synthase. C'est en cohérence avec la différence d'état d'oligomérisation de l'IF1 de mammifère et l'IF1 de levure des inhibiteurs énoncé dans la littérature. Contrairement au mammifère, l'état actif d'IF1 de levure est monomérique (Fujii et al., 1983) tandis que l'état inactif est dimérique (Le Breton et al., 2016). Pour conclure nos données réalisées sur mitochondries isolées mettent en évidence que IF1/STF1 ne sont pas essentiels à l'oligomérisation de l'ATP synthase chez la levure.

2. Caractérisation du F1 libre détectable en BN-PAGE chez la souche contrôle

La plupart des travaux portant sur IF1 ont été réalisés sur enzymes et mitochondries isolées permettant d'optimiser sa caractérisation fonctionnelle et d'augmenter son abondance relative. Nous avons décidé pour la suite de notre étude, de minimiser les procédures expérimentales longues susceptibles d'altérer l'intégrité structurale et fonctionnelle des enzymes, en étudiant le rôle d'IF1/STF1 directement sur extrait cellulaire. Jusqu'à présent

aucun protocole d'extraction protéique cellulaire en conditions natives n'avait été établi chez la levure du fait de la complexité d'allier la rupture de la paroi cellulaire tout en préservant l'intégrité structurelle et fonctionnelle des protéines. J'ai donc mis au point un protocole incluant une rupture mécanique de la paroi cellulaire suivie d'une extraction des protéines en conditions natives. J'ai réalisé sur ces extraits cellulaires des analyses structurelle de l'ATP synthase par BN-PAGE (Figure 1D et E) et des mesures d'activité enzymatique en présence d'oligomycine et à différents pH (Figure 2C-E). Mes résultats ont permis de confirmer que ce nouveau protocole permettait de conserver l'organisation supramoléculaire et les propriétés enzymatiques de l'ATP synthase dont l'inhibition de son activité par IF1/STF1. Enfin, bien que cette méthode permet de conserver le matériel biologique, j'ai pu détecter par BN-PAGE la présence du sous-assemblage F1 chez la souche sauvage (WT) dans ces conditions d'extractions (Figure 1D et E). Le F1 libre est souvent considéré comme un artefact technique résultant de la déstabilisation des ATP synthases assemblées (monomères ou oligomères) causée par la décongélation des échantillons, l'utilisation du détergent ou le bleu de Coomassie présent dans le BN-PAGE (Ackerman and Tzagoloff, 1990; Jansch et al., 1996; Wittig et al., 2007). Néanmoins, plusieurs études ont identifié le F1 libre comme un intermédiaire d'assemblage stable de l'ATP synthase (He et al., 2020; Li et al., 2012; Nijtmans et al., 1995). Notre nouvelle approche d'extraction nous a permis de déterminer si le F1 libre était un artefact technique ou non en nous basant sur ses caractéristiques structurelles et fonctionnelles : un domaine catalytique, soluble et insensible à l'oligomycine (Schatz, 1968). J'ai séparé les entités solubles des entités membranaires par fractionnement classique via ultracentrifugation des extraits cellulaires. D'après les résultats obtenus par activité dans le gel en BN-PAGE, le F1 libre est bien retenu dans la fraction soluble contrairement aux entités assemblées (monomères et oligomères) retenues dans la fraction membranaire (Figure 1D et E). De plus, j'ai contrôlé que ce F1 soluble ne provenait pas d'une déstabilisation des entités assemblées due à l'utilisation de détergent (Figure S1A) ou de bleu de charge en BN-PAGE (Figure 1D et E). En revanche, mes résultats ont mis en évidence que la charge conférée par le bleu du BN-PAGE permettait une meilleure détection du F1 libre (Figure 1D et E). Les mesures d'activité hydrolytique que j'ai réalisées ont permis de mettre en évidence que l'activité du F1 libre est oligomycine insensible (Figure 2C-E). D'après un modèle d'étapes d'assemblage de l'ATP synthase de levure proposé par Rak et al., le domaine F1 libre encodé entièrement par le génome nucléaire pourrait être un intermédiaire d'assemblage et favoriserait même la traduction des sous-unités mitochondriales

6 et 8 (Rak et al., 2011; Rak and Tzagoloff, 2009). Du fait de l'origine mitochondriale et nucléaire des sous-unités, l'assemblage de l'ATP synthase est un processus complexe qui nécessite une coordination (Song et al., 2018). La synchronisation de l'assemblage des domaines, les régulations et la chronologie des étapes d'assemblage ainsi que la conservation au cours de l'évolution de ce mécanisme selon les organismes modèles sont aujourd'hui encore extrêmement débattus (Song et al., 2018). L'ensemble de nos résultats ont permis de mettre en évidence que le F1 libre observé chez la souche sauvage partage les mêmes caractéristiques que l'entité F1 communément décrite comme un intermédiaire d'assemblage dans la littérature, mais nos données ne permettent pas de définir le devenir de cette entité. Néanmoins, l'activité d'hydrolyse d'ATP par le F1 libre n'étant pas assujetti au rétrocontrôle thermodynamique exercé par le potentiel membranaire, peut altérer l'énergétique cellulaire, et par conséquent, requière une régulation de son activité hydrolytique.

3. Les inhibiteurs IF1/STF1 sont nécessaires pour maintenir le sous-complexe d'ATP synthase, le F1 libre.

Afin d'étudier la régulation de l'activité du F1 libre j'ai réalisé des analyses en BN-PAGE et des analyses fonctionnelles chez la souche *inh1Δ stf1Δ*. De manière surprenante, nos résultats ont montré que la perte d'IF1/STF1 entraînait une diminution drastique du F1 libre, sans pour autant impacter le niveau des entités pleinement assemblées (Figure 1D et E). C'est la première fois qu'on observe un phénotype moléculaire aussi important lié à la perte d'IF1/STF1. Afin de déterminer si IF1/STF1 participent à la stabilisation du F1 libre, j'ai traité les cellules avec un inhibiteur de la traduction cytosolique (Buchanan et al., 2016). Étonnamment, la déstabilisation des entités assemblées n'entraîne pas d'augmentation de F1 libre (Figure 3A). De plus, contrairement aux entités assemblées, le F1 libre est plus stable au cours du temps (Figure 3A). C'est très surprenant qu'un si gros complexe protéique ait un temps de demi-vie aussi court. Néanmoins, nos résultats sont cohérents avec d'autres études démontrant que le niveau protéique de la sous-unité 6/a diminue fortement après 90 min d'inhibition de la traduction cytosolique (Kucharczyk et al., 2010; Naumenko et al., 2017). De plus, nos observations montrent qu'IF1/STF1 ne participent pas à la stabilisation des entités assemblées mais à celle du F1 libre (Figure 2A). La relation IF1-F1 que nous observons résonne avec

plusieurs travaux antérieurs. L'étude des étapes d'assemblage dans des cellules humaines, menée par l'équipe du Prof. John Walker, a permis de mettre en évidence que, dans tous les cas sauf un, la formation des sous-assemblages d'ATP synthase s'accompagnait d'une augmentation du niveau relatif d'IF1 (He et al., 2020). De plus, ces sous-assemblages, ne présentant pas la sous-unité 6/a, ne sont pas couplés à la force protomotrice (He et al., 2020). De plus, IF1 lié à des sous-assemblages d'ATP synthase a été mis en évidence dans une autre étude portant sur une pathologie cardiaque, la variante canadienne française du syndrome de Leigh (FCLS) présentant des mutations pathogènes dans le gène de la « Leucine-Rich Pentatricopeptide Repeat Containing protein » (LRPPRC) (Mourier et al., 2014). La protéine LRPPRC est nécessaire à la stabilité des ARN messagers codés par l'ADNmt. Mourier *et al.*, ont pu mettre en évidence chez des souris transgéniques modèles pour le FCLS, que les sous-complexes d'ATP synthase sont incapables de synthétiser l'ATP mais présentent néanmoins des capacités d'hydrolyse inchangées. Ils ont observé parallèlement à l'aggravation de la cardiomyopathie, une augmentation du niveau d'IF1 corrélée à l'apparition de sous-assemblages d'ATP synthase. De façon surprenante, les protéines IF1 sont quasiment exclusivement associées aux sous-assemblages d'ATP synthase (Figure 18). Les auteurs ont ainsi proposé qu'IF1 permettrait d'inhiber l'activité hydrolytique des sous-assemblages d'ATP synthase afin de préserver l'ATP cellulaire.

En parallèle, la caractérisation de la souche *atp18Δ* a permis de montrer que la perte de la sous-unité i/j affectait l'assemblage de l'ATP synthase et engendrait une quantité importante de F1 libre (Arnold et al., 1998). D'autres études ont montré que le défaut d'assemblage de cette souche s'accompagnait d'un défaut d'activité de synthèse et d'hydrolyse (Vaillier et al., 1999). Mes analyses par BN-PAGE ont confirmé les précédents travaux et de façon surprenante, nous avons découvert que la perte unique d'IF1 chez la souche *atp18Δ* entraînait une diminution drastique de F1 libre (Figure 3C). Ce phénotype moléculaire lié à la perte d'IF1 est donc également observable chez un mutant dont l'ATP synthase présente un défaut d'activité. Étonnamment, la perte d'IF1 et, par conséquent, du F1 libre dans la souche *atp18Δ* ne semble pas affecter de façon supplémentaire la croissance (Figure 3D). En comparaison avec le phénotype *Lrpprc KO*, il aurait été intéressant de quantifier IF1/STF1 dans la souche *atp18Δ* afin de déterminer si l'augmentation de F1 libre est corrélée à une augmentation des inhibiteurs. Réciproquement, il serait intéressant d'évaluer si la suppression d'IF1 dans un modèle *Lrpprc*

KO induit une augmentation du flux d'hydrolyse d'ATP ou une déstabilisation des sous-assemblages d'ATP synthase.

Conceptuellement, nous pouvons envisager qu'IF1 permettrait de stabiliser le F1 libre tout en inhibant son activité hydrolytique jusqu'à son assemblage avec le F0. Ainsi une fois le F1 couplé et assujéti au potentiel membranaire, IF1 serait alors éjecté par les changements conformationnels induits par le fonctionnement du domaine catalytique dans le sens de la synthèse. En perspective, le fait que le niveau d'IF1 soit si fortement impacté par la présence de sous-assemblages d'ATP synthase très fréquemment observés dans tous les modèles présentant des défauts d'expression ou de maintenance du génome mitochondrial, pourrait éventuellement être un outil de diagnostic de maladies génétiques mitochondriales. Les résultats obtenus sur les deux modèles d'études, *Lrpprc KO* et *atp18Δ*, soutiennent notre découverte montrant une relation aigüe entre IF1 et le sous-assemblage d'ATP synthase F1. Cependant, la régulation et le mécanisme de cette activité stabilisatrice du F1 par IF1 restent à être élucidés.

Le rôle métabolique d'IF1 a été mis en évidence dans des conditions où le potentiel membranaire est diminué ou aboli. Ces données ont été renforcées par les études biochimiques montrant que les IF1 de levure et de mammifère sont actifs et se lient à l'ATP synthase à pH acide. Cependant, dans le contexte *Lrpprc KO*, une quantité importante d'IF1 lié aux sous-assemblages d'ATP synthase a été observée au sein de mitochondries hyperpolarisées, une condition défavorable à l'activation d'IF1 (Mourier et al., 2014). On pressent que l'interaction IF1-ATP synthase pourrait ne pas dépendre uniquement du pH matriciel. De plus, une récente étude a mis en évidence, par une technique de « cross-linking » couplée à de la spectrométrie de masse, qu'IF1 se trouverait à proximité des sous-unités α et β du domaine F1 de l'ATP synthase au sein de mitochondries énergisées (Schweppe et al., 2017). Certaines recherches laissent entrevoir la possibilité d'une hétérogénéité des ATP synthases au sein de la mitochondrie, ayant pour certaines une activité de synthèse et pour d'autres une activité hydrolytique (Moyle and Mitchell, 1975; Romero-Carramiñana et al., 2023; Salewskij et al., 2020). Karine Busch et son équipe ont mis en évidence par une technique de microscopie à fluorescence à super-résolution appelée microscopie de suivi et de localisation (TALM) que l'ATP synthase s'adapte aux changements métaboliques par réorganisation fonctionnelle, mais aussi spatiale et structurelle (Salewskij et al., 2020). La

présence d'ATP synthases fonctionnellement différentes peut être corrélée à une hétérogénéité du potentiel membranaire le long de la membrane interne mitochondriale mis en évidence par Wolf et ses collègues (Wolf et al., 2019). Dans mon travail, j'ai mis en évidence le rôle d'IF1 dans la stabilisation du F1 libre dans une condition physiologique, où les mitochondries sont énergisées. Il aurait été intéressant de déterminer comment est régulée cette activité, si IF1 interagit physiquement avec le F1 libre *in vivo* et le stabilise en inhibant son activité hydrolytique. Au vu de l'ensemble de ces données, il serait avantageux de déterminer la localisation d'IF1 et des différentes entités d'ATP synthase au sein de la mitochondrie et de déterminer si les conditions de liaison d'IF1 à l'ATP synthase et aux sous-assemblages dépendent du pH mais aussi du couplage des entités à la force protomotrice. Conceptuellement, nous pouvons envisager qu'étant soluble le F1 libre ne subira pas les mêmes variations de pH que les entités assemblées localisées non pas dans la matrice mais à la membrane interne mitochondriale. De plus, nous pouvons entrevoir que si l'IF1 est lié physiquement au F1 libre, il ne serait pas sujet à une éjection par la rotation du domaine catalytique dans le sens de la synthèse car, contrairement aux entités assemblées, le F1 n'est pas couplé à la force protomotrice. En parallèle, des études ont mis en évidence que l'activité d'IF1 humain n'est pas régulée uniquement par le pH mais aussi par une modification post-transcriptionnelle, la phosphorylation d'une sérine rendant inactif IF1 (García et al., 2006; Zhao et al., 2011). Je pense que déterminer les différents mécanismes de régulation d'activité d'IF1 mais aussi de liaison aux différentes entités d'ATP synthase permettrait de comprendre d'avantage le rôle d'IF1 en conditions physiologiques et pathologiques.

4. Les inhibiteurs IF1/STF1 ainsi que le sous-complexe F1 libre sont indispensables pour la viabilité des levures $\rho^-/0$.

Les levures *S. cerevisiae* sont des organismes eucaryotes qui présentent la particularité de pouvoir survivre et proliférer en absence de leur génome mitochondrial qu'elles peuvent perdre de façon spontanée en conditions de croissance sur milieux fermentescibles (glucose, galactose). Les cellules $\rho^-/0$, dépourvues partiellement (ρ^-) ou totalement (ρ^0) de génome mitochondrial, ne possèdent plus de complexes OXPHOS assemblés mais présentent néanmoins un F1 libre fonctionnel à même d'hydrolyser l'ATP. Il a été démontré que le

transporteur ATP/ADP, par l'échange d'ATP⁴⁻ entrant contre un ADP³⁻ sortant, est indispensable à la croissance des cellules $\rho^{-/0}$ (Kováčová et al., 1968). Cet échange de nucléotides, présentant une importance vitale, pourrait aussi permettre de conserver un potentiel membranaire mitochondrial suffisant indispensable à l'import des protéines, à la directionnalité des transports électrogéniques et aux autres maintiens des fonctions de la mitochondrie (Dupont et al., 1985). Giraud et Velours ont observé chez la souche *atp16Δ* de levure, dont la sous-unité δ de l'ATP synthase a été supprimée, un défaut d'assemblage du F1 libre affectant la croissance de la souche *atp16Δ* $\rho^{-/0}$ comparé à la souche contrôle $\rho^{-/0}$ (Giraud and Velours, 1997). Cette observation a alimenté l'hypothèse selon laquelle l'activité hydrolytique du F1 libre permettrait via l'échange électrogénique ATP⁴⁻/ADP³⁻ de générer un potentiel mitochondrial essentiel au maintien de la croissance des cellules $\rho^{-/0}$ (Chen et al., 1998; Chen and Clark-Walker, 1999; Clark-Walker, 2007; Giraud and Velours, 1997). Pour autant, l'implication potentiel d'IF1 et son rôle de régulation dans le contexte des cellules $\rho^{-/0}$ demeure largement inexploré et énigmatique. Mon travail a permis de montrer que l'absence d'IF1 était associée à une augmentation de 20% de conversion spontanée des cellules ρ^+ en $\rho^{-/0}$ (Figure 6A). Nos résultats corroborent ceux d'une récente étude montrant que la perte d'IF1 n'impacte pas la croissance cellulaire des cellules $\rho^{-/0}$ en milieu glucose (Liu et al., 2021). Étonnamment, le ratio d'IF1/ β n'est pas diminué chez les cellules contrôles $\rho^{-/0}$, pour autant le ratio STF1/ β tend à diminuer (Figure 6B). De manière surprenante, comme chez les ρ^+ , la perte d'IF1/STF1 engendre une diminution drastique du sous-assemblage F1 libre, rendant indétectable l'activité hydrolytique dans le gel d'extrait cellulaire *inh1Δ stf1Δ* $\rho^{-/0}$ cultivées en milieu glucose (0,5%) (Figure 6D-F). Nos résultats corroborent ceux du Prof. Tzagoloff qui montrent que la perte des sous-unités composantes du F1 favorise la conversion en $\rho^{-/0}$ (Tzagoloff et al., 1975). Ces observations contredisent clairement l'hypothèse selon laquelle l'hydrolyse d'ATP serait particulièrement essentielle à la survie et la croissance des cellules $\rho^{-/0}$ (Figure 6C). Pour autant, mes travaux ont permis de mettre en évidence que le métabolisme cellulaire sur milieux fermentaires tels que le glucose et le galactose, compatibles avec la croissance des cellules $\rho^{-/0}$, ne sollicitaient pas de façon identiques le métabolisme et la respiration mitochondriale (Figure 4C). Il serait donc intéressant d'étudier l'impact de la perte d'IF1/STF1 dans un contexte $\rho^{-/0}$ en milieu galactose, une condition ayant précédemment permis de mettre en évidence le rôle du F1 libre dans le maintien des capacités de croissance de cellules $\rho^{-/0}$ (Giraud and Velours, 1997). Si d'après nos résultats le F1 libre n'est pas essentiel à la croissance, il est envisageable que d'autres enzymes

mitochondriales hydrolysant l'ATP puissent participer au maintien du potentiel membranaire avec l'ANT chez les cellules $p^{-/0}$. Par exemple, à l'inverse, un défaut de synthèse d'ATP par l'ATP synthase peut être compensable par la surexpression du transporteur Odc1p promouvant la synthèse d'ATP par la succinyl-CoA synthétase l'enzyme mitochondriale du cycle de Krebs (Schwimmer et al., 2005). Mon travail incite à reconsidérer l'importance de l'activité hydrolytique du F1 libre dans le maintien du potentiel membranaire dans la survie et le maintien de la croissance des cellules $p^{-/0}$.

5. Le glycérol est un état métabolique glyco-oxydatif où l'équilibre énergétique repose sur la production d'ATP par la glycolyse et les OXPHOS.

La levure *S. cerevisiae* est un modèle de choix qui a permis d'étudier les mécanismes génétiques associés à la flexibilité métabolique en réponse à différentes sources carbonées. J'ai étudié le rôle métabolique d'IF1/STF1, en tirant parti de la flexibilité métabolique de la levure et en variant la source de carbone. Pour ce faire, j'ai (i) suivi la croissance cellulaire qui reflète l'efficacité du métabolisme par sa capacité à transformer une source de carbone disponible en biomasse (Gustafsson, 1991; Westerhoff et al., 1983), et (ii) mesuré la respiration cellulaire en conditions fermentescibles (glucose 0,5% et galactose 2%) et non-fermentescibles (glycérol 2% et lactate 2%). L'ensemble de ces mesures m'a permis de constater que les levures *inh1Δ stf1Δ* présentaient une augmentation des flux respiratoires sans pour autant modifier le temps de génération des cellules (Figure 4). Mes résultats concordent avec des études antérieures réalisées chez la levure (glucose 2% et glycérol 0,5%) (Galkina et al., 2022; Ichikawa et al., 1990; Lu et al., 2001) et chez d'autres organismes, qui n'ont révélé aucun phénotype sévère de croissance lié à la perte d'IF1 (Fernández-Cárdenas et al., 2017; Nakamura et al., 2013). Mes analyses quantitatives par Western blot ont montré une augmentation du ratio IF1/ β et STF1/ β dans les conditions non-fermentescible (Figure 5A et B). Ces résultats sont en corrélation avec ceux de Galkina *et al.*, montrant l'augmentation du niveau d'IF1 et de STF1, étiquetés à la GFP, dans les levures cultivées en milieux non-fermentescibles comparé aux milieux fermentescibles (Galkina et al., 2022). Les flux de consommation d'oxygène que j'ai mesurés sur cellules sont faibles en glucose et très importants en lactate, bien qu'à seulement 0,5% glucose, la levure ne

soit pas soumise à la répression catabolique (Figure 4C). De façon plus surprenante, les cellules cultivées en milieu galactose et glycérol ont des flux respiratoires similaires (Figure 4C). La classification des milieux basée sur des critères métaboliques tels que leurs capacités à induire un processus fermentaire ou non, n'est pas suffisante pour comprendre les différences mesurées en flux respiratoires. J'ai mis en place une technique simple, permettant de définir les conditions métaboliques cellulaires, non plus à travers leur activité respiro-fermentaire, mais à travers la dépendance énergétique de la croissance vis-à-vis de la glycolyse et des OXPHOS. J'ai ainsi réalisé des tests en goutte pour suivre la croissance, en fonction des différents milieux, de deux souches présentant des altérations génétiques affectant la synthèse d'ATP par la voie glycolytique ou par les OXPHOS (Figure 5C). Il a été nécessaire de choisir judicieusement un mutant de la voie glycolytique viable et un mutant d'ATP synthase qui n'impacte pas les capacités de la chaîne respiratoire. Plusieurs études ont montré que la perte de certaines sous-unités de l'ATP synthase entraînait une perte du complexe IV (Paul et al., 1989; Rak et al., 2007). C'est pour cela que notre choix s'est porté sur le mutant délété de la pyruvate kinase 1 (*pyk1Δ*), enzyme permettant la synthèse d'ATP à la dernière étape de la glycolyse (Sprague, 1977). De plus, nous avons choisi le mutant délété de la sous-unité i/j de l'ATP synthase (*atp18Δ*) caractérisé dans la littérature et confirmé dans mon étude (voir partie III.B) comme un mutant présentant un défaut de synthèse d'ATP avec des capacités maximales de la chaîne respiratoire identiques au contrôle (Vaillier et al., 1999). Ces analyses ont permis de valider que la glycolyse était la source principale d'énergie supportant la croissance cellulaire en glucose et galactose, classiquement décrits comme des sources de carbone fermentescibles. De la même façon, mes analyses ont permis de montrer que la croissance en lactate, source de carbone non-fermentescible, dépendait principalement des OXPHOS (Figure 5C). A l'inverse, j'ai pu mettre en évidence que la croissance en présence de glycérol, défini comme une source de carbone non-fermentescible, est placée sous la co-dépendance de la glycolyse et des OXPHOS (Figure 5C). Une analyse rapide des métabolites et voies impliquées dans le métabolisme du glycérol nous a permis d'entrevoir les voies alimentant la glycolyse. En effet, le glycérol une fois internalisé est rapidement phosphorylé en glycérol-3-phosphate (G3P) puis oxydé en dihydroxyacétone phosphate (DHAP), un intermédiaire de la voie glycolytique. Ainsi le G3P permet non seulement d'alimenter le système des OXPHOS à travers la Gut2p, mais le DHAP produit par les Gut2p ou les Gpd_{1/2}, permet d'alimenter simultanément la glycolyse (Figure 5D). De plus, ces observations soutiennent de récentes études qui, d'après des analyses

transcriptomiques et métabolomiques, demandent à reconsidérer la classification du glycérol comme une source carbonée « non-fermentescible » (Aßkamp et al., 2019; Xiberras et al., 2019). Mes analyses ont montré que le milieu glycérol, contrairement au lactate, n'était pas un milieu respiratoire strict mais un milieu glyco-oxydatif défini par la dépendance de la croissance pour les voies métaboliques glycolytique et oxydative.

6. IF1/STF1 atténuent l'impact du stress dépolarisant mitochondrial sur la croissance en milieu glycérol.

Comme énoncé précédemment, le rôle d'IF1 a été mis en évidence majoritairement en condition de stress chez le mammifère tels que l'anoxie ou des défauts de la chaîne respiratoire liés à des facteurs chimiques ou génétiques (Buchet and Godinot, 1998; Rouslin and Broge, 1996; Sgarbi et al., 2018). Dans notre étude nous avons souhaité étudier le rôle d'IF1, en supprimant les contraintes thermodynamiques liées à la force protomotrice sans affecter ou inhiber le fonctionnement de la chaîne respiratoire. Pour ce faire, nous avons opté pour une dépolarisation des mitochondries en utilisant l'agent découplant, le CCCP (Beauvoit et al., 1991). Deux équipes de recherche ont mis en évidence sur des mitochondries purifiées que l'absence d'IF1 entraînait une augmentation des flux d'hydrolyse d'ATP en présence de CCCP (Ichikawa et al., 1990; Venard et al., 2003). Contrairement à ces précédentes études, nous avons étudié le rôle métabolique d'IF1/STF1 *in vivo* à l'échelle cellulaire et en variant la source carbonée disponible. Dans un premier temps, j'ai contrôlé l'efficacité du découplage par le CCCP par l'absence de réponse de la respiration cellulaire au triéthylétain (état non-phosphorylé) (Figure 4C). Par la suite, j'ai pu évaluer l'impact de la perte d'IF1/STF1 sur la croissance cellulaire en milieux fermentescibles (glucose 0,5% et galactose 2%) ou non-fermentescibles (glycérol 2% et lactate 2%) en condition de découplage (traitement au CCCP) (Figure 4A et B). Étonnamment, l'impact du stress de dépolarisation mitochondriale sur la croissance était identique pour la souche *inh1Δ stf1Δ* et la souche sauvage dans toutes les conditions de milieux, à l'exception de la condition glycérol (Figure 4A et B). Mes résultats montrent qu'IF1/STF1 permettent à la cellule de proliférer en résistant à un découplage mitochondrial en condition glycérol. De plus, la quantification de l'ATP, l'ADP et l'AMP, après 1h de traitement au CCCP, montre une diminution des charges énergétiques adényliques liée

à la perte d'IF1/STF1, confirmant que le stress de dépolarisation impacte l'énergétique cellulaire du fait de l'activité hydrolytique de l'ATP synthase non inhibée. Mon étude permet donc de démontrer que l'action d'IF1/STF1 inhibant la réversibilité de l'ATP synthase en condition dépolarisante n'est essentielle que lorsque le métabolisme énergétique cellulaire est placé sous la co-dépendance des voies métaboliques comme défini par le métabolisme glyco-oxydatif (Figure 4A et B). Mes observations confortent les résultats d'une étude réalisée sur des cellules humaines dépourvues d'IF1, montrant qu'une diminution ponctuelle de la concentration d'ATP intracellulaire après un traitement au CCCP, était prévenue par l'ajout d'oligomycine (Fujikawa et al., 2012). De façon intéressante, les auteurs ont observé une augmentation des flux glycolytiques après ajout de CCCP en absence d'IF1 qui selon eux permettrait de compenser l'hydrolyse d'ATP par les ATP synthases découplées (Fujikawa et al., 2012). Pour autant, mon étude démontre que le stress de découplage en milieu glycérol, i.e. condition glyco-oxydative, induit un arrêt de croissance et donc la voie glycolytique ne semble pas pouvoir compenser la perte de la synthèse d'ATP aggravée par l'hydrolyse d'ATP par l'ATP synthase chez la levure.

Étonnamment, en condition découplante, le défaut de croissance de la souche *inh1Δ stf1Δ* est corrélé à une diminution de la respiration cellulaire mesurée après 9h de traitement (Figure 4). J'ai démontré que la diminution de la respiration n'est pas liée à une diminution du contenu mitochondrial mais liée à une diminution de l'activité des complexes III et IV sans impacter le niveau protéique du complexe IV (Figure 5F-I). D'après mes données complémentaires, la diminution des flux respiratoires s'intensifie avec le temps d'incubation des cellules avec l'agent découplant. De plus, au bout de 9h de traitement, les charges énergétiques adényliques ne sont pas les seules impactées car nous observons une diminution du niveau des adénosines en absence d'IF1/STF1. Ces données mettent en évidence que la perte d'IF1/STF1 et la crise énergétique cellulaire associée, affectent sur du long terme l'activité et la composition du système des OXPHOS.

Notre étude réalisée sur le modèle levure, un organisme très prolifératif, nous a permis de mettre en évidence l'importance du rôle métabolique d'IF1 dans des conditions métaboliques spécifiques où la prolifération dépend simultanément de la voie glycolytique et de la voie oxydative, en condition découplante. En parallèle avec les cellules cancéreuses, caractérisées par leurs capacités prolifératives, il serait intéressant de déterminer si les cancers

(colon, poumon, sein, ovaire et foie), présentant un niveau protéique d'IF1 élevé, ont un métabolisme glyco-oxydatif (Gore et al., 2022). La tumeur présente une hétérogénéité métabolique spatiale, nécessitant l'adaptation des cellules qui la composent en fonction de l'accessibilité aux nutriments et l'oxygénation du fait de leur proximité aux vaisseaux sanguins. Le Pr. Warburg a mis en évidence que le degré de prolifération d'une cellule cancéreuse était corrélée au degré de répression du métabolisme mitochondrial associé à une augmentation du flux glycolytique et à la production de lactate (Warburg, 1956). Nous pourrions envisager, d'effectuer un criblage systématique des différentes cellules cancéreuses en suivant simplement la dépendance de la croissance cellulaire des lignées cancéreuses vis-à-vis de la production d'énergie associées aux voies glycolytiques et oxydatives. Cela permettrait de définir, voire de classifier, le métabolisme des différents types de cellules cancéreuses afin de corréliser potentiellement les propriétés métaboliques avec les capacités de croissance ou invasives de ces tumeurs et leurs capacités à s'adapter à l'hypoxie. Nous pourrions ainsi identifier les faiblesses pour chaque type de cellule cancéreuse afin d'adapter les traitements pour lutter plus efficacement contre leur prolifération.

7. Les homologues IF1 et STF1

Nous avons décidé pour nos travaux de ne pas évaluer le rôle respectif d'IF1 et de STF1 dans l'inhibition de l'hydrolyse de l'ATP synthase mais de supprimer cette inhibition endogène grâce au double mutant (*inh1Δ stf1Δ*). La caractérisation fonctionnelle de ces homologues avait précédemment été réalisés et avait notamment mis en évidence que STF1 a la capacité d'inhiber l'activité hydrolytique de l'ATP synthase avec le même mécanisme d'action qu'IF1 (pH dépendant et en présence de MgATP). Pour autant, l'affinité de liaison d'IF1 à l'ATP synthase semble bien supérieure à celle mesurée pour STF1 (Venard et al., 2003). Le rôle de cet homologue n'est pas encore élucidé. Certaines études laissent entrevoir STF1 comme une protéine de stabilisation d'IF1 ou un inhibiteur de l'ATP synthase à pH plus élevé (Cabezón et al., 2002). Afin d'en savoir davantage sur l'intérêt de la levure de conserver ces deux inhibiteurs, j'ai réalisé des tests en goutte en milieu glycérol en condition de découplage avec les simples mutants *inh1Δ* et *stf1Δ*. J'ai pu observer, dans ces conditions, la croissance fortement affectée pour le simple mutant *inh1Δ* contrairement au simple mutant *stf1Δ*. Le défaut de croissance observé chez le double mutant *inh1Δ stf1Δ* semblerait être légèrement plus important que le

simple mutant *inh1Δ*. Ces données confortent les résultats de Venard *et al.*, indiquant l'activité prépondérante d'IF1 au regard de STF1 (Venard et al., 2003). Ces données m'ont permis de conclure qu'IF1 était l'acteur principal permettant la conservation de l'énergie cellulaire en condition de découplage en milieu glyco-oxydatif. De plus, d'après mes données, contrairement à IF1 je n'ai pas pu détecter la présence de STF1 lié à l'ATP synthase en électrophorèse à deux dimensions (2D BN/SDS-PAGE) (Figure 2A). Il est possible que mes conditions expérimentales ne soient pas optimales afin de préserver l'interaction entre STF1 et l'ATP synthase. Enfin, de façon intéressante, nous pouvons noter que les niveaux protéiques des inhibiteurs jusqu'à présent toujours similaires soient différents dans la condition ρ^{-0} (Figure 6B) (Okada et al., 1986). Ces données permettent d'entrevoir que ces deux homologues puissent jouer un rôle différent ou être soumis à différentes régulations qui pourrait contribuer à expliquer l'intérêt pour la levure, organisme capable de perdre spontanément son ADNmt, à conserver deux inhibiteurs homologues contrairement aux mammifères. L'ensemble de ces données m'ont permis de mettre en évidence le rôle majeur d'IF1 au sein du métabolisme cellulaire et ont apporté des indices et pistes permettant de questionner la fonction principale de STF1. Il aurait été néanmoins intéressant d'étudier le rôle spécifique de chaque inhibiteur en réalisant les expériences de cette étude sur les simples mutants *inh1Δ* et *stf1Δ*.

B. La souche *atp18Δ* : un mutant présentant une sévère déficience de l'ATP synthase et une forte augmentation du contenu mitochondrial cellulaire.

L'ATP synthase est constituée de 17 sous-unités différentes, réparties en deux domaines : le domaine F1 constitue le domaine catalytique (α , β , γ , ϵ , δ) et le domaine F0 constitue le domaine membranaire (6/a, c, 8/A6L, 4/b, d, h/F6, OSCP et i/j/6.8PL). L'ATP synthase compte aussi des sous-unités dites surnuméraires (e, f, g et k/DAPIT) présentes au sein du dimère d'ATP synthase. Les analyses fonctionnelles et structurales ont permis d'identifier le rôle de chacune des protéines composantes de l'ATP synthase. La sous-unité i, appelée aussi j, est une petite protéine d'environ 6,7 kDa encodée par le gène nucléaire *ATP18*

chez *S. cerevisiae*. Son homologue, chez le mammifère, est la sous-unité 6.8PL (6.8 kDa protéolipide) encodée par le gène *ATP5MJ*. Cette sous-unité hydrophobe structurée en hélice alpha est localisée dans le domaine membranaire de l'ATP synthase à l'interface du dimère au niveau du domaine FO près de la sous-unité 6/a (Figure 28) (H. Guo et al., 2017; Hahn et al., 2016).

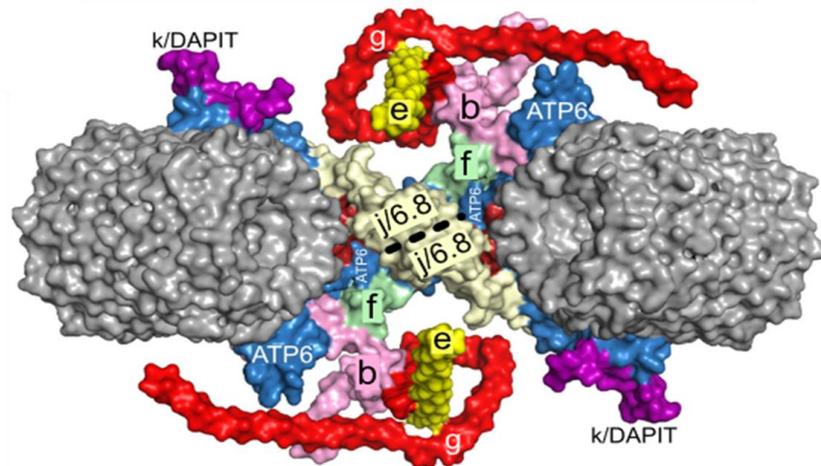


Figure 28 : Structure du domaine FO dimérique de l'ATP synthase de *S. cerevisiae*

L'anneau c_{10} est identifié en gris et les autres sous-unités sont colorées et identifiées sur les structures directement. (issu de (He et al., 2020)) PDB : 6B8H (H. Guo et al., 2017)

Les caractérisations antérieures de la souche *atp18Δ* ont permis de mettre en évidence une déficience de l'ATP synthase présentant des flux de synthèse et d'hydrolyse d'ATP fortement altérés, permettant d'expliquer le défaut de croissance observé en milieu respiratoire (Arnold et al., 1999; Vaillier et al., 1999). De plus, Vaillier *et al.* ont mis en évidence que la souche *atp18Δ* présente une augmentation significative de l'activité d'hydrolyse d'ATP insensible à l'oligomycine (Vaillier et al., 1999). En accord avec ces résultats, Wagner *et al.* ont mis en évidence, par des analyses par BN-PAGE, que la sous-unité i/j permet la stabilité de l'ATP synthase monomérique et dimérique car sa suppression engendre une augmentation de la quantité de F1 libre, insensible à l'oligomycine, au dépend du dimère d'ATP synthase (Figure 29) (Wagner et al., 2010). En parallèle, Paumard et ses collègues ont démontré que la dimérisation de l'ATP synthase est essentielle à la formation des crêtes mitochondriales,

cependant la perte de la sous-unité i/j n'impacte pas l'ultrastructure de la membrane interne mitochondriale contrairement en l'absence des sous-unités e et g (Paumard et al., 2002).

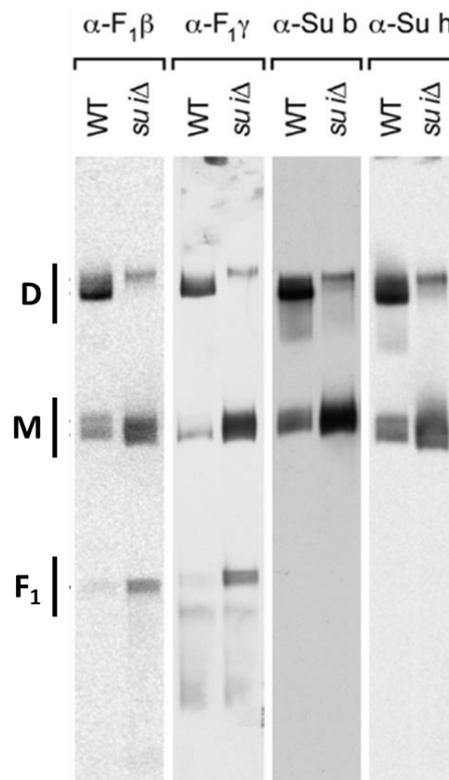


Figure 29 : Analyse structurale de l'ATP synthase des mitochondries de la souche sauvage (WT) et du mutant *atp18Δ*.

La structure de l'ATP synthase solubilisée à la digitonine (1%) a été résolue en BN-PAGE (4-8%) puis détectée par Western blot avec les anticorps indiqués. D : dimère ; M : monomère ; F₁ : domaine F1 de l'ATP synthase. (modifié de (Wagner et al., 2010))

Vaillier *et al.*, ont mesuré, sur mitochondries isolées, le potentiel membranaire mitochondrial de levure généré par l'activité réverse de l'ATP synthase et ils ont observé une dissipation accrue du potentiel au court du temps en absence de la sous-unité i/j (Figure 30) (Vaillier et al., 1999). Cette difficulté à maintenir et générer un potentiel de membrane mitochondrial via l'activité hydrolytique de l'ATP synthase avait été interprétée, au regard de la proximité spatiale entre la sous-unité i/j et le canal à proton, comme pouvant être associée à une mécanisme de découplage mitochondrial (Paumard et al., 2002). Notre étude a permis de caractériser la souche *atp18Δ* et d'identifier pour la première fois qu'une altération génétiquement ciblée de l'ATP synthase pouvait moduler de façon remarquable le contenu cellulaire mitochondrial.

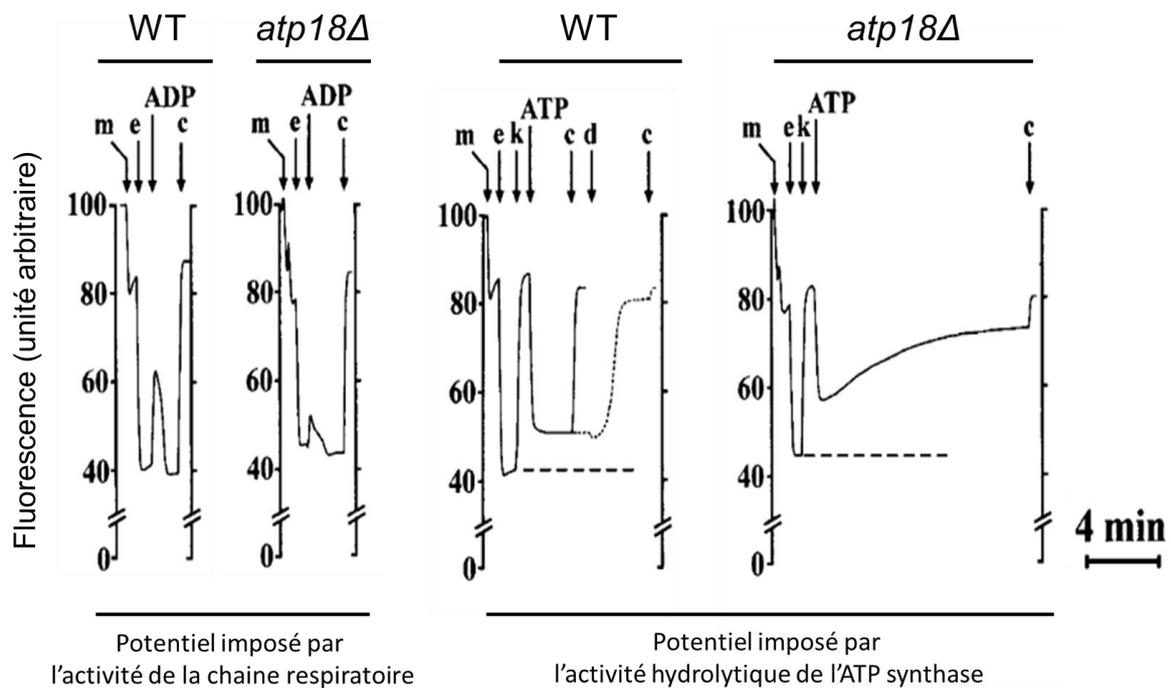


Figure 30 : Energisation des mitochondries de la souche sauvage (WT) et du mutant *atp18Δ*, suivie par l'extinction de la fluorescence de la rhodamine 123.

Les mitochondries ont été incubées dans 2 ml de milieu de respiration. Les ajouts ont été de 0,32 mg de protéines mitochondriales (m), 10 μ l d'éthanol (e), 50 μ M d'ADP, 3 μ M de CCCP (c), 6 μ g de dicyclohexylcarbodiimide (d), et 200 μ M de KCN (k) ; 1 mM d'ATP a été ajouté 1 min après le KCN. La courbe en pointillé indique l'ajout des mitochondries, de l'éthanol, du KCN, de l'ATP, du dicyclohexylcarbodiimide et du CCCP ; - - - indiquent l'ajout des mitochondries et de l'éthanol. (modifié de (Vaillier et al., 1999))

Afin d'étudier le rôle de la sous-unité i/j de l'ATP synthase, j'ai généré de nouvelles souches *atp18Δ* dont la perte de la sous-unité i/j a été validée par Western blot (Figure 31A). Ensuite, j'ai analysé l'ultrastructure de l'ATP synthase par BN-PAGE à partir d'extraits de cellules cultivées en milieu glycérol (Figure 31B). Comme précédemment observé, mes analyses démontrent une absence quasi complète du dimère d'ATP synthase, associé à une augmentation du sous assemblage F1 libre chez la souche *atp18Δ* (Figure 31B). Une gamme de ratio détergent/protéine a été réalisée afin de confirmer que l'absence de dimère ou que la forte présence du F1 libre détecté chez la souche *atp18Δ* ne provenait pas d'une déstabilisation des entités assemblées (monomères et oligomères) générée par le détergent (Figure 31B). Mes observations confortent donc les observations précédentes et montrent que la sous-unité i/j participe à la stabilité de l'ATP synthase (Wagner et al., 2010). J'ai ensuite déterminé l'impact de ces défauts fonctionnels et structuraux de l'ATP synthase lié à la perte de la sous-unité i/j sur

les capacités bioénergétiques à partir de mitochondries purifiées des cellules WT et *atp18Δ* cultivées en milieu lactate (Figure 31C). Le flux de synthèse d'ATP (JATP) et le flux de consommation d'oxygène (JO_2) ont été mesurés à l'état phosphorylant (ADP + Pi) en présence d'éthanol comme substrat alimentant indirectement la chaîne respiratoire. Le ratio JATP/ JO_2 , permettant de rendre compte du rendement entre la synthèse d'ATP et la respiration, était fortement affecté dans les mitochondries isolées de la souche *atp18Δ* comparé au WT (Figure 31C). De plus, j'ai mesuré sur des mitochondries isolées les flux de consommation d'oxygène à l'état phosphorylant (ADP + Pi), non-phosphorylant (oligomycine) et découplé (titration CCCP) en présence de NADH ou d'éthanol en tant que substrat de la chaîne respiratoire (Figure 31). La perte importante du rendement des oxydations phosphorylantes peut être associée à un défaut d'ATP synthase important et/ou à une respiration élevée due à une fuite de protons. Pour autant, la faible augmentation de la respiration en condition non-phosphorylante, particulièrement sensible au découplage, ainsi que la différence des flux importante entre les respirations découplées et non-phosphorylantes, nous permettent de conclure que la respiration reste fortement contrôlée par le potentiel de membrane. Cela exclut donc la présence d'un découplage important dans ce modèle *atp18Δ* par rapport au WT. Mes travaux permettent de conforter fonctionnellement la déficience drastique d'ATP synthase liée à la perte de la sous-unité i/j (Figure 31D et E) affectant sévèrement la croissance des levures en conditions respiratoires strictes (lactate) ou glyco-oxydatives (glycérol) (Figure 31F et G) (Arnold et al., 1999; Vaillier et al., 1999). De plus, mes analyses indiquent que la souche *atp18Δ* ne présente pas de sensibilité accrue au découplage car sa croissance est affectée au même degré que la croissance du WT en lactate et en glycérol (Figure 31F et G).

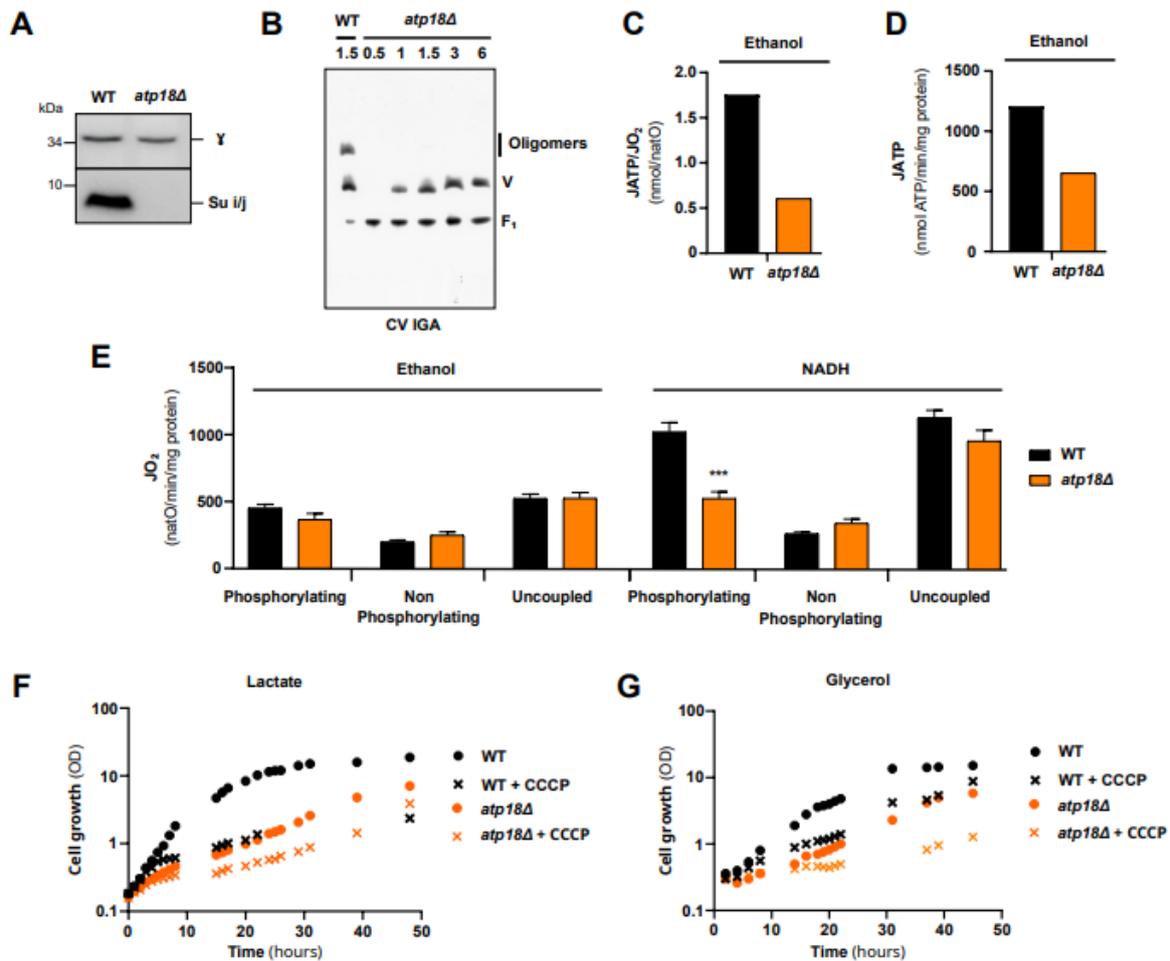


Figure 31 : La perte de la sous-unité i/j induit un défaut d'assemblage et d'activité de synthèse de l'ATP synthase sans affecter les capacités de la chaîne respiratoire.

(A) Western blot réalisé sur extraits de protéines cellulaires des souches WT et *atp18Δ*, cultivées sur un milieu lactate 2%. (B) Electrophorèse BN-PAGE (3-12%) réalisée avec des extraits cellulaires totaux de WT et *atp18Δ* cultivés dans un milieu glycérol 2%. Les extraits cellulaires de la souche *atp18Δ* ont été solubilisés avec un rapport digitonine/protéine croissant allant de 0,5 à 6 g/g de protéines. Les assemblages d'ATP synthase ont été révélés par l'activité hydrolytique F1F0-ATP synthase (CV) en gel (IGA). (représentatif de $n = 3$ expériences indépendantes) (C) Ratio du flux de synthèse d'ATP sur le flux de consommation d'oxygène mesuré sur mitochondries isolées de WT (barres noires) et *atp18Δ* (barres orange) cultivées sur un milieu lactate 2%. ($n = 2$ expériences indépendantes) (D) Flux de synthèse d'ATP mesurés sur mitochondries isolées de WT (barres noires) et *atp18Δ* (barres orange) cultivées sur un milieu lactate 2%. ($n = 2$ expériences indépendantes) (E) Flux de consommation d'oxygène mesurés sur mitochondries isolées de WT (barres noires) et *atp18Δ* (barres orange) cultivées sur un milieu lactate 2%. Les flux de consommation d'oxygène ont été normalisés extemporanément par rapport à la quantité protéique. La respiration cellulaire a été mesurée à l'état phosphorylé, non-phosphorylé (oligomycine) et découplé (titration CCCP). ($n \geq 3$ expériences indépendantes, ANOVA à deux voies, barres d'erreur \pm SEM $***p < 0.0005$) Croissance cellulaire en lactate 2% (F) et en glycérol 2% (G) des cellules WT (noir) et *atp18Δ* (orange) en présent (croix) ou non (cercles) de CCCP, suivant la densité optique de la culture à 550 nm. ($n = 2$ expériences indépendantes)

Afin de contrôler que la concentration de CCCP utilisée était suffisante pour découpler les OXPHOS, j'ai mesuré les flux respiratoires sur des cellules intactes. De façon surprenante, en absence de traitement, j'ai observé que les cellules *atp18Δ* présentaient une activité respiratoire bien supérieure à celle mesurée chez les cellules WT, en milieu lactate et glycérol (Figure 32A). Ces résultats sont très étonnants, car d'après les données de Devin *et al.*, la croissance cellulaire est corrélée à l'activité des OXPHOS en milieu non-fermentescible (Devin *et al.*, 2006), hors la souche *atp18Δ* présente un défaut de croissance important mais des flux respiratoires très élevés comparé au WT en glycérol et lactate. Les flux respiratoires mesurés sur des cellules confirment les résultats obtenus sur des mitochondries isolées, la différence de flux entre les conditions non-phosphorylantes et découplées n'indique pas de découplage lié à la perte de la sous-unité i/j. Pour déterminer si l'augmentation des flux respiratoires sont liés à une augmentation du contenu mitochondrial, j'ai quantifié des cytochromes sur des cellules cultivées en glycérol (Devin *et al.*, 2006). J'ai quantifié sur des cellules les cytochromes du complexe III (c1, bh, bl) et le cytochrome c mais je n'ai pas eu la résolution suffisante pour quantifier les cytochromes a et a3 du complexe IV. Une quantité deux fois plus importante des cytochromes c + c1 et bh + bl est observée pour la souche *atp18Δ* comparé au WT (Figure 32B). Afin de confirmer ces données, j'ai quantifié par PCR quantitative l'ADN mitochondrial et nucléaire avec deux couples d'amorces différentes. Une quantité d'ADN mitochondrial d'environ 3 fois plus importante par cellule a été mesurée pour la souche *atp18Δ* comparé au WT (Figure 32C). Avec l'aide du Dr. Bénédicte SALIN et de Mme Corinne BLANCARD, nous avons observé le contenu mitochondrial grâce à la cryo-ME sur des cellules entières (Figure 32D). De façon surprenante, la taille des cellules de la souche *atp18Δ* est plus importante que la souche WT et compte un nombre de mitochondries plus élevé. Mes travaux mettent en évidence que la perte de la sous-unité induit une augmentation importante du contenu mitochondrial de par leur taille et leur nombre. De plus, on peut voir à l'aide d'un microscope optique, que les cellules *atp18Δ* forment des agrégats (Figure 32E). Afin de vérifier que la normalisation de la respiration cellulaire par la densité optique de la culture cellulaire n'a pas été biaisée par la formation d'agrégats de cellules *atp18Δ*, j'ai observé la corrélation entre le poids sec des cellules et mesure de densité optique (550 nm). Le poids sec des cellules par unité de DO est identique entre la souche WT et *atp18Δ* confirmant les valeurs obtenues en flux respiratoire (Figure 32F).

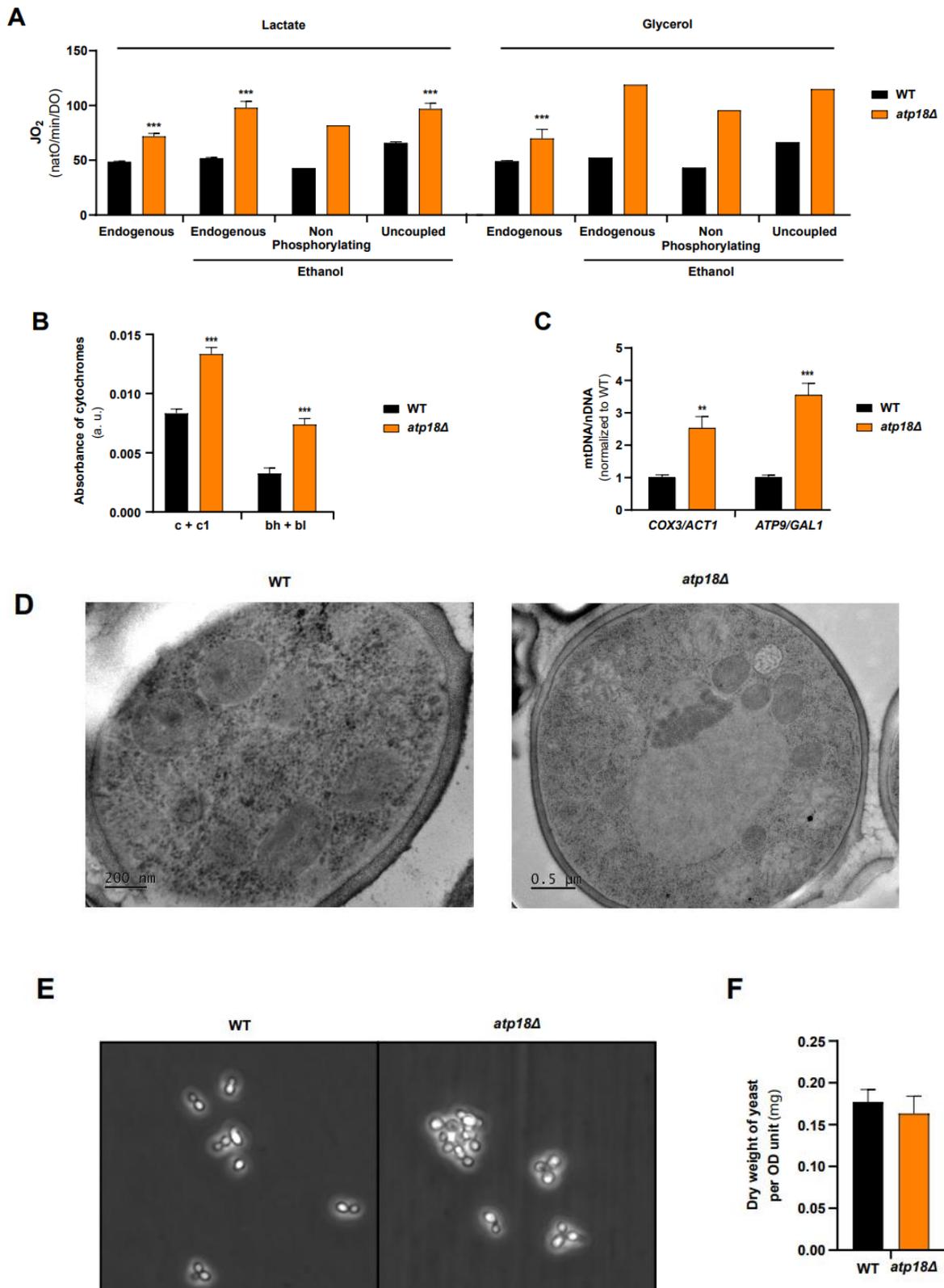


Figure 32 : La perte de sous-unité *i/j* induit une augmentation du contenu mitochondrial

(A) Flux de consommation d'oxygène mesurés sur cellules WT (barres noires) et *atp18Δ* (barres orange) cultivées en lactate 2% ou glycérol 2%. Les flux de consommation d'oxygène ont été normalisés par rapport à la densité optique (550 nm) déterminée extemporanément. La

*respiration cellulaire a été mesurée à l'état endogène et en présence d'éthanol, à l'état endogène, non phosphorylé (triéthylétain) et découplé (titration CCCP). (n ≥ 3 expériences indépendantes, ANOVA à deux voies, barres d'erreur ± SEM, ***p<0,0005 ; n = 2 pour les données sans écart type) (B) Quantification des cytochromes (c, c1, bh et bl) des cellules WT et atp18Δ cultivées en glycérol 2%, déterminé par la différence d'absorbance à l'état réduit et oxydé des cytochromes. (n = 3 expériences indépendantes, ANOVA à deux voies, barres d'erreur ± SEM, ***p<0,0005) (C) Quantification par PCR du rapport ADN mitochondrial/ADN nucléaire réalisée sur l'ADN total extrait des cellules WT et atp18Δ cultivées en glycérol 2%. (n = 3 expériences indépendantes, t-test student non apparié, barres d'erreur ± SEM, **p<0,005, ***p<0,0005) (D) Images obtenues par microscopie électronique des cellules WT et atp18Δ cultivées en glycérol 2%. L'échelle pour chaque image est indiquée par une barre. (E) Images obtenues par microscopie optique des cellules WT et atp18Δ cultivées en glycérol 2%. (F) Mesure du poids sec des cellules WT et atp18Δ cultivées en glycérol 2% par unité de densité optique (550nm) en mg. (n = 3 expériences indépendantes, t-test student non apparié, barres d'erreur ± SEM)*

J'ai pu confirmer les précédentes études montrant que la souche *atp18Δ* présente un défaut d'ATP synthase sans impacter les capacités de la chaîne respiratoire. Mon travail a pu aussi mettre en évidence pour la première fois un mutant d'ATP synthase avec un contenu mitochondrial considérablement augmenté. La cellule a la capacité de moduler ses voies métaboliques en fonction de ses besoins énergétiques, l'un des processus mis en place est l'ajustement de son contenu mitochondrial cellulaire. Par exemple, lorsque la concentration de glucose environnant diminue, la levure a la capacité de reprogrammer l'expression génétique afin d'induire l'expression des gènes codants pour les protéines mitochondriales via le facteur de transcription Hap (« Heme activator protein »), activateur des gènes de la respiration (Buschlen et al., 2003; DeRisi et al., 1997; Lascaris et al., 2003; Santangelo, 2006). Ce processus, appelé « shift diauxique », permet à la levure d'augmenter sa biogénèse mitochondriale afin de métaboliser l'éthanol qu'elle a produit lors de la fermentation alcoolique du glucose. Le contenu mitochondrial est modulé en fonction de deux processus qui s'opposent, la biogénèse mitochondriale et la mitophagie.

La biogénèse mitochondriale dépend de la coordination des événements nucléaires et mitochondriaux. Les mitochondries ayant leur propre génome, le mécanisme de signalisation entre les mitochondries et le noyau questionne beaucoup et depuis longtemps. Des facteurs de signalisation impliqués dans le mécanisme de la biogénèse ont été mis en évidence, ce sont trois protéines kinases A encodées par le noyau : Tpk1, Tpk2 et Tpk3p (homologue PGC1 chez le mammifère) (Toda et al., 1987). Le Dr. A. Devin et son équipe ont montré que l'absence de

Tpk3 entraîne une diminution drastique du contenu mitochondrial chez les cellules cultivées en milieu fermentescible et affecte la croissance en milieu respiratoire (Chevtzoff et al., 2005).

Le processus de dégradation sélectif des mitochondries, appelé mitophagie, intervient aussi dans la modulation de la quantité du matériel mitochondrial (Bhatia-Kiššová and Camougrand, 2010; Kanki et al., 2015). Des cribles génétiques ont permis d'identifier le gène *ATG32* comme étant indispensable à la mitophagie (Okamoto et al., 2009). De par sa localisation sur la membrane externe mitochondriale, la protéine codée par le gène *ATG32* pourrait être un récepteur de la mitophagie (Okamoto et al., 2009). Kurihara *et al.* ont montré que la mitophagie permet de diminuer le contenu mitochondrial cellulaire afin de minimiser la production de EROs (Kurihara et al., 2012). Les OXPHOS sont une source importante de EROs et d'avantage si les complexes enzymatiques sont défectueux (Houštěk et al., 2006). Une étude a mis en évidence qu'en l'absence de la protéine *Fmc1*, nécessaire pour l'assemblage et la stabilité du secteur F1 de l'ATP synthase, induit une augmentation de la mitophagie (Lefebvre-Legendre et al., 2001; Priault et al., 2005).

Nous pourrions, pour la suite dans un premier temps, déterminer si l'augmentation du contenu mitochondrial est liée à une augmentation de la biogénèse et/ou une diminution de la mitophagie en quantifiant les protéines indispensables à ces mécanismes tels que les protéines *Tpk3p* et *Atg32*. Nous pourrions aussi supprimer les gènes *TPK3* ou *ATG32* chez le mutant *atp18Δ* et observer les conséquences sur le contenu mitochondrial, afin de déterminer si la voie de biogénèse mitochondriale ou/et de mitophagie est/sont responsable(s) de cette augmentation du contenu mitochondrial. Il sera aussi intéressant de quantifier le facteur de transcription des gènes de la respiration, *Hap4*.

Dans un second temps, comme nous avons mesuré sur mitochondries isolées *atp18Δ* des flux respiratoires faibles à l'état phosphorylant traduisant une hyperpolarisation des mitochondries, il sera intéressant de déterminer s'il y a une augmentation de la production des EROs. Des études ont montré que l'inhibition de l'ATP synthase par des inhibiteurs favorise la production de EROs qui peut être contrée par l'ajout d'un agent découplant, abolissant le potentiel membranaire mitochondrial (Korshunov et al., 1997; Skulachev, 1996). De plus, si c'est le cas pour la souche *atp18Δ*, nous pourrions déterminer quels sont les mécanismes mis en place par la cellule pour lutter contre une quantité importante d'EROs en quantifiant les systèmes de détoxification telles que les catalases, les peroxydases et les SOD. Si les cellules *atp18Δ* accumulent une quantité élevée d'EROs avec un contenu mitochondrial très important,

la question sur la mise en place du processus de mitophagie devient encore plus pertinente. Enfin, d'après la littérature, les EROs, produites majoritairement par les OXPHOS, pourraient possiblement être des molécules de signalisation entre le noyau et les mitochondries (Suzuki et al., 1997). Vu dans leur ensemble, ces données laissent entrevoir plusieurs pistes d'investigation pour déterminer les processus biochimiques et de signalisation mis en place afin de permettre à la souche *atp18Δ* d'augmenter de façon aussi importante son contenu mitochondrial.

IV. Limites et perspectives de l'étude

Contrairement à la plupart des recherches précédentes qui ont été réalisées sur des enzymes et des mitochondries purifiées, mon travail s'est attaché à caractériser le rôle d'IF1 sur le métabolisme énergétique dans des conditions proches de l'*in vivo* sur des cellules intactes. Cependant, la levure possède une paroi cellulaire et des systèmes de défense contre les xénobiotiques tels que les transporteurs de la famille ABC, qui imposent d'importantes contraintes techniques et expérimentales. Par exemple, nous n'avons pas trouvé d'inhibiteur de l'ATP synthase pouvant efficacement inverser le défaut de croissance induit par le stress découplant chez la souche *inh1Δ stf1Δ* afin de conforter l'implication spécifique de l'hydrolyse d'ATP par l'ATP synthase dans ces conditions. J'ai pourtant traité les cellules avec différents inhibiteurs d'ATP synthase (oligomycine et triéthylétain), mais aucun n'a pu efficacement inverser le phénotype. L'oligomycine n'a eu aucun effet notable car probablement inefficace sur les cellules dans mes conditions. Le triéthylétain a impacté la croissance en condition fermentaire à cause potentiellement d'effet très aspécifiques. Toutefois, ces inhibiteurs affectent aussi la synthèse d'ATP, contrairement à l'inhibiteur chimique BMS-199264 capable d'inhiber spécifiquement l'activité hydrolytique de l'ATP synthase (Grover et al., 2004). La production de cet inhibiteur, très intéressant pour notre étude, a été interrompue pendant de nombreux mois et son coût prohibitif à l'époque de ma thèse explique que nous n'ayons pas pu expérimenter son action sur des cellules entières.

L'extraction protéique sur des cellules entières est bien plus rapide qu'une isolation de mitochondries par digestion enzymatique et présente l'avantage de s'affranchir de nombreux traitements chimiques visant à fragiliser la paroi cellulaire. Pour autant, l'extraction protéique cellulaire nécessite une casse mécanique à l'aide de billes de verre qui peut ne pas être neutre sur l'intégrité de l'ATP synthase et pourrait expliquer, en partie, la présence de F1 libre. L'un des arguments allant contre cette possibilité est que la souche *inh1Δ stf1Δ* présente, après la casse, le même niveau d'ATP synthase assemblées en oligomère et monomère et ne présente aucun F1 libre comparé au WT. Ne pouvant exclure le phénotype protecteur d'IF1/STF1 sur le F1 libre puisse intervenir post-casse cellulaire, il aurait été intéressant de réaliser différentes cinétiques de casse et de suivre par BN-PAGE la présence du F1 libre et par activité enzymatique

l'activité oligomycine insensible caractéristique du F1 libre. Afin de renforcer nos données et d'aller plus loin, il aurait été avantageux de pouvoir observer le F1 libre sur cellule directement en utilisant potentiellement les approches de microscopie à haute résolution développées par Karin Busch, mais leur applicabilité sur levure aurait probablement nécessité un investissement important de temps (Busch and Appelhans, 2018). Néanmoins, une technique alternative s'offre à nous, grâce à la nouvelle approche de microscopie par expansion développée par le Dr. Jim Dompierre et le Dr. Manuel Rojo au sein de l'IBGC. Le Dr. I Sagot et son équipe ont réussi à localiser l'ATP synthase au sein de la cellule vivante de levure par marquage à la GFP de différentes sous-unités dont la sous-unité γ du domaine F1 sans l'impacter fonctionnellement (Jimenez et al., 2014). L'utilisation de cette technique de marquage couplée à la microscopie par expansion pourra nous permettre de discriminer le F1 libre et les ATP synthases assemblées *in vivo*. De plus, nous aurions pu utiliser la méthode de pontage chimique afin de déterminer les proportions d'IF1 lié aux différentes entités d'ATP synthase. Il aurait été intéressant, d'exprimer une sous-unité du F1 marquée placée sous un promoteur inductible afin de nous permettre de suivre le devenir des assemblages ainsi que la stabilité au cours du temps des F1 libres ou liés, afin de mieux comprendre le rôle d'IF1/STF1 dans ce contexte. Enfin, les analyses structurales et fonctionnelles sur des mitochondries isolées des cellules $\rho^{-/0}$, auraient permis une meilleure détection du fait d'une concentration de matériel biologique plus importante. Nous aurions pu aussi, mesurer le potentiel membranaire des mitochondries isolées des cellules $\rho^{-/0}$ afin de déterminer s'il est diminué dans la souche *inh1 Δ stf1 Δ* à cause de la perte du F1 libre.

D'autre part, nous aurions pu aller plus loin dans la caractérisation des spécificités des métabolismes dans les différents milieux de culture en identifiant les métabolites intermédiaires produits par la cellule en fonction de la source carbonée. En particulier, l'utilisation de glycérol marqué au C13 aurait permis d'entériner de façon absolue le devenir du DHAP comme métabolite de la glycolyse. Nous aurions pu aussi lever l'incertitude de la capacité des levures à fermenter en glycérol, en quantifiant l'éthanol dans le milieu de culture en cours de la croissance cellulaire.

Le rôle métabolique d'IF1 a été mis en évidence dans notre étude dans des conditions artificielles de découplage, en traitant les cellules avec un agent protonophore chimique (CCCP). Cependant, nous pouvons entrevoir des conditions de découplage similaires dans l'environnement naturel des levures tels qu'un substrat riche en acide gras libre, qui sont des

molécules protonophores, ou une température environnementale élevée augmentant la perméabilité passive de la membrane interne mitochondriale aux protons. Chez le mammifère, nous avons l'exemple du tissu adipeux brun, qui présente physiologiquement un découplage mitochondrial lié à la présence de la protéine UCP1 en abondance dans la membrane interne mitochondriale. Cette protéine permet de dissiper l'énergie sous forme de chaleur plutôt que de la convertir en ATP. L'activité découplante de cette protéine UCP1 a d'ailleurs été validée par son expression exogène chez la levure (Stuart et al., 2001). Il aurait été avantageux pour notre étude d'utiliser ces levures mutantes exprimant UCP1 à la place d'un traitement au CCCP pour bénéficier d'un système de dépolarisation inductible et beaucoup plus spécifique.

Comme pour de nombreuses autres études, nous avons été confrontés à des limitations techniques et à un manque de temps, néanmoins, je veux croire que mon travail de recherche a permis de répondre à plusieurs questions et d'ouvrir de nombreuses perspectives de recherche.

CONCLUSIONS

V. Conclusions

Chez la levure et les mammifères, l'activité hydrolytique de l'ATP synthase est régulée par un inhibiteur endogène : IF1 (pour facteur d'inhibition 1). Ce peptide d'inhibiteur d'environ 9 kDa est codé par le gène nucléaire *INH1* et *ATIF1*, chez la levure et le mammifère, respectivement. Contrairement au mammifère, l'IF1 de levure a un homologue, STF1 encodé par le gène nucléaire *STF1*. Il a été mis en évidence *in vitro*, un rôle redondant des deux inhibiteurs avec cependant une affinité de liaison à l'ATP synthase plus faible pour STF1 comparé à IF1 (Venard et al., 2003). Le rôle métabolique d'IF1 a été très étudié en condition de stress démontrant son importance pour empêcher l'hydrolyse futile d'ATP dans des conditions où le potentiel membranaire est affaibli ou aboli. La séquence protéique et l'activité dépendante du pH d'IF1 ont été très conservées au cours de l'évolution. Initialement décrit comme étant un inhibiteur spécifique de l'activité hydrolytique, son implication dans la régulation de l'activité de synthèse ou dans l'oligomérisation de l'ATP synthase est aujourd'hui débattue. De plus, l'absence de phénotype sévère chez les organismes n'exprimant plus IF1 questionne sur le rôle physiologique de cet inhibiteur. Mon projet de thèse, réalisé chez *Saccharomyces cerevisiae*, s'est structuré en trois axes de recherche : (i) caractériser l'importance structurelle d'IF1 dans l'organisation supramoléculaire de l'ATP synthase de levure et sa capacité fonctionnelle à interagir et inhiber les différents assemblages de l'ATP synthase ; (ii) évaluer l'incidence de la perte d'IF1 sur la croissance et la bioénergétique mitochondriale dans différentes conditions métaboliques ; (iii) déterminer le rôle d'IF1 dans des conditions de déficiences mitochondriales induites par un stress de découplage des OXPHOS ou dans des situations de perte du génome mitochondrial.

Mes études structurales sur des mitochondries isolées ont pu mettre en évidence qu'IF1/STF1 sont indispensables à l'oligomérisation de l'ATP synthase. Cependant, des analyses fonctionnelles et structurales sur des extraits cellulaires ont montré, en absence d'IF1/STF1, une diminution drastique du sous-assemblage F1 d'ATP synthase. L'existence du domaine catalytique F1 libre de l'ATP synthase en tant qu'entité stable est débattue dans la littérature, car souvent considéré comme un artéfact d'expérimentation. De par ses caractéristiques telles que sa solubilité et sa résistance à l'oligomycine, nous avons mis en évidence que ce F1 libre

n'est pas un artéfact provenant de la déstabilisation des entités assemblées (monomères et oligomères) généré par le détergent ou au bleu de Coomassie du BN-PAGE. Au contraire, mes travaux ont montré que le bleu de charge du BN-PAGE confère une charge au F1 libre permettant une meilleure détection de celui-ci. Le F1 libre n'étant pas lié au potentiel membranaire mitochondrial, son activité hydrolytique peut s'avérer dangereuse pour le maintien de l'énergie cellulaire. J'ai mis en évidence qu'IF1 peut se lier et inhiber à pH 6,4 aux différentes entités d'ATP synthase, dont le F1 libre, de façon équivalente. Ces résultats ont permis d'identifier un nouveau rôle physiologique d'IF1 permettant de maintenir au sein de la cellule le niveau du sous-assemblage d'ATP synthase, le F1 libre. Il aurait été intéressant de déterminer si à long terme ce sous-assemblage est assemblé au domaine F₀ ou s'il est dégradé. De plus, nous pourrions pour la suite de l'étude déterminer le mécanisme de stabilisation du F1 par IF1.

Dans un second axe de recherche, nous avons évalué l'importance métabolique d'IF1/STF1, en suivant la prolifération cellulaire des souches WT et *inh1Δ stf1Δ* dans des conditions de croissances définies comme étant fermentescibles (glucose 0,5 % ou galactose 2%) et des conditions non-fermentescibles (glycérol 2% ou lactate 2%). J'ai favorisé l'activité hydrolytique de l'ATP synthase assemblée en induisant un stress de découplage mitochondrial. Le résultat de notre analyse démontre qu'IF1/STF1 est particulièrement important dans la seule situation combinant (i) une condition de croissance en glycérol et (ii) une condition de stress mitochondrial de découplage. D'un point de vue thermodynamique, il est totalement cohérent qu'IF1 soit important dans des conditions de dépolarisation où l'activité hydrolytique de l'ATP synthase est rendue possible par l'abolition des fortes contraintes thermodynamiques liées à la force protomotrice. Par contre, le fait que l'importance fonctionnelle du peptide inhibiteur IF1 ne soit visible qu'en condition de croissance en présence de glycérol et non lactate, était totalement inattendu. Afin de comprendre la spécificité métabolique de cette condition de croissance en glycérol, nous avons décidé de développer une nouvelle approche. Cette dernière permet de définir les conditions métaboliques cellulaires, non plus à travers leur capacité fermentescible, mais en fonction de la dépendance du maintien de la croissance vis à vis de la glycolyse et des OXPHOS. Ainsi, j'ai utilisé des souches génétiquement modifiées présentant un défaut de synthèse d'ATP via la voie glycolytique ou oxydative. Par cette technique j'ai mis en évidence que le métabolisme cellulaire des levures métabolisant le

glycérol devra être reconsidéré et défini comme glyco-oxydatif car le maintien de la croissance cellulaire dépend à la fois de la glycolyse et des OXPHOS. Il serait avantageux par cette simple méthode consistant à suivre la croissance cellulaire en présence d'inhibiteurs des voies métaboliques glycolytique et oxydative de déterminer, pour chaque type cellulaire (différenciées et cancéreuses), en fonction de chaque source carbonée, la dépendance métabolique vis-à-vis de ces voies.

Dans le troisième axe de notre étude, j'ai étudié le rôle d'IF1/STF1 dans un contexte ρ^- . La levure *S. cerevisiae* a la capacité de perdre spontanément partiellement ou totalement (ρ^-) son génome mitochondrial. Par conséquent, les cellules ρ^- ne possèdent pas de complexes OXPHOS assemblés mais présentent néanmoins un F1 libre à même d'hydrolyser l'ATP. Selon le dogme actuel, l'activité hydrolytique du F1 libre couplé à l'activité du transporteur ADP/ATP permettent de maintenir un potentiel mitochondrial suffisant, essentiel aux cellules ρ^- (Buchet and Godinot, 1998; Chen et al., 1998; Giraud and Velours, 1997). De manière surprenante, comme chez les ρ^+ , IF1/STF1 permettent de stabiliser le F1 chez les cellules ρ^- cultivées en milieu non-fermentescible. Allant à l'encontre du dogme actuel, la perte d'IF1 et, par conséquent, du F1 libre n'impacte pas la croissance des ρ^- . Mes travaux amènent à reconsidérer l'importance de l'activité hydrolytique dans le maintien du potentiel membranaire chez les cellules ρ^- . Il serait intéressant d'étudier l'activité d'autres ATPases et d'autres transporteurs électrogéniques mitochondriaux afin de déterminer les autres potentiels acteurs permettant de maintenir le potentiel membranaire mitochondrial dans les cellules ρ^- .

L'ATP synthase est une enzyme clé de la production d'énergie via la voie oxydative produisant une quantité importante d'ATP cellulaire. Plusieurs maladies génétiques ont été associées à un défaut d'ATP synthase, dû à diverses mutations affectant des gènes nucléaires codant pour des facteurs d'assemblage ou des sous-unités du complexe et aussi des mutations affectant des gènes mitochondriaux (Ghezzi and Zeviani, 2018). En parallèle, une surexpression d'IF1 a été associée à certains cancers et à des maladies génétiques (Gore et al., 2022; Mourier et al., 2014). Mes données ont permis d'en apprendre d'avantages sur le rôle métabolique d'IF1 en conditions physiologiques et de stress, permettant d'envisager IF1 à la fois comme un outil de diagnostic et une cible thérapeutique.

VI. Abréviations

$\rho^{-/0}$: levure ayant perdu partiellement (ρ^{-}) ou intégralement (ρ^0) son génome mitochondrial

ADN : acide désoxyribonucléique

ADNmt : acide désoxyribonucléique mitochondrial

ADNn : acide désoxyribonucléique nucléaire

ADP³⁻ : adénosine di phosphate

ANT : transporteur de nucléotides adényliques

APS : Persulfate d'amonium

ARN : acide ribonucléique

ASD : Albumine de sérum de bœuf

ATP⁴⁻ : adénosine tri phosphate

DAB : diaminobenzidine

BN-PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide natif bleu

CCCP : carbonyl cyanide m-chlorophenyl hydrazone

CN-PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide natif clair

Cryo-ME : cryo-microscopie électronique

DAPIT : pour « Diabetes-associated Protein in Insulin-sensitive Tissue »

DHAP : dihydroxyacétone phosphate

DO : densité optique

EROs : espèces réactives d'oxygène

FAD : flavine adénine dinucléotide

FCLS : variante canadienne française du syndrome de Leigh (pour « Leigh syndrome, French-Canadian type »)

Fe-S : centre fer-soufre

FMN : flavine mononucléotide

G3P : glycérol-3-phosphate

G3PDH : glycérol-3-phosphate déshydrogénase

HAP : pour « Heme Activator Protein »

IF1 : facteur d'inhibition 1

INAC : complexe d'assemblage de la membrane interne (pour « inner membrane assembly complex »)

INT : iodonitrotetrazolium

KCN : cyanure de potassium

Kpb : kilo paires de base

LRPPRC : Protéine contenant des répétitions de pentatrigo-peptides riches en leucine (pour « Leucine-Rich PentatrigoPeptide Repeat Containing protein »)

MEM : membrane externe mitochondriale

Mg²⁺ : ion magnésium

MIM : membrane interne mitochondriale

NADH : nicotinamide adénine dinucléotide

Nde1/2p : NADH déshydrogénases externes

Ndi : NADH déshydrogénase interne

OSCP : protéine conférant la sensibilité à l'oligomycine (pour « Oligomycin Sensitivity Conferring Protein »)

OXPHOS : oxydations phosphorylantes

PAGE : électrophorèse sur gel de polyacrylamide

PBS-T : tampon phosphate salin avec tween

PCR : réaction de polymérisation en chaîne

PGK1 : phosphoglycérate kinase 1

Pi : phosphate inorganique

PiC : transporteur de phosphate inorganique

Rpm : rotation par minute

SAB : sérum d'albumine de bovin

SDS : dodécylsulfate de sodium

SOD : superoxyde dismutases

Su : sous-unité (pour « subunit »)

TCA : Acide tricarboxylique

TEMED : N,N,N',N'-tétraméthylène diamine

TET : Triéthylétain

WT : souche sauvage (pour « Wild Type »)

VII. Bibliographie

- Abrahams, J.P., Leslie, A.G., Lutter, R., Walker, J.E., 1994. Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria. *Nature* 370, 621–628. <https://doi.org/10.1038/370621a0>
- Ackerman, S.H., 2002. Atp11p and Atp12p are chaperones for F1-ATPase biogenesis in mitochondria. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 12th European Bioenergetics Conference 1555, 101–105. [https://doi.org/10.1016/S0005-2728\(02\)00262-1](https://doi.org/10.1016/S0005-2728(02)00262-1)
- Ackerman, S.H., Tzagoloff, A., 1990. Identification of two nuclear genes (ATP11, ATP12) required for assembly of the yeast F1-ATPase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 87, 4986–4990.
- Anderson, S., Bankier, A.T., Barrell, B.G., de Bruijn, M.H.L., Coulson, A.R., Drouin, J., Eperon, I.C., Nierlich, D.P., Roe, B.A., Sanger, F., Schreier, P.H., Smith, A.J.H., Staden, R., Young, I.G., 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290, 457–465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>
- Ando, C., Ichikawa, N., 2008. Glutamic Acid in the Inhibitory Site of Mitochondrial ATPase Inhibitor, IF1, Participates in pH Sensing in Both Mammals and Yeast. *The Journal of Biochemistry* 144, 547–553. <https://doi.org/10.1093/jb/mvn100>
- Andrianaivomananjaona, T., Moune-Dimala, M., Herga, S., David, V., Haraux, F., 2011. How the N-terminal extremity of *Saccharomyces cerevisiae* IF1 interacts with ATP synthase: a kinetic approach. *Biochim Biophys Acta* 1807, 197–204. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.002>
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A., Schägger, H., 1999. ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of subunit j and disruption of the ATP18 gene. *J Biol Chem* 274, 36–40. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.1.36>
- Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R.A., Schägger, H., 1998. Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J* 17, 7170–7178. <https://doi.org/10.1093/emboj/17.24.7170>
- Aßkamp, M.R., Klein, M., Nevoigt, E., 2019. *Saccharomyces cerevisiae* exhibiting a modified route for uptake and catabolism of glycerol forms significant amounts of ethanol from this carbon source considered as ‘non-fermentable.’ *Biotechnol Biofuels* 12, 257. <https://doi.org/10.1186/s13068-019-1597-2>
- Barbato, S., Sgarbi, G., Gorini, G., Baracca, A., Solaini, G., 2015. The inhibitor protein (IF1) of the F1F0-ATPase modulates human osteosarcoma cell bioenergetics. *J Biol Chem* 290, 6338–6348. <https://doi.org/10.1074/jbc.M114.631788>
- Baylis Scanlon, J.A., Al-Shawi, M.K., Le, N.P., Nakamoto, R.K., 2007. Determination of the Partial Reactions of Rotational Catalysis in F1-ATPase. *Biochemistry* 46, 8785–8797. <https://doi.org/10.1021/bi700610m>
- Beauvoit, B., Rigoulet, M., 2001. Regulation of Cytochrome c Oxidase by Adenylic Nucleotides. Is Oxidative Phosphorylation Feedback Regulated by its End-Products? *IUBMB Life* 52, 143–152. <https://doi.org/10.1080/152165401317316545>
- Beauvoit, B., Rigoulet, M., Raffard, G., Canioni, P., Guérin, B., 1991. Differential sensitivity of the cellular compartments of *Saccharomyces cerevisiae* to protonophoric uncoupler under fermentative and respiratory energy supply. *Biochemistry* 30, 11212–11220. <https://doi.org/10.1021/bi00111a004>

- Bhatia-Kiššová, I., Camougrand, N., 2010. Mitophagy in yeast: actors and physiological roles: Mitophagy in yeast. *FEMS Yeast Research* 10, 1023–1034. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2010.00659.x>
- Blum, T.B., Hahn, A., Meier, T., Davies, K.M., Kühlbrandt, W., 2019. Dimers of mitochondrial ATP synthase induce membrane curvature and self-assemble into rows. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 116, 4250–4255. <https://doi.org/10.1073/pnas.1816556116>
- Bonnefoy, N., Fiumera, H.L., Dujardin, G., Fox, T.D., 2009. Roles of Oxa1-related inner-membrane translocases in assembly of respiratory chain complexes. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Assembly of the Mitochondrial Respiratory Chain* 1793, 60–70. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2008.05.004>
- Boubekur, S., Camougrand, N., Bunoust, O., Rigoulet, M., Guérin, B., 2001. Participation of acetaldehyde dehydrogenases in ethanol and pyruvate metabolism of the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 268, 5057–5065. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1033.2001.02418.x>
- Boveris, A., Oshino, N., Chance, B., 1972. The cellular production of hydrogen peroxide. *Biochem J* 128, 617–630. <https://doi.org/10.1042/bj1280617>
- Bowler, M.W., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 2007. Ground state structure of F1-ATPase from bovine heart mitochondria at 1.9 Å resolution. *J Biol Chem* 282, 14238–14242. <https://doi.org/10.1074/jbc.M700203200>
- Boyer, P.D., 1993. The binding change mechanism for ATP synthase--some probabilities and possibilities. *Biochim Biophys Acta* 1140, 215–250. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(93\)90063-l](https://doi.org/10.1016/0005-2728(93)90063-l)
- Buchanan, B.W., Lloyd, M.E., Engle, S.M., Rubenstein, E.M., 2016. Cycloheximide Chase Analysis of Protein Degradation in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Vis Exp* 53975. <https://doi.org/10.3791/53975>
- Buchet, K., Godinot, C., 1998. Functional F1-ATPase Essential in Maintaining Growth and Membrane Potential of Human Mitochondrial DNA-depleted ρ^0 Cells*. *Journal of Biological Chemistry* 273, 22983–22989. <https://doi.org/10.1074/jbc.273.36.22983>
- Busch, K.B., Appelhans, T., 2018. Microcompartmention of mitochondrial OXPHOS, resolved with superresolution microscopy. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, 20th European Bioenergetics Conference* 1859, e13–e14. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2018.09.042>
- Buschlen, S., Amillet, J.-M., Guiard, B., Fournier, A., Marcireau, C., Bolotin-Fukuhara, M., 2003. The *S. Cerevisiae* HAP Complex, a Key Regulator of Mitochondrial Function, Coordinates Nuclear and Mitochondrial Gene Expression. *Comp Funct Genomics* 4, 37–46. <https://doi.org/10.1002/cfg.254>
- Cabezón, E., Arechaga, I., Jonathan, P., Butler, G., Walker, J.E., 2000. Dimerization of Bovine F1-ATPase by Binding the Inhibitor Protein, IF1*. *Journal of Biological Chemistry* 275, 28353–28355. <https://doi.org/10.1074/jbc.C000427200>
- Cabezon, E., Butler, P.J.G., Runswick, M.J., Carbajo, R.J., Walker, J.E., 2002. Homologous and heterologous inhibitory effects of ATPase inhibitor proteins on F-ATPases. *J Biol Chem* 277, 41334–41341. <https://doi.org/10.1074/jbc.M207169200>
- Cabezon, E., Butler, P.J.G., Runswick, M.J., Walker, J.E., 2000. Modulation of the Oligomerization State of the Bovine F1-ATPase Inhibitor Protein, IF1, by pH *. *Journal of Biological Chemistry* 275, 25460–25464. <https://doi.org/10.1074/jbc.M003859200>

- Cabezón, E., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 2003. The structure of bovine F1-ATPase in complex with its regulatory protein IF1. *Nat Struct Biol* 10, 744–750. <https://doi.org/10.1038/nsb966>
- Cabezón, E., Runswick, M.J., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 2001. The structure of bovine IF1, the regulatory subunit of mitochondrial F-ATPase. *EMBO J* 20, 6990–6996. <https://doi.org/10.1093/emboj/20.24.6990>
- Cain, K., Griffiths, D.E., 1977. Studies of energy-linked reactions. Localization of the site of action of trialkyltin in yeast mitochondria. *Biochem J* 162, 575–580. <https://doi.org/10.1042/bj1620575>
- Campanella, M., Casswell, E., Chong, S., Farah, Z., Wieckowski, M.R., Abramov, A.Y., Tinker, A., Duchen, M.R., 2008. Regulation of mitochondrial structure and function by the F1Fo-ATPase inhibitor protein, IF1. *Cell Metab* 8, 13–25. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2008.06.001>
- Campanella, M., Parker, N., Tan, C.H., Hall, A.M., Duchen, M.R., 2009. IF1: setting the pace of the F1Fo-ATP synthase. *Trends in Biochemical Sciences* 34, 343–350. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2009.03.006>
- Chance, B., 1965. Reaction of Oxygen with the Respiratory Chain in Cells and Tissues. *Journal of General Physiology* 49, 163–188. <https://doi.org/10.1085/jgp.49.1.163>
- Chen, X.J., Clark-Walker, G.D., 1999. The Petite Mutation in Yeasts: 50 Years On, in: Jeon, K.W. (Ed.), *International Review of Cytology*. Academic Press, pp. 197–238. [https://doi.org/10.1016/S0074-7696\(08\)62397-9](https://doi.org/10.1016/S0074-7696(08)62397-9)
- Chen, X.J., Clark-Walker, G.D., 1993. Mutations in Mgi Genes Convert *Kluyveromyces Lactis* into a Petite-Positive Yeast. *Genetics* 133, 517–525.
- Chen, X.J., Hansbro, P.M., Clark-Walker, G.D., 1998. Suppression of p0 lethality by mitochondrial ATP synthase F1 mutations in *Kluyveromyces lactis* occurs in the absence of F0. *Mol Gen Genet* 259, 457–467. <https://doi.org/10.1007/s004380050836>
- Chevtzoff, C., Vallortigara, J., Avéret, N., Rigoulet, M., Devin, A., 2005. The yeast cAMP protein kinase Tpk3p is involved in the regulation of mitochondrial enzymatic content during growth. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1706, 117–125. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2004.10.001>
- Cintrón, N.M., Pedersen, P.L., 1979. A protein inhibitor of the mitochondrial adenosine triphosphatase complex of rat liver. Purification and characterization. *J Biol Chem* 254, 3439–3443.
- Clark-Walker, G.D., 2007. The F1-ATPase inhibitor Inh1 (IF1) affects suppression of mtDNA loss-lethality in *Kluyveromyces lactis*. *FEMS Yeast Res* 7, 665–674. <https://doi.org/10.1111/j.1567-1364.2006.00201.x>
- Cogliati, S., Enriquez, J.A., Scorrano, L., 2016. Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends Biochem Sci* 41, 261–273. <https://doi.org/10.1016/j.tibs.2016.01.001>
- Collinson, I.R., Runswick, M.J., Buchanan, S.K., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., van Raaij, M.J., Griffiths, D.E., Walker, J.E., 1994. F0 Membrane Domain of ATP Synthase from Bovine Heart Mitochondria: Purification, Subunit Composition, and Reconstitution with F1-ATPase. *Biochemistry* 33, 7971–7978. <https://doi.org/10.1021/bi00191a026>
- Cooper, C.E., Brown, G.C., 2008. The inhibition of mitochondrial cytochrome oxidase by the gases carbon monoxide, nitric oxide, hydrogen cyanide and hydrogen sulfide: chemical mechanism and physiological significance. *J Bioenerg Biomembr* 40, 533–539. <https://doi.org/10.1007/s10863-008-9166-6>

- Corvest, V., Sigalat, C., Haraux, F., 2007. Insight into the bind-lock mechanism of the yeast mitochondrial ATP synthase inhibitory peptide. *Biochemistry* 46, 8680–8688. <https://doi.org/10.1021/bi700522v>
- Corvest, V., Sigalat, C., Venard, R., Falson, P., Mueller, D.M., Haraux, F., 2005. The binding mechanism of the yeast F1-ATPase inhibitory peptide: role of catalytic intermediates and enzyme turnover. *J Biol Chem* 280, 9927–9936. <https://doi.org/10.1074/jbc.M414098200>
- Davies, K.M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gómez, J.D., Kühlbrandt, W., 2012. Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 109, 13602–13607. <https://doi.org/10.1073/pnas.1204593109>
- Davies, K.M., Blum, T.B., Kühlbrandt, W., 2018. Conserved in situ arrangement of complex I and III2 in mitochondrial respiratory chain supercomplexes of mammals, yeast, and plants. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 115, 3024–3029. <https://doi.org/10.1073/pnas.1720702115>
- de VRIES, S., Grivell, L.A., 1988. Purification and characterization of a rotenone-insensitive NADH: Q6 oxidoreductase from mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *European Journal of Biochemistry* 176, 377–384. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1988.tb14292.x>
- DeRisi, J.L., Iyer, V.R., Brown, P.O., 1997. Exploring the metabolic and genetic control of gene expression on a genomic scale. *Science* 278, 680–686. <https://doi.org/10.1126/science.278.5338.680>
- Devin, A., Dejean, L., Beauvoit, B., Chevzoff, C., Avéret, N., Bunoust, O., Rigoulet, M., 2006. Growth Yield Homeostasis in Respiring Yeast Is Due to a Strict Mitochondrial Content Adjustment*. *Journal of Biological Chemistry* 281, 26779–26784. <https://doi.org/10.1074/jbc.M604800200>
- Dienhart, M., Pfeiffer, K., Schagger, H., Stuart, R.A., 2002. Formation of the yeast F1Fo-ATP synthase dimeric complex does not require the ATPase inhibitor protein, Inh1. *J Biol Chem* 277, 39289–39295. <https://doi.org/10.1074/jbc.M205720200>
- Domínguez-Zorita, S., Cuezva, J.M., 2023. The Mitochondrial ATP Synthase/IF1 Axis in Cancer Progression: Targets for Therapeutic Intervention. *Cancers* 15. <https://doi.org/10.3390/cancers15153775>
- Dupont, C.H., Mazat, J.P., Guerin, B., 1985. The role of adenine nucleotide translocation in the energization of the inner membrane of mitochondria isolated from rho + and rho degree strains of *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochem Biophys Res Commun* 132, 1116–1123. [https://doi.org/10.1016/0006-291x\(85\)91922-9](https://doi.org/10.1016/0006-291x(85)91922-9)
- Faccenda, D., Nakamura, J., Gorini, G., Dhoot, G.K., Piacentini, M., Yoshida, M., Campanella, M., 2017. Control of Mitochondrial Remodeling by the ATPase Inhibitory Factor 1 Unveils a Pro-survival Relay via OPA1. *Cell Rep* 18, 1869–1883. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2017.01.070>
- Fang, J., Beattie, D.S., 2003. External alternative NADH dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*: a potential source of superoxide. *Free Radical Biology and Medicine* 34, 478–488. [https://doi.org/10.1016/S0891-5849\(02\)01328-X](https://doi.org/10.1016/S0891-5849(02)01328-X)
- Fernández-Cárdenas, L.P., Villanueva-Chimal, E., Salinas, L.S., José-Nuñez, C., Tuena de Gómez Puyou, M., Navarro, R.E., 2017. *Caenorhabditis elegans* ATPase inhibitor factor 1 (IF1) MAI-2 preserves the mitochondrial membrane potential ($\Delta\psi_m$) and is important to

- induce germ cell apoptosis. PLoS One 12, e0181984. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0181984>
- Fiala, G.J., Schamel, W.W.A., Blumenthal, B., 2011. Blue Native Polyacrylamide Gel Electrophoresis (BN-PAGE) for Analysis of Multiprotein Complexes from Cellular Lysates. J Vis Exp 2164. <https://doi.org/10.3791/2164>
- Fiedorczuk, K., Letts, J.A., Degliesposti, G., Kaszuba, K., Skehel, M., Sazanov, L.A., 2016. Atomic structure of the entire mammalian mitochondrial complex I. Nature 538, 406–410. <https://doi.org/10.1038/nature19794>
- Fillingame, R.H., Angevine, C.M., Dmitriev, O.Y., 2003. Mechanics of coupling proton movements to c-ring rotation in ATP synthase. FEBS Lett 555, 29–34. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(03\)01101-3](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(03)01101-3)
- Foury, F., Roganti, T., Lecrenier, N., Purnelle, B., 1998. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett 440, 325–331. [https://doi.org/10.1016/s0014-5793\(98\)01467-7](https://doi.org/10.1016/s0014-5793(98)01467-7)
- Frangione, B., Rosenwasser, E., Penefsky, H.S., Pullman, M.E., 1981. Amino acid sequence of the protein inhibitor of mitochondrial adenosine triphosphatase. Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 78, 7403. <https://doi.org/10.1073/pnas.78.12.7403>
- Frank, V., Kadenbach, B., 1996. Regulation of the H⁺/e⁻ stoichiometry of cytochrome c oxidase from bovine heart by intramitochondrial ATP/ADP ratios. FEBS Lett 382, 121–124. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(96\)00096-8](https://doi.org/10.1016/0014-5793(96)00096-8)
- Fujii, S., HASHIMOTO, T., YOSHIDA, Y., MIURA, R., YAMANO, T., TAGAWA, K., 1983. pH-Induced Conformational Change of ATPase Inhibitor from Yeast Mitochondria. A Proton Magnetic Resonance Study. The Journal of Biochemistry 93, 189–196. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134153>
- Fujikawa, M., Imamura, H., Nakamura, J., Yoshida, M., 2012. Assessing Actual Contribution of IF1, Inhibitor of Mitochondrial FoF1, to ATP Homeostasis, Cell Growth, Mitochondrial Morphology, and Cell Viability*. Journal of Biological Chemistry 287, 18781–18787. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.345793>
- Galkin, A., Brandt, U., 2005. Superoxide Radical Formation by Pure Complex I (NADH:Ubiquinone Oxidoreductase) from *Yarrowia lipolytica**. Journal of Biological Chemistry 280, 30129–30135. <https://doi.org/10.1074/jbc.M504709200>
- Galkina, K.V., Zubareva, V.M., Kashko, N.D., Lapashina, A.S., Markova, O.V., Feniouk, B.A., Knorre, D.A., 2022. Heterogeneity of Starved Yeast Cells in IF1 Levels Suggests the Role of This Protein in vivo. Front Microbiol 13, 816622. <https://doi.org/10.3389/fmicb.2022.816622>
- García, J.J., Morales-Ríos, E., Cortés-Hernandez, P., Rodríguez-Zavala, J.S., 2006. The inhibitor protein (IF1) promotes dimerization of the mitochondrial F1F0-ATP synthase. Biochemistry 45, 12695–12703. <https://doi.org/10.1021/bi060339j>
- García-Bermúdez, J., Sánchez-Aragó, M., Soldevilla, B., Del Arco, A., Nuevo-Tapióles, C., Cuezva, J.M., 2015. PKA Phosphorylates the ATPase Inhibitory Factor 1 and Inactivates Its Capacity to Bind and Inhibit the Mitochondrial H(+)-ATP Synthase. Cell Rep 12, 2143–2155. <https://doi.org/10.1016/j.celrep.2015.08.052>
- Ghezzi, D., Zeviani, M., 2018. Human diseases associated with defects in assembly of OXPHOS complexes. Essays Biochem 62, 271–286. <https://doi.org/10.1042/EBC20170099>
- Giraud, M.F., 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. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1997.00813.x>
- Gledhill, J.R., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 2007. How the regulatory protein, IF(1), inhibits F(1)-ATPase from bovine mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104, 15671–15676. <https://doi.org/10.1073/pnas.0707326104>
- Gore, E., Duparc, T., Genoux, A., Perret, B., Najib, S., Martinez, L.O., 2022. The Multifaceted ATPase Inhibitory Factor 1 (IF1) in Energy Metabolism Reprogramming and Mitochondrial Dysfunction: A New Player in Age-Associated Disorders? *Antioxid Redox Signal* 37, 370–393. <https://doi.org/10.1089/ars.2021.0137>
- Grover, G.J., Atwal, K.S., Slep, P.G., Wang, F.-L., Monshizadegan, H., Monticello, T., Green, D.W., 2004. Excessive ATP hydrolysis in ischemic myocardium by mitochondrial F1FO-ATPase: effect of selective pharmacological inhibition of mitochondrial ATPase hydrolase activity. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* 287, H1747-1755. <https://doi.org/10.1152/ajpheart.01019.2003>
- Gu, J., Wu, M., Guo, R., Yan, K., Lei, J., Gao, N., Yang, M., 2016. The architecture of the mammalian respirasome. *Nature* 537, 639–643. <https://doi.org/10.1038/nature19359>
- Gu, J., Zhang, L., Zong, S., Guo, R., Liu, T., Yi, J., Wang, P., Zhuo, W., Yang, M., 2019. Cryo-EM structure of the mammalian ATP synthase tetramer bound with inhibitory protein IF1. *Science* 364, 1068–1075. <https://doi.org/10.1126/science.aaw4852>
- Guérin, 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. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(79\)55021-6](https://doi.org/10.1016/0076-6879(79)55021-6)
- Guo, H., Bueller, S.A., Rubinstein, J.L., 2017. Atomic model for the dimeric FO region of mitochondrial ATP synthase. *Science* 358, 936–940. <https://doi.org/10.1126/science.aao4815>
- Guo, R., Zong, S., Wu, M., Gu, J., Yang, M., 2017. Architecture of Human Mitochondrial Respiratory Megacomplex I2III2IV2. *Cell* 170, 1247-1257.e12. <https://doi.org/10.1016/j.cell.2017.07.050>
- Gustafsson, L., 1991. Microbiological calorimetry. *Thermochimica Acta* 193, 145–171. [https://doi.org/10.1016/0040-6031\(91\)80181-H](https://doi.org/10.1016/0040-6031(91)80181-H)
- Habersetzer, J., Larrieu, I., Priault, M., Salin, B., Rossignol, R., Brèthes, D., Paumard, P., 2013. Human F1FO ATP Synthase, Mitochondrial Ultrastructure and OXPHOS Impairment: A (Super-)Complex Matter? *PLoS One* 8, e75429. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0075429>
- Hackenbrock, C.R., Chazotte, B., Gupte, S.S., 1986. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr* 18, 331–368. <https://doi.org/10.1007/BF00743010>
- Hahn, A., Parey, K., Bublitz, M., Mills, D.J., Zickermann, V., Vonck, J., Kühlbrandt, W., Meier, T., 2016. Structure of a Complete ATP Synthase Dimer Reveals the Molecular Basis of Inner Mitochondrial Membrane Morphology. *Mol Cell* 63, 445–456. <https://doi.org/10.1016/j.molcel.2016.05.037>
- Hartley, A.M., Lukoyanova, N., Zhang, Y., Cabrera-Orefice, A., Arnold, S., Meunier, B., Pinotsis, N., Maréchal, A., 2019. Structure of yeast cytochrome c oxidase in a supercomplex with cytochrome bc1. *Nat Struct Mol Biol* 26, 78–83. <https://doi.org/10.1038/s41594-018-0172-z>

- Hashimoto, T., Yoshida, Y., Tagawa, K., 1990. Regulatory proteins of F1F0-ATPase: role of ATPase inhibitor. *J Bioenerg Biomembr* 22, 27–38. <https://doi.org/10.1007/BF00762843>
- Hashimoto, T., Yoshida, Y., Tagawa, K., 1990. Simultaneous bindings of ATPase inhibitor and 9K protein to F1F0-ATPase in the presence of 15K protein in yeast mitochondria. *J Biochem* 108, 17–20. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a123154>
- Hashimoto, T., Yoshida, Y., Tagawa, K., 1984. Purification and Properties of Factors in Yeast Mitochondria Stabilizing the F1F0-ATPase-Inhibitor Complex. *The Journal of Biochemistry* 95, 131–136.
- Hashimoto, T., Yoshida, Y., Tagawa, K., 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, 715–720. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134411>
- He, J., Carroll, J., Ding, S., Fearnley, I.M., Montgomery, M.G., Walker, J.E., 2020. Assembly of the peripheral stalk of ATP synthase in human mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 117, 29602–29608. <https://doi.org/10.1073/pnas.2017987117>
- He, J., Ford, H.C., Carroll, J., Douglas, C., Gonzales, E., Ding, S., Fearnley, I.M., Walker, J.E., 2018. Assembly of the membrane domain of ATP synthase in human mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 2988–2993. <https://doi.org/10.1073/pnas.1722086115>
- Hedges, D., Proft, M., Entian, K.D., 1995. CAT8, a new zinc cluster-encoding gene necessary for derepression of gluconeogenic enzymes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol* 15, 1915–1922. <https://doi.org/10.1128/MCB.15.4.1915>
- Hirst, J., 2018. Open questions: respiratory chain supercomplexes—why are they there and what do they do? *BMC Biology* 16, 111. <https://doi.org/10.1186/s12915-018-0577-5>
- Hong, S., Pedersen, P.L., 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, 38–43. [https://doi.org/10.1016/s0003-9861\(02\)00303-x](https://doi.org/10.1016/s0003-9861(02)00303-x)
- Horstman, L.L., Racker, E., 1970. Partial Resolution of the Enzymes Catalyzing Oxidative Phosphorylation: XXII. INTERACTION BETWEEN MITOCHONDRIAL ADENOSINE TRIPHOSPHATASE INHIBITOR AND MITOCHONDRIAL ADENOSINE TRIPHOSPHATASE. *Journal of Biological Chemistry* 245, 1336–1344. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)63241-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)63241-7)
- Horvath, S.E., Daum, G., 2013. Lipids of mitochondria. *Progress in Lipid Research* 52, 590–614. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2013.07.002>
- Houštek, J., Pícková, A., Vojtíšková, A., Mráček, T., Pecina, P., Ješina, P., 2006. Mitochondrial diseases and genetic defects of ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics, Mitochondria: from Molecular Insight to Physiology and Pathology* 1757, 1400–1405. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2006.04.006>
- Ibrahim, N.G., Stuchell, R.N., Beattie, D.S., 1973. Formation of the Yeast Mitochondrial Membrane. *European Journal of Biochemistry* 36, 519–527. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1973.tb02938.x>
- Ichikawa, N., Ando, C., Fumino, M., 2006. *Caenorhabditis elegans* MAI-1 protein, which is similar to mitochondrial ATPase inhibitor (IF1), can inhibit yeast FOF1-ATPase but cannot be transported to yeast mitochondria. *J Bioenerg Biomembr* 38, 93–99. <https://doi.org/10.1007/s10863-006-9009-2>

- Ichikawa, N., Karaki, A., Kawabata, M., Ushida, S., Mizushima, M., Hashimoto, T., 2001. The Region from Phenylalanine-17 to Phenylalanine-28 of a Yeast Mitochondrial ATPase Inhibitor Is Essential for Its ATPase Inhibitory Activity. *The Journal of Biochemistry* 130, 687–693.
- Ichikawa, N., Ogura, C., 2003. Overexpression, purification, and characterization of human and bovine mitochondrial ATPase inhibitors: comparison of the properties of mammalian and yeast ATPase inhibitors. *J Bioenerg Biomembr* 35, 399–407. <https://doi.org/10.1023/a:1027383629565>
- Ichikawa, N., Ushida, S., Kawabata, M., Masazumi, Y., 1999. Nucleotide Sequence of cDNA Coding the Mitochondrial Precursor Protein of the ATPase Inhibitor from Humans. *Bioscience, Biotechnology, and Biochemistry* 63, 2225–2227. <https://doi.org/10.1271/bbb.63.2225>
- Ichikawa, N., Yoshida, Y., Hashimoto, T., Ogasawara, N., Yoshikawa, H., Imamoto, F., Tagawa, K., 1990. Activation of ATP hydrolysis by an uncoupler in mutant mitochondria lacking an intrinsic ATPase inhibitor in yeast. *Journal of Biological Chemistry* 265, 6274–6278. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)39321-4](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)39321-4)
- Ikon, N., Ryan, R.O., 2017. Cardiolipin and mitochondrial cristae organization. *Biochim Biophys Acta Biomembr* 1859, 1156–1163. <https://doi.org/10.1016/j.bbamem.2017.03.013>
- Jänsch, L., Kruff, V., Schmitz, U.K., Braun, H.-P., 1996. New insights into the composition, molecular mass and stoichiometry of the protein complexes of plant mitochondria. *The Plant Journal* 9, 357–368. <https://doi.org/10.1046/j.1365-3113.1996.09030357.x>
- Jia, L., Dienhart, M.K., Stuart, R.A., 2007. Oxa1 Directly Interacts with Atp9 and Mediates Its Assembly into the Mitochondrial F1Fo-ATP Synthase Complex. *Mol Biol Cell* 18, 1897–1908. <https://doi.org/10.1091/mbc.E06-10-0925>
- Jimenez, L., Laporte, D., Duvezin-Caubet, S., Courtout, F., Sagot, I., 2014. Mitochondrial ATP synthases cluster as discrete domains that reorganize with the cellular demand for oxidative phosphorylation. *Journal of Cell Science* 127, 719–726. <https://doi.org/10.1242/jcs.137141>
- Junesch, U., Gräber, P., 1987. Influence of the redox state and the activation of the chloroplast ATP synthase on proton-transport-coupled ATP synthesis/hydrolysis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 893, 275–288. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(87\)90049-1](https://doi.org/10.1016/0005-2728(87)90049-1)
- Junge, W., Lill, H., Engelbrecht, S., 1997. ATP synthase: an electrochemical transducer with rotatory mechanics. *Trends in Biochemical Sciences* 22, 420–423. [https://doi.org/10.1016/S0968-0004\(97\)01129-8](https://doi.org/10.1016/S0968-0004(97)01129-8)
- Kahancová, A., Sklenář, F., Ježek, P., Dlasková, A., 2020. Overexpression of native IF1 downregulates glucose-stimulated insulin secretion by pancreatic INS-1E cells. *Sci Rep* 10, 1551. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-58411-x>
- Kanki, T., Furukawa, K., Yamashita, S., 2015. Mitophagy in yeast: Molecular mechanisms and physiological role. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research, Mitophagy* 1853, 2756–2765. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2015.01.005>
- Kobayashi, R., Ueno, H., Okazaki, K.-I., Noji, H., 2023. Molecular mechanism on forcible ejection of ATPase inhibitory factor 1 from mitochondrial ATP synthase. *Nat Commun* 14, 1682. <https://doi.org/10.1038/s41467-023-37182-9>
- Korshunov, S.S., Skulachev, V.P., Starkov, A.A., 1997. High protonic potential actuates a mechanism of production of reactive oxygen species in mitochondria. *FEBS Letters* 416, 15–18. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(97\)01159-9](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(97)01159-9)

- Kováčová, V., Irmleřová, J., Kovác, L., 1968. Oxidative phosphorylation in yeast. IV. Combination of a nuclear mutation affecting oxidative phosphorylation with cytoplasmic mutation to respiratory deficiency. *Biochim Biophys Acta* 162, 157–163. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(68\)90097-2](https://doi.org/10.1016/0005-2728(68)90097-2)
- Krebs, H. a., Johnson, W. a., 1980. The role of citric acid in intermediate metabolism in animal tissues. *FEBS Letters* 117, K2–K10. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(80\)80564-3](https://doi.org/10.1016/0014-5793(80)80564-3)
- Kucharczyk, R., Ezkurdia, N., Couplan, E., Procaccio, V., Ackerman, S.H., Blondel, M., di Rago, J.-P., 2010. Consequences of the pathogenic T9176C mutation of human mitochondrial DNA on yeast mitochondrial ATP synthase. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 16th European Bioenergetics Conference 2010 1797, 1105–1112. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2009.12.022>
- Kunau, W.-H., Dommès, V., Schulz, H., 1995. β -Oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: A century of continued progress. *Progress in Lipid Research* 34, 267–342. [https://doi.org/10.1016/0163-7827\(95\)00011-9](https://doi.org/10.1016/0163-7827(95)00011-9)
- Kurihara, Y., Kanki, T., Aoki, Y., Hirota, Y., Saigusa, T., Uchiumi, T., Kang, D., 2012. Mitophagy Plays an Essential Role in Reducing Mitochondrial Production of Reactive Oxygen Species and Mutation of Mitochondrial DNA by Maintaining Mitochondrial Quantity and Quality in Yeast*. *Journal of Biological Chemistry* 287, 3265–3272. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.280156>
- Larrieu, I., Tolchard, J., Sanchez, C., Kone, E.Y., Barras, A., Stines-Chaumeil, C., Odaert, B., Giraud, M.-F., 2017. Cell-Free Expression for the Study of Hydrophobic Proteins: The Example of Yeast ATP-Synthase Subunits, in: Lacapere, J.-J. (Ed.), *Membrane Protein Structure and Function Characterization: Methods and Protocols*. Springer, New York, NY, pp. 57–90. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-7151-0_4
- Larsson, C., Pålman, I.-L., Ansell, R., Rigoulet, M., Adler, L., Gustafsson, L., 1998. The importance of the glycerol 3-phosphate shuttle during aerobic growth of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 14, 347–357. [https://doi.org/10.1002/\(SICI\)1097-0061\(19980315\)14:4<347::AID-YEA226>3.0.CO;2-9](https://doi.org/10.1002/(SICI)1097-0061(19980315)14:4<347::AID-YEA226>3.0.CO;2-9)
- Lascaris, R., Bussemaker, H.J., Boorsma, A., Piper, M., van der Spek, H., Grivell, L., Blom, J., 2003. Hap4p overexpression in glucose-grown *Saccharomyces cerevisiae* induces cells to enter a novel metabolic state. *Genome Biol* 4, R3. <https://doi.org/10.1186/gb-2002-4-1-r3>
- Lasserre, J.-P., Dautant, A., Aiyar, R.S., Kucharczyk, R., Glatigny, A., Tribouillard-Tanvier, D., Rytka, J., Blondel, M., Skoczen, N., Reynier, P., Pitayu, L., Rötig, A., Delahodde, A., Steinmetz, L.M., Dujardin, G., Procaccio, V., di Rago, J.-P., 2015. Yeast as a system for modeling mitochondrial disease mechanisms and discovering therapies. *Dis Model Mech* 8, 509–526. <https://doi.org/10.1242/dmm.020438>
- Le Breton, N., Adrianaivomananjaona, T., Gerbaud, G., Etienne, E., Bisetto, E., Dautant, A., Guigliarelli, B., Haraux, F., Martinho, M., Belle, V., 2016. Dimerization interface and dynamic properties of yeast IF1 revealed by Site-Directed Spin Labeling EPR spectroscopy. *Biochim Biophys Acta* 1857, 89–97. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2015.10.010>
- Lefebvre-Legendre, L., Vaillier, J., Benabdelhak, H., Velours, J., Slonimski, P.P., di Rago, J.-P., 2001. Identification of a Nuclear Gene (*FMC1*) Required for the Assembly/Stability of Yeast Mitochondrial F1-ATPase in Heat Stress Conditions*. *Journal of Biological Chemistry* 276, 6789–6796. <https://doi.org/10.1074/jbc.M009557200>

- Li, L., Carrie, C., Nelson, C., Whelan, J., Millar, A.H., 2012. Accumulation of Newly Synthesized F1 in Vivo in Arabidopsis Mitochondria Provides Evidence for Modular Assembly of the Plant F1Fo ATP Synthase. *J Biol Chem* 287, 25749–25757. <https://doi.org/10.1074/jbc.M112.373506>
- Liu, Siqi, Liu, Shanshan, He, B., Li, Lanlan, Li, Lin, Wang, J., Cai, T., Chen, S., Jiang, H., 2021. OXPPOS deficiency activates global adaptation pathways to maintain mitochondrial membrane potential. *EMBO Rep* 22, e51606. <https://doi.org/10.15252/embr.202051606>
- Lu, Y.-M., Miyazawa, K., Yamaguchi, K., Nowaki, K., Iwatsuki, H., Wakamatsu, Y., Ichikawa, N., Hashimoto, T., 2001. Deletion of Mitochondrial ATPase Inhibitor in the Yeast *Saccharomyces cerevisiae* Decreased Cellular and Mitochondrial ATP Levels under Non-Nutritional Conditions and Induced a Respiration-Deficient Cell-Type1. *The Journal of Biochemistry* 130, 873–878. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003060>
- Matsubara, H., Hase, T., Hashimoto, T., Tagawa, K., 1981. Amino Acid Sequence of an Intrinsic Inhibitor of Mitochondrial ATPase from Yeast. *The Journal of Biochemistry* 90, 1159–1165.
- Matsubara, H., Inoue, K., Hashimoto, T., Yoshida, Y., Tagawa, K., 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, 315–318. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a134347>
- Messner, K.R., Imlay, J.A., 2002. Mechanism of Superoxide and Hydrogen Peroxide Formation by Fumarate Reductase, Succinate Dehydrogenase, and Aspartate Oxidase *. *Journal of Biological Chemistry* 277, 42563–42571. <https://doi.org/10.1074/jbc.M204958200>
- Mitchell, P., 1961. Coupling of Phosphorylation to Electron and Hydrogen Transfer by a Chemi-Osmotic type of Mechanism. *Nature* 191, 144–148. <https://doi.org/10.1038/191144a0>
- Molinié, T., Cougouilles, E., David, C., Cahoreau, E., Portais, J.-C., Mourier, A., 2022. MDH2 produced OAA is a metabolic switch rewiring the fuelling of respiratory chain and TCA cycle. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1863, 148532. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2022.148532>
- Mourier, A., Ruzzenente, B., Brandt, T., Kühlbrandt, W., Larsson, N.-G., 2014. Loss of LRPPRC causes ATP synthase deficiency. *Hum Mol Genet* 23, 2580–2592. <https://doi.org/10.1093/hmg/ddt652>
- Moyle, J., Mitchell, P., 1975. Active/inactive state transitions of mitochondrial ATPase molecules influenced by Mg²⁺, anions and aurovertin. *FEBS Lett* 56, 55–61. [https://doi.org/10.1016/0014-5793\(75\)80110-4](https://doi.org/10.1016/0014-5793(75)80110-4)
- Nakamoto, R.K., Scanlon, J.A.B., Al-Shawi, M.K., 2008. The Rotary Mechanism of the ATP Synthase. *Arch Biochem Biophys* 476, 43–50. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2008.05.004>
- Nakamura, J., Fujikawa, M., Yoshida, M., 2013. IF1, a natural inhibitor of mitochondrial ATP synthase, is not essential for the normal growth and breeding of mice. *Biosci Rep* 33, e00067. <https://doi.org/10.1042/BSR20130078>
- Nalin, C.M., McCarty, R.E., 1984. Role of a disulfide bond in the gamma subunit in activation of the ATPase of chloroplast coupling factor 1. *J Biol Chem* 259, 7275–7280.
- Naumenko, N., Morgenstern, M., Rucktäschel, R., Warscheid, B., Rehling, P., 2017. INA complex liaises the F1Fo-ATP synthase membrane motor modules. *Nat Commun* 8, 1237. <https://doi.org/10.1038/s41467-017-01437-z>

- Nicholls, D.G., Ferguson, S.J., 2013. Preface, in: Nicholls, D.G., Ferguson, S.J. (Eds.), *Bioenergetics* (Fourth Edition). Academic Press, Boston, pp. ix–x. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-388425-1.00017-8>
- Nijtmans, L.G.J., Klement, P., Houšťek, J., Van Den Bogert, C., 1995. Assembly of mitochondrial ATP synthase in cultured human cells: implications for mitochondrial diseases. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Basis of Disease* 1272, 190–198. [https://doi.org/10.1016/0925-4439\(95\)00087-9](https://doi.org/10.1016/0925-4439(95)00087-9)
- Norling, B., Tourikas, C., Hamasur, B., Glaser, E., 1990. Evidence for an endogenous ATPase inhibitor protein in plant mitochondria. *European Journal of Biochemistry* 188, 247–252. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb15396.x>
- Okada, Y., Hashimoto, T., Yoshida, Y., Tagawa, K., 1986. Existence of stoichiometric amounts of an intrinsic ATPase inhibitor and two stabilizing factors with mitochondrial ATP synthase in yeast. *J Biochem* 99, 251–256. <https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.jbchem.a135466>
- Okamoto, K., Kondo-Okamoto, N., Ohsumi, Y., 2009. Mitochondria-Anchored Receptor Atg32 Mediates Degradation of Mitochondria via Selective Autophagy. *Developmental Cell* 17, 87–97. <https://doi.org/10.1016/j.devcel.2009.06.013>
- Påhlman, I.L., Gustafsson, L., Rigoulet, M., Larsson, C., 2001. Cytosolic redox metabolism in aerobic chemostat cultures of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 18, 611–620. <https://doi.org/10.1002/yea.709>
- Paul, M.-F., Velours, J., ARSELIN de CHATEAUBODEAU, G., Aigle, M., Guerin, B., 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. *European Journal of Biochemistry* 185, 163–171. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1989.tb15098.x>
- Paumard, P., Vaillier, J., Couлары, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D.M., Brèthes, D., di Rago, J.-P., Velours, J., 2002. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J* 21, 221–230. <https://doi.org/10.1093/emboj/21.3.221>
- Pfanner, N., Warscheid, B., Wiedemann, N., 2019. Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nat Rev Mol Cell Biol* 20, 267–284. <https://doi.org/10.1038/s41580-018-0092-0>
- Pinke, G., Zhou, L., Sazanov, L.A., 2020. Cryo-EM structure of the entire mammalian F-type ATP synthase. *Nat Struct Mol Biol* 27, 1077–1085. <https://doi.org/10.1038/s41594-020-0503-8>
- Pogoryelov, D., Yildiz, Ö., Faraldo-Gómez, J.D., Meier, T., 2009. High-resolution structure of the rotor ring of a proton-dependent ATP synthase. *Nat Struct Mol Biol* 16, 1068–1073. <https://doi.org/10.1038/nsmb.1678>
- Priault, M., Salin, B., Schaeffer, J., Vallette, F.M., di Rago, J.-P., Martinou, J.-C., 2005. Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast. *Cell Death Differ* 12, 1613–1621. <https://doi.org/10.1038/sj.cdd.4401697>
- Pullman, M.E., Monroy, G.C., 1963. A Naturally Occurring Inhibitor of Mitochondrial Adenosine Triphosphatase. *Journal of Biological Chemistry* 238, 3762–3769. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)75338-1](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)75338-1)
- Rak, M., Gokova, S., Tzagoloff, A., 2011. Modular assembly of yeast mitochondrial ATP synthase. *EMBO J* 30, 920–930. <https://doi.org/10.1038/emboj.2010.364>
- Rak, M., Tetaud, E., Godard, F., Sagot, I., Salin, B., Duvezin-Caubet, S., Slonimski, P.P., Rytka, J., di Rago, J.-P., 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, 10853–10864. <https://doi.org/10.1074/jbc.M608692200>
- Rak, M., Tzagoloff, A., 2009. F₁-dependent translation of mitochondrially encoded Atp6p and Atp8p subunits of yeast ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 18509–18514. <https://doi.org/10.1073/pnas.0910351106>
- Rees, D.M., Montgomery, M.G., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 2012. Structural evidence of a new catalytic intermediate in the pathway of ATP hydrolysis by F₁-ATPase from bovine heart mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 109, 11139–11143. <https://doi.org/10.1073/pnas.1207587109>
- Ren, M., Phoon, C.K.L., Schlame, M., 2014. Metabolism and function of mitochondrial cardiolipin. *Prog Lipid Res* 55, 1–16. <https://doi.org/10.1016/j.plipres.2014.04.001>
- Ritov, V.B., Tverdislova, I.L., Avakyan TYu, null, Menshikova, E.V., Leikin YuN, null, Bratkovskaya, L.B., Shimon, R.G., 1992. Alamethicin-induced pore formation in biological membranes. *Gen Physiol Biophys* 11, 49–58.
- Robinson, G.C., Bason, J.V., Montgomery, M.G., Fearnley, I.M., Mueller, D.M., Leslie, A.G.W., Walker, J.E., 2013. The structure of F₁-ATPase from *Saccharomyces cerevisiae* inhibited by its regulatory protein IF₁. *Open Biol* 3, 120164. <https://doi.org/10.1098/rsob.120164>
- Romero-Carramiñana, I., Esparza-Moltó, P.B., Domínguez-Zorita, S., Nuevo-Tapióles, C., Cuezva, J.M., 2023. IF₁ promotes oligomeric assemblies of sluggish ATP synthase and outlines the heterogeneity of the mitochondrial membrane potential. *Commun Biol* 6, 836. <https://doi.org/10.1038/s42003-023-05214-1>
- Rønnow, B., Kielland-Brandt, M.C., 1993. GUT2, a gene for mitochondrial glycerol 3-phosphate dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 9, 1121–1130. <https://doi.org/10.1002/yea.320091013>
- Rouslin, W., Broge, C.W., 1996. IF₁ function in situ in uncoupler-challenged ischemic rabbit, rat, and pigeon hearts. *J Biol Chem* 271, 23638–23641. <https://doi.org/10.1074/jbc.271.39.23638>
- Rouslin, W., Pullman, M.E., 1987. Protonic inhibition of the mitochondrial adenosine 5'-triphosphatase in ischemic cardiac muscle. Reversible binding of the ATPase inhibitor protein to the mitochondrial ATPase during ischemia. *J Mol Cell Cardiol* 19, 661–668. [https://doi.org/10.1016/s0022-2828\(87\)80374-7](https://doi.org/10.1016/s0022-2828(87)80374-7)
- Sagan, L., 1967. On the origin of mitosing cells. *Journal of Theoretical Biology* 14, 225-IN6. [https://doi.org/10.1016/0022-5193\(67\)90079-3](https://doi.org/10.1016/0022-5193(67)90079-3)
- Salewskij, K., Rieger, B., Hager, F., Arroum, T., Duwe, P., Villalta, J., Colgiati, S., Richter, C.P., Psathaki, O.E., Enriquez, J.A., Dellmann, T., Busch, K.B., 2020. The spatio-temporal organization of mitochondrial F₁FO ATP synthase in cristae depends on its activity mode. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1861, 148091. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2019.148091>
- Sambongi, Y., Iko, Y., Tanabe, M., Omote, H., Iwamoto-Kihara, A., Ueda, I., Yanagida, T., Wada, Y., Futai, M., 1999. Mechanical rotation of the c subunit oligomer in ATP synthase (FOF₁): direct observation. *Science* 286, 1722–1724. <https://doi.org/10.1126/science.286.5445.1722>
- Santangelo, G.M., 2006. Glucose signaling in *Saccharomyces cerevisiae*. *Microbiol Mol Biol Rev* 70, 253–282. <https://doi.org/10.1128/MMBR.70.1.253-282.2006>
- Schägger, H., Pfeiffer, K., 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 19, 1777–1783. <https://doi.org/10.1093/emboj/19.8.1777>

- Schägger, 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. [https://doi.org/10.1016/0003-2697\(87\)90587-2](https://doi.org/10.1016/0003-2697(87)90587-2)
- Schatz, G., 1968. Impaired binding of mitochondrial adenosine triphosphatase in the cytoplasmic “petite” mutant of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 243, 2192–2199.
- Schnizer, R., Van Heeke, G., Amaturro, D., Schuster, S.M., 1996. Histidine-49 is necessary for the pH-dependent transition between active and inactive states of the bovine F1-ATPase inhibitor protein. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology* 1292, 241–248. [https://doi.org/10.1016/0167-4838\(95\)00208-1](https://doi.org/10.1016/0167-4838(95)00208-1)
- Schwarz, D., Junge, F., Durst, F., Frölich, N., Schneider, B., Reckel, S., Sobhanifar, S., Dötsch, V., Bernhard, F., 2007. Preparative scale expression of membrane proteins in *Escherichia coli*-based continuous exchange cell-free systems. *Nat Protoc* 2, 2945–2957. <https://doi.org/10.1038/nprot.2007.426>
- Schweppe, D.K., Chavez, J.D., Lee, C.F., Caudal, A., Kruse, S.E., Stuppard, R., Marcinek, D.J., Shadel, G.S., Tian, R., Bruce, J.E., 2017. Mitochondrial protein interactome elucidated by chemical cross-linking mass spectrometry. *Proc Natl Acad Sci U S A* 114, 1732–1737. <https://doi.org/10.1073/pnas.1617220114>
- Schwerzmann, K., Pedersen, P.L., 1986. Regulation of the mitochondrial ATP synthase/ATPase complex. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 250, 1–18. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(86\)90695-8](https://doi.org/10.1016/0003-9861(86)90695-8)
- Schwimmer, C., Lefebvre-Legendre, L., Rak, M., Devin, A., Slonimski, P.P., Rago, J.-P. di, Rigoulet, M., 2005. Increasing Mitochondrial Substrate-level Phosphorylation Can Rescue Respiratory Growth of an ATP Synthase-deficient Yeast *. *Journal of Biological Chemistry* 280, 30751–30759. <https://doi.org/10.1074/jbc.M501831200>
- Sgarbi, G., Barbato, S., Costanzini, A., Solaini, G., Baracca, A., 2018. The role of the ATPase inhibitor factor 1 (IF1) in cancer cells adaptation to hypoxia and anoxia. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 1859, 99–109. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2017.10.007>
- Singer, T.P., Massey, V., Kearney, E.B., 1957. Studies on succinic dehydrogenase. V. Isolation and properties of the dehydrogenase from baker’s yeast. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 69, 405–421. [https://doi.org/10.1016/0003-9861\(57\)90506-4](https://doi.org/10.1016/0003-9861(57)90506-4)
- Skulachev, V.P., 1996. Role of uncoupled and non-coupled oxidations in maintenance of safely low levels of oxygen and its one-electron reductants. *Q Rev Biophys* 29, 169–202. <https://doi.org/10.1017/s0033583500005795>
- Small, W.C., McAlister-Henn, L., 1998. Identification of a Cytosolically Directed NADH Dehydrogenase in Mitochondria of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Bacteriol* 180, 4051–4055. <https://doi.org/10.1128/JB.180.16.4051-4055.1998>
- Solaini, G., Harris, D.A., 2005. Biochemical dysfunction in heart mitochondria exposed to ischaemia and reperfusion. *Biochem J* 390, 377–394. <https://doi.org/10.1042/BJ20042006>
- Song, J., Pfanner, N., Becker, T., 2018. Assembling the mitochondrial ATP synthase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 115, 2850–2852. <https://doi.org/10.1073/pnas.1801697115>
- Spang, A., Saw, J.H., Jørgensen, S.L., Zaremba-Niedzwiedzka, K., Martijn, J., Lind, A.E., van Eijk, R., Schleper, C., Guy, L., Ettema, T.J.G., 2015. Complex archaea that bridge the gap between prokaryotes and eukaryotes. *Nature* 521, 173–179. <https://doi.org/10.1038/nature14447>

- Spikes, T.E., Montgomery, M.G., Walker, J.E., 2021. Interface mobility between monomers in dimeric bovine ATP synthase participates in the ultrastructure of inner mitochondrial membranes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 118, e2021012118. <https://doi.org/10.1073/pnas.2021012118>
- Sprague, G.F., 1977. Isolation and characterization of a *Saccharomyces cerevisiae* mutant deficient in pyruvate kinase activity. *J Bacteriol* 130, 232–241.
- Srivastava, A.P., Luo, M., Zhou, W., Symersky, J., Bai, D., Chambers, M.G., Faraldo-Gómez, J.D., Liao, M., Mueller, D.M., 2018. High-resolution cryo-EM analysis of the yeast ATP synthase in a lipid membrane. *Science* 360, eaas9699. <https://doi.org/10.1126/science.aas9699>
- Stoldt, S., Wenzel, D., Kehrein, K., Riedel, D., Ott, M., Jakobs, S., 2018. Spatial orchestration of mitochondrial translation and OXPHOS complex assembly. *Nat Cell Biol* 20, 528–534. <https://doi.org/10.1038/s41556-018-0090-7>
- Stone, J.R., Yang, S., 2006. Hydrogen peroxide: a signaling messenger. *Antioxid Redox Signal* 8, 243–270. <https://doi.org/10.1089/ars.2006.8.243>
- Strauss, M., Hofhaus, G., Schröder, R.R., Kühlbrandt, W., 2008. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J* 27, 1154–1160. <https://doi.org/10.1038/emboj.2008.35>
- Stuart, J.A., Harper, J.A., Brindle, K.M., Jekabsons, M.B., Brand, M.D., 2001. A mitochondrial uncoupling artifact can be caused by expression of uncoupling protein 1 in yeast. *Biochem J* 356, 779–789.
- Sun, J., Trumpower, B.L., 2003. Superoxide anion generation by the cytochrome *bc1* complex. *Archives of Biochemistry and Biophysics* 419, 198–206. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2003.08.028>
- Sun, L., Nakamae, N., Ichikawa, N., 2015. The region from phenylalanine-28 to lysine-50 of a yeast mitochondrial ATPase inhibitor (IF1) forms an α -helix in solution. *J Bioenerg Biomembr* 47, 457–465. <https://doi.org/10.1007/s10863-015-9627-7>
- Suzuki, Y.J., Forman, H.J., Sevanian, A., 1997. Oxidants as stimulators of signal transduction. *Free Radic Biol Med* 22, 269–285. [https://doi.org/10.1016/s0891-5849\(96\)00275-4](https://doi.org/10.1016/s0891-5849(96)00275-4)
- Tessier, W.D., Meaden, P.G., Dickinson, F.M., Midgley, M., 1998. Identification and disruption of the gene encoding the K⁺-activated acetaldehyde dehydrogenase of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiology Letters* 164, 29–34. <https://doi.org/10.1111/j.1574-6968.1998.tb13063.x>
- Toda, T., Cameron, S., Sass, P., Zoller, M., Wigler, M., 1987. Three different genes in *S. cerevisiae* encode the catalytic subunits of the cAMP-dependent protein kinase. *Cell* 50, 277–287. [https://doi.org/10.1016/0092-8674\(87\)90223-6](https://doi.org/10.1016/0092-8674(87)90223-6)
- Tomasetig, L., Di Pancrazio, F., Harris, D.A., Mavelli, I., Lippe, G., 2002. Dimerization of FOF1ATP synthase from bovine heart is independent from the binding of the inhibitor protein IF1. *Biochim Biophys Acta* 1556, 133–141. [https://doi.org/10.1016/s0005-2728\(02\)00344-4](https://doi.org/10.1016/s0005-2728(02)00344-4)
- Trouillard, M., Meunier, B., Rappaport, F., 2011. Questioning the functional relevance of mitochondrial supercomplexes by time-resolved analysis of the respiratory chain. *Proceedings of the National Academy of Sciences* 108, E1027–E1034. <https://doi.org/10.1073/pnas.1109510108>
- Tsunoda, S.P., Rodgers, A.J.W., Aggeler, R., Wilce, M.C.J., Yoshida, M., Capaldi, R.A., 2001. Large conformational changes of the ϵ subunit in the bacterial F1FO ATP synthase provide a

- ratchet action to regulate this rotary motor enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A* 98, 6560–6564. <https://doi.org/10.1073/pnas.111128098>
- Tzagoloff, A., Akai, A., Needleman, R., 1975. Assembly of the mitochondrial membrane system. Characterization of nuclear mutants of *Saccharomyces cerevisiae* with defects in mitochondrial ATPase and respiratory enzymes. *Journal of Biological Chemistry* 250, 8228–8235. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(19\)40840-5](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(19)40840-5)
- Vaillier, J., Arselin, G., Graves, P.V., Camougrand, N., Velours, J., 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, 543–548. <https://doi.org/10.1074/jbc.274.1.543>
- Van De Stadt, R.J., De Boer, B.L., Van Dam, K., 1973. The interaction between the mitochondrial ATPase (F1) and the ATPase inhibitor. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics* 292, 338–349. [https://doi.org/10.1016/0005-2728\(73\)90040-6](https://doi.org/10.1016/0005-2728(73)90040-6)
- van Raaij, M.J., Orriss, G.L., Montgomery, M.G., Runswick, M.J., Fearnley, I.M., Skehel, J.M., Walker, J.E., 1996. The ATPase inhibitor protein from bovine heart mitochondria: the minimal inhibitory sequence. *Biochemistry* 35, 15618–15625. <https://doi.org/10.1021/bi960628f>
- Vanderwaeren, L., Dok, R., Voordeckers, K., Nuyts, S., Verstrepen, K.J., 2022. *Saccharomyces cerevisiae* as a Model System for Eukaryotic Cell Biology, from Cell Cycle Control to DNA Damage Response. *Int J Mol Sci* 23, 11665. <https://doi.org/10.3390/ijms231911665>
- Venard, R., Brèthes, D., Giraud, M.-F., Vaillier, J., Velours, J., Haraux, F., 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, 7626–7636. <https://doi.org/10.1021/bi034394t>
- Vik, S.B., Antonio, B.J., 1994. A mechanism of proton translocation by F1F0 ATP synthases suggested by double mutants of the a subunit. *Journal of Biological Chemistry* 269, 30364–30369. [https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)43822-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)43822-7)
- Vinothkumar, K.R., Zhu, J., Hirst, J., 2014. Architecture of mammalian respiratory complex I. *Nature* 515, 80–84. <https://doi.org/10.1038/nature13686>
- Wagner, K., Perschil, I., Fichter, C.D., van der Laan, M., 2010. Stepwise Assembly of Dimeric F1Fo-ATP Synthase in Mitochondria Involves the Small Fo-Subunits k and i. *Mol Biol Cell* 21, 1494–1504. <https://doi.org/10.1091/mbc.E09-12-1023>
- Walker, J.E., Fearnley, I.M., Gay, N.J., Gibson, B.W., Northrop, F.D., Powell, S.J., Runswick, M.J., Saraste, M., Tybulewicz, V.L.J., 1985. Primary structure and subunit stoichiometry of F1-ATPase from bovine mitochondria. *Journal of Molecular Biology* 184, 677–701. [https://doi.org/10.1016/0022-2836\(85\)90313-4](https://doi.org/10.1016/0022-2836(85)90313-4)
- Wang, Z., Wu, M., 2015. An integrated phylogenomic approach toward pinpointing the origin of mitochondria. *Sci Rep* 5, 7949. <https://doi.org/10.1038/srep07949>
- Warburg, O., 1956. On the Origin of Cancer Cells. *Science* 123, 309–314. <https://doi.org/10.1126/science.123.3191.309>
- Weissert, V., Rieger, B., Morris, S., Arroum, T., Psathaki, O.E., Zobel, T., Perkins, G., Busch, K.B., 2021. Inhibition of the mitochondrial ATPase function by IF1 changes the spatiotemporal organization of ATP synthase. *Biochim Biophys Acta Bioenerg* 1862, 148322. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2020.148322>
- Westerhoff, H.V., Hellingwerf, K.J., Van Dam, K., 1983. Thermodynamic efficiency of microbial growth is low but optimal for maximal growth rate. *Proc Natl Acad Sci U S A* 80, 305–309.

- Winzler, E.A., Shoemaker, D.D., Astromoff, A., Ung, H., Anderson, K., Andre, B., Bangham, R., Benito, R., Boeke, J.D., Bussey, H., Chu, A.M., Connelly, C., Davis, K., Dietrich, F., Dow, S.W., Bakkoury, M.E., Foury, F., Friend, S.H., Centalen, E., Ciaever, C., Hegemann, J.H., Jones, T., Laub, M., Liao, H., Liebundguth, N., Lockhart, D.J., Lucau-Danila, A., Lussier, M., M'Rabet, N., Menard, P., Mittmann, M., Pai, C., Rebischung, C., Revuelta, J.L., Riles, L., Roberts, C.J., Ross-MacDonald, P., Scherens, B., Snyder, M., Sookhai-Mahadeo, S., Storms, R.K., Véronneau, S., 1999. Functional Characterization of the *S. cerevisiae* Genome by Gene Deletion and Parallel Analysis 285.
- Wittig, I., Karas, M., Schägger, H., 2007. High Resolution Clear Native Electrophoresis for In-gel Functional Assays and Fluorescence Studies of Membrane Protein Complexes*. *Molecular & Cellular Proteomics* 6, 1215–1225. <https://doi.org/10.1074/mcp.M700076-MCP200>
- Wittig, I., Schägger, H., 2008. Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 1777, 592–598. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2008.04.027>
- Wolf, D.M., Segawa, M., Kondadi, A.K., Anand, R., Bailey, S.T., Reichert, A.S., van der Bliek, A.M., Shackelford, D.B., Liesa, M., Shirihai, O.S., 2019. Individual cristae within the same mitochondrion display different membrane potentials and are functionally independent. *EMBO J* 38, e101056. <https://doi.org/10.15252/embj.2018101056>
- Wu, Q., Andrianaivomananjaona, T., Tetaud, E., Corvest, V., Haraux, F., 2014. Interactions involved in grasping and locking of the inhibitory peptide IF1 by mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 1837, 761–772. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2014.01.023>
- Xiberras, J., Klein, M., Nevoigt, E., 2019. Glycerol as a substrate for *Saccharomyces cerevisiae* based bioprocesses – Knowledge gaps regarding the central carbon catabolism of this ‘non-fermentable’ carbon source. *Biotechnology Advances, Microbial Engineering Biotechnologies* 37, 107378. <https://doi.org/10.1016/j.biotechadv.2019.03.017>
- Yamada, E., Ishiguro, N., Miyaiishi, O., Takeuchi, A., Nakashima, I., Iwata, H., Isobe, K., 1997. Differential display analysis of murine collagen-induced arthritis: cloning of the cDNA-encoding murine ATPase inhibitor. *Immunology* 92, 571–576.
- Yoshida, Y., Sato, T., Hashimoto, T., Ichikawa, N., Nakai, S., Yoshikawa, H., Imamoto, F., Tagawa, K., 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, 49–53. <https://doi.org/10.1111/j.1432-1033.1990.tb19193.x>
- Zaremba-Niedzwiedzka, K., Caceres, E.F., Saw, J.H., Bäckström, D., Juzokaite, L., Vancaester, E., Seitz, K.W., Anantharaman, K., Starnawski, P., Kjeldsen, K.U., Stott, M.B., Nunoura, T., Banfield, J.F., Schramm, A., Baker, B.J., Spang, A., Ettema, T.J.G., 2017. Asgard archaea illuminate the origin of eukaryotic cellular complexity. *Nature* 541, 353–358. <https://doi.org/10.1038/nature21031>
- Zhao, X., León, I.R., Bak, S., Mogensen, M., Wrzesinski, K., Højlund, K., Jensen, O.N., 2011. Phosphoproteome Analysis of Functional Mitochondria Isolated from Resting Human Muscle Reveals Extensive Phosphorylation of Inner Membrane Protein Complexes and Enzymes *. *Molecular & Cellular Proteomics* 10. <https://doi.org/10.1074/mcp.M110.000299>
- Zhou, Z., Zhang, K., Liu, Z., Gao, X., Huang, K., Chen, C., Wang, D., Yang, Q., Long, Q., 2021. ATPAF1 deficiency impairs ATP synthase assembly and mitochondrial respiration. *Mitochondrion* 60, 129–141. <https://doi.org/10.1016/j.mito.2021.08.005>

Étude du rôle métabolique du peptide inhibiteur de l'ATP synthase IF1 en conditions physiologique et pathologique.

La F_1F_0 ATP-synthase est une machinerie multi-protéique permettant la transduction de l'énergie d'un gradient électrochimique en énergie chimique sous forme d'ATP. Ce complexe protéique est enchâssé dans la membrane interne mitochondriale de par son domaine F_0 , lui-même physiquement associé à un secteur catalytique intra-mitochondrial, le domaine F_1 . Cette enzyme mitochondriale joue un rôle primordial dans le métabolisme énergétique. L'ATP synthase de levure, comme celle du mammifère, sont des enzymes réversibles dont l'activité hydrolytique est régulée par un inhibiteur endogène : IF1. Un deuxième peptide inhibiteur, STF1, a été identifié, uniquement chez la levure. L'inhibition de l'ATP synthase par IF1/STF1 est dépendante du pH, par conséquent ces inhibiteurs sont inactifs dans des conditions physiologiques où la mitochondrie est polarisée, mais sont actifs dans des conditions pathologiques de dépolarisation. Pour autant, l'importance métabolique et physiopathologique d'IF1/STF1 a été remise en question par les modèles levures et murins démontrant que la perte de cet inhibiteur n'a quasiment aucune incidence sur le métabolisme ou la physiologie de ces organismes. Mon travail de thèse a permis d'étudier des mécanismes d'action de cet inhibiteur sur l'ATP synthase associés ou non à des stress énergétiques affectant l'état de polarisation mitochondrial. Mon travail a permis de mettre en évidence un nouveau mécanisme d'action d'IF1/STF1 dans la stabilité et la maintenance du sous-assemblage de l'ATP synthase, le F_1 libre (domaine soluble F_1 non associé au domaine F_0). La présence de ce domaine catalytique déconnecté de la force protomotrice, constitue une réelle menace énergétique. En effet, la toxicité énergétique potentielle du F_1 libre est donc soit inhibée par l'action directe d'IF1/STF1, soit prévenue en absence d'IF1/STF1 par l'instabilité et la disparition physique de ce sous-complexe. Mes travaux de thèse ont de plus permis de définir que l'action d'IF1/STF1 était particulièrement cruciale dans des conditions métaboliques dites glyco-oxydatives spécifiquement observées en milieu glycérol. Dans ces conditions, la prolifération cellulaire et la maintenance du potentiel phosphate sont placées sous la co-dépendance de l'ATP synthase et des phosphorylations par le substrat des kinases glycolytiques.

Mots clés: Inhibitory factor 1, Mitochondries, ATP synthase, Bioénergétique

Study of the metabolic role of the ATP synthase inhibitor peptide IF1, under physiological and pathological conditions.

F_1F_0 ATP synthase is a multi-protein machinery that converts the energy of an electrochemical gradient into chemical energy in the form of ATP. This protein complex is anchored in the mitochondrial inner membrane by its F_0 sector, which is itself physically associated with an intra-mitochondrial F_1 catalytic sector. This mitochondrial enzyme plays a key role in energy metabolism. Yeast and mammalian ATP synthase, are reversible enzymes and this hydrolytic activity is regulated by an endogenous inhibitor: IF1. In yeast, another inhibitor peptide, STF1, has been identified. Inhibition of ATP synthase by IF1/STF1 is pH-dependent, so these inhibitors are inactive under physiological conditions where mitochondria are polarised, but IF1/STF1 are particularly active under pathological conditions of depolarisation. Intriguingly, the metabolic and pathophysiological importance of IF1/STF1 has been challenged by yeast and mouse models showing that the loss of this inhibitor has almost no detectable impact on the metabolism or physiology of these organisms. My thesis work investigated the mechanisms of action of these inhibitors on ATP synthase, associated or not with energy stresses affecting the mitochondrial polarization state. My work has highlighted a new mechanism of action for IF1 by demonstrating that it controls the stability and maintenance of the ATP synthase sub-assembly, the free F_1 (soluble F_1 sector not associated with the F_0 sector). The presence of this catalytic sector, disconnected from the proton motor force, represents a serious energetic threat. The potential energetic toxicity of free F_1 is annihilated through two mechanisms: (i) the direct canonical inhibition of IF1/STF1, or (ii) the instability and physical disappearance of free F_1 in absence of IF1/STF1. My thesis work also defined that the action of IF1/STF1 was particularly crucial under mitochondrial depolarization stress conditions in glyco-oxidative metabolism observed in glycerol medium. Under these conditions, the phosphate potential is co-dependent on ATP synthase and substrate phosphorylation of glycolytic kinases, and cell proliferation under depolarisation stress relies on IF1/STF1 activity.

Keywords: Inhibitory factor 1, Mitochondria, ATP synthase, Bioenergetic
