

Université Victor Segalen

Année 2012

Thèse n° 75657

thèse

pour le

Doctorat de l'Université Bordeaux 2

École Doctorale Sciences de la vie et de la Santé

Mention : Sciences, Technologie, Santé

Option : Génétique

Présentée et soutenue publiquement

Le 20 décembre 2012

Par Alexandre MARTOS

Né le 05 Octobre 1986 à Perpignan

**Relocalisation expérimentale de gènes
mitochondriaux au noyau**

Un éclairage nouveau sur l'évolution du génome
mitochondrial

Membres du Jury :

Hubert BECKERPrésident & Rapporteur
Agnès DELAHODDE Rapporteur
Nathalie BONNEFOY Examineur
Bertrand DAIGNAN-FORNIER Examineur
Pascal SIRAND-PUGNET Examineur
Jean-Paul DI RAGO Directeur de Thèse

University of Victor Segalen

Year 2012

Thesis n° 75657

thesis

for the

PhD degree of the University of Bordeaux 2

**Doctoral School Life and Health Sciences
Sciences, Technology, Health
Option : Genetics**

Publicly presented and defended

On December 20th, 2012

By Alexandre MARTOS

Born the 05th of October, 1986 at Perpignan

Experimental relocation of mitochondrial genes to the nucleus

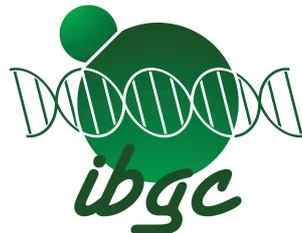
A new light shed on mitochondrial genome evolution

Board of Examiners :

Hubert BECKER Chairman & Referee
Agnès DELAHODDE Referee
Nathalie BONNEFOY Examiner
Bertrand DAIGNAN-FORNIER Examiner
Pascal SIRAND-PUGNET Examiner
Jean-Paul DI RAGO Thesis Director

Cette thèse a été préparée au sein de l'équipe Génétique Moléculaire des Systèmes Mitochondriaux de l'Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires (IBGC, UMR 5095, CNRS / Université de Bordeaux Segalen) et financée par l'Agence Nationale de la Recherche (ANR).

Équipe GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE DES SYSTÈMES MITOCHONDRIAUX
IBGC – UMR 5095 CNRS / Université de Bordeaux Segalen
1 rue Camille Saint Saëns
33077 BORDEAUX CEDEX



Agence Nationale de la Recherche
212 Rue de Bercy
75012 PARIS



Contacts :
am.alexandremartos@gmail.com
JP.Dirago@ibgc.cnrs.fr

Remerciements

Écrire les remerciements a toujours été très difficile pour moi, de par ma crainte d'oublier quelqu'un, ou de ne pas arriver à retranscrire ma gratitude. Comme vous pourrez le constater, je resterai concis sur ce sujet, mais les sentiments que je vais exprimer vont au-delà des mots que vous pourrez lire.

En tout premier lieu, je tiens à remercier les membres du jury, mes rapporteurs Agnès Delahodde et Hubert Becker, ainsi que mes examinateurs Nathalie Bonnefoy, Bertrand Daignan-Fornier et Pascal Sirand-Pugnet, pour avoir accepté de participer à l'évaluation du travail présenté dans ce manuscrit.

Je remercie particulièrement Jean-Paul di Rago, pour son enseignement et sa patience envers moi, nos discussions scientifiques très intéressantes et, évidemment, pour m'avoir encadré et guidé dans ce travail passionnant pendant ces trois années de thèse.

Merci aussi à François, Emmanuel, Stéphane et Jean-Paul (II), pour leur soutien, leurs encouragements, leurs conseils, leurs réponses à mes nombreuses questions, nos discussions scientifiques (ou non) très intéressantes, et pour tout le reste.

Je remercie également l'ensemble de mes collègues de l'IBGC. Les années que j'ai passées dans cet institut se sont révélées passionnantes et enrichissantes, et ont constitué une excellente première expérience dans le domaine de la Recherche.

Merci à tous ceux que je ne cite pas et qui m'ont prêté main-forte pour le travail décrit dans ce manuscrit. Je remercie particulièrement les nombreuses personnes qui ont participé à la relecture et à la correction de cette thèse. Sans eux, l'Académie française m'aurait probablement traîné en justice...

Je remercie enfin ma famille, ma mère Marie-Paule et mon père Salvador, mes sœurs Ingrid et Lydia et leurs familles, ma fiancée Gaëlle et mes futurs beaux-parents Catherine et Alain, ainsi que mes meilleurs amis, Guillem, Pierre, Anicet et Judith, Mathieu, Zep et Charlène, pour leur soutien inconditionnel et leur aide précieuse durant toutes ces années, mais aussi pour tous les moments passés, présents, et à venir. Je n'en serais pas là sans eux. Je leur dédie cette thèse.

*A mes parents
A toute ma famille
A mes meilleurs amis*

La connaissance scientifique possède en quelque sorte des propriétés fractales : nous aurons beau accroître notre savoir, le reste – si infime soit-il – sera toujours aussi infiniment complexe que l'ensemble de départ. Tel est, à mon sens, le secret de l'Univers.

Moi, Asimov
Isaac ASIMOV

En science, la phrase la plus excitante que l'on peut entendre, celle qui annonce de nouvelles découvertes, ce n'est pas "Eurêka !" mais "C'est drôle..."

Isaac ASIMOV



Table des matières

I	Introduction	1
1	Et voici la vie...	3
1.1	La vie terrestre	4
1.1.1	Comment différencier le vivant de l'inerte	4
1.1.2	Le premier être vivant	4
1.1.2.1	La complexité originelle	5
1.1.2.2	Les différentes caractéristiques cellulaires de LUCA	6
1.2	L'évolution du vivant	7
1.2.1	Les premières traces de vie	7
1.2.2	Les premières cellules vivantes : les procaryotes	7
1.2.3	L'émergence des eucaryotes	8
1.2.3.1	La cellule eucaryote	9
1.2.3.2	Les différents modèles pour l'émergence des eucaryotes	10
1.2.3.3	La date de naissance des eucaryotes	11
1.3	La respiration : un avantage évolutif	12
1.4	Une bactérie devenue organite	13
1.4.1	Une origine bactérienne	13
1.4.2	La mitochondrie, organite eucaryote universel ?	13
2	Les mitochondries	15
2.1	Un organite particulier	16
2.1.1	La structure des mitochondries	16
2.1.2	Dynamique mitochondriale	17
2.1.3	Hérédité mitochondriale	17
2.1.4	Les protéines mitochondriales	18
2.1.4.1	L'adressage à la mitochondrie	18
2.1.4.2	Systèmes d'import de protéines	18
2.1.4.3	Insertion des protéines synthétisées dans la matrice	21
2.1.5	Des fonctions mitochondriales essentielles à la cellule	22
2.2	Les oxydations phosphorylantes	22
2.2.1	La théorie chimioosmotique	24
2.2.2	La chaîne respiratoire, génératrice du gradient de protons	24
3	L'ATP synthase	27
3.1	Structure générale	28
3.1.1	Le secteur F_1	30
3.1.2	Le secteur F_0	31
3.2	Biogénèse du complexe chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33
4	Le génome mitochondrial	35
4.1	Le génome mitochondrial	36
4.1.1	Caractéristiques générales de ce génome	36

4.1.2	Le génome mitochondrial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
4.2	L'évolution du génome mitochondrial, de l'endosymbiose à aujourd'hui	37
4.2.1	La réduction du génome ancestral	37
4.2.2	Certains gènes mitochondriaux chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ne le sont pas chez d'autres organismes	38
4.3	Pourquoi un génome mitochondrial ?	38
4.3.1	La relocalisation de gènes mitochondriaux au noyau	38
4.3.2	Les avantages d'une relocalisation des gènes mitochondriaux au noyau	40
4.3.3	Les mécanismes allant à l'encontre d'une relocalisation au noyau des gènes mitochondriaux	41
4.4	La relocalisation artificielle de gènes mitochondriaux au noyau	42
4.4.1	La levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , un outil intéressant pour la relocalisation artificielle	42
4.4.2	Les expériences décrites dans la littérature	43
4.4.2.1	La maturase mitochondriale Bi4p	43
4.4.2.2	Le gène <i>VAR1</i> , composant du mitoribosome	44
4.4.2.3	Le cytochrome b du complexe III	44
4.4.2.4	La sous-unité Cox2p du complexe IV	44
4.4.2.5	La sous-unité Atp8p de l'ATP synthase	44
4.4.2.6	La sous-unité Atp6p de l'ATP synthase	45
4.4.2.7	La sous-unité Atp9p de l'ATP synthase	46
	Objectifs	47
	 II Matériel et méthodes	 49
	 1 Souches et milieux de culture	 51
1.1	Liste des souches, milieux de culture et protocole de conservation de souches de <i>Podospora anserina</i>	52
1.2	Souches de levures	52
1.3	Milieux de culture	67
1.3.1	Milieux de culture bactériens	67
1.3.2	Milieux de culture de levures	67
1.3.2.1	Milieux riches	67
1.3.2.2	Milieux synthétiques	67
1.4	Conditions de culture et de conservation des souches	67
	 2 Techniques de génétique	 69
2.1	Techniques de génétique du modèle <i>Podospora anserina</i>	70
2.2	Transformation de bactéries	70
2.2.1	Préparation de bactéries électrocompétentes	70
2.2.2	Transformation par électroporation	70
2.3	Techniques générales	70
2.3.1	Croisement de souches de levure	70
2.3.2	Estimation de la proportion de ρ^- / ρ^0 d'une population de levures	71
2.3.3	Élimination au 5-FOA de cellules prototrophes pour l'uracile	71
2.4	Modification des génomes nucléaires et mitochondriaux de levure	71
2.4.1	Transformation du génome nucléaire de levure	71
2.4.2	Disruption d'un gène nucléaire de levure	72
2.4.3	Transformation du génome mitochondrial de levure	72
2.4.4	Génération de cellules ρ^- / ρ^0	72

2.4.5	Cytoduction du génome mitochondrial entre deux souches de levure . . .	72
2.4.6	Obtention de mutants spontanés	73
3	Techniques de biologie moléculaire	75
3.1	Liste des constructions utilisées chez <i>Podospora anserina</i>	76
3.2	Vecteurs, séquences et amorces	76
3.2.1	Liste des plasmides utilisés	76
3.2.2	Liste des séquences génétiques utilisées	79
3.3	Caractérisation des acides nucléiques	92
3.3.1	Dosage des acides nucléiques	92
3.3.2	Détermination de la séquence nucléotidique par séquençage	92
3.3.2.1	Séquençage d'un gène	92
3.3.2.2	Séquençage global d'un génome	92
3.3.3	Séparation sur gel d'électrophorèse	93
3.3.4	Analyses par Southern et Northern blot	93
3.3.5	Transcriptomique	93
3.4	Manipulation de fragments d'ADN	93
3.4.1	Digestion enzymatique	93
3.4.2	Ligation de fragments d'ADN	94
3.4.2.1	Clonage classique	94
3.4.2.2	Clonage par <i>gap repair</i>	94
3.4.3	Amplification de fragments d'ADN par PCR	94
3.4.3.1	Liste des amorces utilisées	95
3.4.3.2	Amplification sur colonie de bactéries	97
3.4.3.3	Amplification sur colonie de levures	97
3.4.3.4	PCR quantitative en temps réel	97
3.5	Isolement d'acides nucléiques	97
3.5.1	Précipitation à l'éthanol	97
3.5.2	Purification sur gel d'électrophorèse	97
3.5.3	Préparation d'ADN génomique	97
3.5.4	Récupération de plasmides	98
3.5.4.1	Plasmides dans des souches de bactéries	98
3.5.4.2	Plasmides dans des souches de levures	98
3.5.5	Préparation d'ARN totaux	99
3.5.6	Extraction d'acides nucléiques de <i>Podospora anserina</i>	99
4	Techniques de biochimie	101
4.1	Analyse sur mitochondries isolées de levure	102
4.1.1	Préparation de mitochondries isolées	102
4.1.2	Mesure de la consommation d'oxygène <i>ex vivo</i>	103
4.1.3	Quantification de la production d'ATP	104
4.1.4	Analyse du potentiel membranaire $\Delta\Psi$	104
4.1.5	Estimation de l'activité hydrolitique de l'ATPase	105
4.1.6	Visualisation des complexes ATP synthases sur gel	105
4.2	Caractérisation du protéome de la levure	106
4.2.1	Marquage <i>in vivo</i> des produits de la traduction mitochondriale	106
4.2.2	Purification des complexes ATP synthases	106
4.2.3	Préparation d'extraits cellulaires totaux	106
4.2.4	Fractionnement cellulaire	106
4.3	Dosage des protéines par colorimétrie	107
4.4	Analyse des extraits protéiques	107

4.4.1	Tampon de charge	107
4.4.2	Séparation par électrophorèse sur gel dénaturant	107
4.4.3	Séparation par électrophorèse sur gel en bleu natif	107
4.4.4	Transfert sur membrane	108
4.4.5	Analyse par immunodétection	108
4.4.6	Liste des anticorps utilisés	108
5	Techniques de bioinformatique	111
5.1	Optimisation de séquences protéiques	112
5.2	Analyses de séquences	112
5.2.1	Alignements multiples	112
5.2.2	Analyses phylogénétiques	112
5.3	Analyse de l'hydrophobicité	112
III	Résultats	113
1	Une expression fonctionnelle de la sous-unité Atp9p à partir du noyau requiert une diminution d'hydrophobicité de sa première traverse membranaire	115
1.1	Délétion du gène mitochondrial <i>ATP9</i> chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	116
1.2	Expression du gène <i>ATP9</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> à partir du génome nucléaire	117
1.2.1	Modification du gène <i>ATP9</i> de levure	117
1.2.2	La version nucléaire du gène <i>ATP9</i> de levure ne complète pas la délétion de la version mitochondriale	117
1.3	Expérimentations avec les gènes <i>ATP9</i> naturellement nucléaires de <i>Podospira anserina</i>	118
1.3.1	Les gènes <i>ATP9</i> naturellement nucléaires	118
1.3.2	L'expression allotopique des gènes <i>ATP9</i> de <i>Podospira anserina</i> complète partiellement la délétion du gène <i>ATP9</i> de levure	119
1.4	L'hydrophobicité est un facteur important pour une relocalisation fonctionnelle d' <i>ATP9</i>	119
1.4.1	La première traverse membranaire des sous-unités Atp9p de <i>Podospira anserina</i> est moins hydrophobe comparativement à la protéine de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	119
1.4.2	La réduction de l'hydrophobicité de la première traverse membranaire de la sous-unité Atp9p est requise pour une expression fonctionnelle depuis le noyau	120
	Article : Bietenhader, Martos, Tetaud, Aiyar, et al. <i>Plos Genetics</i>, 2012	121
2	Des adaptations supplémentaires sont nécessaires pour optimiser la croissance des souches avec un gène <i>ATP9</i> relocalisé	151
2.1	Sélections de mutations (SUP) améliorant l'expression du gène <i>ATP9</i> relocalisé	152
2.1.1	Tests des différentes constructions du gène <i>ATP9</i>	152
2.1.2	Mutants secondaires	153
2.1.3	Effet des mutations sur l'accumulation de la protéine Atp9p-Hyb	153
2.1.4	Analyses génétiques des mutations SUP	155
2.1.4.1	Les mutations SUP ne sont pas situées sur le plasmide portant le gène <i>ATP9-Hyb</i>	155
2.1.4.2	Les mutations SUP sont nucléaires récessives	155
2.2	Identification des mutations SUP par séquençage	156

2.2.1	Séquençage des mutants	156
2.2.2	Mutations ne participant pas au phénotype des souches SUP	160
2.2.3	Mutations SUP et catégories fonctionnelles	160
2.3	Influence des mutations SUP sur l'expression des gènes <i>yATP9-Nuc</i> , <i>PaATP9-5</i> et <i>PaATP9-7</i>	163
2.3.1	Fonctionnalité du gène <i>yATP9-Nuc</i> dans le contexte SUP	163
2.3.2	Les mutations SUP améliorent-elles l'expression des gènes <i>PaATP9-5</i> ou <i>PaATP9-7</i> ?	163
2.3.2.1	Influence sur la croissance	163
2.3.2.2	Morphologie cellulaire	164
2.3.3	Influence des mutations SUP sur le fonctionnement mitochondrial	164
2.3.3.1	Caractérisation quantitative des OXPHOS	164
2.3.3.2	Variations du potentiel mitochondrial	168
2.3.3.3	Visualisation des ATPases	170
2.4	Analyse des mécanismes d'action des mutations SUP	170
2.4.1	La m-AAA protéase	171
2.4.2	La m-AAA protéase : le gène <i>YTA10</i>	171
2.4.2.1	Clonage de l'allèle <i>yta10-Sup</i>	171
2.4.2.2	Effet de la mutation <i>yta10-Sup</i> dans un contexte sauvage	171
2.4.2.3	Effet de la mutation <i>yta10-Sup</i> dans une souche avec <i>ATP9</i> relocalisé	172
2.4.2.4	La mutation SUP du gène <i>YTA10</i> en fond SUPi accroît la résistance de la sous-unité Atp9p exprimée depuis le noyau à la dégradation par la m-AAA protéase	173
2.4.3	La m-AAA protéase : le gène <i>YTA12</i>	177
2.4.3.1	Clonage de l'allèle <i>yta12-Sup</i>	177
2.4.4	La glutamyl-tRNA synthétase	177
2.4.4.1	Synthèse de l'allèle <i>gus1-Sup</i>	177
2.4.4.2	Délétion de l'allèle WT et remplacement par l'allèle SUP du gène essentiel <i>GUS1</i>	177
2.4.4.3	Phénotype de croissance	178
2.4.5	La protéine Ent5p	178
3	Quelles sont les forces impliquées dans le maintien dans la mitochondrie ou la relocalisation au noyau du gène <i>ATP9</i> ?	181
3.1	Histoire phylogénétique du gène <i>ATP9</i> dans le règne des Fungi	182
3.1.1	La répartition du gène <i>ATP9</i> chez les champignons	182
3.1.2	Scénario évolutif	183
3.2	L'expression des isoformes nucléaires du gène <i>ATP9</i> est régulée au cours du cycle de vie de <i>Podospora anserina</i>	183
3.2.1	La délétion de chaque isoforme affecte des étapes différentes du cycle de vie de <i>Podospora anserina</i>	183
3.2.2	L'expression des isoformes des gènes <i>PaATP9</i> est régulée au cours du cycle de vie de <i>Podospora anserina</i>	184
3.2.3	Les gènes <i>PaATP9-5</i> et <i>PaATP9-7</i> sont interchangeables	184
3.3	La relocalisation du gène <i>ATP9</i> permettrait de moduler la production d'ATP synthèses chez <i>Podospora anserina</i>	185
	Article : Déquard-Chablat, Sellem, et al. <u>Molecular Biology and Evolution</u>, 2011	187
4	Les mutations SUP améliorant l'expression allotopique du gène <i>ATP9</i> améliorent également l'expression du gène mitochondrial <i>COX2</i> depuis le noyau	215

4.1	Construction des souches $\Delta cox2 : :ARG\delta^m$	216
4.2	Influence des mutations SUP sur l'expression nucléaire du gène <i>COX2</i>	217
4.2.1	Phénotype de croissance	217
4.2.2	Accumulation de la sous-unité Cox2p	218
5	Relocalisation des gènes <i>ATP6</i> et <i>COX3</i>	221
5.1	Les gènes <i>ATP6</i> et <i>COX3</i> nucléaires	222
5.2	Les effets des mutations SUP sur les constructions nucléaires du gène <i>ATP6</i>	222
5.2.1	Transfert des génomes mitochondriaux $\Delta atp6 : :ARG\delta^m$ dans les souches à fonds SUP	222
5.2.2	Modifications du gène <i>ATP6</i>	222
5.2.3	Phénotype de croissance	223
5.3	Les effets des mutations SUP sur les constructions nucléaires du gène <i>COX3</i>	226
5.3.1	Transfert des génomes mitochondriaux $\Delta cox3 : :ARG\delta^m$ dans les souches à fond SUP	226
5.3.2	Modifications du gène <i>COX3</i>	226
5.3.3	Phénotype de croissance	227
5.3.4	Accumulation de la protéine Cox3p	228
IV	Discussion	231
	L'évolution du génome mitochondrial : un génome procaryote devenu mitochondrial	233
	La relocalisation fonctionnelle du gène <i>ATP9</i> nécessite de nombreuses adaptations chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	237
	Des mutations dans le génome nucléaire de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> améliorent l'expression allotopique du gène <i>ATP9</i>	241
	Des modifications supplémentaires sont nécessaires pour une relocalisation fonctionnelle optimale du gène <i>ATP9</i>	241
	La relocalisation du gène <i>ATP9</i> est-elle bénéfique pour la cellule ?	255
	Chez <i>Podospora anserina</i> et <i>Mus musculus</i> , l'expression des isoformes nucléaires du gène <i>ATP9</i> est régulée	255
	Une nouvelle hypothèse sur l'évolution du génome mitochondrial	257
	Bibliographie	259
	Index	273
	Liste des symboles	279

Liste des tableaux

I	Introduction	3
3	L'ATP synthase	27
I.3.1	Liste des sous-unités de l'ATP synthase	28
I.3.2	Liste différents facteurs impliqués dans la biogénèse de l'ATP synthase de levure	34
II	Matériel et méthodes	51
1	Souches et milieux de culture	51
II.1.1	Liste des souches utilisées dans cette étude	66
3	Techniques de biologie moléculaire	75
II.3.1	Liste des plasmides utilisés dans cette étude	78
II.3.2	Liste des séquences utilisées dans cette étude	79
II.3.3	Liste des amorces nucléotidiques utilisées dans cette étude	96
4	Techniques de biochimie	101
II.4.1	Liste des anticorps utilisés dans cette étude	109

III Résultats **115**

1 Une expression fonctionnelle de la sous-unité Atp9p à partir du noyau requiert une diminution d'hydrophobicité de sa première traverse membranaire	115
III.1.1 Génotypes et sources des souches de levure	125
III.1.2 Activités respiratoire et de synthèse/hydrolyse d'ATP mitochondriales . . .	129
III.1.3 Plasmides utilisés dans ce chapitre	145
2 Des adaptations supplémentaires sont nécessaires pour optimiser la croissance des souches avec un gène <i>ATP9</i> relocalisé	151
III.2.1 Identification des mutations de l'ensemble des clones SUP	158
III.2.2 Les gènes portant une mutation SUP ont des fonctions variées	161
III.2.3 Les mutations SUP affectent légèrement les oxydations phosphorylantes . .	167
3 Quelles sont les forces impliquées dans le maintien dans la mitochondrie ou la relocalisation au noyau du gène <i>ATP9</i> ?	181
III.3.1 Distribution du gène <i>ATP9</i> dans les génomes mitochondriaux et nucléaires des Fungi	192
III.3.2 Relations génotypes - phénotypes	198
III.3.3 Séquences utilisées pour l'analyse phylogénétique des sous-unités Atp9p . .	208
III.3.4 Amorces utilisées dans ce chapitre	210
4 Les mutations SUP améliorant l'expression allotopique du gène <i>ATP9</i> améliorent également l'expression du gène mitochondrial <i>COX2</i> depuis le noyau	215
III.4.1 Les mutations SUP ont un impact sur l'activité du complexe IV dans un contexte <i>COX2</i> relocalisé	220

Table des figures

I	Introduction	3
1	Et voici la vie...	3
I.1.1	Les différents modèles d'évolution de LUCA	5
I.1.2	Stromatolites modernes et fossiles	7
I.1.3	Structure générale d'un organisme procaryote	8
I.1.4	Structure générale d'une cellule eucaryote	9
I.1.5	Modèles hypothétiques de l'émergence des cellules eucaryotes	11
I.1.6	Ligne temporelle présentant les invasions majeures à l'origine des mitochondries et plastes	12
2	Les mitochondries	15
I.2.1	Structure générale d'une mitochondrie	16
I.2.2	Visualisation du réseau mitochondrial chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	17
I.2.3	Signaux d'adressage mitochondriaux	19
I.2.4	Les différentes voies d'import de protéines dans les mitochondries	20
I.2.5	Insertion cotraductionnelle dans la membrane interne mitochondriale	21
I.2.6	Les différentes voies métaboliques impliquant les mitochondries	23
I.2.7	Les complexes des oxydations phosphorylantes	25
3	L'ATP synthase	27

I.3.1	Structure générale de l'ATP synthase de levure	29
I.3.2	Diagramme schématique illustrant le modèle tri-site E1E2 pour la synthèse et l'hydrolyse par le secteur F1	30
I.3.3	Relations entre le F _o , l'oligomérisation des ATP synthases et la formation des crêtes mitochondriales	31
I.3.4	Structure du monomère de sous-unité Atp9p et du rotor de l'ATP synthase de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	32
I.3.5	Modèle de la génération du mouvement rotatoire du canal à protons de l'ATP synthase	32
I.3.6	Assemblage de l'ATP synthase de levure	34
4	Le génome mitochondrial	35
I.4.1	Représentation schématique du génome mitochondrial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	37
I.4.2	Modèle hypothétique du devenir des copies d'un gène relocalisé	40
III	Résultats	115
1	Une expression fonctionnelle de la sous-unité Atp9p à partir du noyau requiert une diminution d'hydrophobicité de sa première traverse membranaire	115
III.1.1	Délétion du gène mitochondrial <i>ATP9</i> de levure et phénotypes résultants . . .	126
III.1.2	Une version nucléaire du gène mitochondrial <i>ATP9</i> de levure ne complémente pas la délétion de la version mitochondriale	127
III.1.3	Les gènes de <i>Podospora anserina</i> restaurent la compétence respiratoire des levures dépourvues d' <i>ATP9</i>	128

III.1.4	Les sous-unités Atp9p de <i>Podospora anserina</i> sont moins hydrophobes que celles de la levure	130
III.1.5	Réduire l'hydrophobicité de la première traverse membranaire améliore l'import d'Atp9p dans la mitochondrie	131
III.1.6	Les profils transcriptomiques de levures exprimant les gènes <i>ATP9</i> de <i>Podospora anserina</i> indiquent des réponses transcriptionnelles à la relocalisation de <i>ATP9</i>	132
III.1.7	Modèle hypothétique de l'influence de l'hydrophobicité de Atp9p sur son expression à partir du noyau	133
III.1.8	Construction de la souche de levure $\Delta atp9 : :ARG8^m$ et phénotypes additionnels	146
III.1.9	Séquences protéiques et alignements	147
III.1.10	Construction des cassettes des gènes <i>ATP9</i> de <i>Podospora anserina</i>	148
III.1.11	Matrice de corrélation montrant les similarités d'expression des souches avec <i>ATP9</i> relocalisé	149

2 Des adaptations supplémentaires sont nécessaires pour optimiser la croissance des souches avec un gène *ATP9* relocalisé 151

III.2.1	Une sélection sur milieu respiratoire a permis d'obtenir un mutant de réversion SUPi	152
III.2.2	Les mutants SUP1, SUP2 et SUP3 sélectionnés ont une meilleure croissance sur milieu respiratoire	153
III.2.3	La protéine Atp9p-Hyb est mieux accumulée dans les mutants SUP	154
III.2.4	Les mutations SUP sont situées dans le génome nucléaire et sont récessives .	156
III.2.5	Les mutations SUP identifiées peuvent être rassemblées en quelques grandes catégories	162

III.2.6	Les mutations des fonds génétiques SUP sont actives sur les gènes de <i>Podospora anserina</i>	165
III.2.7	Morphologie cellulaire des souches exprimant le gène PaATP9-5 de <i>Podospora anserina</i>	166
III.2.8	Analyse des capacités d'énergisation des membranes mitochondriales	169
III.2.9	Visualisation en BN-PAGE des complexes ATP synthase	170
III.2.10	Clonage des gènes <i>YTA10</i> et <i>YTA12</i> mutés par technique de <i>gap repair</i>	172
III.2.11	Mutation <i>yta10-Sup</i> dans un contexte sauvage	173
III.2.12	Mutation <i>yta10-Sup</i> dans un contexte sauvage avec <i>ATP9</i> relocalisé	174
III.2.13	Morphologie cellulaire des souches exprimant le gène PaATP9-5 et l'allèle <i>yta10-Sup</i>	174
III.2.14	Mutation <i>yta10-Sup</i> dans le contexte SUPi initial	175
III.2.15	L'allèle <i>yta10-Sup</i> a un effet sur l'accumulation de protéine Atp9p exprimée depuis le noyau	176
III.2.16	L'allèle SUP du gène <i>GUS1</i> a un effet sur le contexte SUP	178
3	Quelles sont les forces impliquées dans le maintien dans la mitochondrie ou la relocalisation au noyau du gène <i>ATP9</i> ?	181
III.3.1	Alignement de séquences protéiques et relation phylogénétique entre les <i>ATP9</i> des champignons	194
III.3.2	Représentation schématiser que du cycle de vie de <i>Podospora anserina</i> et développement des périthèces chez les organes femelles d'une souche de type sauvage ou délétée pour <i>ATP9-7</i>	196
III.3.3	Expression des <i>ATP9-5</i> et <i>ATP9-7</i> au cours du cycle de vie de <i>Podospora anserina</i>	198
III.3.4	Arbres phylogénétique additionnels	213

4	Les mutations SUP améliorant l'expression allotopique du gène <i>ATP9</i> améliorent également l'expression du gène mitochondrial <i>COX2</i> depuis le noyau	215
III.4.1	Cytoconduction des génomes $\Delta cox2$: <i>ARG8^m</i> dans les souches à fond nucléaire SUP	216
III.4.2	Le fond génétique SUP3 améliore la croissance respiratoire des les souches avec <i>COX2</i> relocalisé	218
III.4.3	Les mutations du fond SUP3 ont un impact sur l'accumulation de la protéine Cox2p exprimée à partir du noyau	219
5	Relocalisation des gènes <i>ATP6</i> et <i>COX3</i>	221
III.5.1	Différentes constructions du gène <i>ATP6</i> ont été utilisées	223
III.5.2	Les constructions du gène <i>ATP6</i> ne complètent pas la délétion de la version mitochondriale	224
III.5.3	Détection de protéines extraites par fractionnement cellulaire de la souche $\Delta atp6$: <i>arg8^m</i> + ScOXAI ^{MTS} -ScATP6-Nuc	225
III.5.4	Effet de la délétion du gène <i>YME1</i> sur l'accumulation de la protéine ScOXAIp ^{MTS} -ScAtp6p-Nuc	226
III.5.5	Différentes constructions du gène <i>COX3</i> utilisées	227
III.5.6	Les constructions <i>COX3</i> utilisées ne complètent pas la délétion de la version mitochondriale	229
III.5.7	La protéine Cox3p-Hyb exprimée à partir du noyau n'est pas correctement accumulée	230
IV	Discussion	233
	L'évolution du génome mitochondrial : un génome procaryote devenu mitochondrial	233

IV.1.1	Le code génétique mitochondrial diffère du code génétique standard	235
La relocalisation fonctionnelle du gène <i>ATP9</i> nécessite de nombreuses adaptations chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>		237
IV.2.2	L'hydrophobicité est un facteur important dans la relocalisation du gène <i>ATP9</i>	239
Des mutations dans le génome nucléaire de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> améliorent l'expression allotopique du gène <i>ATP9</i>		241
IV.3.3	Le complexe m-AAA protéase : structure et fonctions	243
IV.3.4	Alignements de séquences de la sous-unité Yta10p	245
IV.3.5	Alignements de séquences de la sous-unité Yta12p	246
IV.3.6	La m-AAA protéase est impliquée dans la dégradation de la sous-unité Atp9p importée depuis le cytosol	247
IV.3.7	Structure tridimensionnelle de la GluRS	248
IV.3.8	La mutation SUP est située sur un site peu conservé de la protéine Gus1p . .	249
IV.3.9	Positionnement de la mutation SUP de la GluRS	250
IV.3.10	Fonction de la protéine Ent5p	252
IV.3.11	La mutation SUP de la Ent5p affecte son affinité pour la clathrine	253

Première partie

Introduction

Chapitre 1

Et voici la vie...

Sommaire

1.1	La vie terrestre	4
1.1.1	Comment différencier le vivant de l'inerte	4
1.1.2	Le premier être vivant	4
1.2	L'évolution du vivant	7
1.2.1	Les premières traces de vie	7
1.2.2	Les premières cellules vivantes : les procaryotes	7
1.2.3	L'émergence des eucaryotes	8
1.3	La respiration : un avantage évolutif	12
1.4	Une bactérie devenue organite	13
1.4.1	Une origine bactérienne	13
1.4.2	La mitochondrie, organite eucaryote universel ?	13

1.1 La vie terrestre

1.1.1 Comment différencier le vivant de l'inerte

La différenciation entre le "vivant" et l'"inanimé" ressemble presque, à l'échelle humaine, à une forme d'intuition. Tout un chacun saura différencier le vivant d'un objet inanimé, voire même déterminer les états "vie" et "mort" d'un même organisme. Cependant, depuis la découverte des micro-organismes, et des structures telles que les virus, il est devenu plus difficile de positionner la transition, la frontière entre le vivant et l'inanimé.

Une difficulté supplémentaire est à envisager. Nous pouvons observer autour de nous de nombreuses formes d'organismes mais toutes sont basées sur un même schéma, une même chimie organique fondée sur quelques éléments prédominants comme le carbone, l'azote, l'oxygène et l'hydrogène. Il nous est difficile d'imaginer d'autres formes de chimies du vivant. Cette limitation n'implique toutefois pas l'inexistence d'autres chimies organiques, différentes de celles que nous connaissons.

Il est donc nécessaire de déterminer des critères minimaux permettant de définir correctement ce qu'est un être vivant. Pour cela, il est possible de s'inspirer de notre biosphère, et plus particulièrement de l'unité fondamentale de tout être vivant connu : la cellule.

La cellule est délimitée par une membrane plasmique au sein de laquelle se déroule toute une batterie de réactions chimiques, lui permettant notamment de se fournir en énergie et de réagir aux stress induits par l'environnement. Cet ensemble de réactions constitue son métabolisme. La cellule possède également une molécule, l'ADN, support de l'information nécessaire à son fonctionnement et à sa reproduction. Au cours de cette dernière, cette molécule est copiée presque à l'identique et transmise aux cellules-filles engendrées. Les erreurs faites lors de cette copie seront soumises aux mécanismes de la sélection naturelle, à l'évolution.

De cette description, trois caractéristiques majeures s'imposent. La cellule est une unité confinée, possédant un métabolisme et un support de l'information génétique répliquable, soumettant la cellule aux mécanismes de l'évolution. Ces trois caractéristiques sont communes à toute entité vivante connue. Il est alors possible d'extrapoler des critères minimaux (Gargaud *et al.*, 2009), définissant tout entité vivante :

- Une différenciation du soi et du non-soi par un lien physique entre ses différents composants
- La capacité à se maintenir hors de l'équilibre thermodynamique dans un contexte environnemental donné
- La possibilité de reproduction par un processus soumis à la sélection naturelle

La définition d'un organisme vivant nous permet de placer une frontière relativement claire entre inanimé et vivant. Une question intéressante serait alors de déterminer les caractéristiques du ou des premiers organismes vivants qui ont franchi cette limite, qui ont émergé sur notre planète et ont engendré la biosphère que nous observons aujourd'hui.

1.1.2 Le premier être vivant

Déjà en 1859, Charles Darwin énonçait, dans son livre *De l'origine des espèces*, "*L'analogie me pousse donc à penser que tous les êtres organisés qui ont vécu sur la Terre descendent probablement d'une même forme primordiale dans laquelle la vie a été insufflée à l'origine.*" (Darwin, 1859). À l'époque, il ne disposait malheureusement pas des outils informatiques et de biologie moléculaire actuels qui lui auraient éventuellement permis d'appuyer cette théorie. À l'heure actuelle, l'ensemble des analyses phylogénétiques réalisées conforte son hypothèse, à savoir que tous les organismes vivants connus, appartenant aux trois lignées des eubactéries, archées et eucaryotes, ont un seul et même parent, le dernier ancêtre commun universel, dénommé LUCA (pour *Last Universal Common Ancestor*, parfois nommé cenancêtre) (Gargaud *et al.*,

2009). Les données phylogénétiques et les comparaisons des différents règnes permettent de dresser un portrait approximatif de cette entité.

1.1.2.1 La complexité originelle

Deux hypothèses majeures sont envisagées concernant la nature de cet organisme primordial. La première, la plus intuitive, est que LUCA ait été un organisme unicellulaire regroupant les caractéristiques communes de ses descendants procaryotes et eucaryotes (Gargaud *et al.*, 2009). L'autre hypothèse est que LUCA ait été, en fait, une population de précellules (figure I.1.1), chacune possédant une partie des caractéristiques des êtres vivants connus aujourd'hui, et des échanges génétiques entre elles auraient mené à la formation des trois lignées cellulaires connues à l'heure actuelle (Gargaud *et al.*, 2009). Dans les deux cas, LUCA était une entité complexe, à l'origine des différentes lignées procaryotes (eubactéries et archées) et eucaryotes actuelles (figure I.1.1).

Il existe une hypothèse mettant LUCA à l'origine directe des eucaryotes. Dans ce cas, il aurait engendré les lignées procaryotes par perte de certaines caractéristiques, par réduction de sa complexité. Cette hypothèse est mise à mal par les données paléontologiques, indiquant que les plus anciens fossiles d'être vivants connus ont une origine procaryotique, et par les données phylogénétiques indiquant que des organites cellulaires des eucaryotes (par exemple les chloroplastes) sont issus d'endosymbioses entre procaryotes. Il est donc plus probable que LUCA ait été un procaryote (Gargaud *et al.*, 2009).

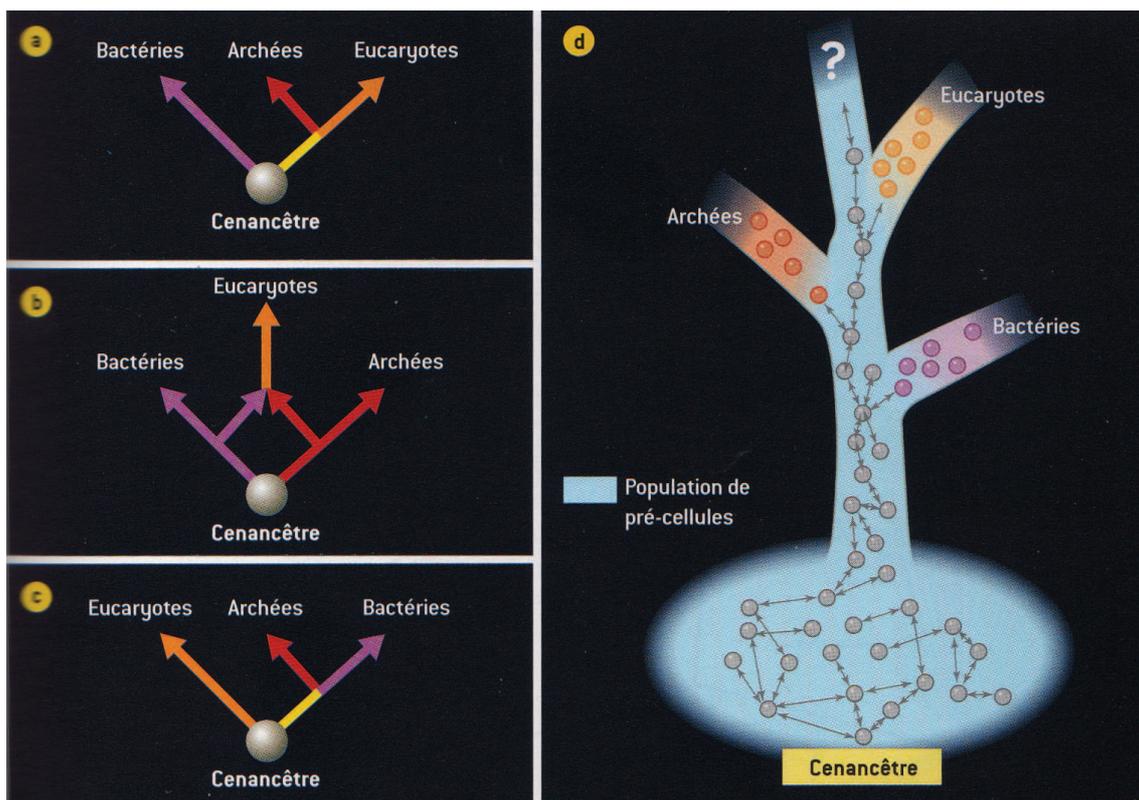


FIGURE I.1.1: Les différents modèles d'évolution de LUCA (Gargaud *et al.*, 2009)

(a-c) Modèles présentant trois hypothèses sur l'apparition des différents règnes, tous issus d'une seule et unique cellule, nommée LUCA ou cenancêtre, qui possédait la plupart des caractéristiques communes aux organismes actuels. Le modèle (d) propose une hypothèse différente, supposant que l'ancêtre commun était en fait un ensemble de "précellules" qui possédaient collectivement l'ensemble des caractéristiques des êtres vivants actuels. Les échanges génétiques fréquents dans cette population ont amené à l'émergence des différents règnes.

1.1.2.2 Les différentes caractéristiques cellulaires de LUCA

Cet organisme devait présenter les grands systèmes majeurs, métaboliques et structurels, des différents règnes vivants actuels.

La nature du support de son information génétique est encore débattue aujourd'hui. Une partie de la communauté scientifique postule qu'il était composé d'Acide RiboNucléique (ARN), du fait de la présence de petits ARN (ARN_s) dans les différentes lignées, ainsi que de la non-universalité des systèmes de réplication ou réparation d'ADN. Le support ADN que l'on connaît aujourd'hui serait apparu par la suite (Gargaud *et al.*, 2009).

La seconde hypothèse est que l'Acide DésoxyriboNucléique (ADN) aurait servi de support de l'information génétique, du fait de la conservation élevée dans sa descendance des protéines impliquées dans le métabolisme de l'ADN (Gargaud *et al.*, 2009). Un autre argument, à mettre en comparaison avec l'hypothèse précédente, est qu'un support de l'information composé d'ARN aurait un taux de mutations plus élevé que celui d'un support ADN. De plus, pour la même quantité d'informations qu'aurait contenue un support ADN – selon les estimations, LUCA aurait possédé entre 600 et 1 000 gènes – le support de l'information aurait nécessité un nombre important de molécules ARN, du fait de leur plus faible stabilité. Ceci aurait pu poser des problèmes lors de la multiplication cellulaire, plus particulièrement dans la répartition des chromosomes entre cellules-filles (Gargaud *et al.*, 2009).

Quel que soit le support de l'information, le système de traduction de LUCA a été très conservé dans l'ensemble des règnes du vivant (Gargaud *et al.*, 2009). Le processus de traduction par le ribosome est un processus ancien, très probablement présent – jusqu'à un certain degré de complexité – chez LUCA. Une version simple des processus de transcription de l'information génétique devait également être présente chez la cellule originelle (Gargaud *et al.*, 2009).

Le métabolisme de LUCA devait produire de l'énergie sous forme utilisable par la cellule. Le système universel de production est la génération d'un gradient ionique et son utilisation par une ATP synthase pour la production d'ATP (Gargaud *et al.*, 2009). La présence de ce complexe protéique sophistiqué dans l'ensemble des organismes vivants connus indique qu'il était probablement présent dans la cellule procaryotique ancestrale qu'était LUCA (Gargaud *et al.*, 2009; Lane *et al.*, 2010). Le processus à l'origine de la création du gradient ionique est méconnu, il devait probablement s'agir de réactions chimiques de type RedOx (Réductions / Oxydations), la photosynthèse n'étant apparue que plus tard chez les eubactéries (Gargaud *et al.*, 2009).

En ce qui concerne la membrane cellulaire de LUCA, elle devait être composée d'une bicouche lipidique, structure commune à toute cellule vivante. Une différence apparaît toutefois dans la composition des membranes entre archées et bactéries / eucaryotes (Callen, 2003). Cette différence réside à la fois dans le type de stéréoisomère du glycérol-phosphate, ainsi que dans le type de chaînes hydrophobes composant ces lipides. L'hypothèse la plus intuitive serait que LUCA possédait l'ensemble des différents lipides composant les membranes actuelles (Gargaud *et al.*, 2009). Une autre hypothèse, plus radicale, serait que LUCA était un organisme acellulaire, la membrane lipidique serait alors remplacée par une compartimentation de type minéral. Cette hypothèse est mise à mal par différentes données phylogénétiques, notamment la haute conservation de protéines membranaires comme les ATP synthases (Gargaud *et al.*, 2009).

1.2 L'évolution du vivant

Dès l'apparition de LUCA, les mécanismes de l'évolution darwinienne ont été à l'œuvre et ont sélectionné les systèmes cellulaires les plus adaptés aux différentes niches écologiques existantes. Cette sélection a façonné sur des échelles de temps géologiques, qui se comptent en milliards d'années, la grande variété des espèces vivantes actuelles.

1.2.1 Les premières traces de vie

Les premières traces de vie avérées laissées par des organismes vivants sont représentées par les stromatolites, structures d'origine microbienne (figure I.1.2). La plus vieille de ces structures est datée de 2,7 milliards d'années. D'autres structures similaires ont été découvertes et datées de 3,5 milliards d'années et au-delà, mais il n'est pas établi avec certitude que ces témoins géologiques soient issus d'une activité biologique (Gargaud *et al.*, 2009). Quoiqu'il en soit, les premières traces de vie datent de milliards d'années, et auraient donc une origine procaryotique. Cette branche du vivant représente une grande partie de la biomasse terrestre, et est uniquement composée d'organismes unicellulaires.

1.2.2 Les premières cellules vivantes : les procaryotes

Au niveau structural, les procaryotes ne possèdent pas, au contraire des eucaryotes, de compartiment spécialisé contenant l'information génétique de la cellule. L'information génétique, sous forme de molécule d'ADN circulaire, est localisée à même le cytoplasme dans une structure amembranaire nommée nucléoïde (figure I.1.3 page suivante) (Callen, 2003). Cette absence de noyau cellulaire est même à l'origine du nom conféré à ce type d'organisme, *pro* : avant + *caryon* : noyau. L'intérieur de la cellule procaryote ne présente pas de compartimentation poussée. La membrane cellulaire est souvent doublée d'une membrane phospholipidique ou d'une paroi cellulaire (figure I.1.3 page suivante) (Callen, 2003). Les processus d'endo ou d'exocytose n'existent pas chez ces organismes (Callen, 2003).

Les cellules eucaryotes ont la possibilité soit de rester un organisme unicellulaire, soit d'associer plusieurs cellules pour former un organisme pluricellulaire (Callen, 2003). Les procaryotes sont, au

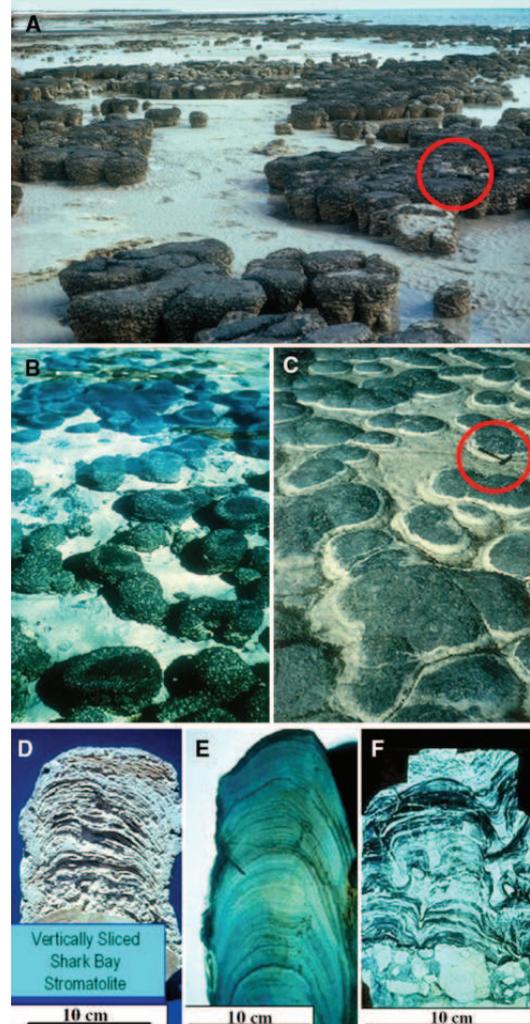


FIGURE I.1.2: Stromatolites modernes et fossiles (Schopf, 2011)

(a) *Stromatolites modernes situés à Shark Bay (Hamelin Pool), Australie-Occidentale.* (b) *Stromatolites modernes de Shark Bay en colonne et domicale, pour comparaison avec* (c) *les stromatolites fossiles de la dolomite du Transvaal (2,3 milliards d'années), province du Cap, Afrique du Sud.* (d-f) *Coupes verticales de stromatolites (modernes et fossiles) verticales à domicales montrant des (d) accretions bactériennes laminaires montantes provenant de Shark Bay (e) Supergroupe de Belt du Montana (1,3 milliards d'années) (f) Groupe du Fig Tree de l'Est du Transvaal (3,350 milliards d'années).* Les échelles pour (a) et (c) sont représentées par les marteaux de géologues entourés par des cercles rouges.

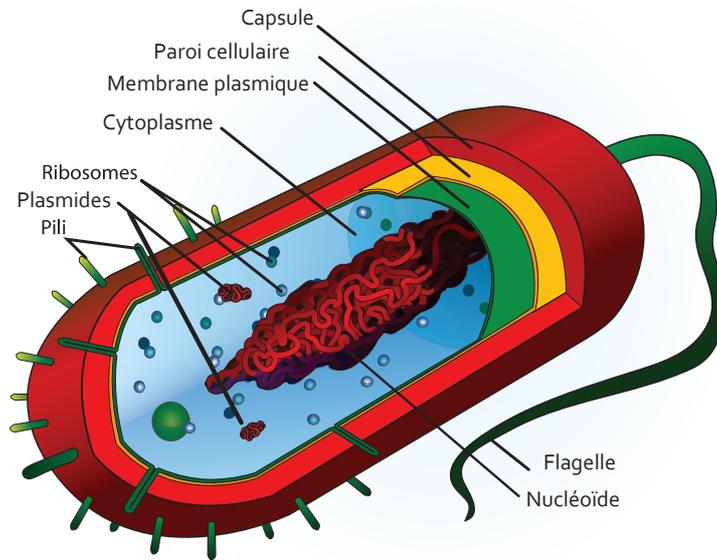


FIGURE I.1.3: Structure générale d'un organisme procaryote

Diagramme de la structure générale d'une cellule procaryote. La structure membranaire de la cellule peut varier selon les espèces considérées. Le nucléoïde, structure amémbranaire, est constitué par le chromosome bactérien circulaire et diverses protéines. Par Mariana Ruiz (LadyofHats), source : Wikipedia Commons.

contraire, exclusivement unicellulaires, bien que les structures comme les biofilms se rapprochent d'une forme de multicellularité.

La cellule procaryote se déplace généralement à l'aide de son flagelle, ou par glissement sur le support (Callen, 2003). Les procaryotes n'effectuent également pas de reproduction sexuée par méiose – il existe des échanges de matériel génétique non réciproques à l'aide des pilis (figure I.1.3) –, elles se reproduisent par scissiparité ou gemmiparité (Callen, 2003).

L'ensemble des procaryotes ne constitue toutefois pas un groupe monophylétique. En effet, il est séparé en deux règnes, les eubactéries et les archées (anciennement archéobactéries, voir figure I.1.1 page 5) (Gargaud *et al.*, 2009; Callen, 2003). Cette séparation est justifiée de par certaines différences que présentent ces deux groupes.

Les archées présentent notamment une structure et une chimie de leur parois cellulaires différentes des eubactéries. La composition lipidique des membranes des archées est différente de celle des eubactéries dont la composition membranaire se rapproche de celle des eucaryotes (Gargaud *et al.*, 2009).

Au niveau génétique, les archées utilisent des ARN polymérase qui se rapprochent de celles des eucaryotes, et qui sont beaucoup plus complexes que leurs homologues bactériennes (Gargaud *et al.*, 2009). De plus, la répartition en mosaïque de leurs gènes, similaire à celle des eucaryotes, est éloignée du système en cistrons des eubactéries. Enfin, les protéines de réplication et de réparation d'ADN des archées sont plus proches de celles des eucaryotes que de celles des eubactéries (Gargaud *et al.*, 2009).

1.2.3 L'émergence des eucaryotes

La théorie selon laquelle LUCA était une cellule à part entière propose que les organismes procaryotes sont à l'origine des cellules eucaryotes (voir figure I.1.1 page 5) (Gargaud *et al.*, 2009). Cependant, les analyses phylogénétiques et les données structurales ne permettent pas de raciner de manière précise l'origine des eucaryotes, les rapprochant tantôt des eubactéries,

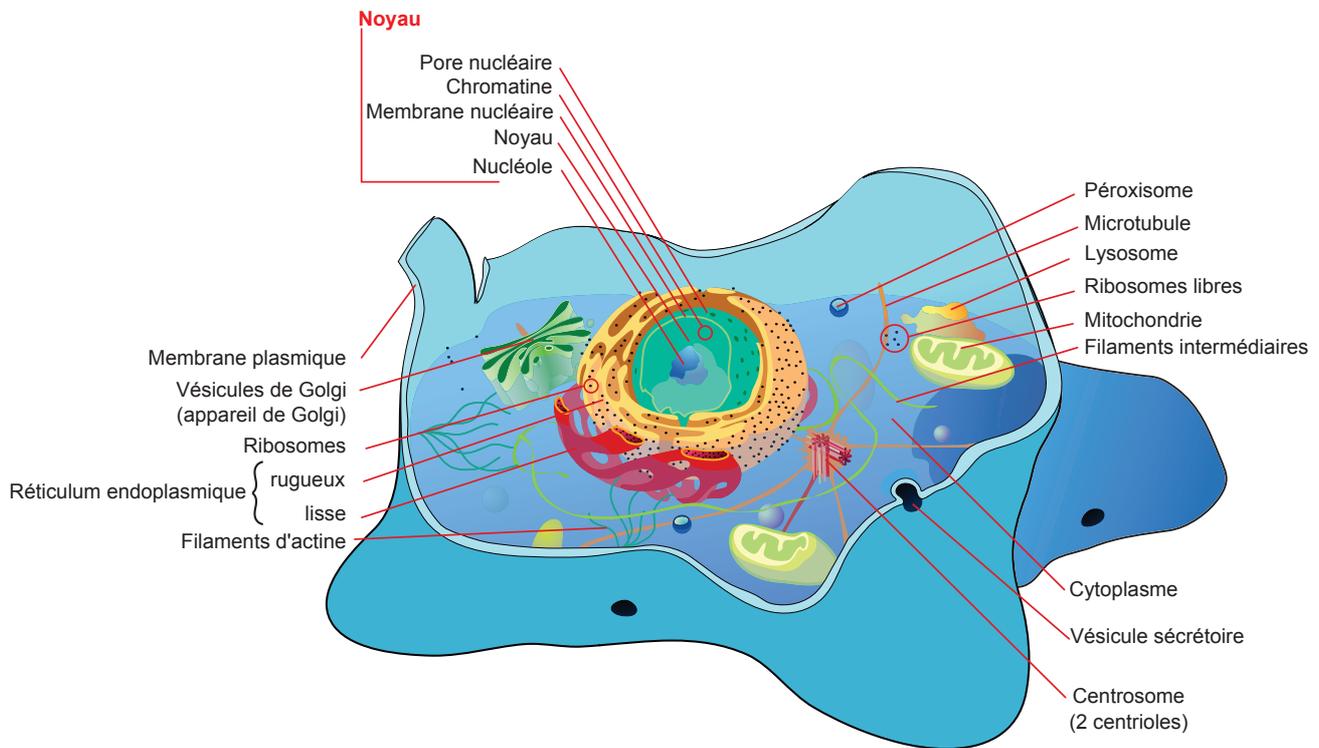


FIGURE I.1.4: Structure générale d'une cellule eucaryote

Diagramme de la structure générale d'une cellule eucaryote animale. Certaines caractéristiques diffèrent chez les plantes et champignons (par exemple absence de lysosomes et centrioles chez ces derniers). Ne sont pas représentés les parois et vacuoles des plantes et champignons, ainsi que le flagelle présent chez certaines cellules eucaryotes. Adapté d'un diagramme de Mariana Ruiz (LadyofHats), source : Wikipedia Commons.

tantôt des archées (Gargaud *et al.*, 2009). Plusieurs théories postulent même que les deux règnes sont à l'origine du troisième, au travers de mécanismes de symbiose cellulaire. De nombreuses hypothèses ont été proposées pour décrire l'émergence des cellules eucaryotes (Gargaud *et al.*, 2009). Je n'en citerai que quelques-unes dans les lignes suivantes.

1.2.3.1 La cellule eucaryote

La caractéristique principale des cellules eucaryotes est, comme précisé précédemment, que leur information génétique est enfermée dans un compartiment membranaire spécialisé, le noyau cellulaire (figure I.1.4) (Callen, 2003). Leur nom est également tiré de cette caractéristique, *eu* pour vrai et *caryon* pour noyau, soit organisme à vrai noyau. Cette membrane a entraîné la séparation de deux mécanismes inhérents aux cellules, la transcription devenue nucléaire et la traduction, cantonnée au reste du cytoplasme. Au niveau génétique, les molécules d'ADN des cellules eucaryotes sont organisées en chromosomes, molécules d'ADN linéaires compactées à différents niveaux (Callen, 2003). Le caryotype et la ploïdie sont variables selon les espèces. Au niveau cytoplasmique, les eucaryotes possèdent un réseau protéique constituant le cytosquelette (figure I.1.4), responsable de l'architecture cellulaire ainsi que des mouvements intra et extracellulaires. Ce cytosquelette, ainsi que la présence d'une grande variété de vésicules au sein de la cellule eucaryote, ont engendré les mécanismes d'endo et d'exocytose (Callen, 2003). Les eucaryotes possèdent également des organites membranaires impliqués dans des fonctions diverses, comme le réticulum endoplasmique ou l'appareil de Golgi, et notamment deux organites contenant également de l'information génétique (Callen, 2003). Le premier est la mitochondrie, au centre du métabolisme respiratoire et, en quelque sorte, "centrale énergétique" de la cellule ; le second est le plaste, organite chargé de la photosynthèse chez les eucaryotes chlorophylliens (plantes et algues).

La division cellulaire se fait par mitose, mais les cellules eucaryotes peuvent réaliser la méiose, division particulière permettant de réaliser des gamètes haploïdes, à la base de la reproduction sexuée (Callen, 2003).

Le règne des eucaryotes est divisé en plusieurs embranchements, les Plantae ou végétaux, les Metazoa ou animaux, les Fungi ou champignons et enfin les Protista, embranchement polyphylétique comprenant divers groupes d'eucaryotes unicellulaires (Gargaud *et al.*, 2009). Chacun de ces embranchements possède ses propres caractéristiques que je ne détaillerai pas ici.

1.2.3.2 Les différents modèles pour l'émergence des eucaryotes

Différents modèles ont été proposés pour expliquer l'émergence des eucaryotes. La figure I.1.5 page ci-contre résume ces hypothèses.

Le modèle autogène

Le modèle autogène présuppose l'émergence d'un protoeucaryote, issu d'une lignée procaryote et ayant acquis certaines structures communes à l'ensemble des eucaryotes actuels, notamment le noyau et le cytosquelette, concomitant à l'acquisition de la phagocytose. Ce mécanisme aurait ensuite permis à la cellule d'incorporer en son sein d'autres procaryotes, ancêtres des mitochondries et plastes (Gargaud *et al.*, 2009). J'aborderai plus loin ce point précis. Certains modèles placent ce protoeucaryote (et donc ses descendants eucaryotes) comme lignée sœur des archées, d'autres présupposent une émergence indépendante de cette lignée, en parallèle des procaryotes (Gargaud *et al.*, 2009). Un autre modèle propose une ascendance provenant de bactéries Gram positives, et une émergence ne datant pas de plus de 800 millions d'années. Cette théorie est cependant critiquée au vu des données récoltées et notamment concernant le registre fossile (Gargaud *et al.*, 2009).

Les modèles chimériques

Les hypothèses chimériques proposent quant à elles une émergence des eucaryotes à partir des cellules procaryotes et ce, grâce à des phénomènes de symbiose multiples (Gargaud *et al.*, 2009). En ce qui concerne l'apparition du noyau, de nombreux modèles supposent une apparition *de novo*, sans préciser quelle pression de sélection a joué dans cette émergence. D'autres postulent que cette structure serait elle-même issue d'une symbiose (Gargaud *et al.*, 2009). Par exemple, le modèle syntrophique considère que le noyau serait issu d'une archée méthanogène entrée en symbiose avec une bactérie fermentatrice complexe. Cette symbiose aurait formé la cellule protoeucaryote.

Pour les organites comme les mitochondries, un premier jeu d'hypothèses postule que les eucaryotes sont issus d'une symbiose métabolique entre les deux règnes procaryotes (archées et eubactéries), fondée sur différents échanges moléculaires tels que le transfert de soufre ou d'hydrogène (Gargaud *et al.*, 2009). Toutefois, l'hypothèse chimérique pionnière, appuyée par les données phylogénétiques, est l'hypothèse de l'endosymbiose sérielle.

L'endosymbiose sérielle

Formulée par Lynn Margulis en 1975 – basée sur l'idée de Konstantin Mereschowsky, chercheur russe du début du 20^{ème} siècle qui suggéra que les chloroplastes dérivait des bactéries photosynthétiques (cyanobactéries) par symbiose –, elle postule que non seulement les plastes mais également les mitochondries sont issues d'une endosymbiose (figure I.1.6 page 12) (Margulis, 1975).

Les mitochondries (et organites dérivés, voir chapitre 2 section 1.4.2 page 13) étant universellement présentes chez les eucaryotes, il est généralement considéré que les mitochondries constituent un premier évènement d'endosymbiose entre le protoeucaryote ancestral (quelle

que soit son origine) et une eubactérie (Gray *et al.*, 1999). Les analyses phylogénétiques ont déterminé que cette eubactérie devait être proche d' α -protéobactéries de l'ordre des Rickettsiales (les analyses rapprochent notamment les mitochondries de *Rickettsia prowazekii*) (Gray, 1998; Andersson *et al.*, 1998).

À l'heure actuelle, les mécanismes de cette endosymbiose sont largement discutés, certains proposant que le protoeucaryote aurait phagocyté l' α -protéobactérie, d'autres qu'au contraire cette endosymbiose serait issue d'une forme de parasitisme cellulaire de l'eubactérie, qui aurait infecté le protoeucaryote (Davidov et Jurkevitch, 2009). Les plastes des végétaux constitueraient un évènement secondaire de symbiose entre ce nouvel eucaryote et des bactéries de type cyanobactéries, ayant développé les mécanismes de la photosynthèse (Dyall *et al.*, 2004).

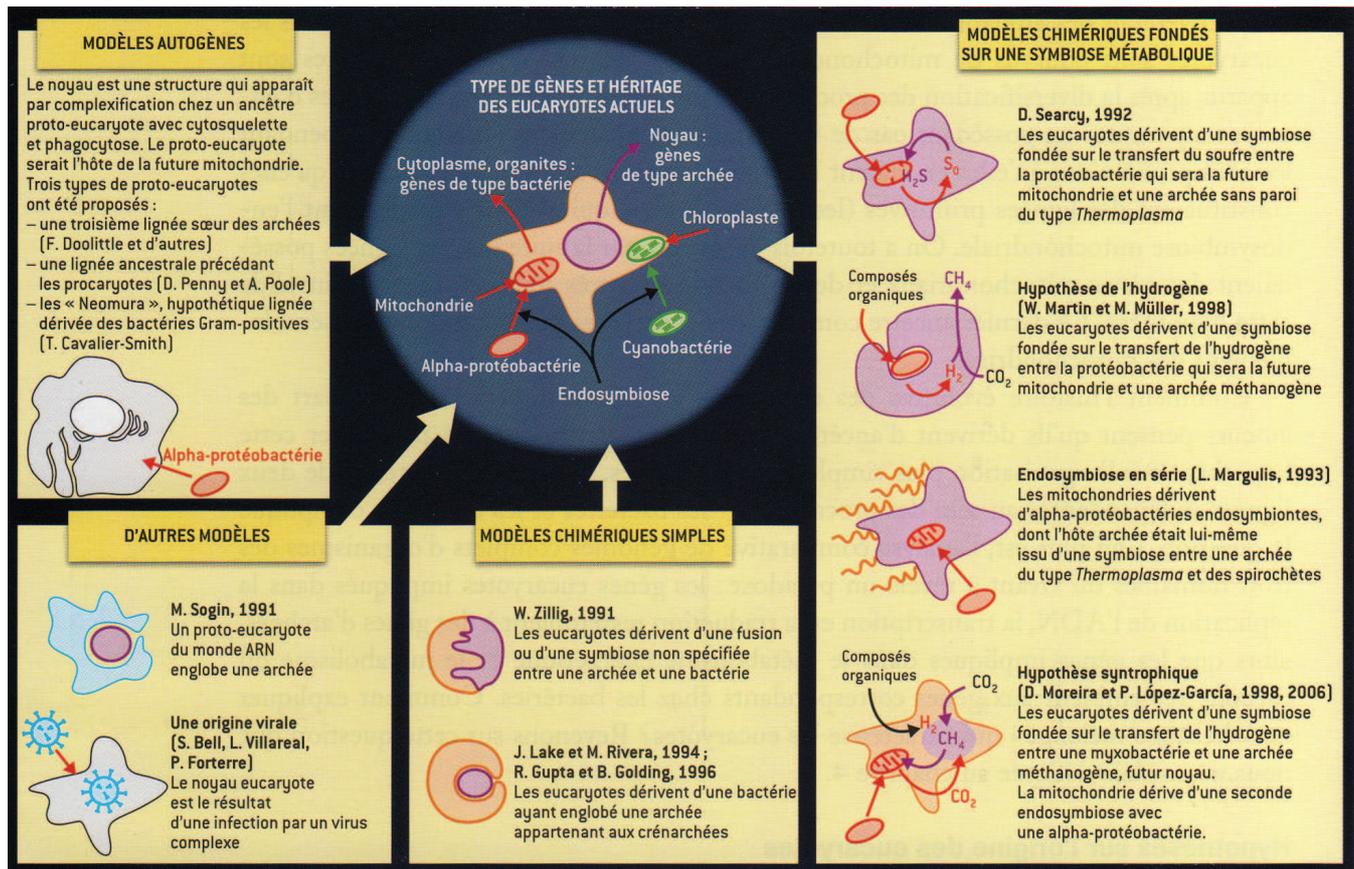


FIGURE I.1.5: Modèles hypothétiques de l'émergence des cellules eucaryotes (Gargaud *et al.*, 2009)

1.2.3.3 La date de naissance des eucaryotes

Le registre fossile a permis de dater l'apparition des cellules procaryotes à au moins 2,7 milliards d'années. En ce qui concerne les eucaryotes, il existe deux méthodes permettant de dater leur apparition.

Comme pour les procaryotes, le registre fossile contient des traces morphologiques d'organismes, classés comme des eucaryotes, datant de 2,1 milliards d'années (Gargaud *et al.*, 2009). Cependant, ces fossiles de *Grypania spiralis* ont été classés comme tels à cause de leur grande taille, qui n'est pas un critère sûr pour la définition d'un organisme eucaryote. Des fossiles plus récents, datant de 1,5 milliards d'années, possèdent des structures complexes à la surface de leurs cellules, une caractéristique des eucaryotes unicellulaires qui semble faire

consensus (Gargaud *et al.*, 2009). Les organismes de ce type ne possèdent pas d'équivalent vivant à l'heure actuelle, et les premiers organismes fossiles correspondant à un groupe actuel datent de 1,2 milliards d'années (Gargaud *et al.*, 2009). Enfin, selon certains chercheurs, les eucaryotes les plus anciens ne peuvent dater de plus de 850 millions d'années, le registre fossile s'étoffant au-delà de cette date (Gargaud *et al.*, 2009).

Le manque de données fossiles relatives aux premiers eucaryotes a incité une partie de la communauté scientifique à se tourner vers d'autres méthodes de datation. La datation moléculaire se base sur le principe de l'horloge moléculaire, théorie selon laquelle le taux de mutation des gènes par unité de temps est constant. Si ce taux moyen est connu, il est alors possible de déterminer le moment de la divergence d'une séquence particulière entre plusieurs espèces, c'est à dire dater l'apparition de l'ancêtre commun de cette séquence.

Cependant, le taux de mutations de chaque séquence génétique dans chaque espèce est variable. Ceci introduit donc des biais dans les datations et ne permet donc que de fournir une fourchette de datation allant de 1,085 à 2,309 milliards d'années (voir figure I.1.6) (Gargaud *et al.*, 2009).

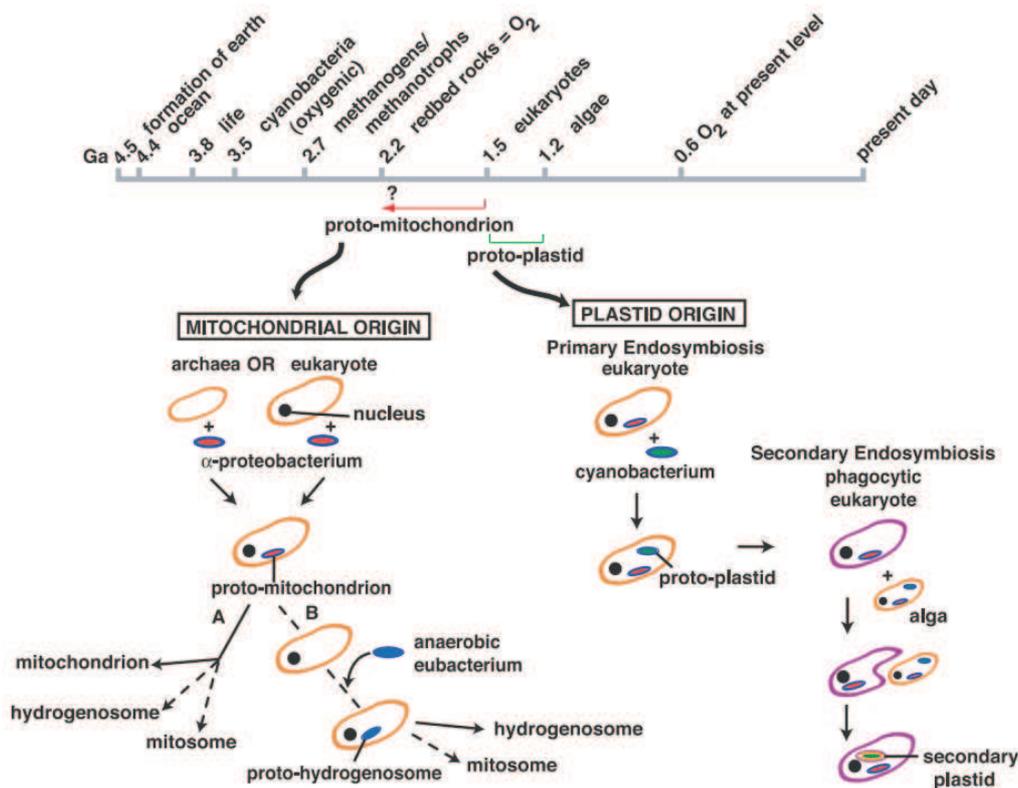


FIGURE I.1.6: Ligne temporelle présentant les invasions majeures à l'origine des mitochondries et plastides (Dyall *et al.*, 2004)

Le schéma ci-dessus positionne temporellement les diverses endosymbioses à l'origine des mitochondries et plastides dans la cellule eucaryote. Le cas des hydrogénosomes et mitosomes sera traité dans le chapitre suivant. Les mitochondries et α-protéobactéries sont représentées en rouge, les hydrogénosomes et eubactéries anaérobies en bleu foncé, les plastides et cyanobactéries en vert, et les endomembranes entourant les plastides secondaires en jaune. Les lignes en pointillés représentent des relations non résolues. Ga : milliards d'années.

1.3 La respiration : un avantage évolutif

L'atmosphère primitive de la Terre – avant l'apparition de la vie telle que nous la connaissons – avait une composition réductrice (Gargaud *et al.*, 2009). Toutefois, les données géologiques montrent que cette atmosphère a radicalement changé de composition aux alentours de 2,4 milliards d'années. Ce changement a été caractérisé par une forte oxydation des roches (le GOE pour *Great Oxidation Event*, ou grand évènement d'oxydation) (Farquhar *et al.*, 2011).

Les différents indices tendent vers un relargage massif dans l'atmosphère d'une molécule à fort pouvoir oxydant, le dioxygène O₂. À cette époque, la seule réaction capable de produire une telle quantité d'oxygène est la photosynthèse (Gargaud *et al.*, 2009). Cette dernière est une réaction chimique intimement liée à la vie terrestre, et a été développée par des organismes procaryotes, les cyanobactéries.

Différents facteurs ont influé sur la période d'incubation nécessaire avant l'apparition de ce mécanisme, mais celui-ci est, au final, devenu un évènement écologique majeur dans l'histoire de la Terre (Gargaud *et al.*, 2009).

Les premiers organismes procaryotes se sont probablement développés dans un milieu réducteur, jusqu'au GOE (Gargaud *et al.*, 2009). L'oxygène, jusqu'alors quasi-absent de l'atmosphère, est un puissant oxydant et serait devenu un poison moléculaire pour les espèces anaérobies qui se sont développées jusque-là. Les radicaux libres que cette molécule peut produire peuvent entraîner des dommages cellulaires et des mutations (Allen et Raven, 1996). Les mécanismes de sélection naturelle ont donc restreint l'habitat des organismes anaérobies aux niches dépourvues d'oxygène, comme les sédiments anoxiques ou les sources hydrothermales (Gargaud *et al.*, 2009).

Les organismes résistants à ce poison ont donc pu coloniser les niches abandonnées. En effet, les phénomènes d'endosymbiose ont possiblement permis à certains organismes de résister à cet oxygène atmosphérique. Selon certaines théories, la cellule protoeucaryote était un organisme anaérobie (Gargaud *et al.*, 2009) que le dioxygène aurait probablement affecté. Cependant, sa symbiose avec une α -protéobactérie aérobie lui a probablement permis de résister à cet oxygène, et même de l'utiliser dans sa production d'énergie (Andersson et Kurland, 1999).

1.4 Une bactérie devenue organite

1.4.1 Une origine bactérienne

Comme je l'ai précisé précédemment, la théorie de l'endosymbiose sérielle, appuyée par des données phylogénétiques, postule que les mitochondries sont issues d'une endosymbiose entre un hôte protoeucaryote et une eubactérie de type α -protéobactérie. Selon Gray (1998); Andersson *et al.* (1998), *Rickettsia prowazekii* serait l' α -protéobactérie la plus proche au niveau phylogénétique des mitochondries.

Bactérie Gram négative et agent pathogène du typhus, cet organisme aérobie est un parasite intracellulaire obligatoire qui a la capacité de se multiplier dans le cytoplasme des cellules-hôtes (Hackstadt, 1996). Son génome circulaire d'un million de paires de bases encode 834 protéines (Gray, 1998). La production énergétique de *Rickettsia prowazekii* rappelle celle des mitochondries, du cycle de Krebs aux Oxydations Phosphorylantes (OXPHOS) (Andersson, 1998).

Plus de 150 gènes encodés par son génome présentent de grandes similarités avec les différents gènes eucaryotes reliés à la mitochondrie (Andersson *et al.*, 1998). La datation moléculaire issue de la comparaison entre les gènes encodant la sous-unité cytochrome b ou les gènes *COXI* entre mitochondries et *Rickettsia prowazekii* indique une divergence des deux lignées située entre 1,5 et 2 milliards d'années (Sicheritz-Pontén *et al.*, 1998), date approximative de l'émergence des eucaryotes. Il est donc possible que leur ancêtre commun soit à l'origine de ces deux lignées.

1.4.2 La mitochondrie, organe eucaryote universel ?

Il existe dans diverses lignées eucaryotes amitochondriées des structures nommées hydrogénosomes et mitosomes (Dyall et Johnson, 2000). Ces structures participent à la synthèse des centres fer-soufre (van der Giezen, 2009), ont un adressage de leurs protéines similaire à celui des protéines mitochondriales et le noyau de la cellule-hôte contient des séquences rares homologues à des séquences de génome mitochondrial (Dyall et Johnson, 2000; van der Giezen, 2009).

Les mitosomes ne produisent pas d'ATP ou d'hydrogène (Hackstein *et al.*, 2006), tandis que les hydrogénosomes produisent de l'énergie par voie fermentaire (Dyall et Johnson, 2000). Les hydrogénosomes ont, comme les mitochondries, une structure en double enveloppe contenant des complexes d'import de protéines de type TOM et TIM, et se divisent par fission de manière autonome. Leur production d'énergie est spécifique aux anaérobies et ils n'utilisent pas les oxydations phosphorylantes ou le cycle de Krebs (et les enzymes associées) (Dyall et Johnson, 2000; van der Giezen, 2009).

Les comparaisons structurales et phylogénétiques de ces structures montrent une parenté avec les mitochondries (Sogin, 1997), elles seraient donc également issues de la mitochondrie originelle. Ces structures sont donc généralement considérées comme des mitochondries dégénérées. La mitochondrie semble donc être une caractéristique générale des cellules eucaryotes.

Chapitre 2

Les mitochondries

Sommaire

2.1	Un organite particulier	16
2.1.1	La structure des mitochondries	16
2.1.2	Dynamique mitochondriale	17
2.1.3	Hérédité mitochondriale	17
2.1.4	Les protéines mitochondriales	18
2.1.5	Des fonctions mitochondriales essentielles à la cellule	22
2.2	Les oxydations phosphorylantes	22
2.2.1	La théorie chimioosmotique	24
2.2.2	La chaîne respiratoire, génératrice du gradient de protons	24

Le chapitre précédent m’a permis de retracer l’histoire du vivant, de son apparition à l’émergence des cellules eucaryotes. Une particularité de ces cellules, comme évoqué, a été leur capacité à entrer en symbiose avec des cellules procaryotiques, qui ont par la suite formé des organites ayant des fonctions essentielles. De plus, cette endosymbiose a fourni de considérables avantages évolutifs. Dans le cas des plastes, elle a permis aux cellules de ce règne de profiter des mécanismes photosynthétiques mis en place par les eubactéries. L’endosymbiose sérielle a fourni aux cellules eucaryotiques un autre organite majeur : la mitochondrie.

2.1 Un organe particulier

2.1.1 La structure des mitochondries

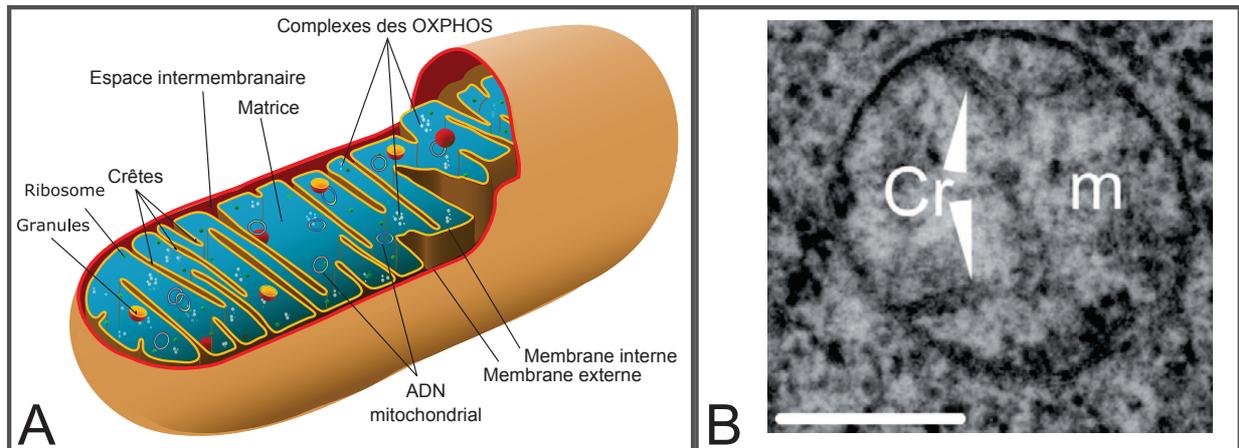


FIGURE I.2.1: Structure générale d'une mitochondrie

(A) Diagramme de la structure générale d'une mitochondrie. L'ensemble des complexes protéiques mitochondriaux n'est pas représenté à cause de leur trop grand nombre et diversité. Seuls quelques supercomplexes de la chaîne respiratoire et ATP synthases sont représentés (complexes OXPHOS), ainsi que les mitoribosomes. Le génome mitochondrial est ici circulaire et les protéines qui lui sont normalement associées (formant ainsi le nucléoïde) ne sont pas représentées. Adapté d'un diagramme de Mariana Ruiz (LadyofHats), source : Wikipedia Commons. (B) Mitochondries de levure observées au microscope électronique. Cr : crêtes mitochondriales, pointées par les flèches ; m : mitochondrie ; barre : 0,2 μm (Bietenhader et al., 2012).

La mitochondrie, comme présentée en figure I.2.1 panneau A, est une structure composée de deux compartiments, l'espace intermembranaire et la matrice, délimités par deux membranes lipidiques (Callen, 2003). La matrice est le cœur de la mitochondrie, et contient le génome mitochondrial ainsi que de nombreuses protéines impliquées dans son maintien et son expression. Elle contient également les protéines impliquées dans les diverses voies métaboliques auxquelles elle participe, dont je décrirai les grandes lignes plus loin dans ce chapitre (section 2.1.5 page 22). La matrice correspond plus à une "soupe" protéique dense qu'à un milieu aqueux, contenant pas moins de 270 à 560 g/L de protéines (Partikian *et al.*, 1998).

La membrane interne délimite ce compartiment. Elle est riche en protéines (environ 70 % contre 30 % de lipides) (Callen, 2003) et imperméable aux ions, et ce, grâce à sa composition riche en cardiolipine (Callen, 2003). Des transporteurs protéiques spécifiques contrôlent les passages des molécules au travers de cette membrane (Becker *et al.*, 2012). Cette membrane possède une structuration particulière, des invaginations augmentant sa surface et formant les crêtes mitochondriales (figure I.2.1 panneau B). Cette membrane contient les complexes et supercomplexes impliqués dans les oxydations phosphorylantes (Callen, 2003), à savoir les complexes de la chaîne respiratoire et les ATP synthases. La chaîne respiratoire a pour rôle principal la génération d'un gradient électrochimique, ou gradient de protons, entre la matrice et l'espace intermembranaire. Celui-ci est un milieu aqueux situé entre les membranes mitochondriales interne et externe, et il contient de nombreuses protéines impliquées dans le transport, la maturation et les activités mitochondriales (Callen, 2003). Le gradient sera ensuite utilisé par les ATP synthases pour synthétiser la majeure partie de l'ATP cellulaire (voir section 2.2 page 22). Ce gradient est également essentiel dans d'autres voies métaboliques.

La mitochondrie est délimitée par la membrane externe, contenant une grande quantité de protéines et notamment la porine, formant de larges pores aqueux qui rendent la membrane poreuse aux molécules de moins de 5 kDa (Callen, 2003), et les systèmes d'import de protéines (décrits plus avant en section 2.1.4.2 page suivante), comme le complexe TOM. Il existe des points de contact entre les deux membranes interne et externe (Fritz *et al.*, 2001), mais ceux-ci sont transitoires et dépendent des conditions physiologiques.

2.1.2 Dynamique mitochondriale

En évoquant l'organite qu'est la mitochondrie, il serait plus exact de parler de "réseau" mitochondrial. En effet, chaque fragment mitochondrial a la possibilité de s'interconnecter avec d'autres fragments, qui peuvent ainsi former un réseau (figure I.2.2) (Egner *et al.*, 2002).

La dynamique de ce réseau est générée par deux phénomènes. Tout d'abord, le cytosquelette d'actine est utilisé par les mitochondries pour se déplacer dans la cellule, puis des processus de fusion/fission sont à l'œuvre entre chaque "fragment" de mitochondrie. De larges réseaux sont observables lorsque la cellule est active au niveau du métabolisme mitochondrial, et au contraire le réseau se fragmente lorsque ce métabolisme est réduit. De tels phénotypes sont également observables, voire même accentués, dans des mutants des processus de fusion/fission (Westermann, 2010).

Cette dynamique est importante, car elle est également un élément de la transmission du génome mitochondrial aux cellules-filles. Des déséquilibres de ce mécanisme peuvent conduire à un défaut dans cette transmission, et éventuellement à des maladies d'origine mitochondriale (Westermann, 2010).

2.1.3 Hérité mitochondriale

Lors de la reproduction cellulaire, la mitochondrie est transmise aux cellules-filles engendrées. Cet organite n'est, en effet, pas resynthétisé *de novo*, d'où l'importance de ces mécanismes de transmission.

Les mitochondries animales et végétales sont transmises par le gamète femelle, au contraire des chloroplastes qui suivent plutôt une hérédité paternelle (Birky, 1995). Cette hérédité uniparentale est probablement due au différentiel de volume de cytoplasme transmis par les gamètes, bien que des mécanismes d'élimination active aient été observés (Kaneda *et al.*, 1995).

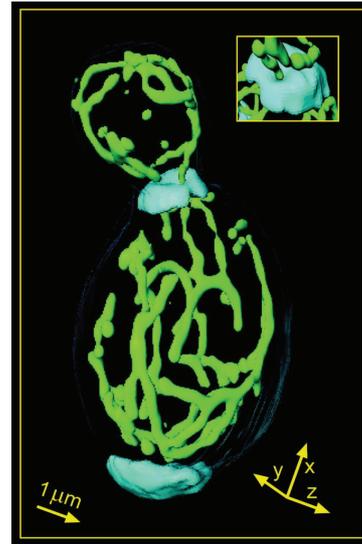


FIGURE I.2.2: Visualisation du réseau mitochondrial chez *Saccharomyces cerevisiae* (Egner *et al.*, 2002)

Visualisation 3D d'une cellule de levure *Saccharomyces cerevisiae* exprimant une GFP adressée à la matrice mitochondriale (surface verte). Les cicatrices des bourgeons sont représentées en volume. La longueur de chaque flèche correspond à 1 µm. Panneau : agrandissement du bourgeonnement, vue d'une perspective différente. Un tubule mitochondrial traverse la cicatrice par un canal.

En général, les organismes sont hétéroplasmiques pour leur génome mitochondrial, c'est-à-dire que leur nombreuses copies ne sont pas toutes identiques et portent donc des séquences génétiques différentes (Chinnery *et al.*, 2000). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, l'hétéroplasmie est instable et ce, à cause d'un fort taux de recombinaison de ses génomes mitochondriaux et de mécanismes particuliers assurant la ségrégation du matériel mitochondrial au cours des divisions cellulaires (Berger et Yaffe, 2000).

2.1.4 Les protéines mitochondriales

Anciennement bactéries, les mitochondries ont évolués en organite. Cependant, les échanges entre ce nouveau compartiment et le cytoplasme ont nécessité une adaptation, surtout en ce qui concerne les échanges de protéines. La majorité des protéines mitochondriales étant encodées au noyau et synthétisée dans le cytoplasme, il est nécessaire pour la cellule d'importer efficacement ces protéines dans l'organelle. Cet import nécessite un système complexe d'adressage, de routage, de maturation et d'assemblage, avec quatre localisations possibles : les membranes mitochondriales interne et externe, l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale.

2.1.4.1 L'adressage à la mitochondrie

La première étape de l'import de protéines vers la mitochondrie est leur adressage à ce compartiment. Cet adressage implique souvent une séquence peptidique de longueur variable. La position – et la nature – de cette séquence dépendent de la destination finale des protéines dans le compartiment mitochondrial (Habib *et al.*, 2007). La figure I.2.3 page suivante montre un schéma des diverses possibilités de signaux d'adressage mitochondrial.

Les protéines destinées à la membrane externe ou les transporteurs de la membrane interne mitochondriale ont généralement un signal d'adressage interne. La plupart des autres protéines mitochondriales ont un signal situé en N ou C-terminal de la protéine, et de dimension variable (généralement entre 10 et 80 acides aminés). Ces séquences n'ont pas de structure consensus, mais contiennent beaucoup d'acides aminés chargés positivement et ont la propriété de former des hélices α amphiphiles. Ces séquences peuvent être parfois bi ou tripartites, afin d'assurer un adressage correct de la protéine.

La protéine une fois importée est maturée par des protéases (voir figure I.2.4 page 20), c'est-à-dire que la préséquence d'adressage peut être retirée (Becker *et al.*, 2012). L'IMP (*Intermembrane Mitochondrial Peptidase* pour peptidase mitochondriale de l'espace intermembranaire) est une protéase ancrée dans la membrane interne mitochondriale, dont le site catalytique est tourné vers l'espace intermembranaire.

La MPP (*Matrix Mitochondrial Peptidase* pour peptidase mitochondriale matricielle) est chargée de la maturation des protéines importées dans la matrice mitochondriale. Le motif de reconnaissance de cette protéase n'est pas très bien défini, bien qu'une règle puisse être utilisée dans beaucoup de cas, à savoir un clivage deux acides aminés après un résidu arginine (Habib *et al.*, 2007). Le sens de translocation ne semble pas être important pour l'import de la protéine, mais il semble que la MPP agisse préférentiellement sur les protéines importées par le N-terminal. De plus, la coupure par la MPP ne suffit pas toujours, et des précurseurs nécessitent parfois un clivage de 8 acides aminés supplémentaires par la MIP (*Mitochondrial Intermediate Peptidase* pour peptidase mitochondriale intermédiaire) (Habib *et al.*, 2007).

D'autres protéases ont été décrites comme pouvant avoir une activité de maturation, comme la m-AAA protéase (Koppen et Langer, 2007). Cependant, il semblerait que la plupart des protéines importées avec une préséquence d'adressage mitochondrial soit maturée par la MPP.

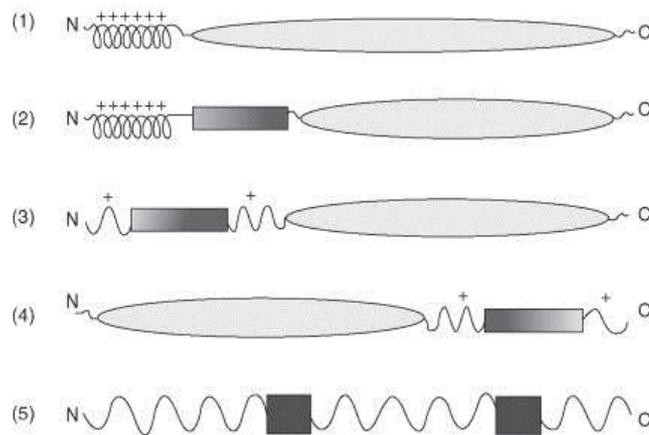


FIGURE I.2.3: Signaux d'adressage mitochondriaux (Habib *et al.*, 2007)

Les boîtes grises représentent les segments hydrophobes, et les boîtes noires des signaux d'adressage internes. (1) Les protéines destinées à la matrice mitochondriale contiennent généralement un signal d'adressage (une préséquence) au niveau de leur extrémité N-terminale. (2) Certaines protéines de la membrane interne ou de l'espace intermembranaire sont dirigées vers la mitochondrie par une préséquence suivie d'un domaine signal hydrophobe. (3) Le signal d'adressage des protéines à la membrane externe est constitué d'un segment hydrophobe entouré de résidus chargés positivement à l'extrémité N-terminale ou (4) localisé au niveau de l'extrémité C-terminale. (5) Beaucoup de protéines qui résident dans la membrane interne et externe contiennent des signaux d'adressage répartis à l'intérieur même de la séquence protéique. (Habib *et al.*, 2007)

2.1.4.2 Systèmes d'import de protéines

Une fois la protéine synthétisée depuis le cytoplasme arrivée à la mitochondrie, elle a deux moyens de franchir la membrane externe. Soit la molécule est de taille inférieure à 5 kDa et peut librement franchir la membrane externe au travers de pores protéiques constitués par la porine, soit la protéine est de plus haut poids moléculaire et elle doit être prise en charge par les systèmes d'import mitochondriaux (figure I.2.4 page suivante) (Becker *et al.*, 2012).

Les signaux d'adressage en préséquence ou internes sont reconnus par des protéines réceptrices associées aux translocases membranaires. La sous-unité Tom20p du complexe TOM (*Translocase of the Outer Membrane* pour translocase de la membrane externe) est chargée de la reconnaissance des résidus chargés positivement des préséquences, tandis que Tom70p est chargé des signaux protéiques internes. Cette dernière est également en charge de la reconnaissance des protéines destinées à la membrane externe et portant des segments transmembranaires multiples en hélice α . Ces protéines sont transférées vers le complexe Mim1 pour une insertion dans la membrane.

La translocation au travers du pore général Tom40p est un mécanisme passif, non ATP ou $\Delta\Psi$ dépendant (Becker *et al.*, 2012). Ce passage impliquerait des interactions électrostatiques entre les résidus chargés positivement de la protéine à transloquer avec les résidus chargés négativement du pore, de plus en plus nombreux au fur et à mesure du passage de la protéine. Cette forme de translocation nécessite un dépliement de la protéine transloquée. Des kinases permettent une régulation de l'activité du complexe TOM.

Les protéines précurseurs en tonneaux β destinées à la membrane externe, comme la porine, sont ensuite prises en charge par les petites chaperonnes TIM (*Translocase of the Inner Membrane* pour translocase de la membrane interne) puis amenées au complexe SAM pour leur insertion dans la membrane externe (figure I.2.4 page suivante) (Becker *et al.*, 2012). Les petites chaperonnes TIM permettent également de stabiliser les autres protéines en transit dans l'espace intermembranaire.

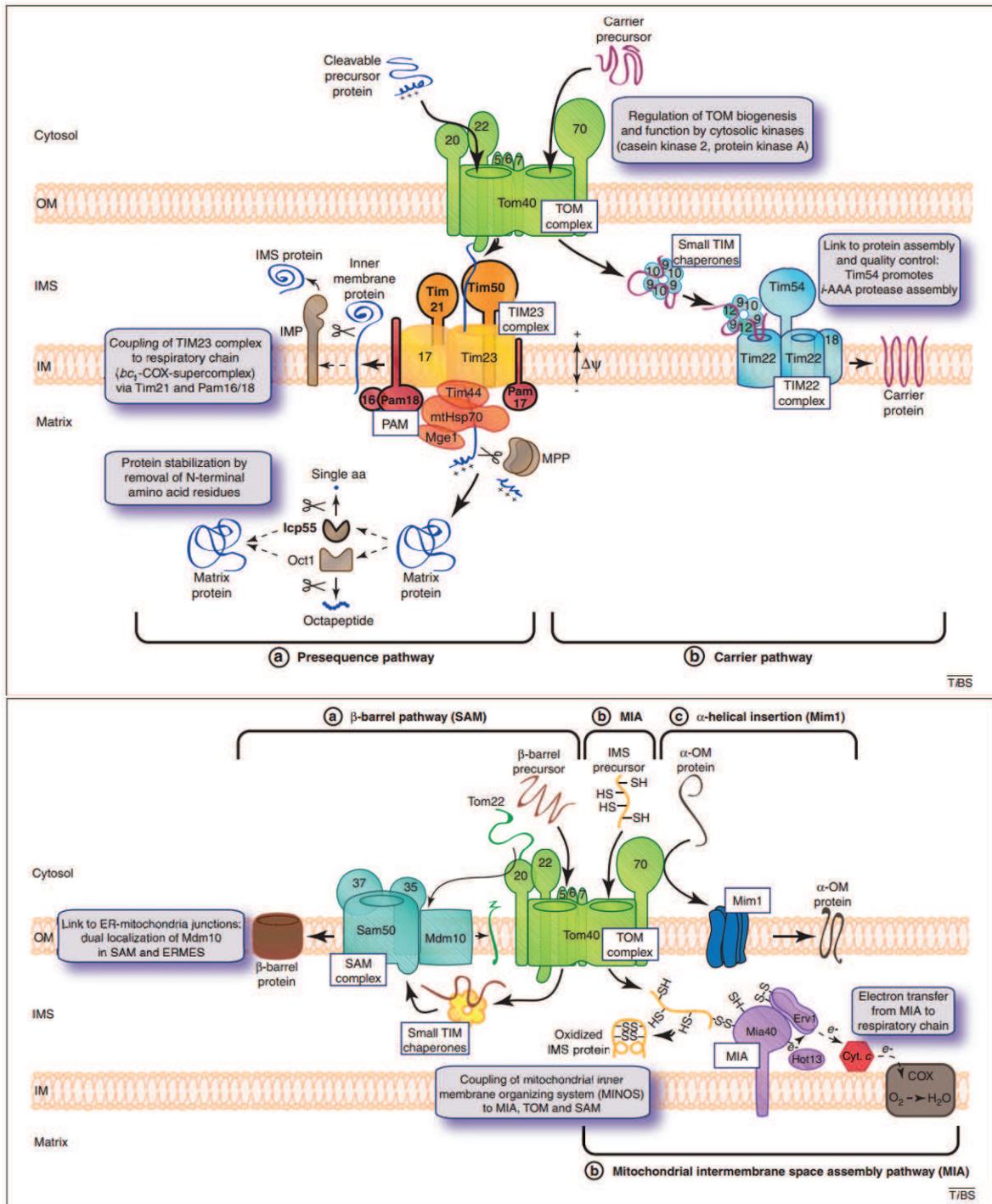


FIGURE I.2.4: Les différentes voies d'import de protéines dans les mitochondries (Becker *et al.*, 2012)

Premier panneau : Les deux voies classiques d'import de protéines dans la mitochondrie. (a) Voie d'import de protéines à préséquences portant des charges positives au niveau N-terminal. (b) Voie d'import de précurseurs protéiques non clivables (avec signaux d'adressage internes).

Second panneau : Trois voies additionnelles d'import de protéines mitochondriales. (a) Voie de transport de protéines à tonneaux β . (b) Voie d'assemblage de l'espace intermembranaire mitochondrial MIA. (c) Voie d'insertion d'hélices α (Mim1).

Arrivé au niveau de la membrane interne, le précurseur protéique peut être pris en charge de plusieurs manières (figure I.2.4 page suivante) (Becker *et al.*, 2012). Les protéines riches en résidus cystéines semblent passer par le complexe MIA (*Mitochondrial Intermembrane space Assembly*) pour assemblage de l'espace intermembranaire mitochondrial). Après le passage au travers du complexe TOM, les précurseurs sont pris en charge par la protéine Mia40p à l'aide des ponts disulfures des cystéines. Mia40p catalyse le repliement oxydatif des protéines, qui peuvent ensuite être insérées à l'aide du système MINOS (*Mitochondrial INner membrane Organizing System* ou système organisateur de la membrane interne mitochondriale), associé de manière transitoire à Mia40p, TOM et SAM.

Par la suite, le complexe TIM22 prend vraisemblablement en charge les protéines sans précurseur clivable, comme pour le transporteur ATP/ADP, et celles possédant une préséquence clivable sont transloquées par le complexe TIM23 (figure I.2.4 page ci-contre) (Becker *et al.*, 2012). La translocation réalisée par ces deux complexes est $\Delta\Psi$ dépendante. À la sortie du complexe TIM23, les précurseurs sont pris en charge par les chaperonnes matricielles comme Hsp70p. TIM23 peut également gérer l'insertion des protéines dans la membrane interne par un phénomène de sortie latérale (*lateral sorting*) (Becker *et al.*, 2012).

2.1.4.3 Insertion des protéines synthétisées dans la matrice

Les protéines destinées à la membrane interne mitochondriale et encodées par le génome mitochondrial suivent une voie d'insertion différente. Peu d'informations sont disponibles sur cette machinerie de transport, mais il est connu que la protéine Oxa1p en est un composant-clé (Bonney *et al.*, 2009). Elle permet non seulement d'insérer de manière cotraductionnelle les protéines synthétisées dans la matrice dans la membrane interne (figure I.2.5), mais également l'insertion de protéines transloquées dans la matrice depuis le cytosol. D'autres protéines ont été identifiées comme pouvant faire partie du complexe formé par l'homo-oligomère d'Oxa1p. Par exemple Pnt1p, ou encore Mdm38p et Mba1p (qui seraient impliquées dans le recrutement du ribosome à la membrane pour une insertion cotraductionnelle) (Ott et Herrmann, 2010). Il a été montré que la protéine Cox18p était nécessaire en plus d'Oxa1p pour une insertion correcte de la sous-unité Cox2p du complexe cytochrome c oxydase. Enfin, il a été suggéré que la protéine Oxa1p aurait un rôle de chaperonne dans la biogénèse de l'ATP synthase (Becker *et al.*, 2009).

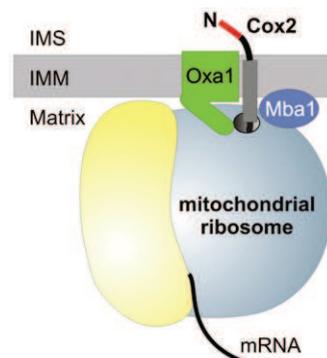


FIGURE I.2.5: Insertion co-traductionnelle dans la membrane interne mitochondriale (Ott et Herrmann, 2010)

La protéine Cox2p est insérée pendant sa traduction dans la membrane interne mitochondriale avec l'aide de Oxa1p et Mba1p. La protéine synthétisée sera ensuite prise en charge par d'autres complexes chargés de son repliement et sa maturation (non représentés sur le schéma).

2.1.5 Des fonctions mitochondriales essentielles à la cellule

La mitochondrie représente une structure optimale pour de nombreuses réactions, et est utilisée par la cellule dans de nombreuses voies métaboliques (Galluzzi *et al.*, 2012). La figure I.2.6 page ci-contre présente quelques voies métaboliques et l'implication des mitochondries dans leurs cascades de réactions.

Tout d'abord, la β -Oxydation, où un acide gras est importé dans la mitochondrie pour y être dégradé en acétyl-CoA, nécessaire au cycle de Krebs. Cette dégradation est génératrice d'ATP, et peut être réalisée dans d'autres organites (les péroxysomes) chez certains eucaryotes.

Ensuite, la biosynthèse de l'hème, le cycle de Krebs fournissant le succinyl-CoA essentiel à la formation du précurseur acide D-aminolevulinique de l'hème. Des enzymes mitochondriales catalyseront les étapes suivantes qui permettront de synthétiser cette molécule indispensable à la cellule.

La mitochondrie est également le siège de la synthèse de cétones, principalement lorsque le taux de β -Oxydation est élevé ou le cycle de Krebs réduit. La mitochondrie sert aussi à la gluconéogénèse via la pyruvate carboxylase. La mitochondrie participe au catabolisme d'acides aminés, dont la première étape est une transamination.

Une fonction importante de la mitochondrie, en dehors des fonctions métaboliques, est le stockage du calcium Ca^{2+} . Avec le réticulum endoplasmique, la mitochondrie est le lieu de stockage d'ions calcium le plus important de la cellule (Galluzzi *et al.*, 2012). Cet ion est utilisé pour diverses régulations bioénergétiques chez les eucaryotes. Il est également possible de noter sa participation dans les phénomènes de mort cellulaire (apoptose).

Une fonction essentielle de la mitochondrie est la formation de centres fer-soufre (Fe-S) (Lill et Mühlhoff, 2005), incorporés ensuite dans des enzymes mitochondriales ou cytoplasmiques (après export du centre de la mitochondrie). Certains complexes de la chaîne respiratoire en contiennent, le complexe I (chez certains eucaryotes), II et III. Les hydrogénosomes et mitosomes, évoqués plus haut, possèdent également cette fonction très conservée chez les eucaryotes.

La mitochondrie est ainsi l'hôte de diverses réactions métaboliques et le siège de plusieurs mécanismes essentiels à la cellule. Toutefois, il existe une autre contribution majeure de la mitochondrie pour la cellule, la capacité de générer une grande quantité d'ATP à partir de la consommation de glucose et d'oxygène moléculaire O_2 (Guérin, 2004).

Une première étape dans cette production est le cycle de l'acide tricarboxylique ou cycle de Krebs (Galluzzi *et al.*, 2012; Guérin, 2004). Ce cycle est exclusivement mitochondrial, l'ensemble des enzymes impliquées sont solubles (excepté la succino-déshydrogénase membranaire) et situées dans le compartiment matriciel. Il permet à la cellule de produire quatre molécules de NADH, une flavine réduite, une molécule de GTP (équivalente à l'ATP) et trois molécules de CO_2 par pyruvate consommé, auparavant généré par la glycolyse cytoplasmique (qui n'a libéré que 10 % de l'énergie potentiellement disponible de la molécule de glucose consommée). Ce pyruvate est tout d'abord décarboxylé en acétyl-CoA qui va entrer dans le cycle décrit en figure I.2.6 page suivante. Les molécules de dioxyde de carbone seront rejetées dans le milieu extérieur, tandis que la flavine et les NADH seront utilisés pour la production de molécules ATP supplémentaires dans les oxydations phosphorylantes, ou OXPHOS.

2.2 Les oxydations phosphorylantes

Les Oxydations Phosphorylantes constituent l'ensemble des réactions aboutissant au couplage de l'oxydation de métabolites et coenzymes avec la synthèse d'ATP au niveau de la membrane interne mitochondriale. C'est un processus impliquant de l'énergie osmotique (Guérin, 2004).

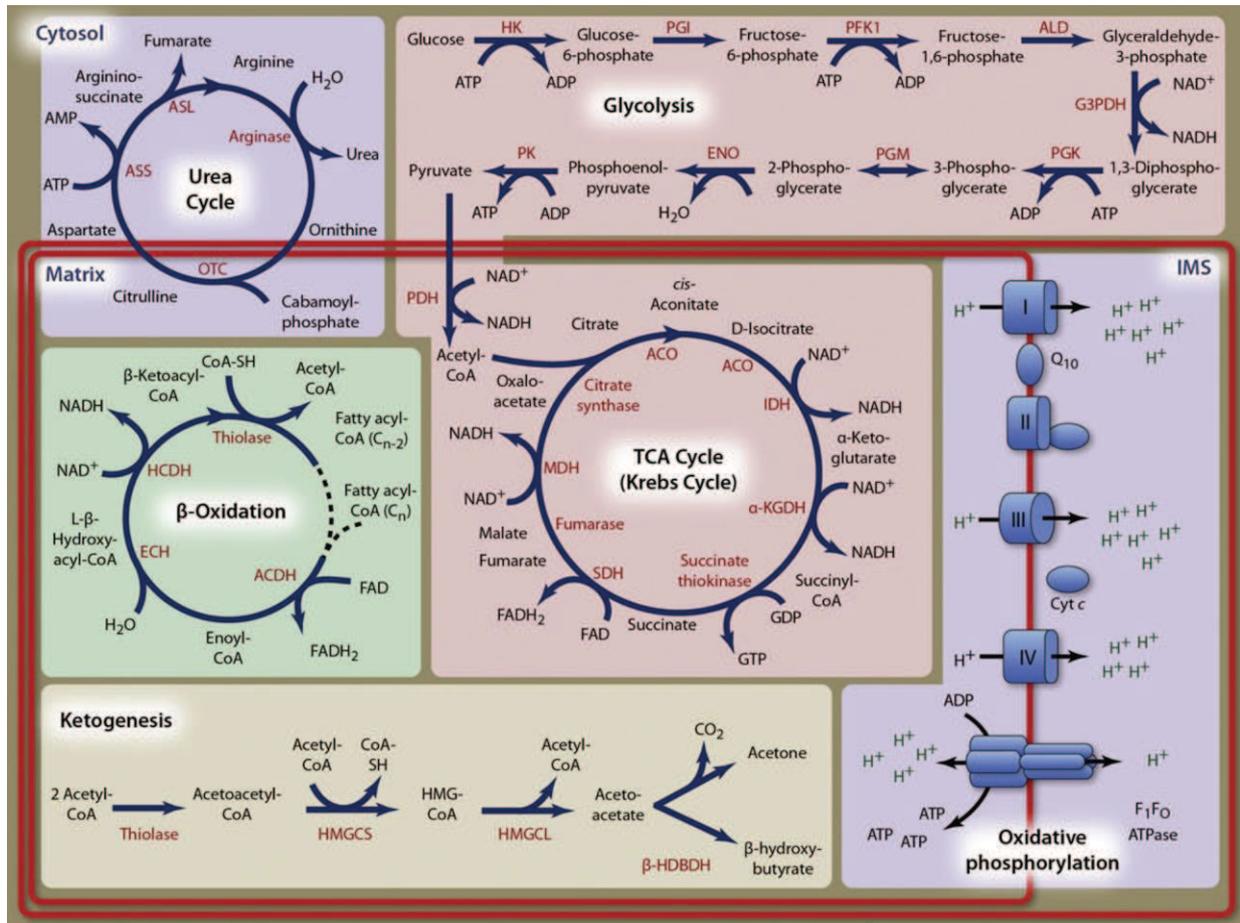


FIGURE I.2.6: Les différentes voies métaboliques impliquant les mitochondries (Galluzzi et al., 2012)

Diagramme simplifié décrivant les différentes voies métaboliques dans lesquelles la mitochondrie est impliquée. Divers intermédiaires et les transporteurs ne sont pas représentés ici. Les membranes mitochondriales sont représentées en rouge. Les complexes des OXPHOS sont représentés en bleu. Le complexe I est représenté, mais n'existe pas chez *Saccharomyces cerevisiae*, il est remplacé par des NADH déshydrogénase internes et externes. α-KGDH : α-KétoGlutarate DésHydrogénase ; ACDH : Acyl-CoA DésHydrogénase ; ACO : Aconitase ; ALD : Aldolase ; ASL : ArgininoSuccinate Lyase ; ASS : ArgininoSuccinate Synthétase ; β-HDBDH : β-HydroxyButyrate DésHydrogénase ; CoA : Coenzyme A ; Cyt c : Cytochrome c ; ECH : Enoyl-CoA Hydratase ; ENO : Énolase ; G3PDH : Glycéraldéhyde-3-Phosphate DésHydrogénase ; HCDH : 3-Hydroxyacyl-CoA DésHydrogénase ; HK : HexoKinase ; HMG-CoA : 3-Hydroxy-3-MéthylGlutaryl-CoA ; HMGCL : HMG-CoA Lyase ; HMGCS : HMG-CoA Synthase ; IDH : Isocitrate DésHydrogénase ; IMS : espace intermembranaire ; MDH : Malate DésHydrogénase ; OTC : Ornithine TransCarbamylase ; PDH : Pyruvate DésHydrogénase ; PFK1 : PhosphoFructoKinase-1 ; PGI : PhosphoGlucose Isomérase ; PGK : PhosphoGlycérate Kinase ; PGM : PhosphoGlycérate Mutase ; PK : Pyruvate Kinase ; SDH : Succinate DésHydrogénase ; Q10 : coenzyme Q10. (Illustration par Ben Smith.)

L'accepteur final des électrons générés par les oxydations varie selon les règnes, et est une molécule de dioxygène O_2 chez les eucaryotes, ce qui fait d'eux des organismes aérobies. Les procaryotes présentent une grande diversité d'accepteurs finaux, mais le mécanisme global reste similaire. Je ne décrirai ici que les oxydations phosphorylantes de la mitochondrie.

2.2.1 La théorie chimioosmotique

Au milieu du 20^{ème} siècle, la recherche en bioénergétique tentait de comprendre les mécanismes liant l'oxydation à la phosphorylation. Mitchell (1961) suggéra que les membranes internes des organites eucaryotes comme les thylakoïdes (chloroplastes) ou la membrane interne mitochondriale permettaient une transduction d'énergie chimique en énergie osmotique, qui pouvait être réciproque. Cette théorie a par la suite été acceptée par la communauté scientifique au vu des preuves expérimentales récoltées (Guérin, 2004).

2.2.2 La chaîne respiratoire, génératrice du gradient de protons

La chaîne respiratoire est composée de quatre complexes protéiques ancrés dans la membrane interne mitochondriale. Ces complexes sont complétés par deux transporteurs d'électrons, le cytochrome c et le coenzyme Q (Guérin, 2004). La figure I.2.7 page ci-contre montre un schéma de la chaîne respiratoire, complété par le complexe V ou ATP synthase, dont j'aborderai la structure et le fonctionnement dans le chapitre 3 page 27.

Le complexe I n'est pas présent chez tous les eucaryotes. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, ce complexe est remplacé par deux NADH déshydrogénases interne (NDI, tournée vers la matrice) et externe (NDE, tournée vers l'espace intermembranaire). Quoiqu'il en soit, ce complexe oxyde la molécule de NADH, ce qui lui permet de récupérer deux électrons qui sont ensuite transférés vers un transporteur membranaire, l'ubiquinone (ubiquinol une fois réduite). L'ubiquinol peut diffuser dans la membrane vers le complexe III. En ce qui concerne le complexe I, le transfert d'électrons est couplé à une translocation de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, ce qui n'est pas le cas des NADH déshydrogénases de la levure. Le complexe II va également participer à la réduction du pool d'ubiquinones, mais son substrat est le succinate. Le complexe III, ou cytochrome bc1, va oxyder les ubiquinol et récupérer les électrons pour les transférer au cytochrome c. L'intérêt de ce transfert est qu'il est couplé à une translocation de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire. Les électrons portés par le cytochrome C sont ensuite transférés au complexe IV de la chaîne respiratoire, aussi nommé cytochrome c oxydase.

Ce complexe va transférer les électrons à l'accepteur final. Ce transfert est également couplé à la translocation d'un proton vers l'espace intermembranaire. La molécule d' O_2 acceptrice sera couplée avec des protons pour former une molécule d'eau H_2O (Guérin, 2004). Il a été montré que les complexes respiratoires (avec différentes stœchiométries) interagissent entre eux pour former des supercomplexes, une sorte de "respirasome" au sein de la mitochondrie (Wittig et Schägger, 2009).

Les complexes I (le cas échéant) et III peuvent devenir de puissants générateurs d'espèces réactives de l'oxygène, ou ROS (*Reactive Oxygen Species*), surtout dans les cas où la course des électrons au travers de ces complexes est entravée par mutation ou par des drogues (Murphy, 2009). Les ROS sont une espèce moléculaire extrêmement réactive. Elles peuvent causer de nombreux dommages dans la cellule au travers de réactions d'oxydations d'acides gras, d'acides aminés ou de co-facteurs enzymatiques, mais également au travers de dommages causés à l'ADN de la cellule (Allen et Raven, 1996), en particulier l'ADN mitochondrial localisé près du principal système générateur de ROS.

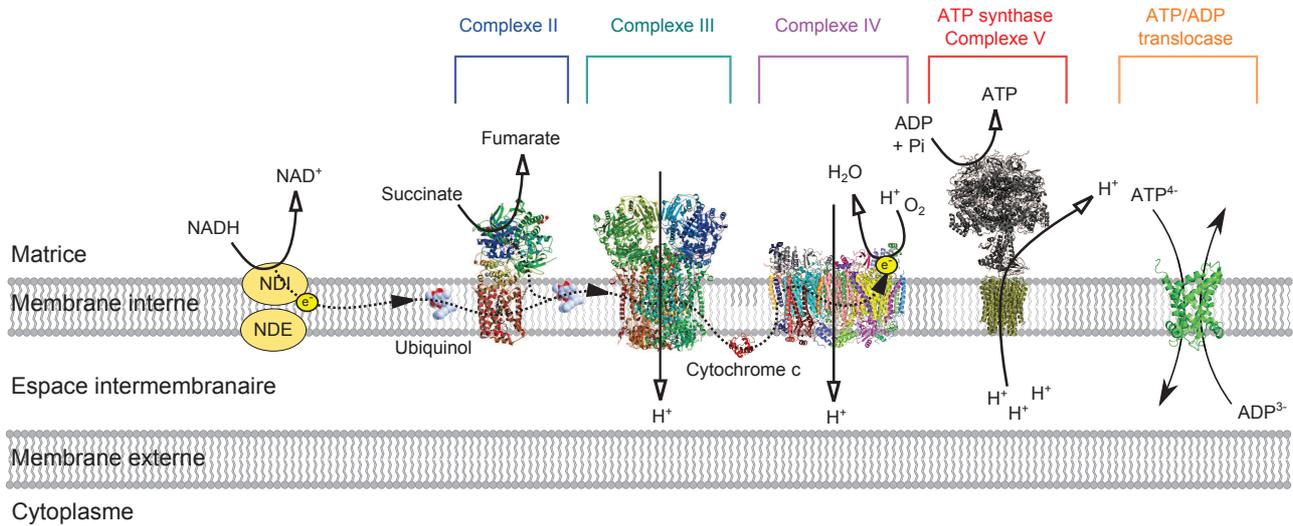


FIGURE I.2.7: Les complexes des oxydations phosphorylantes

Diagramme illustratif des mécanismes généraux des oxydations phosphorylantes chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Les structures des complexes correspondent à celles déterminées pour les organismes *Escherichia coli* (complexe II, PDB : 2H88, Huang et al. (2006)), *Bos taurus* (complexe IV, PDB : 1OCO, Yoshikawa et al. (1998) ; transporteur ATP/ADP, PDB : 2C3E Nury et al. (2005)), et *Saccharomyces cerevisiae* (complexe III, PDB : 1KYO, Lange et Hunte (2002) ; complexe V partiel, PDB : 2WPD, Dautant et al. (2010)). Les électrons extraits des molécules de NADH et succinate sont transférés au pool d'ubiquinones par les NADH déshydrogénases et complexe II, puis aux complexes III et IV (via le cytochrome c) qui va ensuite former une molécule d'eau. Le transfert d'électrons est couplé à une translocation de protons vers l'espace intermembranaire. Le complexe V, l'ATP synthase, va consommer le gradient de protons formé pour la synthèse d'ATP. La translocase ATP/ADP est représentée car elle peut participer à la formation du gradient électrogénique.

Le gradient électrochimique de protons entre la matrice et l'espace intermembranaire mitochondrial, généré par ces différentes translocations, constitue la force protonmotrice mitochondriale, qui va pouvoir être utilisée par le complexe V, ou ATP synthase, pour synthétiser de l'ATP à partir d'ADP et de P_i, réaction endergonique (nécessitant un apport d'énergie pour être réalisée) (Guérin, 2004).

Ce gradient de protons est également utilisé dans de nombreux autres mécanismes cellulaires, comme par exemple l'import de protéines dans la mitochondrie (Becker *et al.*, 2012), et est donc essentiel à la cellule. Un tel gradient peut être généré également par un échange électrogénique ATP⁴⁻ / ADP³⁻ entre la matrice et l'espace intermembranaire, à l'aide du transporteur ATP / ADP situé dans la membrane interne mitochondriale (figure I.2.7).

Chapitre 3

L'ATP synthase

Sommaire

3.1	Structure générale	28
3.1.1	Le secteur F_1	30
3.1.2	Le secteur F_0	31
3.2	Biogénèse du complexe chez la levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	33

Dans le chapitre précédent, j'ai évoqué le fait que l'ATP synthase est le complexe terminal des oxydations phosphorylantes. Ce complexe génère l'essentiel de la production mitochondriale d'ATP. Dans ce chapitre, je vais décrire plus en détail ce complexe protéique, sa structure, son fonctionnement et sa biogénèse. Ce complexe a la particularité d'avoir une origine génétique double, nucléaire et mitochondriale, ce qui fait de la biogénèse cette enzyme un processus très complexe.

3.1 Structure générale

L'ATP synthase est un complexe protéique de 600 kDa ancré à la membrane interne mitochondriale et dont la tête catalytique est située dans la matrice mitochondriale (figure I.3.1 page ci-contre) (Devenish *et al.*, 2008; Ackerman et Tzagoloff, 2005). Ce complexe est composé de deux secteurs majeurs : le secteur F₁ soluble, et le secteur F₀ membranaire. Ces deux domaines sont reliés entre eux par la tige centrale et le pied périphérique, qui permettent d'assurer une cohésion du complexe et le couplage fonctionnel de ces deux secteurs. Cette structure globale est commune à toutes les F₁ / F₀ ATP synthases, bien que le nombre de sous-unités soit variable selon les espèces (table I.3.1). Je baserai mes descriptions dans la suite du document – sauf indication spécifique – sur le complexe ATP synthase de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Une liste des sous-unités de ce complexe, ainsi que les dénominations de leurs homologues chez *Escherichia coli* et *Homo sapiens* sont données en table I.3.1.

	Stœchiométrie	Bactéries	Mitochondries		
		<i>Escherichia coli</i>	<i>Homo sapiens</i>	<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	
				Protéine	Gène
F ₁	3	α	α	α	<i>ATP1</i>
	3	β	β	β	<i>ATP2</i>
	1	γ	γ	γ	<i>ATP3</i>
	1	ϵ	δ	δ	<i>ATP16</i>
	1	-	ϵ	ϵ	<i>ATP15</i>
	1	δ	OSCP	OSCP	<i>ATP5</i>
F ₀	1	a	a	Atp6p	<i>ATP6^M / OLI2</i>
	1	-	A6L	Atp8p	<i>ATP8^M / AAP1</i>
	10-14	c	c	Atp9p	<i>ATP9^M / OLII</i>
	1-2	b	b	4	<i>ATP4</i>
	1	-	d	d	<i>ATP7</i>
	1	-	F6	h	<i>ATP14</i>
	1	-	f	f	<i>ATP17</i>
Protéines associées au F ₀	N/D	-	e	e	<i>ATP21 / TIM11</i>
	N/D	-	g	g	<i>ATP20</i>
	1	-	-	i/j	<i>ATP18</i>
	N/D	-	-	k	<i>ATP19</i>
Protéines régulatrices	1	-	IF1	Inh1p	<i>INH1</i>
	N/D	-	-	Stf1p	<i>STF1</i>
	N/D	-	-	Stf2p	<i>STF2</i>
	N/D	-	-	Stf3p	<i>STF3</i>

TABLE I.3.1: Liste des sous-unités de l'ATP synthase

Liste des sous-unités de l'ATP synthase chez *Escherichia coli*, *Homo sapiens* et *Saccharomyces cerevisiae*. N/D : Non déterminé. D'après Devenish *et al.* (2008); Ackerman et Tzagoloff (2005).

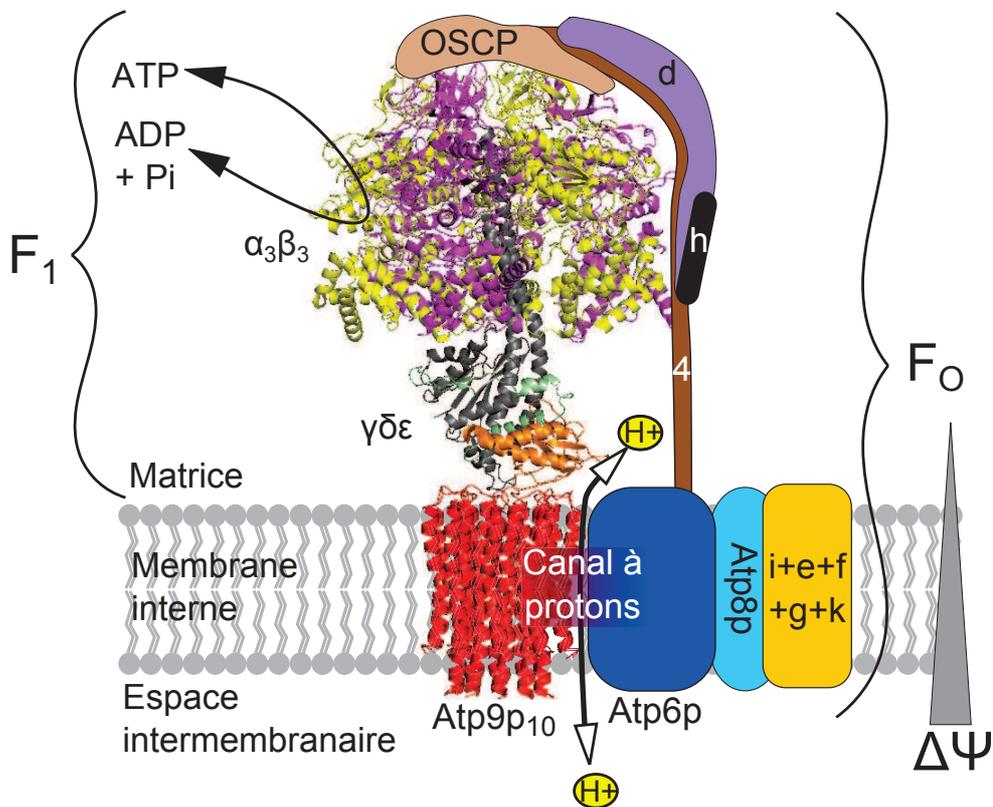


FIGURE I.3.1: Structure générale de l'ATP synthase de levure

Structure générale schématique de l'ATP synthase de la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La structure de l'assemblage F_1 -rotor a été publiée par Dautant et al. (2010). Chaque sous-unité est représentée par une coloration spécifique : α en jaune, β en fuchsia, γ en gris foncé, ϵ en vert clair, δ en orange, Atp9p en rouge, Atp6p en bleu marine, Atp8p en bleu ciel, [i+e+f+g+k] en doré, 4 en marron, h en noir, d en violet, OSCP en beige. Le gradient de protons, symbolisé par une graduation en gris clair, est constitué par une plus grande concentration de protons (sphères jaunes) dans l'espace intermembranaire par rapport à la matrice. Ce gradient est consommé par l'ATP synthase, qui va transférer des protons au travers du canal à protons, ce qui va entraîner la rotation du rotor et de la tige centrale. Cette rotation va engendrer des modifications conformationnelles de la tête catalytique F_1 qui va pouvoir synthétiser de l'ATP. La réaction inverse est possible, et entraînera le transfert d'un proton de la matrice vers l'espace intermembranaire.

3.1.1 Le secteur F₁

La tête catalytique F₁ de l'ATP synthase contient un élément, la tige centrale, formée par les sous-unités γ , δ et ϵ , et se situe à l'interface avec le secteur F₀ au niveau du rotor (figure I.3.1 page précédente) (Devenish *et al.*, 2008; Ackerman et Tzagoloff, 2005). Cette tige transmet le mouvement rotatif du rotor du F₀ aux sites catalytiques du F₁ dans l'hétérohexamère $\alpha_3\beta_3$, situés aux interfaces des sous-unités α et β . Ces sites catalytiques passent par trois états, un "vide", un "ADP+P_i lié", un "ATP lié". Chacun de ces états est présent dans la tête catalytique au même moment, chaque site étant dans un état différent (figure I.3.2).

Lors de la rotation du rotor, la tige centrale effectue une rotation de 120 degrés, modifiant la conformation du site "ADP+P_i lié" suivant, catalysant la phosphorylation de l'ADP. Les deux autres sites se modifient dans le même temps, le site précédent (devenu "ATP lié") se vidant, et le dernier site se liant aux molécules ADP et P_i qui serviront à la génération d'une molécule d'ATP lors de la rotation suivante (Gao *et al.*, 2005). La tête catalytique est capable de réaliser la réaction inverse, l'hydrolyse de l'ATP (Gao *et al.*, 2005). Cette réaction est exergonique, et ne nécessite donc pas le gradient de protons, contrairement à la synthèse d'ATP. Cette réaction d'hydrolyse peut donc être réalisée en l'absence de secteur F₀. Les protéines Inh1p et Stf1p (homologues de l'IF1 des mammifères) assurent l'inhibition de cette hydrolyse, qui pourrait consommer inutilement une partie de l'ATP vital pour la cellule.

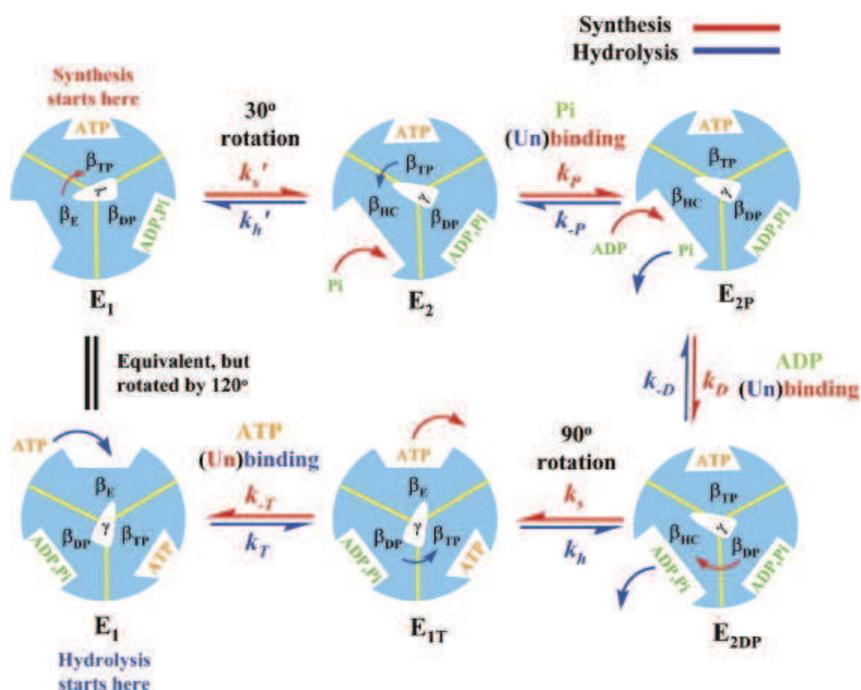


FIGURE I.3.2: Diagramme schématique illustrant le modèle tri-site E1E2 pour la synthèse et l'hydrolyse par le secteur F₁ (Gao *et al.*, 2005)

La figure montre un cycle de rotation de 120 degrés de la sous-unité γ , correspondant à la synthèse (annotations en rouge) ou à l'hydrolyse (annotations en bleu) de l'ATP. Les sites catalytiques sont annotés selon leur description structurale (β_E , β_{TP} , β_{DP} , β_{HC}) (Abrahams *et al.*, 1994; Menz *et al.*, 2001) et leur forme est similaire à celle utilisée dans la littérature (Braig *et al.*, 2000). La constante k_x correspond au taux de liaison pour les espèces x sur un site donné et k_x la constante de dissociation correspondante. k_s' , k_h' , k_s , et k_h sont les constantes pour les rotations correspondantes. Pour l'hydrolyse, le schéma est en accord général avec les hypothèses de Senior *et al.* (2002) et Kagawa *et al.* (2004). (Gao *et al.*, 2005)

3.1.2 Le secteur F_0

Le secteur F_0 , essentiel pour la synthèse d'ATP, est composé du canal à protons, du rotor et du pied périphérique (ou stator) (figure I.3.1 page 29). C'est également ce secteur qui permet l'ancrage du complexe à la membrane interne mitochondriale (Devenish *et al.*, 2008; Ackerman et Tzagoloff, 2005).

Le pied périphérique est un élément à double fonction (Devenish *et al.*, 2008; Ackerman et Tzagoloff, 2005). Tout d'abord, il assure une cohésion du complexe en ancrant le secteur F_1 au secteur F_0 (figure I.3.1 page 29). Les sous-unités OSCP et Atp4p (dans sa partie C-terminale) sont en contact avec la surface du secteur F_1 , et permettent ainsi de le maintenir fixe lors de la rotation de la sous-unité γ (d'où sa qualification de stator). Le stator est également composé des sous-unités d, h, e, f, g, i, k.

Le pied périphérique, via les sous-unités e, g et 4, est également impliqué dans l'oligomérisation des complexes ATP synthases mitochondriales (figure I.3.3(a)), fonction essentielle pour la formation des crêtes mitochondriales (figure I.3.3(b)) (Paumard *et al.*, 2002; Allen, 1995). La sous-unité Atp8p membranaire est située à l'interface entre le pied périphérique et la sous-unité Atp6p du canal à protons, mais son rôle exact n'est pas encore bien compris.

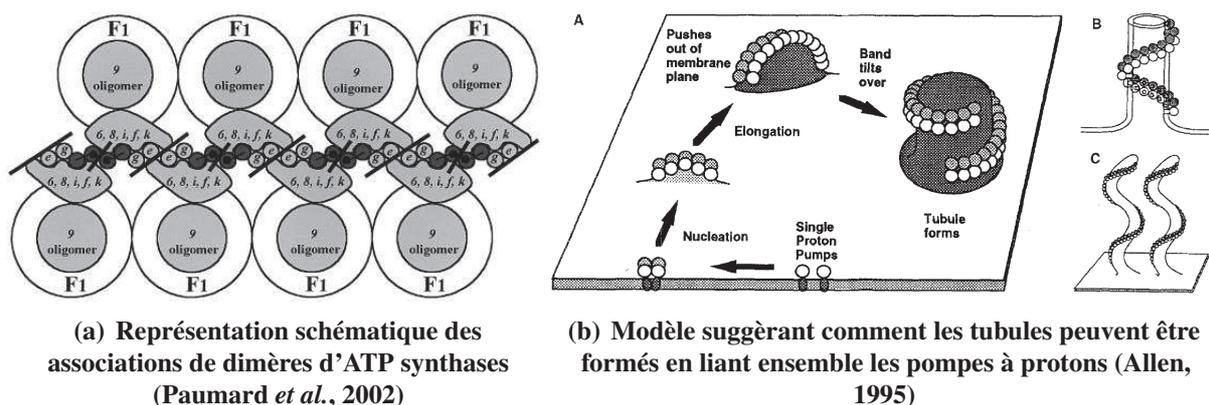


FIGURE I.3.3: Relations entre le F_0 , l'oligomérisation des ATP synthases et la formation des crêtes mitochondriales

(a) Les cercles gris et les blocs représentent les sections membranaires des composants du F_0 de levure comme observées à partir de l'espace intra-crête. La sous-unité 4 (subunit b) est représentée par deux cercles gris sombre (les deux segments transmembranaires) liés par une ligne correspondant à la boucle hydrophile intermembranaire (résidus 46 à 56). Ce modèle présente deux interfaces (barres noires). L'un est médié par la sous-unité 4 et l'autre par les sous-unités e et g.

(b) Le modèle schématisé ci-dessus correspond aux pompes à protons et aux tubules de paramecium, mais peut être étendu aux ATP synthases de *Saccharomyces cerevisiae*. (A-C) Les pompes se lient ensemble en une bande rigide peuvent former des protrudes à partir de la surface plane, emportant de la membrane dans le processus. L'élongation en hélice inclinerait la bande de pompes vers un côté et emporterait plus de membrane hors du plan, ce qui compléterait le tubule. L'addition de pompes en fin de bande entraînerait la croissance du tubule.

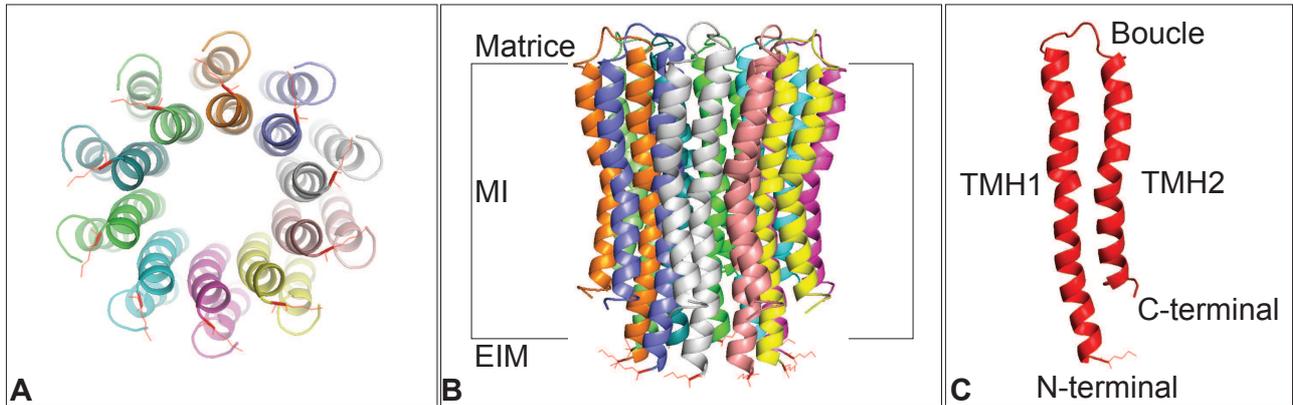


FIGURE I.3.4: Structure du monomère de sous-unité Atp9p et du rotor de l'ATP synthase de *Saccharomyces cerevisiae* (Dautant *et al.*, 2010)

(A) Visualisation du rotor de l'ATP synthase de levure. L'orientation correspond à une observation à partir de l'espace intermembranaire (EIM). La section membranaire et la boucle sont effacées pour plus de visibilité. Chacune des 10 sous-unités d'Atp9p est colorée différemment, et chaque Méthionine N-terminale est affichée et colorée en rouge (cette représentation est reprise sur les trois parties de la figure pour une meilleure orientation). On peut noter que la première moitié de la protéine fait face au centre du rotor, tandis que la seconde moitié est exposée à la membrane interne. Les extrémités N et C-terminales sont situées dans l'EIM. (B) Vue de côté du rotor de l'ATP synthase. Les colorations sont les mêmes que celles présentées en (A). Les boucles de chaque sous-unité sont situées du côté matriciel, et serviront pour l'interaction avec la tige centrale du secteur F_1 . Membrane Interne : MI ; Espace InterMembranaire : EIM. (C) Représentation d'une sous-unité Atp9p monomérique. Les traverses transmembranaires sont composées par deux hélices α . TMH : Trans-membrane Helix ou hélice trans-membranaire.

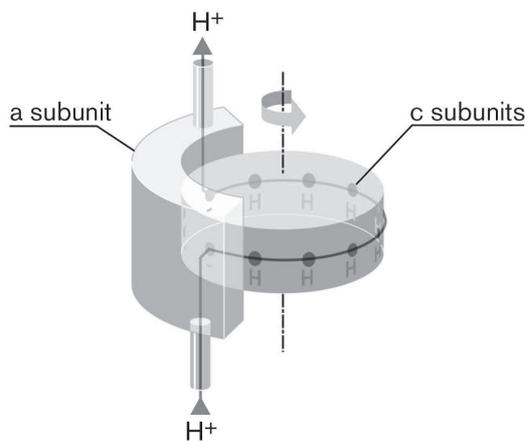


FIGURE I.3.5: Modèle de la génération du mouvement rotatoire du canal à protons de l'ATP synthase (Junge *et al.*, 1997; Stock *et al.*, 2000)

Un modèle à deux canaux proposé par Junge *et al.* (1997). Deux moitiés de canaux situés à travers l'interface entre les sous-unités Atp6p (subunit a) et Atp9p (subunits c) sont liés par la rotation de l'anneau de sous-unités Atp9p.

Le rotor et le canal à protons de l'ATP synthase sont intimement liés. En effet, ce canal est composé de deux éléments, la protéine Atp6p et une roue de sous-unités Atp9p (Devenish *et al.*, 2008; Ackerman et Tzagoloff, 2005). La sous-unité Atp6p est une protéine à 5 traverses membranaires, dont deux sont impliquées dans la formation du canal à protons (figure I.3.5). Ces deux traverses font face au rotor, ou tout du moins à une portion de ce rotor correspondant à un, voire deux monomères d'Atp9p (figure I.3.4). Le nombre de monomères composant ce rotor est variable selon les espèces, il est par exemple de 8 chez *Bos taurus* (Watt *et al.*, 2010), 10 chez *Saccharomyces cerevisiae* (Dautant *et al.*, 2010) et de 10 à 14 pour *Escherichia coli* (Senior *et al.*, 2002).

La protéine Atp9p possède deux traverses membranaires (figure I.3.4), la première orientée vers le centre du rotor, et la seconde vers l'extérieur. Une boucle matricielle lie les deux traverses, et les extrémités N et C-terminales sont situées dans l'espace intermembranaire.

Le canal à protons (figure I.3.5 page ci-contre) est situé en grande partie sur la sous-unité Atp6p et est divisé en deux parties discontinues, la jonction étant effectuée par un résidu Glutamate 59 dans la protéine Atp9p de levure (Angevine *et al.*, 2007; Fillingame *et al.*, 2003). Lors du passage d'un proton dans la première moitié du canal, le proton est transféré du résidu arginine de la sous-unité Atp6p au résidu glutamate 59 de la sous-unité Atp9p lui faisant face. Les forces électrostatiques en présence agissent sur la roue qui va entamer sa rotation. Cette rotation continuera si d'autres protons viennent se lier au glutamate de la sous-unité Atp9p suivante.

Cette rotation a été mise en évidence par visualisation directe en fluorescence (Stock *et al.*, 2000). Après un tour de roue complet, le proton est relargué dans la seconde partie du canal à protons de la sous-unité Atp6p, rejoignant ainsi la matrice. La rotation de l'oligomère de sous-unités Atp9p est transmise à la tige centrale du F₁, permettant ainsi la synthèse de trois ATP au niveau de l'hexamère $\alpha_3\beta_3$ par rotation complète. Le nombre de sous-unités Atp9p va déterminer le nombre de protons nécessaires pour synthétiser une molécule d'ATP.

3.2 Biogénèse du complexe chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*

Le complexe ATP synthase est un élément essentiel à la cellule, et son assemblage n'est pas simple. Outre la nécessité d'un rendement d'assemblage suffisant, il faut également éviter l'accumulation de certains intermédiaires d'assemblage potentiellement délétères. Par exemple, le canal à protons, s'il n'est pas associé au secteur F₁, transférerait sans contrôle les protons vers la matrice, et consommerait donc futility le gradient de protons, indispensable à la cellule. Ce cas de figure peut être létal pour la cellule. Il est donc nécessaire de contrôler la biogénèse du complexe.

De nombreuses protéines sont nécessaires à l'expression et l'assemblage des différentes sous-unités de l'ATP synthase. Le tableau I.3.2 page suivante liste les différentes protéines connues impliquées dans sa biogénèse et ce que l'on connaît de leurs fonctions.

Les composants de l'ATP synthase sont assemblés selon une séquence définie (figure I.3.6 page suivante) (Kucharczyk *et al.*, 2009; Ackerman et Tzagoloff, 2005).

L'hétérohexamère $\alpha_3\beta_3$ du secteur F₁ est tout d'abord assemblé à l'aide des chaperonnes Atp12p (spécifique à la sous-unité α) et Atp11p (spécifique à la sous-unité β). Il a également été montré que Fmc1p avait un rôle essentiel, bien que celui-ci ne soit pas exactement compris. L'hétérohexamère $\alpha_3\beta_3$ est ensuite assemblé avec les éléments de la tige centrale. Le secteur F₁ ainsi formé est capable de se lier au rotor du secteur F₀ qui a été assemblé en parallèle à l'aide de la protéine Atp25p, à la fois facteur de traduction et chaperonne de cette sous-unité.

La sous-unité Atp8p, le pied périphérique puis les sous-unités i, f et k sont ajoutés. La sous-unité Atp6p est synthétisée puis assemblée à l'aide des facteurs Atp10p et Atp23p, ce dernier étant en outre chargé du clivage du *leader peptide* de la sous-unité Atp6p chez *Saccharomyces cerevisiae*. L'incorporation en dernier de la sous-unité Atp6p permettrait une "activation" du complexe une fois toutes les autres composantes assemblées, et ainsi d'éviter la consommation futile de protons par des secteurs F₀ fonctionnels libres (non associés au secteur F₁).

Des étapes supplémentaires impliquent l'oligomérisation du complexe à l'aide des sous-unités e et g, qui pourra alors aider à la formation des crêtes mitochondriales (figure I.3.3 page 31).

Gène / Structure	Cible	Fonction	Référence
<i>ATP12</i> <i>FMC1</i> <i>ATP11</i>	α Atp12p / α β	Chaperonne Cochaperonne Chaperonne	Ackerman et Tzagoloff (2005) ¹ voir ¹ voir ¹
<i>AEP1</i> <i>AEP2</i> <i>ATP25</i> <i>OXA1</i>	Atp9p Atp9p Atp9p Atp9p	Stab. de l'ARN _m / Trad. Traduction Stab. de l'ARN _m / Oligom. assemblage anneau / Atp6p	(Rak <i>et al.</i> , 2009) ² voir ² voir ² voir ²
<i>ATP10</i> <i>ATP23</i> <i>ATP22</i> <i>AEP3</i> <i>NCA2</i> <i>NCA3</i> <i>NAMI</i>	Atp6p Atp6p Atp6p Atp6p et Atp8p Atp6p et Atp8p Atp6p et Atp8p Atp6p et Atp8p	Chaperonne Maturation Traduction Stab. de l'ARN _m Stab. de l'ARN _m / Trad. Stab. de l'ARN _m / Trad. Mat. de l'ARN _m	voir ² voir ² voir ² voir ² voir ² voir ² voir ²
Secteur F ₁ & <i>FMC1</i> Secteur F ₁	Atp9p Atp6p et Atp8p	N/D Traduction	Lefebvre-Legendre <i>et al.</i> (2001) Rak et Tzagoloff (2009)

TABLE I.3.2: Liste différents facteurs impliqués dans la biogénèse de l'ATP synthase de levure

Liste des différents facteurs impliqués dans la biogénèse de l'ATP synthase chez *Saccharomyces cerevisiae*. Stab. : Stabilité ; Oligom. : Oligomérisation ; Trad. : Traduction ; Mat. : Maturation. D'après Lefebvre-Legendre *et al.* (2001); Ackerman et Tzagoloff (2005); Zeng *et al.* (2007, 2008); Rak et Tzagoloff (2009); Rak *et al.* (2009).

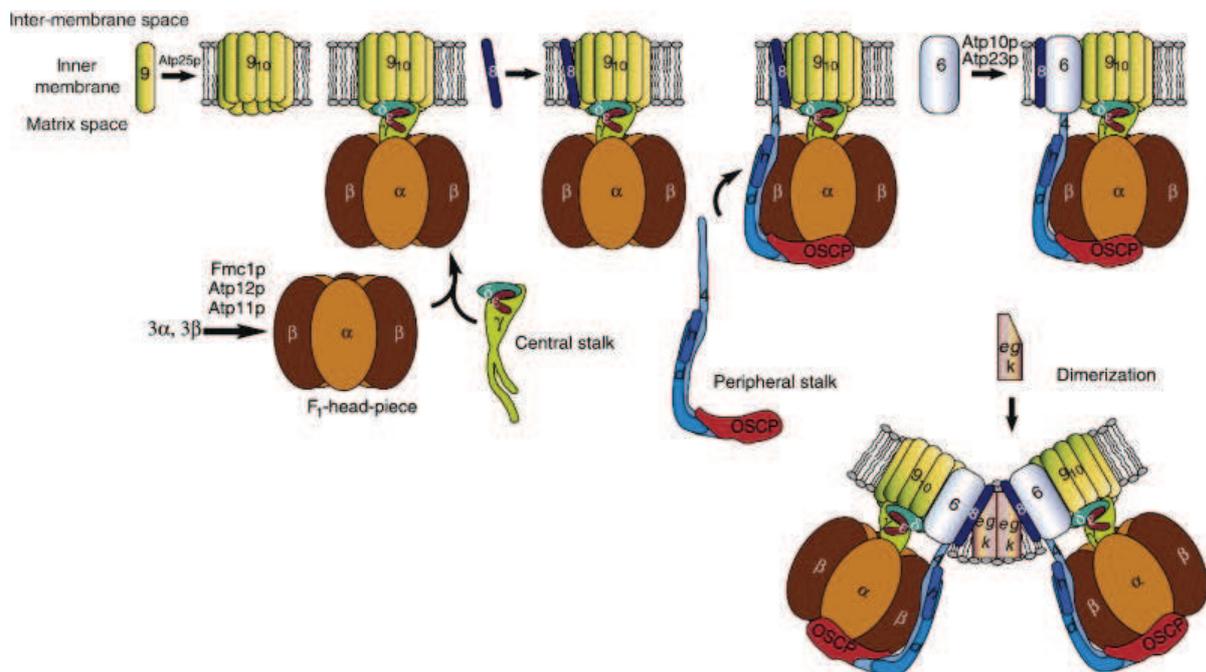


FIGURE I.3.6: Assemblage de l'ATP synthase de levure (Kucharczyk *et al.*, 2009)

L'assemblage est un processus séquentiel et est assisté par des chaperonnes spécifiques (indiquées au-dessus des flèches). Initialement, le secteur F₁, l'anneau de sous-unités Atp9p et la tige centrale sont pré-assemblés puis attachés entre eux. Ensuite, la sous-unité Atp8p et le pied périphérique sont ajoutés au pré-complexe. La sous-unité Atp6p est incorporée dans une dernière étape qui rendra le complexe fonctionnel. Les sous-unités e et g permettront l'assemblage oligomérique du complexe ATP synthase. (Kucharczyk *et al.*, 2009)

Chapitre 4

Le génome mitochondrial

Sommaire

4.1	Le génome mitochondrial	36
4.1.1	Caractéristiques générales de ce génome	36
4.1.2	Le génome mitochondrial de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	36
4.2	L'évolution du génome mitochondrial, de l'endosymbiose à aujourd'hui . . .	37
4.2.1	La réduction du génome ancestral	37
4.2.2	Certains gènes mitochondriaux chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ne le sont pas chez d'autres organismes	38
4.3	Pourquoi un génome mitochondrial ?	38
4.3.1	La relocalisation de gènes mitochondriaux au noyau	38
4.3.2	Les avantages d'une relocalisation des gènes mitochondriaux au noyau	40
4.3.3	Les mécanismes allant à l'encontre d'une relocalisation au noyau des gènes mitochondriaux	41
4.4	La relocalisation artificielle de gènes mitochondriaux au noyau	42
4.4.1	La levure <i>Saccharomyces cerevisiae</i> , un outil intéressant pour la relocalisation artificielle	42
4.4.2	Les expériences décrites dans la littérature	43

Nous l'avons vu précédemment, la formation de l'ATP synthase dépend de l'expression coordonnée des génomes nucléaire et mitochondrial. Dans ce chapitre, je vais récapituler les diverses connaissances que nous avons à l'heure actuelle sur le génome mitochondrial.

4.1 Le génome mitochondrial

4.1.1 Caractéristiques générales de ce génome

Le nombre de copies de ce génome est variable au sein de la cellule, aussi bien selon les espèces que selon les conditions physiologiques (Williamson, 2002). Si le génome nucléaire peut contenir une dizaine de copies pour les plus grandes polyploïdies, le génome mitochondrial atteint la cinquantaine pour *Saccharomyces cerevisiae* (Williamson, 2002), voire des milliers de copies chez *Homo sapiens* (Bogenghagen, 2012).

Ces copies ne sont toutefois pas distribuées de manière homogène dans le réseau mitochondrial. Les génomes sont contenus dans des unités dynamiques nommées les nucléoïdes (Bogenghagen, 2012). La transmission du génome mitochondrial suit une hérédité maternelle. Bien que la plupart des espèces soit hétéroplasmiques (contenant des génomes mitochondriaux différents), certaines espèces comme la levure *Saccharomyces cerevisiae* possèdent des mécanismes amenant à une homoplasmie au bout de quelques générations.

Bien qu'il ait été montré que le génome mitochondrial est circulaire chez les mammifères (Sinclair et Stevens, 1966), des doutes subsistent quant à la forme des génomes mitochondriaux de certaines levures comme *Saccharomyces cerevisiae* (certains travaux tendent vers une structure linéaire) (Williamson, 2002).

Le génome mitochondrial présente une variation de taille et de composition selon les espèces (Gray *et al.*, 1999). D'une composition plus riche en nucléotide A et T que le génome nucléaire (Mounolou et Lacroute, 2005), il est d'une taille relativement petite chez certains parasites, atteignant les 6 000 pb (Wilson et Williamson, 1997), mais peut avoir d'énormes proportions chez certains eucaryotes comme les plantes, où il peut atteindre les 700 000 pb (Kubo et Newton, 2008).

Cependant, il n'y a pas de rapport entre taille et nombre de gènes mitochondriaux (bien que les plantes aient le plus grand nombre de gènes) car ces génomes peuvent contenir de nombreux introns. Chez le champignon filamenteux *Podospora anserina*, 75 % du génome est représenté par des introns (Cummings *et al.*, 1990).

Les gènes de ces génomes sont organisés en unités polycistroniques (Foury *et al.*, 1998), c'est-à-dire qu'un ARN transcrit fournira plusieurs ARN_m à traduire. À l'heure actuelle, aucun mécanisme de transcription gène-spécifique n'a été décrit pour le génome mitochondrial, seuls des mécanismes de régulation traductionnels ainsi que des mécanismes de régulation globale de la transcription ont été observés (Herrmann *et al.*, 2012; Blomain et McMahon, 2012).

4.1.2 Le génome mitochondrial de *Saccharomyces cerevisiae*

Le génome mitochondrial de *Saccharomyces cerevisiae* (figure I.4.1 page ci-contre) contient environ 86 000 paires de bases. Il spécifie 7 protéines directement impliquées dans les OXPHOS (le cytochrome b du complexe III ; Cox1p, Cox2p et Cox3p du complexe IV ; Atp6p, Atp8p et Atp9p de l'ATP synthase), 24 ARN_t, les ARN ribosomiaux 16 et 21S, la sous-unité du mitoribosome *VARI*, la composante ARN9S de la RNAaseP (impliquée dans la maturation des ARN_t) ainsi que des introns codant diverses maturases intervenant dans la maturation des ARN transcrits (Foury *et al.*, 1998).

La figure I.4.1 page suivante montre les positions des différents gènes, ainsi que les unités polycistroniques auxquelles ils appartiennent. Pour comparaison, le génome nucléaire de *Saccharomyces cerevisiae* est composé d'un peu plus de 6 000 gènes répartis sur 16 chromosomes, pour un total d'environ 13 millions de paire de bases.

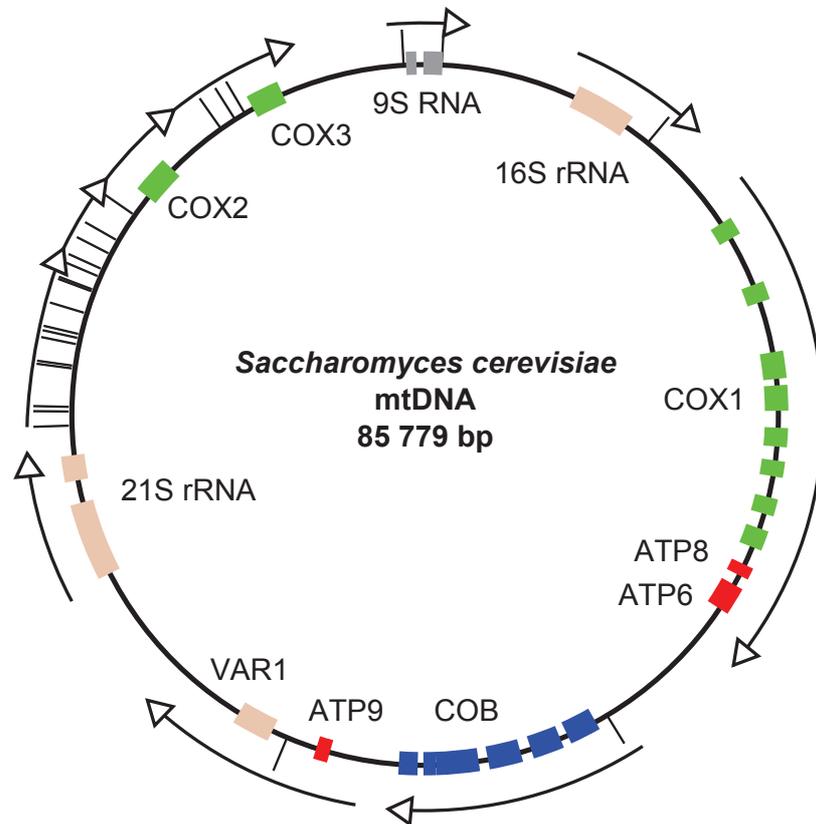


FIGURE I.4.1: Représentation schématique du génome mitochondrial de *Saccharomyces cerevisiae*

Pour plus de clarté, le génome mitochondrial est ici représenté de manière circulaire. Les promoteurs/terminateurs, origines de réplifications ainsi que les introns (et leurs phases codantes) ne sont pas représentés. Les gènes mitochondriaux de *Saccharomyces cerevisiae* sont symbolisés par des boîtes colorées dont la dimension est proportionnelle à leur taille en paires de base. Les gènes COX1, COB et ARN_r 21S sont morcelés du fait de la présence d'introns, non représentés ici. En jaune sont représentées les sous-unités du complexe cytochrome c oxydase, en rouge celles de l'ATP synthase, en bleu celles du cytochrome bc1. Les ARN_r sont représentés par une barre verticale. Les unités polycistroniques sont représentées par les flèches, qui vont dans le sens de la transcription.

4.2 L'évolution du génome mitochondrial, de l'endosymbiose à aujourd'hui

4.2.1 La réduction du génome ancestral

Le génome mitochondrial est, comme je l'ai précisé dans les chapitres précédents, issu d'un génome procaryotique ancestral. Ce génome devait être suffisant pour supporter une vie libre et autonome de l'organisme à l'origine des mitochondries. Il a été montré aujourd'hui qu'un génome procaryote minimal suffisant pour supporter la vie devait contenir de l'ordre de près d'un demi-millier de gènes (Glass *et al.*, 2006). Le contenu du génome mitochondrial a donc été fortement réduit au cours de l'évolution (visible également en comparant la taille des génomes mitochondriaux et bactériens).

Cette réduction a pu être effectuée de plusieurs manières. Tout d'abord, l'expression de deux génomes complets dans une même cellule pourrait engendrer de nombreux problèmes, notamment au travers d'incompatibilités entre systèmes protéiques. D'un autre point de vue, la redondance d'information génétique pour un même processus permet une perte de cette information sans

dommages pour la cellule. Il a donc été possible qu'une partie de l'information génétique contenue dans ce génome ancestral soit perdue au cours de l'évolution, soit par contre-sélection soit par perte aléatoire. Le reste de l'information génétique a pu être conservé dans le génome mitochondrial, ou relocalisé au génome nucléaire.

4.2.2 Certains gènes mitochondriaux chez *Saccharomyces cerevisiae* ne le sont pas chez d'autres organismes

La composition actuelle des génomes mitochondriaux est variable selon chaque espèce (Foury *et al.*, 1998; Cummings *et al.*, 1990). De plus, les gènes mitochondriaux qui ne sont pas impliqués dans son maintien ou son expression encodent toujours des sous-unités des complexes protéiques impliqués dans les OXPHOS. Quelle est la raison de ce biais de composition du génome mitochondrial ?

En ce qui concerne le complexe III, ou cytochrome bc1, le gène encodant la sous-unité cytochrome b n'a jamais été déterminé comme nucléaire – si l'on ne prend pas en compte les espèces possédant les structures telles que les mitosomes et hydrogénosomes où le cytochrome b est absent (voir section 1.4.2 page 13) –, il est toujours observé dans le génome mitochondrial (Lang *et al.*, 1999).

Le cas est légèrement différent pour le complexe cytochrome c oxydase. En effet, la sous-unité Cox1p a également été observée toujours encodée dans le génome mitochondrial, excepté sa portion C-terminale qui a pu être relocalisée au noyau chez divers groupes d'eucaryotes, indiquant une relocalisation effectuée très tôt au cours de l'évolution des eucaryotes, mais dont la séquence a été perdue par la suite. Pour les gènes *COX2* et *COX3*, encodés à la mitochondrie chez la plupart des eucaryotes, il a été montré que chez les algues vertes chlorophycées ces deux gènes sont encodés dans le génome nucléaire. *COX2* est également présent dans le génome nucléaire des légumineuses.

En ce qui concerne les sous-unités de l'ATP synthase, seules les sous-unités Atp6p, Atp8p et Atp9p ont été observées comme étant encodées dans le génome mitochondrial. C'est le cas chez *Saccharomyces cerevisiae*. Cependant, il a également été montré également que la sous-unité Atp6p était encodée dans le génome nucléaire des algues vertes de type Chlorophycées, moyennant une diminution de l'hydrophobicité de ses trois premières traverses membranaires. Il a également été montré que dans ces mêmes organismes, la sous-unité Atp9p avait été relocalisée, et que le gène encodant la sous-unité Atp8p n'était pas présent dans le génome mitochondrial, bien qu'il n'ait pas été identifié dans leurs génomes nucléaires.

La sous-unité Atp9p est de localisation variable chez les eucaryotes. En effet, il a été montré que ce gène avait été relocalisé chez les animaux (où il est présent en 3 isoformes), ainsi que chez certains champignons filamenteux comme *Neurospora crassa* ou *Podospora anserina*, et ce de manière totalement indépendante. La relocalisation de ce gène a donc pu être réalisée dans les trois règnes différents. Pourquoi, à l'instar des autres sous-unités des complexes OXPHOS toujours encodées dans le génome nucléaire, ce gène *ATP9* – ou, au même titre, les autres gènes qui ont été relocalisés chez certains eucaryotes – n'a-t-il pas été relocalisé au noyau définitivement chez l'ensemble des eucaryotes ?

4.3 Pourquoi un génome mitochondrial ?

4.3.1 La relocalisation de gènes mitochondriaux au noyau

Il a été montré que cette relocalisation de gènes de la mitochondrie vers le noyau est encore possible à l'heure actuelle – l'inverse étant extrêmement improbable (Thorsness et Fox, 1990, 1993; Thorsness et Weber, 1996) – mais les mécanismes exacts de ces transferts ne sont pas connus en détail. Des séquences d'origine mitochondriale ont été également identifiées dans le génome nucléaire eucaryote (Blanchard et Schmidt, 1996). Lors d'un évènement de relocalisation, une copie du gène mitochondrial est insérée dans le génome nucléaire de la cellule. La cellule ne peut cependant pas immédiatement dépendre de cette nouvelle copie pour plusieurs raisons.

Tout d'abord, il est évidemment nécessaire que cette séquence acquière des éléments génétiques nécessaires à son expression, comme un promoteur / terminateur, ainsi que des séquences de régulation 5' et 3' UTR. Cette acquisition peut se faire de nombreuses manières, la cellule de levure possédant approximativement 6 000 gènes ayant de telles séquences, qu'il serait aisé d'utiliser. En parallèle de l'obtention de ces séquences, le gène fraîchement relocalisé nécessite quelques ajustements.

Dans la même optique, pour une expression fonctionnelle, la protéine encodée par le gène relocalisé nécessite d'être adressée spécifiquement à la mitochondrie. À moins de posséder un signal d'adressage interne, la protéine peut être fusionnée à une préséquence d'adressage mitochondrial (voir chapitre 2 section 2.1.4.2 page 18). Ce type de préséquence n'a pas de structure bien définie, facilitant ainsi la possibilité d'acquisition d'un tel signal (sans compter que la duplication d'un signal existant est également possible).

Les génomes mitochondriaux, possédant leur propre système de traduction indépendant de la traduction cytosolique, ont vu leur code génétique se modifier au cours de l'évolution. Celui-ci s'est éloigné du code génétique standard des génomes nucléaires (Sammet *et al.*, 2010). Ces différences sont non seulement visibles entre les codes génétiques de ces deux compartiments, mais les codes génétiques mitochondriaux sont spécifiques à chaque espèce. Cette adaptation a pu être réalisée du fait de la richesse de leur ADN en adénine et thymine, ainsi que la petite taille de leur génome qui a permis une adaptation des gènes aux nouveaux codes génétiques (Ohama *et al.*, 2008).

Dans le cas d'une relocalisation de gènes mitochondriaux vers le noyau, cette différence de code aurait pour effet d'introduire des mutations dans les protéines synthétisées par les systèmes de traduction cytoplasmiques. Ces mutations introduiraient même, dans certains cas, des mutations non-sens, empêchant ainsi une traduction complète de la protéine. Il est donc nécessaire que le gène, pour une expression fonctionnelle, soit modifié par mutations afin d'adopter une séquence compatible avec les systèmes de traduction cytoplasmiques, sans que ces modifications affectent la fonctionnalité de son produit protéique.

Le matériel génétique fraîchement transféré depuis la mitochondrie vers le noyau ne serait donc probablement pas fonctionnel dans l'immédiat. Selon Blanchard et Lynch (2000) (figure I.4.2 page suivante), la copie mitochondriale du gène serait maintenue, jusqu'au point où l'isoforme nucléaire deviendrait fonctionnel et entrerait en compétition avec la copie mitochondriale. Chez *Neurospora crassa*, il a été montré que deux copies du gène *ATP9* existait, une dans chacun des génomes nucléaire et mitochondrial (Bittner-Eddy *et al.*, 1994). Cet organisme pourrait représenter un exemple évolutif de ce cas de figure, mais dont la copie mitochondriale aurait été maintenue pour des raisons non déterminées. Différentes étapes interviendraient lors de cette compétition, décrites dans la figure I.4.2 page suivante. À la fin, la copie mitochondriale serait perdue par la cellule, qui ne posséderait alors que la ou les copies nucléaires.

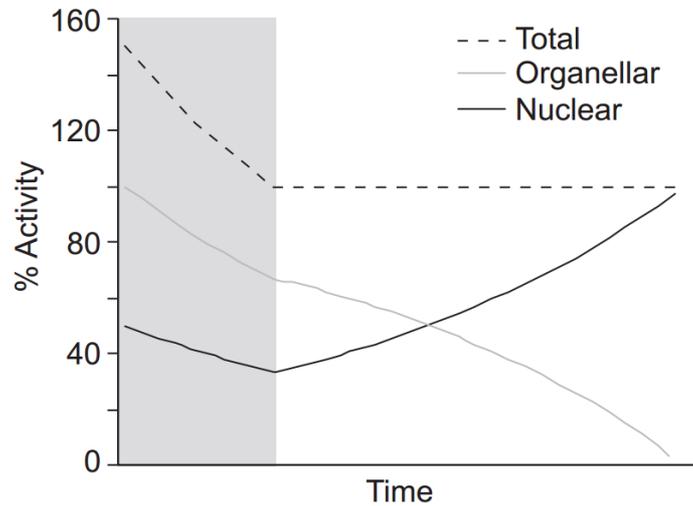


FIGURE I.4.2: Modèle hypothétique du devenir des copies d'un gène relocalisé (Blanchard et Lynch, 2000)

Le graphique débute avec l'expression du gène mitochondrial à 100 % (courbe Organellar). L'expression de la copie nucléaire (courbe Nuclear) est à 50 %. Ce graphique présuppose déjà que la copie nucléaire est adaptée à son nouveau compartiment, elle est pleinement fonctionnelle. Seul son taux d'expression change. Initialement, il y a un excès de protéine produite, conduisant à un excès de complexe enzymatique, et donc d'activité associée (courbe Total). Dès que l'expression de la copie mitochondriale chute en dessous de 100 %, les deux copies deviennent essentielles. Des mutations délétères vont continuer de s'accumuler – au travers de dérives génétiques – jusqu'à ce que l'efficacité totale des deux gènes soit réduite au niveau initial (100 %, symbolisé par la fin de la zone grise). Si la fonctionnalité de la copie mitochondriale continue de diminuer – à cause des mutations et de la dérive génétique, comme décrit par l'hypothèse du cliquet de Müller, ou alors une diminution d'efficacité due à la sélection naturelle – des mutations bénéfiques peuvent s'accumuler dans la copie nucléaire jusqu'à ce que la production protéique soit maintenue par cette copie seule. Le gène mitochondrial peut alors être perdu sans conséquence pour la cellule.

4.3.2 Les avantages d'une relocalisation des gènes mitochondriaux au noyau

Il est possible d'émettre diverses hypothèses afin d'évaluer quels pourraient être les avantages représentés par une relocalisation de gènes mitochondriaux vers le noyau. Comme je l'ai précisé dans le chapitre 2 section 2.2 page 22, les mitochondries sont un siège important de production de ROS (Murphy, 2009). Les radicaux oxygène produits sont extrêmement toxiques pour la cellule (Allen et Raven, 1996). Généralement prises en charge par des enzymes de détoxification (Wei et Lee, 2002), les ROS peuvent cependant réagir avec les molécules présentes aux alentours, et notamment l'ADN, et vont alors entraîner l'apparition de mutations dans le génome affecté (Wallace, 2005).

Contrairement au génome nucléaire, le génome mitochondrial n'est pas protégé par des protéines telles que les histones, et certaines études démontrent une sensibilité supérieure de ce génome mitochondrial à cette source de mutations (Wallace, 2005). Malgré la réparation par des systèmes de correction (Mandavilli *et al.*, 2002), certaines mutations peuvent subsister, et éventuellement entraîner des perturbations dans le transport d'électrons de la chaîne respiratoire. Ces perturbations entraîneront une production plus importante de ROS, déclenchant ainsi une boucle de production de ROS délétère pour la cellule (Wei et Lee, 2002). C'est le "cercle vicieux" considéré comme en partie responsable du vieillissement. La relocalisation des gènes mitochondriaux au noyau pourrait protéger ces gènes de cette source importante de ROS.

Les mutations du génome mitochondrial délétères mais non létales, qu'elles prennent leur source à partir de réactions avec les ROS ou d'autres mutagènes, peuvent éventuellement s'accumuler dans les génomes des bactéries endosymbiotiques (Moran, 1996), et, par extension, dans les génomes mitochondriaux, du fait de la propagation asexuée de ce génome. Cette dérive génétique, principe énoncé par Muller (1964), et baptisée "cliquet de Müller" (*Müller's ratchet* en anglais), intervient dans les génomes transmis de manière asexuée, où les mutations s'accumulent et ne sont pas corrigées par recombinaison (Race *et al.*, 1999).

Ce principe s'applique aux bactéries endosymbiotiques, et peut s'appliquer plus généralement aux génomes des plastes et mitochondries. Lors de la transmission des organites, seule une partie des nombreuses copies de leur génome est transmise, créant ainsi un goulot d'étranglement génétique. Ce goulot peut être bénéfique, en ne transmettant pas les génomes contenant des mutations délétères, cependant l'inverse est également vrai (Chinnery *et al.*, 2000). La relocalisation des gènes mitochondriaux au noyau permettrait d'éviter cette dérive, corrigeant les mutations lors de la méiose.

4.3.3 Les mécanismes allant à l'encontre d'une relocalisation au noyau des gènes mitochondriaux

La relocalisation de gènes mitochondriaux peut présenter divers avantages, dont j'ai donné quelques exemples ci-dessus. Le fait que des gènes mitochondriaux existent encore à l'heure actuelle est intrigant. Diverses hypothèses ont été énoncées pour expliquer ce phénomène.

La première hypothèse à considérer est que nous ne percevons qu'un simple instantané, une simple photographie de l'évolution du vivant que nous connaissons. Cette évolution est toujours en cours (Palmer, 1997). Il est alors possible qu'à l'avenir nous puissions observer des organismes ayant perdu leur génome mitochondrial, mais possédant des mitochondries (ainsi que leur système énergétique que j'ai décrit dans les chapitres précédents) fonctionnelles dont l'ensemble des protéines seraient codées par le génome nucléaire. Le biais de composition non aléatoire des génomes mitochondriaux, encodant uniquement des protéines nécessaires aux OXPHOS (autres que pour leur maintenance ou leur expression), est à considérer, indiquant que d'autres facteurs évolutifs sont à l'origine des génomes mitochondriaux actuels.

Une deuxième hypothèse implique la différence de codes génétiques entre le compartiment mitochondrial et le compartiment nucléaire que j'ai évoquée précédemment. Cette différence pourrait empêcher l'expression correcte d'un gène relocalisé, qui serait éliminé par perte avant une adaptation de son code génétique. Cette différence n'a cependant pas empêché plusieurs gènes, mitochondriaux chez certains organismes, d'être relocalisés au noyau et ce de manière indépendante (Dequard-Chablat *et al.*, 2011), indiquant par là que cette "barrière" n'est pas insurmontable.

Une autre hypothèse, formulée par Allen (1993) et nommé CoRR (*Co-location for Redox Regulation* ou colocalisation pour une régulation Redox), postule que les gènes des chloroplastes et mitochondries sont retenus dans ces compartiments car leur expression nécessiterait d'être sous un contrôle direct de l'état d'oxydo-réduction de leurs produits ou des transporteurs d'électrons avec lesquels ils sont en interaction. Une colocalisation de ces gènes et de leur produits permettrait d'intervenir de manière optimale dans le cas de stress oxydants comme la production de ROS. Cette hypothèse n'a cependant pas été testée chez les mitochondries, et ne fait pas consensus dans la communauté scientifique (de Grey, 2005).

Une dernière hypothèse part du principe que l'expression des gènes mitochondriaux à partir du noyau serait délétère pour la cellule, du fait de la traduction d'un produit protéique inadapté pour le transport au travers du compartiment cytoplasmique. L'hydrophobicité des protéines synthétisées en est l'exemple-type (de Grey, 2005).

En effet, les protéines impliquées dans les OXPHOS et encodées par le génome mitochondrial sont toutes membranaires, et sont donc hydrophobes. J'ai évoqué en section 2.1.4.2 page 18 que ces protéines étaient insérées dans la membrane interne mitochondriale en même temps que leur traduction, évitant ainsi une mauvaise conformation de ces protéines hydrophobes. Leur synthèse par les ribosomes du cytoplasme pourrait être délétère pour la cellule ; non seulement la protéine pourrait s'agréger dans ce compartiment aqueux, mais elle pourrait aussi être mal dirigée et insérée dans d'autres membranes cellulaires. De plus, cette hydrophobicité pourrait se révéler problématique lors de l'adressage à la mitochondrie, la protéine pourrait être insérée dans la membrane externe de manière irréversible.

Il a été montré que des gènes, mitochondriaux chez *Saccharomyces cerevisiae*, ont été relocalisés chez certaines espèces et que cette relocalisation a été accompagnée d'une diminution de l'hydrophobicité de certaines portions des protéines encodées. C'est le cas notamment du gène *COX2* chez les légumineuses (Daley *et al.*, 2002), ou encore du gène *ATP6* chez les chlorophycées (Funes *et al.*, 2002), dont l'hydrophobicité de, respectivement, la première et les trois premières traverses membranaires de ces protéines a été diminuée, ce qui tend à appuyer cette hypothèse.

L'étude de la relocalisation des gènes mitochondriaux au noyau permettrait de déterminer quels facteurs ont influencé la rétention de gènes dans les génomes mitochondriaux actuels. Mis à part les études phylogénétiques, des études complémentaires peuvent être réalisées, notamment au travers d'expérimentations de relocalisation artificielle de gènes mitochondriaux.

4.4 La relocalisation artificielle de gènes mitochondriaux au noyau

L'étude de ces différentes questions peut être abordée par une relocalisation artificielle de gènes mitochondriaux au noyau. Il est, bien évidemment, impossible de résumer des millions d'années d'évolution en une seule expérimentation, un simple "déménagement forcé" d'une partie de l'information génétique d'un compartiment à l'autre de la cellule. Ce type d'étude sert plutôt à déterminer quels sont les facteurs qui auraient pu contribuer à cette relocalisation au cours de l'évolution.

La première étape dans une expérimentation est d'obtenir une souche dépourvue du gène mitochondrial à transférer, soit par sélection de mutants soit par manipulation directe du génome mitochondrial. L'étape suivante consiste à tester la complémentation de ces mutations avec différentes constructions du gène mitochondrial, exprimées à partir du génome nucléaire, et de tester la capacité de ces constructions à restaurer les oxydations phosphorylantes.

4.4.1 La levure *Saccharomyces cerevisiae*, un outil intéressant pour la relocalisation artificielle

Le type d'investigation décrit ci-dessus peut facilement être réalisé dans un organisme unicellulaire où les génomes mitochondrial et nucléaire peuvent être tous deux manipulés, comme la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae*.

C'est, jusqu'à l'heure actuelle, l'un des rares organismes avec lequel peut être réalisé de telles modifications. De plus, après quelques générations la levure a tendance à devenir homoplasmique, c'est-à-dire qu'elle s'homogénéise au niveau de la composition de ses molécules d'ADN

mitochondrial. Ces deux paramètres sont de puissants atouts pour les expérimentations de relocalisation. Ce modèle génétique est également utilisé depuis de nombreuses années pour toutes sortes d'étude de génétique, la manipulation de son génome nucléaire est simple et bien établie.

De plus, la levure, grâce à sa bonne capacité fermentaire, a la capacité de survivre à l'inactivation de son système de production d'énergie au travers des oxydations phosphorylantes. Parmi les levures, *Saccharomyces cerevisiae* a la possibilité de survivre à une perte complète (ρ^0) ou partielle (délétion d'au minimum 50 %, ρ^-) de son génome mitochondrial (Contamine et Picard, 2000). La mutation ρ^- équivaut, dans ses conséquences, à la perte totale d'ADN mitochondrial car elle entraîne systématiquement la perte d'au moins un ARN_t, interrompant définitivement l'expression des gènes n'ayant pas été perdus. Cette propriété de survie, qualifiée de "petite-positivité", est rare chez les levures. La grande majorité d'entre elles, comme par exemple *Schizosaccharomyces pombe*, ne peuvent survivre à cette perte du génome mitochondrial, et sont donc qualifiées de "petite-négatives" (Contamine et Picard, 2000).

Des mutations dans les sous-unités de l'ATP synthase entraînent souvent une production accrue de cellules ρ^- / ρ^0 (Contamine et Picard, 2000). Par exemple, des mutations des sous-unités de la tige centrale δ et γ peuvent amener à l'apparition de ce génotype dans 100 % de la population cellulaire (Contamine et Picard, 2000). Il a été montré que des mutations des sous-unités γ et δ entraînent en effet des fuites massives de protons via le canal à protons de l'ATP synthase, une situation létale pour la levure car il ne lui est plus possible de maintenir un potentiel électrique minimal de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne. La viabilité cellulaire peut être restaurée par la perte du génome mitochondrial, empêchant ainsi la production des sous-unités du canal à protons. Il devient alors possible pour la cellule d'énergiser la membrane mitochondriale interne au travers du translocateur ADP / ATP, l'échange d'ATP cytosolique (produit par la fermentation) contre de l'ADP intramitochondrial étant une réaction électrogénique du fait de la présence de quatre charges négatives sur l'ATP contre trois pour l'ADP.

Des mutations dans d'autres composantes de l'ATP synthase (les sous-unités Atp6p, Atp8p et Atp9p du F₀, et les sous-unités du pied périphérique) conduisent également, pour des raisons mal comprises, à une plus grande production de "petites" (Contamine et Picard, 2000). Au contraire des sous-unités δ et γ , cette production n'est pas absolue, indiquant que l'état ρ^+ est viable chez ces mutants. Des mutations dans les sous-unités α et β sont, quant à elles, incompatibles avec la mutation ρ^- / ρ^0 . Dans ce cas l'ADP – issu de l'hydrolyse de l'ATP par le F₁ – ne peut plus être généré en quantité suffisante dans la matrice mitochondriale pour permettre un import d'ATP issu de la glycolyse dans l'organite, empêchant ainsi l'énergisation de la membrane interne par le translocateur ATP/ADP.

4.4.2 Les expériences décrites dans la littérature

Des expérimentations de relocalisation artificielle ont été réalisées sur plusieurs gènes mitochondriaux chez la levure. Comme expliqué précédemment, il faut, si nécessaire, recoder le gène à relocaliser, et le munir d'une séquence génétique encodant une préséquence d'adressage mitochondrial (MTS).

4.4.2.1 La maturase mitochondriale Bi4p

Le gène mitochondrial *BI4* est situé dans le quatrième intron codant du gène *COB*. Cette maturase est chargée de l'excision des introns ai4 et bi4 des gènes *COB* et *COX1*. Banroques *et al.* (1986, 1987) sont parvenus à relocaliser avec succès le gène encodant la maturase Bi4p mitochondriale de levure. Ils ont pour cela utilisé la MTS de la protéine Atp9p de *Neurospora crassa*. Trois codons ont dû être modifiés sur ce gène pour une expression correcte à partir du

noyau. Cette expérimentation a montré que ces modifications seules suffisent pour une expression correcte du gène à partir du génome nucléaire, celui-ci complétant une mutation inactivant la maturase endogène.

4.4.2.2 Le gène *VAR1*, composant du mitoribosome

La sous-unité Var1p du mitoribosome est essentielle pour la synthèse des protéines encodées par le génome mitochondrial. Un mutant de cette sous-unité ne peut, par conséquent, plus réaliser les réactions d'oxydations phosphorylantes, et ne peut plus croître sur milieu respiratoire. À vrai dire, l'absence de Var1p conduit, comme la majorité des mutations inactivant la traduction mitochondriale, à une conversion totale de la population en cellules ρ^- / ρ^0 . Sanchirico *et al.* (1995) ont réussi à obtenir – moyennant la modifications de 39 codons – une expression fonctionnelle du gène *VAR1* depuis le noyau.

4.4.2.3 Le cytochrome b du complexe III

Claros *et al.* (1995, 1996) ont testé la relocalisation du gène mitochondrial du cytochrome b. Ce gène encode une sous-unité du complexe cytochrome bc1 (ou complexe III), essentiel pour les oxydations phosphorylantes. Le cytochrome b est une protéine à 8 traverses membranaires, très hydrophobe, et qui est connue comme étant toujours codée par l'ADN mitochondrial chez les eucaryotes.

Les expérimentations réalisées ont consisté à fusionner la MTS de la sous-unité Atp9p de *Neurospora crassa* avec la séquence protéique du cytochrome b, suivie de la protéine Bi4p. L'activité de la maturase dans la mitochondrie dépend alors de la bonne importation de la construction. Ils ont ainsi montré que jusqu'à quatre traverses consécutives du cytochrome b pouvaient être importées. Les tentatives d'import de constructions en contenant plus se sont révélées infructueuses. Des expériences similaires ont été réalisées sur des cellules de mammifères (Oca-Cossio *et al.*, 2003).

Les expériences réalisées sur la relocalisation du gène *COB* suggèrent que l'hydrophobicité de la protéine pourrait être la raison du maintien de ce gène dans les mitochondries.

4.4.2.4 La sous-unité Cox2p du complexe IV

Supekova *et al.* (2010) ont réussi à exprimer de manière fonctionnelle une construction du gène *COX2* à partir du noyau chez *Saccharomyces cerevisiae*. Une séquence génétique encodant la protéine native de la levure, fusionnée à la MTS de la sous-unité Atp9p de *Neurospora crassa* ou à la MTS de la protéine Oxa1p de levure, ne peut compléter la délétion de tout ou partie du gène mitochondrial chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Cependant, la mutation d'un résidu tryptophane en arginine (résidu 56 de la protéine native) rend fonctionnelle cette construction. Cruz-Torres *et al.* (2012) ont réalisé des analyses biochimiques sur des souches dépendantes de cette construction pour leur croissance respiratoire, et a montré que l'activité du complexe IV isolé contenant la sous-unité mutée n'était affecté que de 20 à 25 % par rapport à un complexe de type sauvage. De plus, il a été montré que l'accumulation du complexe ne représentait qu'environ 40 % du type sauvage, défaut provenant probablement d'un problème au niveau de l'import de la protéine, ralentissant la biogénèse du complexe cytochrome c oxydase. La biogénèse réduite du complexe, due à la relocalisation du gène *COX2*, est répercutée au niveau phénotypique par un ralentissement de la croissance des souches sur milieu respiratoire.

4.4.2.5 La sous-unité Atp8p de l'ATP synthase

La sous-unité Atp8p de l'ATP synthase est un élément essentiel du complexe ATP synthase. Il a été montré que la relocalisation artificielle du gène de cette protéine était possible chez la

levure *Saccharomyces cerevisiae*, moyennant une modification d'un codon et la fusion de la protéine avec la MTS de la protéine Atp9p de *Neurospora crassa* (Nagley *et al.*, 1988). Il a été montré *in vitro* et *in vivo* que la protéine modifiée était bien insérée dans le complexe ATP synthase (Law *et al.*, 1990) et permettait bien la complémentation d'un mutant *aap1* (un alias non fonctionnel du gène *ATP8*) (Roucou *et al.*, 1999). Cette relocalisation a été également réalisée avec succès dans les cellules de mammifères (Oca-Cossio *et al.*, 2003).

4.4.2.6 La sous-unité Atp6p de l'ATP synthase

La sous-unité Atp6p de l'ATP synthase est une protéine essentielle du fait de sa participation dans la formation du canal à protons. C'est également une protéine d'intérêt médical, des maladies mitochondriales pouvant être causées par des mutations dans son gène chez l'Homme. Une thérapie génique basée sur une expression nucléaire de ce gène permettrait éventuellement de compenser les mutations des copies mitochondriales de ce gène.

De nombreuses expérimentations ont été testées avec ce gène. Manfredi *et al.* (2002) ont expérimenté la relocalisation de ce gène dans des cellules humaines, avec différentes préséquences (de l'homologue humain d'*ATP9*, *ATP5G1* ; de la sous-unité *COX8*). Ojaimi *et al.* (2002) ont effectué des expériences similaires en utilisant la préséquence de la protéine Atp6p de *Chlamydomonas reinhardtii*, dont le gène est naturellement nucléaire. Dans ces deux cas, l'import de la protéine reste faible et peu efficace. Cependant, ces études ont été mises en doute par Bokori-Brown et Holt (2006), montrant que les contrôles réalisés étaient insuffisants, invalidant ainsi ces résultats. Bonnet *et al.* (2007) et Kaltimbacher *et al.* (2006) ont présenté des résultats plus prometteurs avec un import plus efficace de la protéine Atp6p lorsque l'ARN_m de l'encodant est associé au 3' UTR du gène *SOD2*, dont l'ARN_m serait dirigé à la surface de la membrane mitochondriale, où il sera traduit.

Plus récemment, Figueroa-Martínez *et al.* (2011) ont expérimenté des constructions chimériques du gène *ATP6* sur des cellules humaines portant une mutation NARP. Ces constructions, fusionnées à la MTS de *Chlamydomonas reinhardtii*, portaient trois mutations dans la troisième traverse trans-membranaire de la protéine, entraînant une diminution de l'hydrophobicité de ces traverses. Ces expériences n'ont toutefois pas permis de rétablir les réactions des OXPHOS, impactées par la mutation NARP. Aucune protéine Atp6p chimérique n'a pu être détectée dans les complexes ATP synthases, indiquant une non-incorporation de ces chimères.

Enfin, Dunn et Pinkert (2012) ont expérimenté la relocalisation du gène *ATP6* fusionné avec la préséquence du gène *COX8* dans des lignées de souris. Deux constructions ont été testées, l'une sauvage, l'autre portant une mutation L156R (mutation NARP). Une étude phénotypique et biochimique a été réalisée. Les études phénotypiques ont fourni des résultats ambigus, notant parfois des effets importants sur les capacités motrices, tandis que les données biochimiques ne diffèrent pas du contrôle. Les auteurs émettent l'hypothèse d'un faible effet sur les mitochondries des constructions utilisées, qui ne serait pas détectable en analyses biochimiques sur les souris adultes mais aurait des effets délétères lors du stade embryonnaire. Des analyses plus poussées sont sans doute nécessaires sur ces lignées de souris.

A l'heure actuelle, aucune tentative de relocalisation expérimentale du gène *ATP6* décrite n'a donc été formellement réussie. Des études supplémentaires sont à réaliser sur ce gène encodant une protéine hydrophobe essentielle pour l'ATP synthase, pourtant exprimée naturellement à partir du noyau chez des algues vertes comme *Chlamydomonas reinhardtii*.

4.4.2.7 La sous-unité Atp9p de l'ATP synthase

Diverses expérimentations de relocalisation ont également été testées sur le gène *ATP9*. Un premier modèle utilisé pour la relocalisation de ce gène fut *Arabidopsis thaliana*. Hernould *et al.* (1992, 1993); Zabaleta *et al.* (1996); Busi *et al.* (2006) ont montré que l'ARN_m du gène *ATP9* était édité chez cet organisme, un phénomène bien connu chez les plantes en général. L'expression d'une version non éditée de cet ARN (fusionné à une séquence codant la MTS du gène *COX4*) dans le cytoplasme de *Arabidopsis thaliana* et *Nicotiana tabacum* a entraîné l'apparition d'un phénotype dit de stérilité mâle cytoplasmique. La répression de l'expression de cet ARN_m, ou l'expression nucléaire d'une version éditée du gène *ATP9* supprime ce phénotype. L'hypothèse est que la protéine synthétisée à partir de l'ARN non édité est insérée dans le complexe et va diminuer son efficacité, impactant l'état énergétique des grains de pollen et provoquant une stérilité de ces gamètes mâles.

La majeure partie des expérimentations de relocalisation du gène *ATP9* réalisées ont été effectuées sur la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Farrell *et al.* (1988) ont tout d'abord expérimenté l'import *in vitro* de cette protéine. Ils ont ainsi montré qu'une construction comprenant la MTS de la sous-unité Atp9p de *Neurospora crassa* fusionnée à la séquence protéique de la sous-unité Atp9p de *Saccharomyces cerevisiae* pouvait être importée et maturée dans des mitochondries isolées de levure. Law *et al.* (1988) ont montré que, malgré les résultats obtenus *in vitro*, les constructions exprimées à partir du noyau de la levure ne permettaient pas la complémentation de différentes mutations situées sur la version mitochondriale d'*ATP9*. Ils ont également montré une absence d'import de la protéine synthétisée dans le cytoplasme de ces souches. Les conditions physiologiques n'ont donc pas permis de reproduire les résultats obtenus *in vitro*.

Aucune autre expérimentation *in vivo* de relocalisation fonctionnelle du gène *ATP9* n'a été décrite dans la littérature jusqu'à présent. Ce fut l'un des thèmes développés au laboratoire et démarré au cours de la thèse de Mailis BIENTENHADER.

J'ai, au cours de mes trois années de thèse, continué les expérimentations entamées au laboratoire sur la relocalisation du gène *ATP9* chez *Saccharomyces cerevisiae* dans l'optique d'étudier la relocalisation des gènes mitochondriaux en général, ainsi que les raisons de leur maintien dans la mitochondrie au cours de l'évolution du règne eucaryote.

Objectifs

Comme je l'ai expliqué dans les différents chapitres précédents, le maintien du génome mitochondrial au cours de l'évolution est une question intrigante. En effet, de nombreux gènes ont été relocalisés depuis l'endosymbiose sérielle, mais une poignée reste encore dans la mitochondrie. Cet ensemble de gènes est caractérisé par le fait qu'ils encodent des sous-unités impliquées dans la génération d'énergie au travers des oxydations phosphorylantes. Le maintien de ces gènes au sein des mitochondries peut être expliqué par différentes hypothèses.

Il est vrai que l'évolution est toujours en cours, que nos observations des différents organismes vivants actuels et de leurs caractéristiques sont biaisées par l'aspect temporel. L'évolution agit en effet sur des intervalles de temps beaucoup plus grands que ceux que nous avons passé à l'étudier. Il est donc possible que le transfert de l'intégralité des gènes mitochondriaux soit un processus inachevé, toujours en cours. Une seconde hypothèse énonce que la nature des produits de ces gènes bloquerait leur transfert, car leur expression en dehors de la mitochondrie serait très difficile à mettre en place et pourrait avoir des conséquences délétères sur la cellule. Enfin une dernière hypothèse pencherait pour un maintien préférentiel des gènes dans la mitochondrie, qui faciliterait une réaction rapide de la cellule face à des stress mitochondriaux comme la production de ROS via des régulations génétiques plus faciles à mettre en place dans cet organite que depuis le noyau.

Pour aborder ces questions, nous avons choisi d'utiliser le modèle génétique *Saccharomyces cerevisiae*. La levure de boulanger présente des avantages dans des études de relocalisation artificielle de gènes mitochondriaux au noyau. Sa survie face à l'inactivation de son système mitochondrial de production d'énergie et la possibilité technique de transformer ses génomes mitochondrial et nucléaire permettent d'expérimenter des relocalisations artificielles de gènes, à savoir l'inactivation d'un gène mitochondrial suivie de l'expression d'une copie de ce gène à partir du génome nucléaire. Différentes expérimentations de relocalisation artificielle ont déjà été testées sur des gènes mitochondriaux de cet organisme, avec des succès variables.

Mon travail a visé à tester l'expression allotopique du gène *ATP9*. Celui-ci encode une petite protéine, la sous-unité Atp9p ou sous-unité c, constituée de deux traverses trans-membranaires et présente en multiples copies formant un anneau, un élément essentiel du canal à protons de l'ATP synthase. Si la sous-unité Atp9p ne possède que deux traverses membranaires, il s'agit d'une protéine extrêmement hydrophobe, classifiée comme un protéolipide car elle peut aisément être extraite avec des solvants organiques.

Ce gène est intéressant dans le cadre de l'étude présentée dans ce rapport car, bien que majoritairement mitochondrial chez les eucaryotes comme *Saccharomyces cerevisiae*, il est retrouvé dans le génome nucléaire de certaines espèces, chez la majorité des métazoaires, dans le groupe d'algues vertes particulier des chlorophycées comme *Chlamydomonas reinhardtii*, et les champignons filamenteux ascomycètes tel que *Podospira anserina* (et parfois simultanément dans les deux génomes comme chez *Neurospora crassa*). Il n'existe donc pas de barrière insurmontable à la relocalisation de ce gène vers le génome nucléaire.

Cependant, est-il aisé d'exprimer la sous-unité Atp9p à partir du noyau et quelle est la raison de cette forte diversité de localisations génomiques ? Est-elle simplement due au hasard, ou est-elle le reflet de forces exercées sur l'évolution des eucaryotes ?

J'ai donc réalisé des expérimentations de relocalisation artificielle du gène *ATP9* chez la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae*. L'expression d'une version recodée du gène *ATP9* de *Saccharomyces cerevisiae* à partir du génome nucléaire n'a pas permis de compléter la délétion du gène mitochondrial chez cet organisme.

Nous avons ensuite décidé de tester des gènes *ATP9* naturellement nucléaires, les deux isoformes de *Podospora anserina*. Ces isoformes complètent tous deux la délétion du gène mitochondrial chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Toutefois, cette complémentation n'est que partielle, la vitesse de croissance et la caractérisation biochimique dénote des valeurs inférieures à celles d'une souche sauvage. De plus, les cellules exprimant ces gènes dans ce type de milieu ont une morphologie aberrante, impactant probablement la division cellulaire et donc la vitesse de prolifération.

Ces observations indiquent que de nombreuses adaptations sont nécessaires à la relocalisation du gène *ATP9* et à son optimisation. J'ai, au cours de ce travail, cherché à définir quelles sont ces adaptations, notamment par la recherche de mutations améliorant les propriétés de cellules de levure exprimant la sous-unité Atp9p depuis le noyau. J'ai déterminé que l'hydrophobicité de la sous-unité Atp9p doit être diminuée pour pouvoir être importée dans la mitochondrie depuis le cytosol.

D'autres adaptations, par exemple dans la m-AAA protéase mitochondriale ou dans la voie de transport des protéines vers la vacuole, sont nécessaires pour accroître l'efficacité du transport de la sous-unité Atp9p dans la mitochondrie et limiter sa dégradation dans l'organite après son transport. Des adaptations ont également été trouvées dans un système impliqué dans la coordination de l'expression des gènes nucléaires et mitochondriaux nécessaires à la fonction respiratoire.

Il ressort de ces différents travaux que si la sous-unité Atp9p peut-être exprimée depuis le noyau chez la levure, ce transfert génétique est complexe à réaliser et a donc peu de chances d'être maintenu par la sélection naturelle, à moins que le transfert du gène *ATP9* dans le noyau ne puisse conférer quelque avantage à l'organisme.

Nous avons testé cette hypothèse chez *Podospora anserina*. Nous avons montré que, chez cet organisme, la relocalisation au noyau du gène *ATP9* a été exploitée pour la mise en place de régulations permettant de moduler la production d'ATP synthases au cours du cycle de vie de ce champignon. De même, chez l'Homme, chez qui le gène *ATP9* a lui aussi été relocalisé au noyau au cours de l'évolution, il a été montré que la sous-unité Atp9p fait également l'objet de régulations de son expression qui permettent de moduler la production d'ATP synthases dans les cellules et tissus.

L'ensemble de ces résultats nous amène à introduire une nouvelle hypothèse selon laquelle les variations de contenu en gènes des génomes mitochondriaux sont influencées non seulement par la structure des protéines encodées (hydrophobicité), mais également par le mode de vie de l'organisme.

Deuxième partie

Matériel et méthodes

Chapitre 1

Souches et milieux de culture

Sommaire

1.1	Liste des souches, milieux de culture et protocole de conservation de souches de <i>Podospora anserina</i>	52
1.2	Souches de levures	52
1.3	Milieux de culture	67
1.3.1	Milieux de culture bactériens	67
1.3.2	Milieux de culture de levures	67
1.4	Conditions de culture et de conservation des souches	67

1.1 Liste des souches, milieux de culture et protocole de conservation de souches de *Podospora anserina*

La description détaillée de ces protocoles peut être retrouvée dans l'article publié dans *Molecular Biology and Evolution* inclus à la suite du chapitre 3 page 181 en partie III.

1.2 Souches de levures

Les souches utilisées dans cette étude sont reportées dans la table II.1.1 page 66

Nom	Alias	Génotype nucléaire	Plasmide	Insert	Ori.	Génotype mitochondrial	Référence
MR6	WT	<i>MATa; ade2-1; his3-11,15; leu2-3,112; trp1-1; ura3-1; Δarg8::HIS3</i>	∅	∅	∅	ρ^+ (FY1679)	Rak et al. (2007)
MR6/60		fond MR6	∅	∅	∅	ρ^0	Rak et al. (2007)
RKY26	$\Delta atp9::ARG8^m$	fond MR6	∅	∅	∅	ρ^+ $\Delta atp9::ARG8^m$	Bietenhader et al. (2012)
CS1	$\Delta cox2::ARG8^m$	fond MR6	∅	∅	∅	ρ^+ $\Delta cox2::ARG8^m$	C. SAUVANET
MR10	$\Delta atp6::ARG8^m$	fond MR6	∅	∅	∅	ρ^+ $\Delta atp6::ARG8^m$	Rak et al. (2007)
D273-10b α /60	Testrice ρ^0 WT	<i>MATα; ade2-101; met6</i>	∅	∅	∅	ρ^0	Foury et Tzagloff (1976)
DFS160 α /60		<i>MATα; ade2-101; leu2-3,112; ura3-52; Δarg8::URA3; kar1-1</i>	∅	∅	∅	ρ^0	Steele et al. (1996)
DFS160a/60		<i>MATa; ade2-101; leu2-3,112; ura3-52; Δarg8::URA3; kar1-1</i>	∅	∅	∅	ρ^0	Steele et al. (1996)
HMD21		fond DFS160 α /60	∅	∅	∅	ρ^+ (D273-10b α)	Bonnefoy et al. (2001)
KL14-4a/60		<i>MATa; his4; trp2</i>	∅	∅	∅	ρ^0	Wolf et al. (1973)
MB2	ρ synthétique <i>ATP9</i>	fond MR6 α	pJM2- ATP9	<i>ATP9</i> (Mito.)	Mito.	ρ <i>ATP9</i>	M. BIETENHADER
MB9		fond DFS160 α /60	∅	∅	∅	ρ^+ $\Delta atp9::ARG8^m$	M. BIETENHADER
NB371		fond D273-10b α /60	∅	∅	∅	ρ^+ $\Delta cox3::ARG8^m$	N. BONNEFOY
SDC30	ρ synthétique <i>ATP6</i>	fond DFS160 α /60	pJM2- ATP6	<i>ATP6</i> (Mito.)	Mito.	ρ <i>ATP6</i>	Rak et al. (2007)
YER017C	$\Delta yta10::KANMX4$ EUROSCARF	<i>MATa; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; Δyta10::KANMX4</i>	∅	∅	∅	N/D	EUROSCARF

Nom	Alias	Génotype nucléaire	Plasmide	Insert	Ori.	Génotype mitochondrial	Référence
YGL25W	$\Delta gus1 :: KANMX4$ EUROSCARF	<i>MATa / MATα ; his3ΔI / his3ΔI ; leu2$\Delta 0$ / leu2$\Delta 0$; lys2$\Delta 0$ / LYS2 ; met15$\Delta 0$ / met15$\Delta 0$; ura3$\Delta 0$ / ura3$\Delta 0$; $\Delta gus1 :: KANMX4 / GUS1$</i>	\emptyset	\emptyset	\emptyset	N / D	EUROSCARF
YPR024W	$\Delta yme1 :: KANMX4$ EUROSCARF	<i>MATa ; his3ΔI ; leu2$\Delta 0$; met15$\Delta 0$; ura3$\Delta 0$; $\Delta yme1 :: KANMX4$</i>	\emptyset	\emptyset	\emptyset	N / D	EUROSCARF
AMY5	$\Delta atp9 :: ARG8^m + yATP9-Nuc$	fond MR6	pAM11	<i>yATP9-Nuc</i>	2 μ	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY6	$\Delta atp9 :: ARG8^m + ATP9-Hyb / SUP0$	fond MR6	pAM12	<i>ATP9-Hyb</i>	2 μ	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY7	$\Delta atp9 :: ARG8^m + PaATP9-5 (CEN)$	fond MR6	pAM16	<i>PaATP9-5 (CEN)</i>	CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY8	$\Delta atp9 :: ARG8^m + PaATP9-7 (CEN)$	fond MR6	pAM17	<i>PaATP9-7</i>	CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY10	$\Delta atp9 :: ARG8^m + PaATP9-5 (2\mu)$	fond MR6	pAM19	<i>PaATP9-5 (2μ)</i>	2 μ	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY11	$\Delta atp9 :: ARG8^m + PaATP9-7 (2\mu)$	fond MR6	pAM20	<i>PaATP9-7 (2μ)</i>	2 μ	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY42	SUPi	<i>MATa ; ade2-1 ; his3-11,15 ; leu2-3,112 ; trp1-1 ; ura3-1 ; $\Delta arg8 :: HIS3 ; sas1-F97L ; gpd1-T88N ; cst6-G276C ; gar1-G185C ; CAN1 V 32675 A>G ; COX2 XVII 73448 T>C + 7451 T>C + 74225 T>A + 74327 T>C + 74414 A>G$</i>	pAM12	<i>ATP9-Hyb</i>	2 μ	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude

Nom	Alias	Génotype nucléaire	Plasmide	Insert	Ori.	Génotype mitochondrial	Référence
AMY47		fond AMY79	pAM16	PaATP9-5 (CEN)	CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^{gm}$	Cette étude
AMY48		fond AMY80	pAM16	PaATP9-5 (CEN)	CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^{gm}$	Cette étude
AMY49	fond SUP3 + PaATP9-5 (CEN)	fond AMY81	pAM16	PaATP9-5 (CEN)	CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^{gm}$	Cette étude
AMY53	fond SUP1	fond AMY79	∅	∅	∅	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^{gm}$	Cette étude
AMY54	fond SUP2	fond AMY80	∅	∅	∅	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^{gm}$	Cette étude
AMY55	fond SUP3	fond AMY81	∅	∅	∅	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^{gm}$	Cette étude
AMY58		fond MR6	pAMR692	SUP3ATP9-Hyb	2 μ	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^{gm}$	Cette étude
AMY62		fond AMY79	pAM12	ATP9-Hyb	2 μ	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^{gm}$	Cette étude
AMY63		fond AMY79	pAM20	PaATP9-7 (2 μ)	2 μ	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^{gm}$	Cette étude
AMY65		fond AMY79	pAM17	PaATP9-7 (CEN)	CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^{gm}$	Cette étude
AMY66		fond AMY79	pAM11	yATP9-Nuc	2 μ	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^{gm}$	Cette étude
AMY68		fond AMY80	pAM12	ATP9-Hyb	2 μ	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^{gm}$	Cette étude
AMY69		fond AMY80	pAM20	PaATP9-7 (2 μ)	2 μ	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^{gm}$	Cette étude
AMY71		fond AMY80	pAM17	PaATP9-7 (CEN)	CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^{gm}$	Cette étude

Nom	Alias	Génotype nucléaire	Plasmide	Insert	Ori.	Génotype mitochondrial	Référence
AMY72		fond AMY80	pAM11	<i>yATP9-Nuc</i>	2μ	ρ ⁺ Δ <i>atp9</i> :: <i>ARG8^{gn}</i>	Cette étude
AMY74		fond AMY81	pAM12	<i>ATP9-Hyb</i>	2μ	ρ ⁺ Δ <i>atp9</i> :: <i>ARG8^{gn}</i>	Cette étude
AMY75	fond SUP3 + Pa <i>ATP9-7</i> (2μ)	fond AMY81	pAM20	Pa <i>ATP9-7</i> (2μ)	2μ	ρ ⁺ Δ <i>atp9</i> :: <i>ARG8^{gn}</i>	Cette étude
AMY77	fond SUP3 + Pa <i>ATP9-7</i> (CEN)	fond AMY81	pAM17	Pa <i>ATP9-7</i> (CEN)	CEN	ρ ⁺ Δ <i>atp9</i> :: <i>ARG8^{gn}</i>	Cette étude
AMY78	fond SUP3 + <i>yATP9-Nuc</i>	fond AMY81	pAM11	<i>yATP9-Nuc</i>	2μ	ρ ⁺ Δ <i>atp9</i> :: <i>ARG8^{gn}</i>	Cette étude
AMY79	SUP1	<i>MATa</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>ura3-1</i> ; Δ <i>arg8</i> :: <i>HIS3</i> ; <i>sas1-F97L</i> ; <i>gpd1-T88N</i> ; <i>cst6-G276C</i> ; <i>pmt7-V61L</i> ; <i>gus1-V343I</i> ; <i>fas1-RI74S</i> ; <i>yll66w-b-F46S</i> ; <i>yta12-V563F</i>	pAM12	<i>ATP9-Hyb</i>	2μ	ρ ⁺ Δ <i>atp9</i> :: <i>ARG8^{gn}</i>	Cette étude
AMY80	SUP2	<i>MATa</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>ura3-1</i> ; Δ <i>arg8</i> :: <i>HIS3</i> ; <i>sas1-F97L</i> ; <i>gpd1-T88N</i> ; <i>cst6-G276C</i> ; <i>ARS413 IV 32977C>T</i> ; <i>TSC11</i> <i>V 346422A>G</i> ; <i>phb1-T143S</i> ; <i>rap1-M763V</i> ; <i>CAN1 V 32675</i> <i>A>G</i> ; <i>COX2 XVII 73448 T>C</i> + <i>7451 T>C</i> + <i>74225 T>A</i> + <i>74327 T>C</i> + <i>74414 A>G</i>	pAM12	<i>ATP9-Hyb</i>	2μ	ρ ⁺ Δ <i>atp9</i> :: <i>ARG8^{gn}</i>	Cette étude

Nom	Alias	Génotype nucléaire	Plasmide	Insert	Ori.	Génotype mitochondrial	Référence
AMY81	SUP3	<i>MA1a</i> ; <i>ade2-1</i> ; <i>his3-11,15</i> ; <i>leu2-3,112</i> ; <i>trp1-1</i> ; <i>ura3-1</i> ; Δ <i>arg8</i> :: <i>HIS3</i> ; <i>sas1-F97L</i> ; <i>gpd1-T88N</i> ; <i>cst6-G276C</i> ; <i>ent5-D297E</i> ; <i>yta10-G317C</i> ; <i>GLN3 V 23262T</i> > <i>C</i> ; <i>TRF5 XIV</i> <i>66555T</i> > <i>C</i> ; <i>prt1-E725A</i> ; <i>CAN1</i> <i>V 32675 A</i> > <i>G</i> ; <i>COX2 XVII</i> <i>73448 T</i> > <i>C</i> + <i>7451 T</i> > <i>C</i> + <i>74225 T</i> > <i>A</i> + <i>74327 T</i> > <i>C</i> + <i>74414 A</i> > <i>G</i>	pAM12	<i>ATP9-Hyb</i>	2 μ	ρ^+ Δ <i>atp9</i> :: <i>ARG8^m</i>	Cette étude
AMY93		fond AMY79	pAM19	Pa <i>ATP9-5</i> (2 μ)	2 μ	ρ^+ Δ <i>atp9</i> :: <i>ARG8^m</i>	Cette étude
AMY96		fond AMY80	pAM19	Pa <i>ATP9-5</i> (2 μ)	2 μ	ρ^+ Δ <i>atp9</i> :: <i>ARG8^m</i>	Cette étude
AMY99	fond SUP3 + Pa <i>ATP9-5</i> (2 μ)	fond AMY81	pAM19	Pa <i>ATP9-5</i> (2 μ)	2 μ	ρ^+ Δ <i>atp9</i> :: <i>ARG8^m</i>	Cette étude
AMY103	fond SUP1 ρ^- / ρ^0	fond AMY79	\emptyset	\emptyset	\emptyset	ρ^- / ρ^0	Cette étude
AMY104	fond SUP2 ρ^- / ρ^0	fond AMY80	\emptyset	\emptyset	\emptyset	ρ^- / ρ^0	Cette étude
AMY105	fond SUP3 ρ^- / ρ^0	fond AMY81	\emptyset	\emptyset	\emptyset	ρ^- / ρ^0	Cette étude
AMY108	fond SUP3 ρ^0 + WT ADNmt	fond AMY81	\emptyset	\emptyset	\emptyset	ρ^+ (FY1679)	Cette étude
AMY119	SUPi Δ <i>yta10</i> :: <i>KANMX4</i>	fond AMY42 ; Δ <i>yta10</i> :: <i>KANMX4</i>	pAM12	<i>ATP9-Hyb</i>	2 μ	ρ^+ Δ <i>atp9</i> :: <i>ARG8^m</i>	Cette étude

Nom	Alias	Génotype nucléaire	Plasmide	Insert	Ori.	Génotype mitochondrial	Référence
AMY123		fond DFS160 α /60	Ø	Ø	Ø	ρ^+ $\Delta atp6 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY125		fond DFS160 α /60	Ø	Ø	Ø	ρ pJM2-ATP9	Cette étude
AMY128	$\Delta atp9 \Delta yme1$	fond MR6; $\Delta yme1 :: KANMX4$	Ø	Ø	Ø	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY129	$\Delta atp9 \Delta yme1 + yATP9-Nuc$	fond MR6; $\Delta yme1 :: KANMX4$	pAM11	yATP9-Nuc	2 μ	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY133	fond SUP1 $\Delta atp6 :: ARG8^m$	fond AMY79	Ø	Ø	Ø	ρ^+ $\Delta atp6 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY134	fond SUP2 $\Delta atp6 :: ARG8^m$	fond AMY80	Ø	Ø	Ø	ρ^+ $\Delta atp6 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY135	fond SUP3 $\Delta atp6 :: ARG8^m$	fond AMY81	Ø	Ø	Ø	ρ^+ $\Delta atp6 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY137	$\Delta yta10 :: KANMX4$	fond MR6; $\Delta yta10 :: KANMX4$	Ø	Ø	Ø	ρ^+ (FY1679)	Cette étude
AMY141		fond DFS160 α /60	Ø	Ø	Ø	ρ^+ $\Delta cox3 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY146		fond AMY79	Ø	Ø	Ø	ρ^+ $\Delta cox2 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY147		fond AMY80	Ø	Ø	Ø	ρ^+ $\Delta cox2 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY148	fond SUP3 $\Delta cox2 :: ARG8^m$	fond AMY81	Ø	Ø	Ø	ρ^+ $\Delta cox2 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY151	$\Delta atp9 \Delta yme1 +$ plasmide vide	fond MR6; $\Delta yme1 :: KANMX4$	pCM190	Ø	2 μ	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY152	$\Delta cox3 :: ARG8^m$	fond MR6	Ø	Ø	Ø	ρ^+ $\Delta cox3 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY153	fond SUP1 $\Delta cox3 :: ARG8^m$	fond AMY79	Ø	Ø	Ø	ρ^+ $\Delta cox3 :: ARG8^m$	Cette étude

Nom	Alias	Génotype nucléaire	Plasmide	Insert	Ori.	Génotype mitochondrial	Référence
AMY154	fond SUP2 $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$	fond AMY80	∅	∅	∅	ρ^+ $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$	Cette étude
AMY155	fond SUP3 $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$	fond AMY81	∅	∅	∅	ρ^+ $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$	Cette étude
AMY158	$\Delta\text{atp6} \Delta\text{yme1} +$ $\text{ScOXAI}^{\text{MTS}}_-$ ScATP6-Nuc	fond MR6; $\Delta\text{yme1}::\text{KANMX4}$	pAM28	$\text{ScOXAI}^{\text{MTS}}_-$ ScATP6-Nuc	CEN	ρ^+ $\Delta\text{atp6}::\text{ARG8}^m$	Cette étude
AMY162	fond WT + ADNmt D273-10bα WT	fond MR6	∅	∅	∅	ρ^+ (D273-10bα)	Cette étude
AMY163		fond AMY79	∅	∅	∅	ρ^+ (D273-10bα)	Cette étude
AMY164		fond AMY80	∅	∅	∅	ρ^+ (D273-10bα)	Cette étude
AMY165		fond AMY81	∅	∅	∅	ρ^+ (D273-10bα)	Cette étude
AMY166	fond SUP3 $\Delta\text{cox2}::\text{ARG8}^m +$ plasmide vide	fond AMY81	YEp352	∅	2μ	ρ^+ $\Delta\text{cox2}::\text{ARG8}^m$	Cette étude
AMY167	fond SUP3 $\Delta\text{cox2}::\text{ARG8}^m +$ COX2-Nuc	fond AMY81	YEp352- COX2	COX2-Nuc	2μ	ρ^+ $\Delta\text{cox2}::\text{ARG8}^m$	Cette étude
AMY175		fond MR6; $\Delta\text{yta10}::\text{KANMX4}$	pAM16	PaATP9-5 (CEN)	CEN	ρ^+ $\Delta\text{atp9}::\text{ARG8}^m$	Cette étude
AMY177	$\Delta\text{atp9} \Delta\text{yta10}$	fond MR6; $\Delta\text{yta10}::\text{KANMX4}$	pCM189	∅	CEN	ρ^+ $\Delta\text{atp9}::\text{ARG8}^m$	Cette étude
AMY179	$\Delta\text{yta10}::\text{KANMX4}$ + plasmide vide	fond MR6; $\Delta\text{yta10}::\text{KANMX4}$	YCplac22	∅	CEN	ρ^+ (FY1679)	Cette étude

Nom	Alias	Génotype nucléaire	Plasmide	Insert	Ori.	Génotype mitochondrial	Référence
AMY180	$\Delta yta10 :: KANMX4$ + <i>YTA10-Wt</i>	fond MR6; $\Delta yta10 :: KANMX4$	YCplac22- YTA10wt	<i>YTA10-Wt</i>	CEN	ρ^+ (FY1679)	Cette étude
AMY181	$\Delta yta10 :: KANMX4$ + <i>yta10-Sup</i>	fond MR6; $\Delta yta10 :: KANMX4$	YCplac22- YTA10sup	<i>yta10-Sup</i>	CEN	ρ^+ (FY1679)	Cette étude
AMY186		fond MR6	pCM189 + YCplac22- YTA10wt	\emptyset + <i>YTA10-Wt</i>	CEN + CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY187		fond MR6	YCplac22 + pCM189	\emptyset	CEN + CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY193	$\Delta atp9 \Delta yta10$ + <i>ATP9-Hyb</i> + plasmide vide	fond MR6; $\Delta yta10 :: KANMX4$	pAM12 + YCplac22	<i>ATP9-Hyb</i> + \emptyset	2 μ + CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY195	$\Delta atp9 \Delta yta10$ + PaATP9-5 + <i>YTA10-Wt</i>	fond MR6; $\Delta yta10 :: KANMX4$	pAM16 + YCplac22- YTA10wt	PaATP9-5 (CEN) + <i>YTA10-Wt</i>	CEN + CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY198	$\Delta atp9 \Delta yta10$ + <i>ATP9-Hyb</i> + <i>YTA10-Wt</i>	fond MR6; $\Delta yta10 :: KANMX4$	pAM12 + YCplac22- YTA10wt	<i>ATP9-Hyb</i> + <i>YTA10-Wt</i>	2 μ + CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY200	$\Delta atp9 \Delta yta10$ + PaATP9-5 + <i>yta10-Sup</i>	fond MR6; $\Delta yta10 :: KANMX4$	pAM16 + pAM24	PaATP9-5 (CEN) + <i>yta10-Sup</i>	CEN + CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY203	$\Delta atp9 \Delta yta10$ + <i>ATP9-Hyb</i> + <i>yta10-Sup</i>	fond MR6; $\Delta yta10 :: KANMX4$	pAM12 + pAM24	<i>ATP9-Hyb</i> + <i>yta10-Sup</i>	2 μ + CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY210	$\Delta cox2 :: ARG8^m$ + plasmide vide	fond MR6	YEp352	\emptyset	2 μ	ρ^+ $\Delta cox2 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY211	$\Delta cox2 :: ARG8^m$ + <i>COX2-Nuc</i>	fond MR6	YEp352- COX2	<i>COX2-Nuc</i>	2 μ	ρ^+ $\Delta cox2 :: ARG8^m$	Cette étude

Nom	Alias	Génotype nucléaire	Plasmide	Insert	Ori.	Génotype mitochondrial	Référence
AMY212	$\Delta cox2 :: ARG8^m + COX2-Nuc W56R$	fond MR6	YEp352-COX2 W56R	COX2-Nuc W56R	2 μ	ρ^+ $\Delta cox2 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY215		fond AMY79	YEp352	\emptyset	2 μ	ρ^+ $\Delta cox2 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY216		fond AMY79	YEp352-COX2	COX2-Nuc	2 μ	ρ^+ $\Delta cox2 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY217		fond AMY79	YEp352-COX2 W56R	COX2-Nuc W56R	2 μ	ρ^+ $\Delta cox2 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY220		fond AMY80	YEp352	\emptyset	2 μ	ρ^+ $\Delta cox2 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY222		fond AMY80	YEp352-COX2	COX2-Nuc	2 μ	ρ^+ $\Delta cox2 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY223		fond AMY80	YEp352-COX2 W56R	COX2-Nuc W56R	2 μ	ρ^+ $\Delta cox2 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY227	SUPi $\Delta yta10 :: KANMX4$	fond AMY42; $\Delta yta10 :: KANMX4$	pAM12	ATP9-Hyb	2 μ	ρ^- / ρ^0	Cette étude
AMY229	fond SUP3 $\Delta cox2 :: ARG8^m + COX2-Nuc W56R$	fond AMY81	YEp352-COX2 W56R	COX2-Nuc W56R	2 μ	ρ^+ $\Delta cox2 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY230	fond SUPi $\Delta yta10 :: KANMX4$	fond AMY42; $\Delta yta10 :: KANMX4$	\emptyset	\emptyset	\emptyset	ρ^- / ρ^0	Cette étude
AMY235	SUPi $\Delta yta10 :: KANMX4 +$ plasmide vide	fond AMY42; $\Delta yta10 :: KANMX4$	pAM12 + YCplac22	ATP9-Hyb + \emptyset	2 μ + CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY236	SUPi $\Delta yta10 :: KANMX4 + YTA10-Wt$	fond AMY42; $\Delta yta10 :: KANMX4$	pAM12 + YCplac22-YTA10wt	ATP9-Hyb + YTA10-Wt	2 μ + CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude

Nom	Alias	Génotype nucléaire	Plasmide	Insert	Ori.	Génotype mitochondrial	Référence
AMY237	SUPi $\Delta yta10 :: KANMX4$ + <i>yta10-Sup</i>	fond AMY42; $\Delta yta10 :: KANMX4$	pAM12 + pAM24	<i>ATP9-Hyb</i> + <i>yta10-Sup</i>	2 μ + CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY240	$\Delta atp6 :: ARG8^m$ + <i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>ATP6-Hyb</i>	fond MR6	pAM26	<i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>ATP6-Hyb</i>	CEN	ρ^+ $\Delta atp6 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY241	$\Delta atp6 :: ARG8^m$ + <i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>CrATP6</i>	fond MR6	pAM27	<i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>CrATP6</i>	CEN	ρ^+ $\Delta atp6 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY242	$\Delta atp6 :: ARG8^m$ + <i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>ScATP6-Nuc</i>	fond MR6	pAM28	<i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>ScATP6-Nuc</i>	CEN	ρ^+ $\Delta atp6 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY243	fond SUP1 $\Delta atp6 :: ARG8^m$ + <i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>ATP6-Hyb</i>	fond AMY79	pAM26	<i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>ATP6-Hyb</i>	CEN	ρ^+ $\Delta atp6 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY244	fond SUP1 $\Delta atp6 :: ARG8^m$ + <i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>CrATP6</i>	fond AMY79	pAM27	<i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>CrATP6</i>	CEN	ρ^+ $\Delta atp6 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY245	fond SUP1 $\Delta atp6 :: ARG8^m$ + <i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>ScATP6-Nuc</i>	fond AMY79	pAM28	<i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>ScATP6-Nuc</i>	CEN	ρ^+ $\Delta atp6 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY246	fond SUP2 $\Delta atp6 :: ARG8^m$ + <i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>ATP6-Hyb</i>	fond AMY80	pAM26	<i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>ATP6-Hyb</i>	CEN	ρ^+ $\Delta atp6 :: ARG8^m$	Cette étude

Nom	Alias	Génotype nucléaire	Plasmide	Insert	Ori.	Génotype mitochondrial	Référence
AMY247	fond SUP2 $\Delta atp6 :: ARG8^m +$ ScOXAI ^{MTS} - CrATP6	fond AMY80	pAM27	ScOXAI ^{MTS} - CrATP6	CEN	ρ^+ $\Delta atp6 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY248	fond SUP2 $\Delta atp6 :: ARG8^m +$ ScOXAI ^{MTS} - ScATP6-Nuc	fond AMY80	pAM28	ScOXAI ^{MTS} - ScATP6-Nuc	CEN	ρ^+ $\Delta atp6 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY249	fond SUP3 $\Delta atp6 :: ARG8^m +$ ScOXAI ^{MTS} - ATP6-Hyb	fond AMY81	pAM26	ScOXAI ^{MTS} - ATP6-Hyb	CEN	ρ^+ $\Delta atp6 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY250	fond SUP3 $\Delta atp6 :: ARG8^m +$ ScOXAI ^{MTS} - CrATP6	fond AMY81	pAM27	ScOXAI ^{MTS} - CrATP6	CEN	ρ^+ $\Delta atp6 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY251	fond SUP3 $\Delta atp6 :: ARG8^m +$ ScOXAI ^{MTS} - ScATP6-Nuc	fond AMY81	pAM28	ScOXAI ^{MTS} - ScATP6-Nuc	CEN	ρ^+ $\Delta atp6 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY269	$\Delta cox3 :: ARG8^m +$ NcATP9 ^{MTS} - COX3-Hyb	fond MR6	pAM29	NcATP9 ^{MTS} - COX3-Hyb	2 μ	ρ^+ $\Delta cox3 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY270	$\Delta cox3 :: ARG8^m +$ ScOXAI ^{MTS} - COX3-Hyb	fond MR6	pAM30	ScOXAI ^{MTS} - COX3-Hyb	2 μ	ρ^+ $\Delta cox3 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY272	fond SUP1 $\Delta cox3 :: ARG8^m +$ NcATP9 ^{MTS} - COX3-Hyb	fond AMY79	pAM29	NcATP9 ^{MTS} - COX3-Hyb	2 μ	ρ^+ $\Delta cox3 :: ARG8^m$	Cette étude

Nom	Alias	Génotype nucléaire	Plasmide	Insert	Ori.	Génotype mitochondrial	Référence
AMY273	fond SUP1 $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m +$ $\text{ScOXAI}^{\text{MTS}}_{-}$ COX3-Hyb	fond AMY79	pAM30	$\text{ScOXAI}^{\text{MTS}}_{-}$ COX3-Hyb	2 μ	ρ^+ $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$	Cette étude
AMY275	fond SUP2 $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m +$ $\text{NcATP9}^{\text{MTS}}_{-}$ COX3-Hyb	fond AMY80	pAM29	$\text{NcATP9}^{\text{MTS}}_{-}$ COX3-Hyb	2 μ	ρ^+ $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$	Cette étude
AMY276	fond SUP2 $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m +$ $\text{ScOXAI}^{\text{MTS}}_{-}$ COX3-Hyb	fond AMY80	pAM30	$\text{ScOXAI}^{\text{MTS}}_{-}$ COX3-Hyb	2 μ	ρ^+ $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$	Cette étude
AMY278	fond SUP3 $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m +$ $\text{NcATP9}^{\text{MTS}}_{-}$ COX3-Hyb	fond AMY81	pAM29	$\text{NcATP9}^{\text{MTS}}_{-}$ COX3-Hyb	2 μ	ρ^+ $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$	Cette étude
AMY279	fond SUP3 $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m +$ $\text{ScOXAI}^{\text{MTS}}_{-}$ COX3-Hyb	fond AMY81	pAM30	$\text{ScOXAI}^{\text{MTS}}_{-}$ COX3-Hyb	2 μ	ρ^+ $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$	Cette étude
AMY284		fond MR6	pRS315- GUS1wt	GUS1-Wt	CEN	ρ^+ (FY1679)	Cette étude
AMY285		fond MR6	pRS315- GUS1sup	gusI-Sup	CEN	ρ^+ (FY1679)	Cette étude
AMY286	$\Delta\text{gusI}::\text{KANMX4}$ + GUS1-Wt	fond MR6 ; $\Delta\text{gusI}::\text{KANMX4}$	pRS315- GUS1wt	GUS1-Wt	CEN	ρ^+ (FY1679)	Cette étude
AMY287	$\Delta\text{gusI}::\text{KANMX4}$ + gusI-Sup	fond MR6 ; $\Delta\text{gusI}::\text{KANMX4}$	pRS315- GUS1sup	gusI-Sup	CEN	ρ^+ (FY1679)	Cette étude

Nom	Alias	Génotype nucléaire	Plasmide	Insert	Ori.	Génotype mitochondrial	Référence
AMY288		fond AMY42	pRS315-GUS1wt	<i>GUS1-Wt</i>	CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY289		fond AMY42	pRS315-GUS1sup	<i>gus1-Sup</i>	CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY295	SUPi $\Delta gus1 :: KANMX4$ + <i>GUS1-Wt</i>	fond AMY42; $\Delta gus1 :: KANMX4$	pRS315-GUS1wt	<i>GUS1-Wt</i>	CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY296	SUPi $\Delta gus1 :: KANMX4$ + <i>gus1-Sup</i>	fond AMY42; $\Delta gus1 :: KANMX4$	pRS315-GUS1sup	<i>gus1-Sup</i>	CEN	ρ^+ $\Delta atp9 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY299	$\Delta cox3 :: ARG8^m$ + <i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>CrCOX3</i>	fond MR6	pAM33	<i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>CrCOX3</i>	CEN	ρ^+ $\Delta cox3 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY300	$\Delta cox3 :: ARG8^m$ + <i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>ScCOX3-Nuc</i>	fond MR6	pAM35	<i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>ScCOX3-Nuc</i>	CEN	ρ^+ $\Delta cox3 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY301	fond SUP1 $\Delta cox3 :: ARG8^m$ + <i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>CrCOX3</i>	fond AMY79	pAM33	<i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>CrCOX3</i>	CEN	ρ^+ $\Delta cox3 :: ARG8^m$	Cette étude
AMY302	fond SUP1 $\Delta cox3 :: ARG8^m$ + <i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>ScCOX3-Nuc</i>	fond AMY79	pAM35	<i>ScOXAI^{MTS-}</i> <i>ScCOX3-Nuc</i>	CEN	ρ^+ $\Delta cox3 :: ARG8^m$	Cette étude

Nom	Alias	Génotype nucléaire	Plasmide	Insert	Ori.	Génotype mitochondrial	Référence
AMY303	fond SUP2 $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m +$ $\text{ScOXAI}^{\text{MTS}}_{-}$ CrCOX3	fond AMY80	pAM33	$\text{ScOXAI}^{\text{MTS}}_{-}$ CrCOX3	CEN	ρ^+ $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$	Cette étude
AMY304	fond SUP2 $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m +$ $\text{ScOXAI}^{\text{MTS}}_{-}$ ScCOX3-Nuc	fond AMY80	pAM35	$\text{ScOXAI}^{\text{MTS}}_{-}$ ScCOX3-Nuc	CEN	ρ^+ $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$	Cette étude
AMY305	fond SUP3 $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m +$ $\text{ScOXAI}^{\text{MTS}}_{-}$ CrCOX3	fond AMY81	pAM33	$\text{ScOXAI}^{\text{MTS}}_{-}$ CrCOX3	CEN	ρ^+ $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$	Cette étude
AMY306	fond SUP3 $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m +$ $\text{ScOXAI}^{\text{MTS}}_{-}$ ScCOX3-Nuc	fond AMY81	pAM35	$\text{ScOXAI}^{\text{MTS}}_{-}$ ScCOX3-Nuc	CEN	ρ^+ $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$	Cette étude

TABLE II.1.1: Liste des souches utilisées dans cette étude

Une liste complémentaire de souches utilisées peut être retrouvée dans les articles publiés dans *Plos Genetics* et *Molecular Biology and Evolution*, inclus respectivement à la suite des chapitres 1 page 115 et 3 page 181. Les génomes mitochondriaux $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$ ont pour fond génétique parental le génome mitochondrial ρ^+ (D273-10b α). Le reste des génomes mitochondriaux est de parenté mitochondriale ρ^+ (FY1679). Mito. : mitochondrial ; Ori. : Origine de réplication

1.3 Milieux de culture

1.3.1 Milieux de culture bactériens

Lysogeny Broth (LB) : bacto-tryptone 10 g/L ; bacto-yeast extract 5 g/L ; NaCl 10 g/L ; (bacto-agar 15 g/L pour milieux solides) ; antibiotique ampicilline 100 mg/L (LBA) ou tétracycline 3 mg/L (LB_{Tet})

1.3.2 Milieux de culture de levures

1.3.2.1 Milieux riches

YPGA : glucose 20 g/L ; bacto-yeast extract 10 g/L ; bacto-peptone 10 g/L ; adénine 80 mg/L ; agar 20 g/L (pour milieux solides).

YPGalA : galactose 20 g/L ; bacto-yeast extract 10 g/L ; bacto-peptone 10 g/L ; adénine 80 mg/L ; agar 20 g/L (pour milieux solides).

YPEG : glycérol 20 g/L ; bacto-yeast extract 10 g/L ; bacto-peptone 10 g/L ; adénine 80 mg/L ; agar 20 g/L (pour milieux solides) ; éthanol 3 % v/v final (après autoclavage)

BET : glucose 20 g/L ; bacto-yeast extract 10 g/L ; bacto-peptone 10 g/L ; adénine 80 mg/L ; bromure d'éthidium 40 µg/mL (après autoclavage)

G418 : glucose 20 g/L ; bacto-yeast extract 10 g/L ; bacto-peptone 10 g/L ; adénine 80 mg/L ; agar 20 g/L (pour milieux solides) ; généticine (G418) 200 mg/L

N3 : la liste des composants de ce milieu peut être retrouvée dans l'article publié dans Plos Genetics inclus en partie III chapitre 1 page 115.

1.3.2.2 Milieux synthétiques

W0 : glucose 20 g/L ; yeast nitrogen base 1,67 g/L ; sulfate d'ammonium 5 g/L ; agar minimum 20 g/L (pour milieux solides)

CSM-AA : glucose 20 g/L ; yeast nitrogen base 1,67 g/L ; sulfate d'ammonium 5 g/L ; agar minimum 20 g/L (pour milieux solides) ; CSM-AA (*Complete Synthetic Medium*) mélange d'acides aminés et nucléotides dépourvu d'acides aminés ou de nucléotides sélectionnés, en quantité recommandée par le fabricant ; acides aminés ou nucléotides au choix : adénine 80 mg/L, uracile 20 mg/L, arginine 50 mg/L, leucine 100 mg/L, tryptophane (50 mg/L).

5FOA : glucose 20 g/L ; yeast nitrogen base 1,67 g/L ; sulfate d'ammonium 5 g/L ; agar minimum 20 g/L (pour milieux solides) ; CSM-UR (*Complete Synthetic Medium* ou mélange d'acides aminés et nucléotides dépourvu d'uracile et d'arginine) 0,75 g/L ; acides aminés et nucléotides : Adénine 80 mg/L, Uracile 50 mg/L ; acide 5-fluoroorotique 1 g/L ; pH ajusté à 3,5.

Biol3 : la liste des composants de ce milieu peut être retrouvée dans l'article publié dans Plos Genetics inclus en partie III chapitre 1 page 115.

1.4 Conditions de culture et de conservation des souches

Les températures de culture utilisées dans cette étude sont de 28 °C (levures) et 37 °C (bactéries). Les cultures liquides sont agitées à une vitesse de 180 rpm afin de maintenir une oxygénation correcte du milieu. La quantité de cellules contenue dans la culture peut être approximée par mesure de la Densité Optique (DO) à λ 650 nm pour les levures ($1,2 \times 10^7$ cellules par unité de $DO_{650\text{nm}}$) et λ 600 nm pour les bactéries (1×10^8 cellules par unité de $DO_{600\text{nm}}$). La conservation des souches microbiologiques se fait dans du glycérol 50 % v/v stérile à -80 °C.

Chapitre 2

Techniques de génétique

Sommaire

2.1	Techniques de génétique du modèle <i>Podospora anserina</i>	70
2.2	Transformation de bactéries	70
2.2.1	Préparation de bactéries électrocompétentes	70
2.2.2	Transformation par électroporation	70
2.3	Techniques générales	70
2.3.1	Croisement de souches de levure	70
2.3.2	Estimation de la proportion de ρ^- / ρ^0 d'une population de levures	71
2.3.3	Élimination au 5-FOA de cellules prototrophes pour l'uracile	71
2.4	Modification des génomes nucléaires et mitochondriaux de levure	71
2.4.1	Transformation du génome nucléaire de levure	71
2.4.2	Disruption d'un gène nucléaire de levure	72
2.4.3	Transformation du génome mitochondrial de levure	72
2.4.4	Génération de cellules ρ^- / ρ^0	72
2.4.5	Cytoduction du génome mitochondrial entre deux souches de levure	72
2.4.6	Obtention de mutants spontanés	73

2.1 Techniques de génétique du modèle *Podospora anserina*

La description détaillée des protocoles de génétique utilisés avec *Podospora anserina* peut être retrouvée dans l'article publié dans *Molecular Biology and Evolution* inclus en partie III chapitre 3 page 181.

2.2 Transformation de bactéries

2.2.1 Préparation de bactéries électrocompétentes

Une préculture de 20 mL de LB additionné de tétracycline estensemencée avec la souche d'*E.coli* XL1Blue, puis incubée une nuit à 37 °C. La culture est ensuite utilisée pour ensemencer à 0,25 DO_{600 nm}/mL 1 L de milieu LB, placé ensuite à 37 °C. À 1 DO_{600 nm}/mL, la culture est centrifugée 4 000 g 15 minutes. Le culot subit ensuite une série de lavages / centrifugations dans un volume décroissant d'eau distillée à 4 °C (série de 1 L, puis 2 fois 0,5 L, et enfin 0,02 L); centrifugations à 4 000 g 15 minutes). Le dernier culot est repris dans 2 mL de glycérol 10 % v / v stérile à 4 °C. Le mélange obtenu est alors aliquoté en tubes eppendorfs sur azote liquide puis stocké à -80 °C.

Un aliquot est utilisé pour une transformation par électroporation avec un ADN de contrôle (une solution d'ADN plasmidique de concentration connue, différentes quantités utilisées) pour vérifier la compétence des bactéries. Une efficacité de transformation de 10⁸ à 10⁹ transformants /µg d'ADN est attendue.

2.2.2 Transformation par électroporation

Cette technique se base sur la déstabilisation des membranes plasmiques à l'aide d'un champ électrique à haute tension. Les membranes deviennent alors temporairement poreuses, et des acides nucléiques présents dans le milieu peuvent alors pénétrer dans la cellule.

L'appareil d'électroporation utilisé est un électroporateur ECM 395 de la société BTX. Les cuves à électroporation sont au préalable stérilisées aux UV (125 mJ/cm²) puis placées dans la glace. L'électroporation de bactéries est réalisée avec 50 µL de solution de bactéries électrocompétentes décongelées sur glace et 0,01 à 2 µg d'ADN plasmidique (auparavant précipité à l'éthanol pour retirer un maximum de sels). L'électroporation est réalisée selon les recommandations du fabricant, un choc de 2,5 kV est appliqué par électroporation. Le mélange est immédiatement repris dans 1 mL de milieu LB puis incubé à 37 °C sous agitation pendant 1 heure. 200 µL sont ensuite étalés sur milieu LB solide supplémenté en ampicilline, et placés en incubation à 37 °C pendant 15 à 24 heures.

2.3 Techniques générales

2.3.1 Croisement de souches de levure

Le croisement de deux souches de levure de signes sexuels opposés (*MATa* ou *MATα*) peut se faire de deux manières. Le croisement dit de "goutte sur goutte" est réalisé en déposant sur milieu fermentescible riche YPGA deux gouttes l'une sur l'autre (10 µL chacune) provenant de deux cultures des souches à croiser. La deuxième technique consiste à étaler sur milieu fermentescible riche YPGA 200 µL d'une culture de la première souche, puis à répliquer sur une boîte de Petri contenant un sous-clonage de la seconde sur cette boîte de croisement (une boîte de garde est également réalisée).

2.3.2 Estimation de la proportion de ρ^- / ρ^0 d'une population de levures

L'estimation du taux de ρ^- / ρ^0 d'une population de cellules est réalisée en effectuant un crible négatif sur la souche testée. Un étalement en colonies individuelles est effectué sur milieu fermentescible riche solide YPGA. Après 2 jours d'incubation à 28 °C, la boîte de Petri est répliquée avec un velours sur boîte de Petri contenant un milieu de sélection.

Dans le cas d'une souche avec génome mitochondrial sauvage, le milieu de sélection est un milieu respiratoire riche YPEG. Les colonies n'ayant pas la capacité de croître sur ce milieu ont donc un défaut respiratoire, généralement associé au génotype ρ^- / ρ^0 .

Dans le cas d'une souche possédant le marqueur d'auxotrophie *ARG8^m* dans son génome mitochondrial, la culture est répliquée sur milieu fermentescible synthétique dépourvu d'arginine (CSM-R). Les colonies ρ^- / ρ^0 , ne pouvant donc plus produire la protéine Arg8p, seront dépendantes de l'arginine du milieu et ne pourront donc croître sur ce milieu sélectif.

2.3.3 Élimination au 5-FOA de cellules prototrophes pour l'uracile

Les produits dérivés de la métabolisation de l'Acide 5-FluoroOrotique (5-FOA) sont toxiques pour les cellules prototrophes pour l'uracile. En effet, diverses étapes de modifications, dont la dernière est assurée par l'orotidine monophosphate décarboxylase (la protéine encodée par le gène *URA3*), amènent à la formation de 5-fluorouridine, un composé toxique (Rossmann *et al.*, 2011).

Cette contre-sélection des souches prototrophes peut être utilisée pour ségréger les cellules de levure portant un plasmide contenant le marqueur d'auxotrophie *URA3* de celles ayant perdu ce même plasmide. Une culture des souches contenant un tel plasmide dans un milieu supplémenté en 5-FOA permettra soit de sélectionner une mutation dans la chaîne de biosynthèse de l'uracile, soit (et de manière plus fréquente) de sélectionner les souches ayant perdu le plasmide.

Les souches portant un tel plasmide sont cultivées dans un milieu fermentescible contenant de l'uracile, sur 4 à 6 générations. Cette étape est essentielle, car la levée de la pression de sélection sur la prototrophie à l'uracile va permettre de générer des cellules ayant perdu le plasmide. La culture est ensuite sous-clonée sur milieu 5FOA. Après quelques jours d'incubation à 28 °C, plusieurs clones sont prélevés et testés par technique de PCR, pour leur auxotrophie pour l'uracile et pour le phénotype auparavant conféré par le plasmide.

2.4 Modification des génomes nucléaires et mitochondriaux de levure

2.4.1 Transformation du génome nucléaire de levure

Les souches de levures sont transformées selon un protocole adapté de la méthode décrite par Gietz et Woods (2002) basée sur une transformation chimique par acétate de lithium.

Pour une transformation à très haute efficacité, l'équivalent de 1 $DO_{650\text{nm}}/\text{mL}$ d'une culture à température permissive en phase exponentielle de croissance est prélevée, centrifugée 1 minute à 16 000 g puis le culot est rincé dans 1 mL d'eau stérile, recentrifugé et rincé dans 1 mL d'une solution aqueuse d'[acétate de lithium 100 mM ; tris-EDTA 10 :1 mM pH 7,5]. Après recentrifugation, le culot est repris dans 1 mL de cette même solution.

Pour une transformation rapide, la souche de levure est déposée en gouttes sur un milieu de culture fermentescible solide. Les bords de la colonie sont récupérés après 1 à 2 jours d'incubation à température permissive, et repris dans 1 mL d'une solution aqueuse d'[acétate de lithium 100 mM ; tris-EDTA 10 :1 mM pH 7,5].

Dans les deux cas, 50 μ L de la solution contenant les cellules sont mélangés à 300 μ L d'une solution d' [acétate de lithium 100 mM ; tris-EDTA 10 :1 mM pH 7,5 ; PEG 40 % m/v] et complétés par 50 μ g d'ADN carrier (ADN de sperme de saumon, dénaturé 20 minutes à 95 °C et conservé sur glace) et la construction ADN (plasmidique ou linéaire) d'intérêt (en général 0,1 à 1 μ g pour les plasmides). Après incubation sous agitation 30 minutes à 28 °C, un choc thermique est réalisé pendant 15 minutes à 39 °C pour les souches à capacités respiratoires diminuées, 42 °C pour les souches à phénotype respiratoire sauvage. Une centrifugation est immédiatement effectuée à 16 000 g durant 30 secondes, puis le culot de cellules est repris dans 1 mL de milieu fermentescible riche (YPGA) puis incubé sous agitation 1 heure à 28 °C. Les cellules sont récupérées par centrifugation à 16 000 g durant 30 secondes, reprises dans 200 μ L d'eau puis étalées sur milieu fermentescible sélectif et placées 2 à 4 jours à 28 °C.

2.4.2 Disruption d'un gène nucléaire de levure

La disruption d'un gène nucléaire de levure est réalisée à l'aide d'une cassette de résistance à la kanamycine ou au G418 (gène *KANMX4*). Cette cassette est amplifiée par PCR à partir d'un extrait d'ADN génomique des souches de la banque EUROSCARF portant la délétion correspondante. Une liste des différentes amorces utilisées est indiquées dans la table II.3.3 page 96. L'amplicon est purifié par électrophorèse sur gel d'agarose puis transformé directement dans la souche de levure.

Les transformants sont étalés sur milieu G418. Les clones positifs sont sous-clonés sur le même milieu, puis la disruption est vérifiée par PCR et non détection de la protéine correspondante par Western blot. Les souches sont également vérifiées pour le génotype ρ^- / ρ^0 , soit par test de croissance en milieu synthétique dépourvu d'arginine (dans le cas de souches contenant le marqueur *ARG8^m*), soit par croisement entre la souche avec allèle disrupté et une souche ρ^0 mais possédant l'allèle nucléaire sauvage correspondant, suivi d'un test de croissance des diploïdes sur milieu respiratoire.

2.4.3 Transformation du génome mitochondrial de levure

La description détaillée de ce protocole peut être retrouvée dans l'article publié dans Plos Genetics inclus en partie III chapitre 1 page 115.

2.4.4 Génération de cellules ρ^- / ρ^0

Pour ce protocole, 10 μ L d'une culture dense de cellules de levure sont déposés sur milieu BET. Après 2 jours de culture à 28 °C, la boîte est répliquée à nouveau sur milieu BET et sur une boîte de garde YPGA. Cette opération est répétée jusqu'à obtention de cellules ρ^- / ρ^0 , contrôlée en testant le génome mitochondrial de la souche à partir de la boîte de garde. Dans le cas d'un génome mitochondrial sauvage, la boîte de garde est répliquée sur milieu respiratoire YPEG, et le génotype ρ^- / ρ^0 sera indiqué par la perte de la capacité de croissance sur ce milieu. Dans le cas d'un génome portant le gène *ARG8^m*, la réplique de la boîte de garde sera faite sur milieu synthétique dépourvu d'arginine CSM-R. La perte de la capacité de croissance sur ce milieu indiquera la perte de l'expression du gène *ARG8^m*.

2.4.5 Cytoduction du génome mitochondrial entre deux souches de levure

Le gène *kar1-1* porté par le fond DFS160 permet de retarder la fusion des noyaux (Conde et Fink, 1976), et donc la formation d'un diploïde. Cette propriété est utilisée afin de mélanger les

contenus cytoplasmiques entre différentes souches, et notamment les mitochondries qui vont fusionner avant les noyaux, mélangeant ainsi leurs contenus et plus particulièrement leurs génomes.

La souche contenant le génome mitochondrial initial est tout d'abord croisée en goutte sur goutte avec une souche ρ^- / ρ^0 de signe opposé, ici une DFS160 α /60 ou DFS160a/60. La génération F1 est ensuite sélectionnée sur milieu synthétique dépourvu d'uracile (CSM-U, CSM-UR si le génome mitochondrial contient la cassette *ARG8^m*), le fond génétique DFS160 étant prototrophe pour l'uracile, au contraire des autres fonds génétiques utilisés dans cette étude. Les clones positifs sont ensuite vérifiés pour leurs génomes nucléaire par vérification des marqueurs d'auxotrophie (test de croissance) et mitochondrial. Ce dernier est vérifié par croisement et test de complémentation d'une souche ρ^0 dans le cas d'un génome mitochondrial sauvage, croisement et test de complémentation avec une ρ^- synthétique contenant l'allèle sauvage dans le cas d'un génome mitochondrial muté sur l'allèle correspondant.

La souche DFS160 portant le génome mitochondrial peut ensuite être utilisée pour l'opération inverse. Celle-ci est croisée avec une souche d'intérêt ρ^0 de signe sexuel opposé. La génération F1 est ensuite sélectionnée sur milieu 5FOA (qui éliminera en grande partie les clones portant un noyau de type DFS160). Les clones positifs seront également vérifiés pour leurs génomes nucléaire et mitochondrial.

2.4.6 Obtention de mutants spontanés

La technique d'obtention de mutants décrite ici utilise les mutations naturelles comme sources de réversion. Ces mutations apparaissent du fait des erreurs produites par les ADN polymérases lors de la réplication de l'ADN génomique nucléaire ou mitochondrial. Bien que variable selon les contextes génétiques, un taux d'erreur compris entre 10^{-6} et 10^{-8} /cellule /génération sur l'ensemble du génome est généralement considéré, soit une base nucléotidique mal appariée sur dix millions répliquées lors de la mitose.

Cette technique consiste à cultiver la souche d'intérêt en milieu fermentescible synthétique pendant 2 jours, soit 4 à 6 générations. 10^8 cellules sont alors prélevées et centrifugées à 16 000 g durant 1 minute. Le culot de cellules est repris dans 1 mL d'eau distillée stérile, recentrifugé, repris dans 200 μ L d'eau distillée stérile et étalé uniformément sur milieu sélectif solide. Les cellules pourront effectuer quelques générations de plus sur ce milieu – du fait d'infimes traces de glucose restantes dans les cellules – augmentant ainsi la probabilité d'apparition de mutants. Le temps d'incubation à température permissive (28 °C) a été de 45 jours maximum. Dans le cas où quelques clones présenteraient un phénotype suspect, ce délai peut être prolongé par réplique en utilisant un velours sur boîte de Petri contenant le même milieu. Cependant, si aucun clone ne parvient à croître au-delà de 45 jours, il est généralement considéré que les mutations à obtenir sont trop nombreuses ou trop complexes.

Chapitre 3

Techniques de biologie moléculaire

Sommaire

3.1	Liste des constructions utilisées chez <i>Podospora anserina</i>	76
3.2	Vecteurs, séquences et amorces	76
3.2.1	Liste des plasmides utilisés	76
3.2.2	Liste des séquences génétiques utilisées	79
3.3	Caractérisation des acides nucléiques	92
3.3.1	Dosage des acides nucléiques	92
3.3.2	Détermination de la séquence nucléotidique par séquençage	92
3.3.3	Séparation sur gel d'électrophorèse	93
3.3.4	Analyses par Southern et Northern blot	93
3.3.5	Transcriptomique	93
3.4	Manipulation de fragments d'ADN	93
3.4.1	Digestion enzymatique	93
3.4.2	Ligation de fragments d'ADN	94
3.4.3	Amplification de fragments d'ADN par PCR	94
3.5	Isolement d'acides nucléiques	97
3.5.1	Précipitation à l'éthanol	97
3.5.2	Purification sur gel d'électrophorèse	97
3.5.3	Préparation d'ADN génomique	97
3.5.4	Récupération de plasmides	98
3.5.5	Préparation d'ARN totaux	99
3.5.6	Extraction d'acides nucléiques de <i>Podospora anserina</i>	99

3.1 Liste des constructions utilisées chez *Podospora anserina*

La description détaillée des constructions utilisées chez *Podospora anserina* peut être retrouvée dans l'article publié dans *Molecular Biology and Evolution* inclus en partie III chapitre 3 page 181.

3.2 Vecteurs, séquences et amorces

3.2.1 Liste des plasmides utilisés

Les plasmides utilisés durant cette étude sont décrits dans la table II.3.1 page 78.

Plasmides	Taille (pb)	Auxotrophie	Origine de répllication	Sites de restriction utilisés		vecteur d'origine	insert	Source
				5'	3'			
pJM2	5 342	COX2	Mito.	Ø	Ø	Ø	Ø	Bonnefoy et Fox (2001)
pJM2-ATP9	5 934	COX2	Mito.	Ø	Ø	pJM2	ATP9	Bietenhader <i>et al.</i> (2012)
pJM2-ATP6	6 713	COX2	Mito.	Ø	Ø	pJM2	ATP6	Rak <i>et al.</i> (2007)
pJ204	2 810	Ø	Bact.	Ø	Ø	Ø	Ø	DNA2.0
pCM189	8 485	URA3	CEN	BamHI	PstI	Ø	Ø	ATCC
pCM190	8 012	URA3	2µ	BamHI	PstI	Ø	Ø	ATCC
pFL61	5 425	URA3	2µ	NofI	Ø	Ø	Ø	ATCC
YEp352	5 181	URA3	2µ	Ø	Ø	Ø	Ø	ATCC
YEp352-COX2	N/D	URA3	2µ	Ø	Ø	YEp352	COX2-Nuc	Supekova <i>et al.</i> (2010)
YEp352-COX2 W56R	N/D	URA3	2µ	Ø	Ø	YEp352	COX2-Nuc W56R	Supekova <i>et al.</i> (2010)
YCplac22	5 577	TRP1	CEN	Ø	Ø	Ø	Ø	ATCC
Ycplac22-YTA10	7 852	TRP1	CEN	StuI	NcoI	Ycplac22	YTA10-Wt	Arlt <i>et al.</i> (1996)
YCplac111	6 835	LEU2	CEN	Ø	Ø	Ø	Ø	ATCC
Ycplac111-YTA12	9 289	LEU2	CEN	AgeI	PmlI	Ycplac111	YTA12-Wt	Arlt <i>et al.</i> (1996)
pRS315	6 018	LEU2	CEN	Ø	Ø	Ø	Ø	ATCC
pRS315-GUS1wt	8 907	LEU2	CEN	Ø	Ø	pRS315	GUS1-Wt	H. BECKER
pRS315-GUS1sup	8 907	LEU2	CEN	Ø	Ø	pRS315	gus1-Sup	H. BECKER
pUC57	2 710	Ø	Bact.	Ø	Ø	pUC57	Ø	GENSCRIPT
pUC57-ATP6hyb	3 616	Ø	Bact.	BamHI	PstI	pUC57	ScOXAJ ^{MTS} -ATP6-Hyb	D. GONZALEZ-HALPHEN
pUC57-CrATP6	3 541	Ø	Bact.	BamHI	PstI	pUC57	ScOXAJ ^{MTS} -CrATP6	D. GONZALEZ-HALPHEN
pUC57-ScATP6nuc	3 616	Ø	Bact.	BamHI	PstI	pUC57	ScOXAJ ^{MTS} -ScATP6-Nuc	D. GONZALEZ-HALPHEN
pUC57-CrCOX3	3 658	Ø	Bact.	BamHI	PstI	pUC57	ScOXAJ ^{MTS} -CrCOX3	D. GONZALEZ-HALPHEN
pUC57-ScCOX3nuc	3 646	Ø	Bact.	BamHI	PstI	pUC57	ScOXAJ ^{MTS} -ScCOX3-Nuc	D. GONZALEZ-HALPHEN
pUC57-PsCOX3nuc	3 658	Ø	Bact.	BamHI	PstI	pUC57	ScOXAJ ^{MTS} -PsCOX3	D. GONZALEZ-HALPHEN
pAM5	3 146	Ø	Bact.	BamHI	PstI	pJ204	yATP9-Nuc	Cette étude
pAM6	3 146	Ø	Bact.	BamHI	PstI	pJ204	ATP9-Hyb	Cette étude
pAM11	8 411	URA3	2µ	BamHI	PstI	pCM190	yATP9-Nuc	Cette étude
pAM12	8 414	URA3	2µ	BamHI	PstI	pCM190	ATP9-Hyb	Cette étude
pAM13	3 142	Ø	Bact.	BamHI	PstI	pJ204	PaATP9-5	Cette étude

Plasmides	Taille (pb)	Auxotrophie	Origine de réplication	Sites de restriction utilisés		vecteur d'origine	insert	Source
				5'	3'			
pAM14	3 151	∅	Bact.	<i>Bam</i> HI	<i>Pst</i> I	pJ204	PaATP9-7	Cette étude
pAM16	8 878	<i>URA3</i>	CEN	<i>Bam</i> HI	<i>Pst</i> I	pCM189	PaATP9-5	Cette étude
pAM17	8 887	<i>URA3</i>	CEN	<i>Bam</i> HI	<i>Pst</i> I	pCM189	PaATP9-7	Cette étude
pAM19	8 405	<i>URA3</i>	2μ	<i>Bam</i> HI	<i>Pst</i> I	pCM190	PaATP9-5	Cette étude
pAM20	8 414	<i>URA3</i>	2μ	<i>Bam</i> HI	<i>Pst</i> I	pCM190	PaATP9-7	Cette étude
pAM24	7 851	<i>TRP1</i>	CEN	<i>Stu</i> I	<i>Nco</i> I	Ycpalc22	<i>yta10-Sup</i>	Cette étude
pAM25	9 289	<i>LEU2</i>	CEN	<i>Age</i> I	<i>Pml</i> I	Ycplac111	<i>yta12-Sup</i>	Cette étude
pAM26	9 361	<i>URA3</i>	CEN	<i>Bam</i> HI	<i>Pst</i> I	pCM189	ScOXAI ^{MTS} -ATP6-Hyb	Cette étude
pAM27	9 286	<i>URA3</i>	CEN	<i>Bam</i> HI	<i>Pst</i> I	pCM189	ScOXAI ^{MTS} -CrATP6	Cette étude
pAM28	9 361	<i>URA3</i>	CEN	<i>Bam</i> HI	<i>Pst</i> I	pCM189	ScOXAI ^{MTS} -ScATP6-Nuc	Cette étude
pAM29	6 443	<i>URA3</i>	2μ	∅	∅	pFL61	NcATP9 ^{MTS} -COX3-Hyb	D. GONZALEZ-HALPHEN
pAM30	6 376	<i>URA3</i>	2μ	∅	∅	pFL61	ScOXAI ^{MTS} -COX3-Hyb	D. GONZALEZ-HALPHEN
pAM33	9 403	<i>URA3</i>	CEN	<i>Bam</i> HI	<i>Pst</i> I	pCM189	ScOXAI ^{MTS} -CrCOX3	Cette étude
pAM35	9 391	<i>URA3</i>	CEN	<i>Bam</i> HI	<i>Pst</i> I	pCM189	ScOXAI ^{MTS} -ScCOX3-Nuc	Cette étude
pAMR692	3 146	<i>URA3</i>	2μ	<i>Bam</i> HI	<i>Pst</i> I	pCM190	SUP3ATP9-Hyb	récupération de plasmide de AMY81

TABLE II.3.1: Liste des plasmides utilisés dans cette étude

Une liste complémentaire de plasmides utilisés peut être retrouvée dans les articles publiés dans *Plos Genetics and Molecular Biology and Evolution*, inclus respectivement à la suite des chapitres 1 page 115 et 3 page 181. Les différents sites de restriction indiqués sont ceux utilisés dans cette étude pour les expérimentations de clonage classique (situés en amont ou en aval des codons start et stop du gène) ou de gap repair (situés en amont et en aval de la mutation d'intérêt, voir II.3.2 page suivante pour le positionnement exact). 2μ : plasmide multicopies ;

CEN : plasmide monocopie ; N/D : non déterminé.

3.2.2 Liste des séquences génétiques utilisées

Les séquences génétiques décrites dans cette étude sont listées dans la table II.3.2.

TABLE II.3.2: Liste des séquences utilisées dans cette étude

Une liste complémentaire des séquences génétiques décrites dans cette étude peut être retrouvée dans les articles publiés dans *Plos Genetics* et *Molecular Biology and Evolution*, inclus respectivement à la suite des chapitres 1 page 115 et 3 page 181. Dans les séquences génétiques, sont mis en valeur les codons initiateur et stop, ainsi que les sites des mutations SUP (également en minuscules). Ces derniers sont également indiqués en gras dans les séquences protéiques. Les séquences en minuscules soulignées sont les sites de restrictions utilisés pour le clonage de ces séquences génétiques. Les séquences génétiques annotées avec une astérisque* ont été optimisées pour le biais de codons de *Saccharomyces cerevisiae* à l'aide du logiciel GENE DESIGNER de la société DNA2.0. DGH : Diego GONZALEZ-HALPHEN ; TL : Thomas LANGER ; HB : Hubert BECKER.

Gène	Séquence génétique	Séquence protéique	Source
yATP9-Nuc*	ggatcc ATGA AATGCTCTTCTAAGCTGGCCGGTGTGTTGCCAGAATGGGG CGAAACCAGCTATGGCACAAACAAGTAGACTTCCATCATCTATCTTAAGGTCG ACATCTATTGCGGGCCGTCATGGTTTGTATTATCTCAGGAAGGAATGCTTT TGCGCCTGTTATGATGAGGTCGGCCACTCAATCAAGAGGTGTCGTAGCAGAAA CTGCCATGCAATTAGTCTTAGCCGCTAAGTACATAGGAGCAGGTATAAGCACT ATTGGTTTATTGGGAGCGGTATTGGGATTGCTATCGTTTTTGTGCTTAAT TAACGGTGTGTCTAGAAAATCCCTCTATCAAGGACTGTTTTTCCAATGGCAA TCCTTGGCTTTCATTAAAGTGAAGCAACAGGCCTTTTCTGTTTGATGGTTAGC TTCCTTCTGCTATTCGGAGTCTAActgcag	MNASSKLAGAVARMGAKPA MAQTSRLPSSILRSTSIAG RHGLLLSQGRNAFAPVMMR SATQSRGVVAETAMQLVLA AKYIGAGISTIGLLGAGIG IAIVFAALINGVSRNPSIK DTVFPMAILGFALSEATGL FCLMVSFLLLFV*	Cette étude
PaATP9-5*	ggatcc ATGG CATCTACCAGAGTATTAGCCTCACGTCTTGATCTCAAATGG CAACTAAAGTAGCCAGACCTGCTGTGAGAGTTCCTGCAAGGGCCTTCACGGCA GGTACCAAGGCAACGCCACTTCAAGCTGTAAAGAGACAGCAAATGTCATCCAT TATCACGGCTACTAGACAGATTACGCAAAAAGAGGGCCTACTCAAGTGAATCG CACAAGCTATGGTTGAAGTATCTAAGAAGTCTAGGGATGGGTACGGCGGCTATA GGTCTAACAGGTGCGGTATAGGTATAGGGCTTGTATTGTCAGCTCTTCTAAA TGGAGTTGCTAGAAAATCCTGCCTAAGAGGTCAACTGTTCTCCTACGCAATTT TAGGTTTCGCTTTCGTAGAGGCTATCGGGTTATTCGATTGATGGTAGCACTG ATGGCGAAATTTACCTAGctgcag	MASTRVLASRLASQMATKV ARPAVRVPARAFAGTKAT PLQAVKRQOMSSIIITATRO ITQKRAYSSEIAQAMVEVS KNLGMGTAAIGLTGAGIGI GLVFAALLNGVARNPALRG QLFSYAILGFVFAEIGLF DLMVALMAKFT*	Cette étude
PaATP9-7*	ggatcc ATGA ACGCAAGTAGTAAATTAGCAGGCGCTGTCGCTAGAATGGGG CCAAGCCAGCAATGGCTCAAACCTCTCGTCTGCCAGTAGCATACTTCGTTCT ACGTCGATTGCAGGAAGGCATGGATTATTGTTATCACAAGGCAGAAAATGCCTT CGCCCTGTGATGATGAGAAGCGCAACACAGTCCAGAGGCGTCTGTTGCCGAGA CAGCCACTGCCCTATTCTGGCGGCAGGAAAAATGCAAGGTGCTGGTTGGCG ACTATAGGCTGTCTGGAGCTGGAGTAGGTATTGGTACTGTTTTTGCCGCCTT GATAAATGGAACGGCTAGAAACCAGCGTTGAGGAGTCAGTTATTCAGTTATG CTATTCTAGGTTTCGCTTTCGCCAGGCAACAGGTCTGTTTCGCTCTAATGGTC GCATTCTTTTGTATTGCTTACTAGctgcag	MNASSKLAGAVARMGAKPA MAQTSRLPSSILRSTSIAG RHGLLLSQGRNAFAPVMMR SATQSRGVVAETATAAILA AGKMQGAGLATIGLSGAGV GIGTVFAALINGTARNPAL RSQFSYAILGFVFAEATG LFALMVAFLLLFAY*	Cette étude
ATP9-Hyb*	ggatcc ATGA ACGCTTCTTCAAACCTGGCTGGAGCTGTTGCTAGAATGGGTG CTAAACCTGCCATGGCACAGACTAGCAGATTGCCTTCTCCATCCTGAGGTCT ACTTCCATAGCAGGTAGACACGGATTGTTGCTATCCAGGGCCGTAATGCATT TGCACCCGTGATGATGCGTCTGCCACACAAAAGTAGGGGAGTAGTCGCTGAAA CAGCTACAGCGCAATCTTGGCGCTGGCAAAAATGCAAGGGCAGGTCTTGCA ACAATTGGATTGCTGGCGCTGGTGTGGGATTGGGACTGTGTTGTCAGCGCT TATAAATGGTGTATCAAGAAATCCATCCATAAAAGATACGGTCTTTCCAATGG CCATTTTAGGATTCGCTTATCAGAAGCTACTGTTTATTTGTTTGATGGTG AGCTTCTATTGTTATTCGGCTTTGActgcag	MNASSKLAGAVARMGAKPA MAQTSRLPSSILRSTSIAG RHGLLLSQGRNAFAPVMMR SATQSRGVVAETATAAILA AGKMQGAGLATIGLSGAGV GIGTVFAALINGVSRNPSI KDTVFPMAILGFALSEATG LFCLMVSFLLLFV*	Cette étude

Gène	Séquence génétique	Séquence protéique	Source
<i>COX2-Nuc*</i>	<i>Supekova et al. (2010)</i>		
<i>COX2-Nuc W56R*</i>			
<i>ScOXAI^{MTS}-ScATP6-Nuc*</i>	<p>ggatccATGTTTAAATTAACCTCCCGTCTAGTCACCTCACGTTTTGCAGCCT CTTCTAGACTTGCTACGGCTAGAACAAATCGTTTTGCCACGTCCACACCCAAGC TGGATCTCGTTTCAAGCTAAGAGATTCAACTCTACAGGACCTTTAATCTGTT GAATACATATATTACTAGTCCATTGGACCAATTCGAAATTAGAACTTTATTCG GCCTTCAATCCTCTTTTCATCGATCTATCTGTGCTGCTCAGGTACAATCTGGT GCAACAGTTAATCTTTACTATTGGGTATTTACAGATTTTGGCGTTCTCAAGC CCCTAACACAAGATAATTGGTTCTAGATGGTTGATTTCGCAAGAAGCAATAT ACGATACTATTATGAACATGACCAAAGGACAAATCGGTGGGAAGAACTGGGGC CTATATTTCCCTATGATTTTCACACTGTTTCATGTTTCATATTTATGCTAACCT GATATCAATGATTCCATATTTCTTTGCTCTTAGTGCTCACTTAGTTTTTCATAA TTTCGTTGCAATTGTTATTTGGCTAGGGAACACGATCTCGGGTGTACAAA CACGGTTGGGTCTTCTCAGCTTGTGTGCCAGCGGTACCCCATTCGCTTT AGTGCCACTTCTGGTTATTATTGAACTTTGTCTATTTTCGCAAGGGCTATTA GCTTGGGATTGAGGTTAGGCTCCAACATTTAGCCGGTCATCTTTGATGGTT ATTTTGGCTGGACTGACGTTCAATTTTATGCTTATTAACCTATTCACCTTAGT ATTCGGGTTTGTCCCTTAGCTATGATCTTGTCTATTATGATGCTGGAATTTG CAATTGGAATAATTCAAGGATATGATGGCCATTTTGACGGCATCTTATCTG AAGGATGCAGTATATCTTCACTTAActgcag</p>	<p>MFKLT SRLVTSRFAASSRL ATARTIVLPRPHPSWISFQ AKRFNSTGPFNLLNTYITS PLDQFEIRTLFGLQSSFID LSCLNLTTFSLYTIIVLLV ITSLYTLTNNNNKIIGSRW LISQEAIYDTIMNMTKQI GGKNWGLYFPMIFTLFMI FIANLISMIPYSFALS AHL VFIIISLSIVIWLGNLILGL YKHGWNVFFSLFVPAGTLP LVPLLVIETLSYFARAIS LGLRLGSNILAGHLLMVIL AGLTFNFMLINLFLVFGF VPLAMILAIMMLEFAIGII QGYVWAILTASYLKDAVYL H*</p>	DGH
<i>ScOXAI^{MTS}-CrATP6*</i>	<p>ggatccATGTTTAAATTAACCTCCCGTCTAGTCACCTCACGTTTTGCAGCCT CTTCTAGACTTGCTACGGCTAGAACAAATCGTTTTGCCACGTCCACACCCAAGC TGGATCTCGTTTCAAGCTAAGAGATTCAACTCTACAGGACCTTCTACAGCTGC TCAGGTACAATCTGGTGCAACAGTTAATCTTTACTATTGGGTATTTACAGAT TTTGGCGTTCTCAAGCCCTATGGATAAACCCCATGCCCCAGTGGACGATCGT ATGCTACCAGCAATAGTGGACGCATCTGACAATAGAGCCGCTTTAGGCACCTG GGCTACAGCACTGTTTTGTACGATCTTAGCGTCCAATTTATGGGTTTGGTC CCCACGAACGAAGCGCTACCAGCGGACTAGGATTTGCAACTGGATTAGGTG TTAGTGTCTGGGCCACTGCTACTACGCTAGGTTTGTATAAATGGGTTTCTCG TTCCCTGGACACTTTATTCCGGGCGGTACGCCCTGGCCAATGGCATTCACTT TGTCCCTTAGAAACAATTCGTATACATTCAGGGCTGTATCTTTGGGTGTTA GACTATGGGTCAACATGCTAGCGGGGCATACTTTGTTACATATCCTTACGGGT ATGGCCCTTGCCCTACCTTTTCTTGTCTTTTTTGCATGGTTCCAGCAAC ATTTGCCGTCGCATGCCTGTTATCTGCTCTGGTAGGGCTAGAATATTTGGTTG CTGTGTTACAAAGTGGAGTTTTCTCTATATGTCAACAGTCTACGTCGGCGAG TTTAATTCAGTAAAGTTGGCTGGTCTCTGGCGAAAGTGGTAAAAAAGGCTCT TAActgcag</p>	<p>MFKLT SRLVTSRFAASSRL ATARTIVLPRPHPSWISFQ AKRFNSTGPSTAAQVQSGA TVNSLLGLIYRFWRSQAPM DKPHAPVDDRMLPAIVDAS DNRAALGTWATALEFCTILA SNLLGLVPTNEAPTSGLGF ATGLVSVWATATTLGLYK LGFSPFGHFIPGGTPWMA FIFVPLETISYTFRAVSLG VRLWVNMLAGHTLLHILT MALALPFSLSFFAMVPATF AVACLLSALVGLYLVAVL QSGVFSILSTVYVGEFNSV KLAGPLAKVVKAL*</p>	DGH

Gène	Séquence génétique	Séquence protéique	Source
<i>ScOXAI^{MTS}-ATP6-Hyb*</i>	<p>ggatccATGTTTAAATTAACCTCCCGTCTAGTCACCTCACGTTTTGCAGCCT CTTCTAGACTTGCTACGGCTAGAACAAATCGTTTTGCCACGTCCACACCCAAGC TGGATCTCGTTTCAAGCTAAGAGATTCAACTCTACAGGACCTTTAATCTGTT GAATACATATATTACTAGTCCATTGGACCAATTGCAAATTAGAACTTTATTTCG GCCTTCAATCCTCTTTTCATCGATCTATCTGTTTGAACCTAACGACTTTCTCA TTGTACACTATTATTGTTCTACTAGTTATTACCAGCCTATATACGTTAACAAA TAACAACAACAAGATAATTGGTTCTAGATGGTTGATTTCGCAAGAAGCAATAT ACGATACTATTATGAACATGACCAAAGGACAAATCGGTGGGAAGAACTGGGGC CTATATTTCCCTATGATTTTTCACACTGTTTCATGTTTCATATTTATTGCTAACCT GATATCAATGATTCCATATTTCTTTGCTCTTAGTGCTCACTTAGTTTTCATAA TTTCGTTGTCGAATTGTTATTTGGCTAGGGAACACGATCCTGGGGTTGTACAAA CACGGTTGGGTCTTCTTCAGCTTGTGTTGCCAGCGGGTACCCCATTCCTTT AGTGCCACTTCTGGTTATTATTGAACTTTGCTCTATTTCGCAAGGGCTATTA GCTTGGGATTGAGGTTAGGCTCCAACATTTTAGCCGGTCATCTTTTGATGGTT ATTTTGGCTGGACTGACGTTCAATTTTATGCTTATTAACCTATTCACCTTAGT ATTCGGGTTGTTCCCTTAGCTATGATCCTTGCTATTATGATGCTGGAATTTG CAATTGGAATAATTCAAGGATATGTATGGCCATTTTGACGGCATCTTATCTG AAGGATGCAGTATATCTTCACTTAActgcag</p>	<p>MFKLT SRLVTSRFAASSRL ATARTIVLPRPHPSWISFQ AKRFNSTGPFNLNTYITS PLDQFEIRTLFGLQSSFID LSCAAQVQSGATVNSLLLG IYRFWRSQAPNNKIIGSRW LISQEIYDTIMNMTKGQI GGKNWGLYFPMIFTLFMFI FIANLISMIPYSFALSAHL VFIISLSIVIWLGNLILGL YKHGWVFFSLFVPAGTPLP LVPLLVI IETLSYFARAIS LGLRLGSNILAGHLLMVIL AGLTFNMLINLFTLVFGF VPLAMILAIMMLEFAIGII QGYVWAILTASYLKDAVYL H*</p>	DGH
<i>ScOXAI^{MTS}-ScCOX3-Nuc*</i>	<p>ggatccATGTTTAAACTTACTTCAAGATTGGTAACCAGCAGATTCCGCCGAT CGTCACGCTTGCTACCGCTAGAACTATCGTCTACCTCGTCCACATCCATCT TGGATCTCCTTTCAGGCTAAGAGATTTAATTCAACTGGTCTACACATTTGGA AAGAAGTCGTCATCAGCAACATCCTTTTCATATGGTAATGCCTAGTCCATGGC CGATAGTAGTCTCTTTTGCCTGTGTGCTACTGGCATTGTGCGACCGCACTTAC TATGCATGGTTACATTGGAATATGAATATGGTATATTTAGCCCTTTTGTGT TACTAACGAGTTCAATTCTGTGGTTAGAGATATAGTTGCAGAGGCTACGTAT TTGGGTGATCACACAATGGCCGTAGGAAAGGTATCAACCTTGGTTTCTTGAT GTTTGTACTAAGCGAAGTCCTAATTTTCGAGGTCTATTTTGGGCTTACTTTC ATTCGGCAATGTCCCCGACGTTACTACTAGGTGCCTGCTGGCCCCCTGTCGGC ATCGAAGCTGTCCAACCAACTGAGCTTCCATTGTTAAATACTATCATATTACT TTCATCTGGAGCGACGGTCACGTACTCCCATCACGCTTAAATCGCTGGTAATA GAAATAAAGCACTATCTGACTTTTAAATCACATTCTGGTTGATCGTAATATTC GTTACCTGCCAGTACATTGAATATACTAATGCCGCTTTTACTATTTCCGATG GTGCTACGGCTCCGATTTTATGCGGGTACTGGATTACATTTCCCTACATATG GTTATGTTAGCAGCGATGTTGGGGTTAATTACTGGAGAATGCGTAATTATC ATTTAACTGCTGGGCATCATGTGGGTTATGAGACTACCATCATATACCCCAT GTATTGGACGTAATTTGGTTGTTTCTATATGTCGTTTTTACTGGTGGGGCGT TAActgcag</p>	<p>MFKLT SRLVTSRFAASSRL ATARTIVLPRPHPSWISFQ AKRFNSTGPTHLEERSRHQQ HPFHMVMPSPWP IVVSFAL LSLALSTALTMHGYIGNMN MVYLLALFVLLTSSILWFRD IVAEATYLGDMMAVRKGI NLGFLMFVLSEVLIFAGLF WAYFHSAMSPDVTLGACWP PVGIEAVQPTLPLLNII LLSSGATVTYSHHALIAGN RNKALSGLLITFWLIVIFV TCQYIEYTNAAFITSDGVY GSVYFAGTGLHFLHMVMLA AMLGVNYWRMRNYHLTAGH HVGYETTTIYTHVLDVIWL FLYVVFYWWGV*</p>	DGH

Gène	Séquence génétique	Séquence protéique	Source
<i>ScOXAI^{MTS}-CrCOX3*</i>	<p><u>ggatcc</u>ATGTTTAAACTTACTTCAAGATTGGTAACCAGCAGATTGCGCCGATCGTCACGCTTGTCTACCGCTAGAACTATCGTCCTACCTCGTCCACATCCATCTGGATCTCCTTTCAGGCTAAGAGATTTAATTCAACTGGTCTTGAAGTCATGCAGCCGGTCATCAAAGTCTAAAGAATTCTACATGGAACATATCGGCAAAAGGCACCCATTCCACGTCTTACCACCTAGTCCGTGGCCTATGCTGGCCGGTGGGGTACATATGTTAGCTGTCTTGGCATGGCCGCATGGTTTCATAATATGCCTACCGGTGGGGCTCTTATGGCATTGGCATGGCAAATATAGCTTGGACTGCTATAACTTGGTGGAGAGATTGTGCAATAGAAGGCGATATGGGTATGCATACTGAAGTCGTTAGAAAGAACTTCATTTCTGGAATGTGGGCATTTATTGTCTCAGAAGCCTTGCTATTCGTGGGCTTGTGTGGGCATGTTTACACTTAGGCATGTCGCCGTCTGTAGCCCTGCAAATGCAATGGCCCCAGTGGGTATTGAGCCAATTGGATGGGATAAAAGGGCGTTGGTAATGAGCGCCGTTTTAGCGGCTTCTTATTACTCAGCGAATGTGGCAATGGTCGCAAAGGACCCAAAAGTAGTCATGGGGGCTTTGGCCACTACCATCGGATTAGGTGCTATGTTTCTTGACAGCAATACCTTGGTACAATGAAACACCTTTCACAATTACTGATAGCCCATACGGTACCCTTCTTTGTTACGACTGGCTTTACGGCATGCACGTGCTTCTGGGAAGTCTATACCTAAGTCTGCTGCTCTAATGATGTACAAAAGAACTCATAATGCAGGTGCCGCCCTGAAGTCAAGTATTCTACTGGCATTTTGTGATATAGTGTGGATTGCTGTTTACGGCATAATATACGTGGTCAGTACTTAA<u>ctgcag</u></p>	<p>MFKLTSRLVTSRFAASSRL ATARTIVLPRPHPSWISFQ AKRFNSTGPGSHAAGHQTA KEYFMEHIGKRHPHFVLP SPWMLAGWGTYVSVCLGMA AWFHNMTGGALMAFGMAN IAWTAITWWRDCAIEGDMG MHTEVVRKNFISGMWAFIV SEALLFVGLLWACLHLGMS PSVALQMQWPPVGIPIGW DKRALVMSAVLAASYYSAN VAMVAKDPKVVMGALATTI GLGAMFLADQYLEYNETPF TITDSPYGTTFVTTGFHG MHVLLGSLYLTAALMMYKR THNAGAALKSSILYWHFVD IVWIAVYGIIYVGQY*</p>	DGH
<i>ScOXAI^{MTS}-PsCOX3*</i>	<p><u>ggatcc</u>ATGTTTAAACTTACTTCAAGATTGGTAACCAGCAGATTGCGCCGATCGTCACGCTTGTCTACCGCTAGAACTATCGTCCTACCTCGTCCACATCCATCTGGATCTCCTTTCAGGCTAAGAGATTTAATTCAACTGGTCTTCAAGTGATGCTGGTACCATTAAAGTCTTAGGGAACATTATTTAGTACACACAGCGAATAGACATCCATTTACGCTCTTGCAGATTACCTTGGCCCTGTTTGGTTCTTGGGCTGCCTGCAACGTTTTCTTAGGTCTGGCGCAATATTTTCATGGCGTTGCTGGCTCCGACCTCTATTGTTCCGGTAGTGTGCGCACACTTAACTCTTCTGGCCATTACCTGGTGGCGTACTGTGCTATAGAAGCTGAAATGGGTATGCATACAGATGTATCAAGACAAAATATGGTTTCAGGTATGTGGGTATTCATCGTCTCAGAAGCTGTACTATTTATAGGACTTTTGTGGGCTTGTATGGATCTTGGCATATCCCCAGCGTTCATGTTCAAATGCAATGGCCTCCTGTCCGAGTTCATGCAATTGGATGGGATAATAGAGCTTTAGTAATGTCTGCTGTATTAGCAGCTTCTTACTATAGTGCTAATATGCAATGGTGGCTAAAGATCCTAAAACCGTCTAGCAGCACTTCCACGACCGTAGGCTTTGGCGCTATGTTTCTATACGATCAATTTTGGAAATATACGCAAACCTTTTACTTTAACAGATTCTCCGTACGGAACAACCTTCTTCATGACAACAGCTTTTCATGGTATGCACGTGCTAGTAGGTACGATATACCTGGCAGCTGTCACAGCTATGTACAGTAGAACAAAGAAAGCGGGTGTGCTCTAACACATCTGTCTTACTGGCATTTTCGTCGACATTGTATGGATAGCCGTCTATGGAATCATATATGTAGGTCAATATTAA<u>ctgcag</u></p>	<p>MFKLTSRLVTSRFAASSRL ATARTIVLPRPHPSWISFQ AKRFNSTGPPSSDAGHHLSP REHYLVHTANRHPHFVLPD SPWPLFGSWAACNVFLGLA QYFHGVAGSAPLLFGSVAH LTLLEITWWRDCAIEAEMG MHTDVSQRQNMVSGMWVIV SEAVLFIGLLWACMDLGIS PSVHVQMQWPPVGVHAIGW DNRALVMSAVLAASYYSAN IAMVAKDPKTVLALSTTV GFGAMFLYDQFLEYTQTPF TLT DSPYGTTFMTTGFHG MHVLVGTIYLAAVTAMYSR TKKAGVALTTSVLYWHFVD IVWIAVYGIIYVGQY*</p>	DGH

Gène	Séquence génétique	Séquence protéique	Source
<i>NcATP9^{MTS}-COX3-Hyb</i>	<p>gcggccgcATGGCCTCCACTCGTGTCTCGCCTCTCGCCTGGCCTCCCAGAT GGCTGCTTCCGCCAAGGTTGCCCGCCCTGCTGTCCGCGTTGCTCAGGTCAGCA AGCGCACCATCCAGACTGGCTCCCCCTCCAGACCCTCAAGCGCACCCAGATG ACCTCCATCGTCAACGCCACCACCCGCCAGGCTTCCAGAAGCGCGCCTACTC TTCCagatctATGTCTTCTGATGCTGGTCATCATTGTCTCCAAGAGAACATT TGGAAAGATCTAGACATCAACAACATCCATTTCATATGGTTATGCCATCTCCA TGGCCATTGTTTGGTTCTTGGGCTGCTTGTAAATGTTTTTTGGGTTTGGCTCA ATATTTTCATGGTTATATTGGTAATATGAATTTGTTGTTTGGTTCTGTTGCTC ATTTGACTTTGTTGGCTATTACTTGGTGAGAGATATTGTTGCTGAAGCTACT TATTTGGGTGATCATACTATGGCTGTTAGAAAAAATATGGTTTCTGGTATGTG GGTTTTTATGTTTCTGAAGCTGTTTTGTTTATTGGTTTGTGTGGGCTTGTA TGGATTTGGGTATGTCTCCAGATGTTACTTTGGGTGCTTGTGGCCACCAGTT GGTATTGAAGCTGTTCACCAACTGAATTGGCTTTGGTTATGCTGCTGTTTT GGCTGCTTCTTATTATTCTGCTAATATTGCTATGGTTGCTTTGATTGCTGGTA ATAGAAATAAAGTTTTGGCTGCTTTGTCTACTACTGTTGGTTTTGGTGCTATG TTTTTGTATGATCAATTTTTGGGAATATACTAATGCTGCTTTTACTATTTCTGA TGGTGTATGTTACTACTTTTTTTATGACTACTGGTTTTTCATGGTATGCATG TTTTGGTTGGTACTATTTATTTGGCTGCTGTTACTGCTAGAATGAGAAATTAT CATTTGACTGCTGGTCATCATGTTGGTTATGAAACTTCTGTTTTGTATTGGCA TTTTGTTGATATTGTTGGATTGCTGTTTATGGTATTATTTATTGGTGGGGTG TTTAA</p>	<p>MASTRVLASRLASQMAASA KVARPAVRVAQVSKRTIQIQT GSPLQTLKRTQMTSIVNAT TRQAFQKRAYSSRSMSSDA GHHLSPREHLERSRHQQHP FHMVMPSPWPLFGSWAACN VFLGLAQYFHGYIGNMNL FGSVAHLTLLAITWWRDIV AEATYLGDHTMAVRKNMVS GMWVIVSEAVLFIGLLWA CMDLGMSPDVTLGACWPPV GIEAVQPTLALVMSAVLA ASYSANIAMVALIAGNRN KVLALSTTVGFGAMFLYD QFLEYTNAAFITSDGVYGT TFFMTTGFGMHVLTGTYIY LAAVTARMRNYHLTAGHHV GYETSVLYWHFVDIVWIAV YGIYWWGV*</p>	DGH
<i>ScOXAI^{MTS}-COX3-Hyb</i>	<p>gcggccgcATGTTCAAACCTCACCTCTCGACTCGTCACGTCAAGGTTTGGCTGCC TCTTCCAGACTGGCCACCGCTCGAACCATAGTATTGCCCCGGCCCCATCCGTC ATGGATCTCTTTTCAGGCCAAAAGATTTAATTCGACGGGCCCAagatctATGT CTTCTGATGCTGGTCATCATTGTCTCCAAGAGAACATTTGGAAAGATCTAGA CATCAACAACATCCATTTCATATGGTTATGCCATCTCCATGGCCATTGTTGG TTCTTGGGCTGCTTGTAAATGTTTTTTGGGTTTGGCTCAATATTTTCATGGTT ATATTGGTAATATGAATTTGTTGTTTGGTTCTGTTGCTCATTGACTTTGTTG GCTATTACTTGGTGGAGAGATATTGTTGCTGAAGCTACTTATTGGGTGATCA TACTATGGCTGTTAGAAAAAATATGGTTTCTGGTATGTGGGTTTTTATTGTTT CTGAAGCTGTTTTGTTTATTGGTTTGTGTGGGCTTGATGGATTGGGTATG TCTCCAGATGTTACTTTGGGTGCTTGTGGCCACCAGTTGGTATTGAAGCTGT TCAACCAACTGAATTGGCTTTGGTTATGCTGCTGTTTTGGCTGCTTCTTATT ATCTGCTAATATTGCTATGGTTGCTTTGATTGCTGGTAATAGAAATAAAGTT TTGGCTGCTTTGTCTACTACTGTTGGTTTTGGTGCTATGTTTTTGTATGATCA ATTTTTGGGAATATACTAATGCTGCTTTTACTATTTCTGATGGTGTATGGTA CTACTTTTTTTATGACTACTGGTTTTTCATGGTATGCATGTTTTGGTTGGTACT ATTTATTTGGCTGCTGTTACTGCTAGAATGAGAAATTATCATTGACTGCTGG TCATCATGTTGGTTATGAAACTTCTGTTTTGTATTGGCATTGTTGATATTG TTTGGATTGCTGTTTATGGTATTATTTATTGGTGGGGTGTTAA</p>	<p>MFKLT SRLVTSRFAASSRL ATARTIVLPRPHPSWISFQ AKRFNSTGPRSMSSDAGHH LSPREHLERSRHQQHPFHM VMPSPWPLFGSWAACNVFL GLAQYFHGYIGNMNLFGS VAHLTLLAITWWRDIVAEA TYLGDHTMAVRKNMVS GMWVIVSEAVLFIGLLWACMD LGMSPDVTLGACWPPV GIEAVQPTLALVMSAVLAASY YSANIAMVALIAGNRNKVL AALSTTVGFGAMFLYDQFL EYTNAAFITSDGVYGTFF MTTGFGMHVLTGTYIYLAA VTARMRNYHLTAGHHVGYE TSVLYWHFVDIVWIAVYGI IYWWGV*</p>	DGH

Gène	Séquence génétique	Séquence protéique	Source
<i>YTA10-Wt</i>	<p><u>gtcgac</u>ATGATGATGTGGCAACGATATGCAAGGGGTGCGCCACGCTCATTGACATCACTCTCATTGGTAAAGCTAGCCGCATATCAACAGTGAAGCCAGTGCTTCGCTCGCGCATGCCAGTTCACCAGCGTTTGACAGCGTTATCTGGTCTGGCAA</p> <p>CCAGAAACACAATACACCGTTCTACCCAAATACGTTCCCTCCATATCTCATG</p> <p>GACAAGGTTAAATGAAAAATAGGCCAAACAAAGAGGGTGAGGGCAAGAACAAT</p> <p>GGTAATAAAGATAATAATAGCAATAAAGAAGATGGCAAAGACAAAAGAAATGA</p> <p>GTTTGGTTCATTATCAGAATACTTCAGATCTAAGGAATTTGCTAATACGATGT</p> <p>TTTTGACCATCGGATTCACAATTATATTTACTTTGCTCACACCTCCAGTAAC</p> <p>AACTCAGGAGACGACTCTAACCGCGTCTTGACTTTCCAGGATTTCAAAACAAA</p> <p>ATACCTGGAGAAGGGTCTTGTGTCCAAGATTTACGTCGTTAATAAGTTTCTCG</p> <p>TAGAGGCCGAATTAGTCAATACAAGCAAGTTGTATCGTTCACCATTGGTTCA</p> <p>GTAGATATTTTTGAGGAACAGATGGACCAGATCCAGGACCTCTTGAACATTC</p> <p>CTCCTCGGGATCGTATCCCATCAAATACATTGAGAGATCTTCTCCCTTAC</p> <p>ATTTTTGTTCCCTTCTGCCCACCATCATTCTGCTTGGTGGCCTTTACTTC</p> <p>ATAACCAGAAAAATAAATAGTTCCACCACCAATGCCAATGGTGGTGGGAG</p> <p><u>Gaggcct</u>CGGCGCATGTTTAAATGTTGGAAAATCCAGAGCAAAGCTCTTCAAT</p> <p>AAGGAAACAGACATTAATAATTTCAATTTAAAAATGTTGCCGGTTGTGATGAAGC</p> <p>TAAACAGGAAATCATGGAATTTGTTCACTTTTGAAGAACCAGGTAAGTACA</p> <p>CTAAATTGGTGGCCAAGATTCCACGAGGCGCTATTCTTTCTGGACCCCGAG</p> <p>TACCGGTAAGACTCTCTTGGCCAAGGCCACCGCAGGTGAGGCGAACGTGCCCT</p> <p>TCTTGTGAGTATCAGGTTCTGAGTTCGTCGAAATGTTGCTGGGGTGGGTGCT</p> <p>TCACGTGTAAGAGACTTGTTTACTCAAGCAAGGTCTATGGCCCCCTCGATTAT</p> <p>CTTTATAGATGAAATTGACGCTATCGGTAAGAAAGAGGCAAAGCGGCGCTC</p> <p>TCGGTGGCGCTAACGATGAAAGAGAAGCTACGCTGAATCAATTATTGGTGGAA</p> <p>ATGGACGGATTCACTACTTCCGACCAAGTCGTAGTCTTGGCGGTACAAATAG</p> <p>GCCCGATGTGTTGGATAATGCTTTGATGAGACCGGGAAGGTTTCGATAGACATA</p> <p>TCCAAATTGATTCTCTGATGTCAATGGTAGGCAGCAAATATACCTGGTTCAC</p> <p>TTGAAAAGACTGAATCTGGATCCCTTCTTACAGATGATATGAATAATCTTTC</p> <p>TGGGAAATTGGCTACGCTTACTCCAGGTTTTACTGGTGCAGATATCGCTAATG</p> <p>CTTGTAATGAGGCTGCATTAATCGTGCAGACATAATGACCCATATATCACT</p> <p>ATCCATCACTTTGAGCAAGCCATTGAAAGAGTCATTGCGGGACTAGAGAAGAA</p> <p>AACAAGAGTCCCTTTCTAAGGAAGAAAAAGGTCAGTGGCCTATCATGAGGCAG</p> <p>GACATGCCGTTTGTGGTTGGTTTCTAAAAATATGCGGATCCACTTCTGAAAGTA</p> <p>AGCATATCCCAGTGGACAAGGTGCTTTAGGCTATGCCAGTACCTACCACC</p> <p>GGATCAATATTTGATATCTGAGGAGCAATTCAGACATAGAATGATCATGGCTC</p> <p>TTGGTGGCCGTGTTTCTGAGGAGCTACATTTCCATCGGTGACTAGCGGTGCT</p> <p>CATGATGATTTCAAAAAGGTTACACAGATGGCAAATG<u>ccatgg</u>TACATCCCT</p> <p>AGGAATGTCACCCAAGATTGGCTACCTGTCGTTGATCAGAATGATGAAACT</p> <p>TCAAAGTTAAACAAACCTTACAGTAATAAAACGGCAAGAACCATTGATTTAGAA</p> <p>GTTAAATCTATAGTAGATGATGCACACCGAGCTTGTACAGAATTGCTAACCAA</p> <p>AAATTTGGACAAAGTCGATCTTGTGCGAAAAGAATTGCTACGTAAGGAAGCAA</p> <p>TTACTAGAGAAGACATGATTAGATTATTGGGTCCAAGGCCATTCAAGGAAAGG</p> <p>AACGAGGCTTTTGAATAATTTGGATCCAAAGAGCAATACCGAACCGCTGA</p> <p>GGCACCTGCAGCAACAAATTAA<u>aagctt</u></p>	<p>MMMWQRYARGAPRSLTSLS</p> <p>FGKASRISTVKPVLRSRMP</p> <p>VHQRLQTLISGLATRNTIHR</p> <p>STQIRSFHISWTRLNENRP</p> <p>NKEGEGKNNGNKDNNSNKE</p> <p>DGKDKRNEFGSLSEYFRSK</p> <p>EFANTMFLTIGFTIIFTL</p> <p>TPSSNNSGDDSNRVLTFQD</p> <p>FKTKYLEKGLVSKIYVVK</p> <p>FLVEAELVNTKQVVSFTIG</p> <p>SVDIFEEQMDQIQDLLNIP</p> <p>PRDRIPIKYIERSSPFTFL</p> <p>FPFLPTIILLGGLYFITRK</p> <p>INSSPPNANGGGGGGLGGM</p> <p>FNVGKSRAKLFNKETDIKI</p> <p>SFKNVAGCDEAKQEIMEFV</p> <p>HFLKNPQKTYKLGAKIPRG</p> <p>AILSGPPGTGKTLAKATA</p> <p>GEANVPFLSVSGSEFVEMF</p> <p>VGVGASRVRDLFTQARSMA</p> <p>PSIIFIDEIDAIGKERGKG</p> <p>GALGGANDEREATLNQLLV</p> <p>EMDGFTTSDQVVVLAGTNR</p> <p>PDVLDNALMRPGRFDRHIQ</p> <p>IDSPDVNGRQQIYLVHLKR</p> <p>LNLDPLLTDDMNNLSGKLA</p> <p>TLTPFTGADIANACNEAA</p> <p>LIAARHNDPYITIHFEQA</p> <p>IERVIAGLEKTRVLSKEE</p> <p>KRSVAYHEAGHAVCGWFLK</p> <p>YADPLLKVSIIIPRQGGALG</p> <p>YAQYLPPDQYLISEEQFRH</p> <p>RMIMALGGRVSEELHFPVS</p> <p>TSGAHDDFFKVTQMANAMV</p> <p>TSLGMSPKIGYLSFDQNDG</p> <p>NFKVNKPFNKTARTIDLE</p> <p>VKSI VDDAHRACTELLTKN</p> <p>LDKVDLVAKELLRKEAITR</p> <p>EDMIRLLGPRPFKERNEAF</p> <p>EKYLDPKSNTEPPEAPAAT</p> <p>N*</p>	TL

Gène	Séquence génétique	Séquence protéique	Source
<i>yta10-Sup</i>	<p><u>gtcgac</u>ATGATGATGTGGCAACGATATGCAAGGGGTGCGCCACGCTCATTGACATCACTCTCATTGGTAAAGCTAGCCGCATATCAACAGTGAAGCCAGTGCTTCGCTCGCGCATGCCAGTTCACCAGCGTTTGACAGCGTTATCTGGTCTGGCAA</p> <p>CCAGAAACACAATACACCGTTTACCCAAATACGTTCCCTCCATATCTCATG</p> <p>GACAAGGTTAAATGAAAAATAGGCCAAACAAAGAGGGTGAGGGCAAGAACAAT</p> <p>GGTAATAAAGATAATAATAGCAATAAAGAAGATGGCAAAGACAAAAGAAATGA</p> <p>GTTTGGTTCATTATCAGAATACTTCAGATCTAAGGAATTTGCTAATACGATGT</p> <p>TTTTGACCATCGGATTCACAATTATATTACTTTGCTCACACCTCCAGTAAC</p> <p>AACTCAGGAGACGACTCTAACCGCGTCTTGACTTTCCAGGATTTCAAAACAAA</p> <p>ATACCTGGAGAAGGGTCTTGTGTCCAAGATTTACGTCGTTAATAAGTTTCTCG</p> <p>TAGAGGCCGAATTAGTCAATACAAAGCAAGTTGTATCGTTCACCATTGGTTCA</p> <p>GTAGATATTTTTGAGGAACAGATGGACCAGATCCAGGACCTCTTGAACATTC</p> <p>CTCCTCGGGATCGTATCCCATCAAATACATTGAGAGATCTTCTCCCTTAC</p> <p>ATTTTTGTTCCCTTCTGCCCACCATCATTCTGCTTGGTGGCCTTTACTTC</p> <p>ATAACCAGAAAAATAAATAGTTCACCACCAAATGCCAATGGTGGTGGGAG</p> <p><u>Gaggcct</u>CGGCGCATGTTTAAATGTTGGAAAATCCAGAGCAAAGCTCTTCAAT</p> <p>AAGGAAACAGACATTAATAATTTCAATTTAAAAATGTTGCCGGTTGTGATGAAGC</p> <p>TAAACAGGAAATCATGGAATTTGTTCACTTTTGAAGAACCAGGTAAGTACA</p> <p>CTAAATgtGTGCCAAGATTCCACGAGGCGCTATTCTTTCTGGACCCCGAG</p> <p>TACCGGTAAGACTCTCTTGGCCAAGGCCACCGCAGGTGAGGCGAACGTGCCCT</p> <p>TCTTGTGATATCAGGTTCTGAGTTCGTCGAAATGTTGTTGGGGTGGGTGCT</p> <p>TCACGTGTAAGAGACTTGTTTACTCAAGCAAGGTCTATGGCCCCCTCGATTAT</p> <p>CTTTATAGATGAAATTGACGCTATCGGTAAGAAAGAGGCAAAGCGGCGCTC</p> <p>TCGGTGGCGCTAACGATGAAAGAGAAGCTACGCTGAATCAATTATTGGTGGAA</p> <p>ATGGACGGATTCACTACTTCCGACCAAGTCGTAGTCTTGGCGGTACAAATAG</p> <p>GCCCGATGTGTTGGATAATGCTTTGATGAGACCGGGAAGGTTTCGATAGACATA</p> <p>TCCAAATTGATTCTCTGATGTCAATGGTAGGCAGCAAATATACCTGGTTCAC</p> <p>TTGAAAAGACTGAATCTGGATCCCTTCTTACAGATGATATGAATAATCTTTC</p> <p>TGGGAAATTGGCTACGCTTACTCCAGGTTTTACTGGTGCAGATATCGCTAATG</p> <p>CTTGTAATGAGGCTGCATTAATCGTGCAGACATAATGACCCATATATCACT</p> <p>ATCCATCACTTTGAGCAAGCCATTGAAAGAGTCATTGCGGGACTAGAGAAGAA</p> <p>AACAAGAGTCCCTTTCTAAGGAAGAAAAAGGTCAGTGGCCTATCATGAGGCAG</p> <p>GACATGCCGTTTGTGGTTGGTTTCTAAAAATATGCGGATCCACTTCTGAAAGTA</p> <p>AGCATATCCCAGTGGACAAGGTGCTTTAGGCTATGCCAGTACCTACCACC</p> <p>GGATCAATATTTGATATCTGAGGAGCAATTCAGACATAGAATGATCATGGCTC</p> <p>TTGGTGGCCGTGTTTCTGAGGAGCTACATTTCCATCGGTGACTAGCGGTGCT</p> <p>CATGATGATTTCAAAAAGGTTACACAGATGGCAAATG<u>ccatgg</u>TACATCCCT</p> <p>AGGAATGTCACCCAAGATTGGCTACCTGTCGTTGATCAGAATGATGAAAAT</p> <p>TCAAAGTTAAACAAACCTTACGTAATAAAACGGCAAGAACCATTGATTTAGAA</p> <p>GTTAAATCTATAGTAGATGATGCACACCGAGCTTGTACAGAATTGCTAACCAA</p> <p>AAATTTGGACAAAGTCGATCTTGTGCGAAAAGAATTGCTACGTAAGGAAGCAA</p> <p>TTACTAGAGAAGACATGATTAGATTATTGGGTCCAAGGCCATTCAAGGAAAGG</p> <p>AACGAGGCTTTTGAATAATTTGGATCCAAAGAGCAATACCGAACCGCTGA</p> <p>GGCACCTGCAGCAACAAATTAA<u>aagctt</u></p>	<p>MMMWQRYARGAPRSLTSLS</p> <p>FGKASRISTVKPVLRSRMP</p> <p>VHQRLQTLISGLATRNTIHR</p> <p>STQIRSFHISWTRLNENRP</p> <p>NKEGEGKNNGNKDNNSNKE</p> <p>DGKDKRNEFGSLSEYFRSK</p> <p>EFANTMFLTIGFTIIFTL</p> <p>TPSSNNSGDDSNRVLTFQD</p> <p>FKTKYLEKGLVSKIYVVK</p> <p>FLVEAELVNTKQVVSFTIG</p> <p>SVDIFEEQMDQIQDLLNIP</p> <p>PRDRIPIKYIERSSPFTFL</p> <p>FPFLPTIILLGGLYFITRK</p> <p>INSSPPNANGGGGGGLGGM</p> <p>FNVGKSRAKLFNKETDIKI</p> <p>SFKNVAGCDEAKQEIMEFV</p> <p>HFLKNPQKTYKLCAKIPRG</p> <p>AILSGPPGTGKTLAKATA</p> <p>GEANVPFLSVSGSEFVEMF</p> <p>VGVGASRVLDLFTQARSMA</p> <p>PSIIFIDEIDAIGKERGKG</p> <p>GALGGANDEREATLNQLLV</p> <p>EMDGFTTSDQVVVLAGTNR</p> <p>PDVLDNALMRPGRFDRHIQ</p> <p>IDSPDVNQRQIYLVHLKR</p> <p>LNLDPLLTDDMNNLSGKLA</p> <p>TLTPFTGADIANACNEAA</p> <p>LIAARHNDPYITIHFEQA</p> <p>IERVIAGLEKKTRVLSKEE</p> <p>KRSVAYHEAGHAVCGWFLK</p> <p>YADPLLKVSIIIPRQGGALG</p> <p>YAQYLPDPQYLISEEQFRH</p> <p>RMIMALGGRVSEELHFPVS</p> <p>TSGAHDDFKKVTQMANAMV</p> <p>TSLGMSPKIGYLSFDQNDG</p> <p>NFKVNKPFNKTARTIDLE</p> <p>VKSI VDDAHRACTELLTKN</p> <p>LDKVDLVAKELLRKEAITR</p> <p>EDMIRLLGPRPFKERNEAF</p> <p>EKYLDPKSNTEPPEAPAAT</p> <p>N*</p>	TL

Gène	Séquence génétique	Séquence protéique	Source
<i>YTA12-Wt</i>	<p>ggatccATGTTGCTACTTTCTTGGTCAAGAATTGCTACTAAGGTAGTTAGAA GGCCCGTTCGCTTCCGGTCTATTACGGCTTGACCCATATCAAGAGTTTACA TACTCAATATCGGCTACTCAATAGGCTGCAAGAGAATAAGAGCGGTAACAAG AACGAGGACAATAACGAAGACGCTAAACTTAACAAAGAAATCCACAGACGA AGAGGTTGAAGCAATAAGAAAACAAGTAGAAAAATATATCGAACAACTAAAA ATAATACTATACCGGCTAACTGGAAAGAACAGAAACGCAAAATGATGAAAGT ATTAGGCGTTTAGAAGATGCTGTATTGAAACAAGAATCTAACAGAATTCAGA AGAAAGAAAGGAAAAAGAGGAGGAAAATGGTCCTTCAAAAGCCAAGTCAACA GAACAAAAGAGCAGGGCTACTTTGAAGGTAAACAATAGCAGAAATATTCCACCG CCACCACCCTCTCCCCAAAACCACCTCTAAATGATCTAGTAATCCTGT ATCGAAAAATGTTAACTTATTCCAGATAGGACTAACTTTTTCTCCTTTCTG TTTTATTGGATCTCCTCAACAGTTTGAAGAGCAAAGTGAGATAACGTGGCAG GATTTTAGAGAGAACTATTGGCAAAAGGTTATGTTGCGAAGTTGATTGTTGT CAACAAGTCCATGGTGAAAGTGATGTTAAATGACAACGGAAAAACCAAGCC GACAATTACGGTCGCAACTTCTATTATTTACAATTGGTTCAATTGATAGCTT CGAACACAACTTCAGAAAGCACAGGACGAACTGGACATTGATAAGGATTTT AGAATACCTGTACTATATGTTCAAGAAGGCAATTGGGCTAAAGCTATGTTCCA AATTTTGCAACTGTTTAAATGATTGCAGTATTATTTGGTTGACAAGAAGAT CGGCACAAGCAGCGGGCGGTAGCCGTGGAGGCATATTTGGTCTGAGTCGTT TAAGGCTAAAAATTTAACACTGAAACAGACGTTAAGATCAAGTTCAAGGACG TTGCCGGATGCGATGAGGCTAAGGAAGAAATATGGAGTTTGTAGCTTCTTG AAAGAACCTTCTCGTTATGAAAAATGGGAGCTAAAATTCCTAGAGGTGCGAT TCTATCTGGTCCACCAGGTaccggtAAAACCTTGGCTTCAAAGGCAACAGCAG GTGAAGCCGGTGTTCCGTTTTATTTGTTTCTGGTTCAGAATTTGTAGAAATG TTTGTGGTGTGGTGAGCAAGAGTAAGAGATTTGTTCAAACTGCAAGAGA AAATGCACCCTCAATTGTGTTTATTGACGAAATGATGCTATAGGAAAAGCAA GACAAAAGGGTAATTTTTCAGGTGCCAATGATGAGAGAGAGAACACGCTAAAT CAAATGTTAGTAGAAATGGATGGTTTCACTCCAGCTGACCACGTTGTTGTTTT AGCTGGTACCAATAGACCCGATATTCTCGATAAAGCATTATTAAGGCCTGGTA GATTTGACAGGCATATCAATATCGACAAGCCGAACTTGAGGGTAGAAAAGCC ATTTTTGCTGTTTACATTACATCATTGAAACTTGCCGGGAAATTTTTGATTT GAAAAATAGATTAGCGGCTTTGACGCCAGGCTTTTCTGGTCTGATATTGCC AACGTTTGTAACGAGGCCGCTTGATTGCTGCTAGAAGTGATGAAGATGCAG TAAAATTGAATCATTTTGAACAAGCTATCGAAAGAGTCATCGGTGGAGTGGAA CGCAAATCCAAGCTACTCTCTCCGAAGAGAAGAAAGTAGTGGCTTACCACGA GGCTGGTATGCTGTATGTGGATGGTACTTAAAAATACGCAGATCCTCTCTG AAAGTCAGTATTATTCaccgtgGCCAGGGCCCTTGGTTATGCACAGTATTT GCCAGGTGATATCTTCTACTAACTGAACAGCAACTAAGGACAGAATGACC ATGTCTCTGGGTGGAAGAGTTTCTGAAGAATTACATTTCCCATCAGTTACAAG TGCGCATCTGATGACTTCAAAAAGTTACTAGCATGGCCACGGCAATGGTCA CAGAATTAGGCATGAGTGATAAAATGGCTGGGTCAATTACCAGAAGAGAGAT GATAGCGATTTGACAAAACCATTTTCGACGAGACAGGTGACATTATTGATTC CGAAGTATACAGAATCGTCCAAGAAATGCCATGACAGATGTACAAAGCTGCTTA AAGAAAAAGCAGAAGATGTAGAGAAGATTGCTCAAGTACTACTGAAAAAAGAA GTTTTGACAAGAGAAGATATGATTGATTTACTTGGTAAGCGCCCTTTCCAG AAAGGAATGATGCTTTTGTAAAGTACTTGAACGATTACGAAACGGAAAAATC AGGAAGGAAGAAGAAAAAACGAAAAACGTAATGAGCCTAAGCCATCTACAAA CTGAaagctt</p>	<p>MLLLSWSRIATKVVRPVR FRSYYGLTHIKSLHTQYRL LNRLQENKSGKNEDNED AKLNKEIPTDEEVEAIRKQ VEKYIEQTKNNTIPANWKE QKRKIDESIRLEDAVLKQ ESNRIQEERKEKEEENGPS KAKSNRTKEQGYFEGNNSR NIPPPPPPPKPLNDPS NPVSKNVNLFQIGLTFLL SFLDLLNSLEEQSEITWQ DFREKLLAKGYVAKLIVVN KSMVKVMLNDNGKNQADNY GRNFYFTIGSIDSEHKL QKAQDELDDKDFRIPVLY VQEGNWKAMFQILPTVLM IAGI IWLTRRSAQAAGGSR GGIFGLSRSKAKKFNTE VKIKFKDVAGCDEAKEEIM EFVSLKEPSRYEKMGA PRGAILSGPPGTGKILLAK ATAGEAGVPFYFVSGSEFV EMFVGVAARVRDLFKTAR ENAPSI VFIDEIDAIGKAR QKGNFSGANDERENTLNQM LVEMDGFTPADHVVLVLAGT NRPDILDKALLRPGRFDRH INIDKPELEGRKAIFAVHL HHLKLAGEIFDLKNRLAAL TPGFSGADIANVCNEAALI AARSDAVKLNHFQOIE RVIGGVERKSKLLSPEEKK VVAYHEAGHAVCGWYLKYA DPLLVKSIIPRGGALGYA QYLPDIFLLTEQQLKDRM TMSLGGRVSEELHFPSVTS GASDDFKKVTSMATAMVTE LGMSDKIGWVNYQKRDDSD LTKPFSDETGD IIDSEVYR IVQECHRCTKLLKEKAED VEKIAQVLLKKEVLTREDM IDLLGKRPFPERNDADF LNDYETEKIRKEEKEK NEPKPSTN*</p>	TL

Gène	Séquence génétique	Séquence protéique	Source
<i>yta12-Sup</i>	<p>ggatccATGTTGCTACTTTCTTGGTCAAGAATTGCTACTAAGGTAGTTAGAA GGCCCGTTCGCTTCCGGTCTATTACGGCTTGACCCATATCAAGAGTTTACA TACTCAATATCGGCTACTCAATAGGCTGCAAGAGAATAAGAGCGGTAACAAG AACGAGGACAATAACGAAGACGCTAAACTTAACAAAGAAATCCACAGACGA AGAGGTTGAAGCAATAAGAAAACAAGTAGAAAAATATATCGAACAACTAAAA ATAATACTATACCGGCTAACTGGAAAGAACAGAAACGCAAAATGATGAAAGT ATTAGGCGTTTAGAAGATGCTGTATTGAAACAAGAATCTAACAGAATTCAGA AGAAAGAAAGGAAAAAGAGGAGGAAAATGGTCCTTCAAAGCCAAGTCAACA GAACAAAAGAGCAGGGCTACTTTGAAGGTAACAATAGCAGAAATATTCCACCG CCACCACCCTCTCCCCAAAACCACCTCTAAATGATCTAGTAATCCTGT ATCGAAAAATGTTAACTTATTCCAGATAGGACTAACTTTTTCTCCTTTCTG TTTTATTGGATCTCCTCAACAGTTTGAAGAGCAAAGTGAGATAACGTGGCAG GATTTTAGAGAGAACTATTGGCAAAAGGTTATGTTGCGAAGTTGATTGTTGT CAACAAGTCCATGGTGAAAGTGATGTTAAATGACAACGGAAAAACCAAGCC GACAATTACGGTCGCAACTTCTATTATTTACAATTGGTTCAATTGATAGCTT CGAACACAACTTCAGAAAGCACAGGACGAACTGGACATTGATAAGGATTTT AGAATACCTGTACTATATGTTCAAGAAGGCAATTGGGCTAAAGCTATGTTCCA AATTTTGCAACTGTTTAAATGATTGCAGTATTATTTGGTTGACAAGAAGAT CGGCACAAGCAGCGGGCGGTAGCCGTGGAGGCATATTTGGTCTGAGTCGTT TAAGGCTAAAAATTTAACACTGAAACAGACGTTAAGATCAAGTTCAAGGACG TTGCCGGATGCGATGAGGCTAAGGAAGAAATATGGAGTTTGTAGCTTCTTG AAAGAACCTTCTCGTTATGAAAAATGGGAGCTAAAATTCCTAGAGGTGCGAT TCTATCTGGTCCACCAGGTaccggtAAAACCTTGGCTTCAAAGGCAACAGCAG GTGAAGCCGGTGTTCCGTTTTATTTGTTTCTGGTTCAGAATTTGTAGAAATG TTTGTGGTGTGGTGAGCAAGAGTAAGAGATTTGTTCAAACTGCAAGAGA AAATGCACCCTCAATTGTGTTTATTGACGAAATGATGCTATAGGAAAAGCAA GACAAAAGGGTAATTTTTCAGGTGCCAATGATGAGAGAGAGAACACGCTAAAT CAAATGTTAGTAGAAATGGATGGTTTCACTCCAGCTGACCACGTTGTTGTTTT AGCTGGTACCAATAGACCCGATATTCTCGATAAAGCATTATTAAGGCCTGGTA GATTTGACAGGCATATCAATATCGACAAGCCGAACCTGAGGGTAGAAAAGCC ATTTTTGCTGTTTACATTACATCATTGAAACTTGCCGGGGAAATTTTTGATTT GAAAAATAGATTAGCGGCTTTGACGCCAGGCTTTTCTGGTCTGATATTGCC AACTTTTGTAAACGAGGCCGCTTGTATTGCTGCTAGAAGTGATGAAGATGCAG TAAAATTGAATCATTTTGAACAAGCTATCGAAAGAGTCATCGGTGGAGTGGAA CGCAAATCCAAGCTACTCTCTCCGAAGAGAAGAAAGTAGTGGCTTACCACGA GGCTGGTATGCTGTATGTGGATGGTACTTAAAAATACGCAGATCCTCTCTG AAAGTCAGTATTATTCaccgtgGCCAGGGCCCTTGGTTATGCACAGTATTT GCCAGGTGATATCTTCTACTAACTGAACAGCAACTTAAGGACAGAATGACC ATGTCTCTGGGTGGAAGAGTTTCTGAAGAATTACATTTCCATCAGTTACAAG TGGCGCATCTGATGACTTCAAAAAGTTACTAGCATGGCCACGGCAATGGTCA CAGAATTAGGCATGAGTGATAAAATGGCTGGGTCAATTACCAGAAGAGAGAT GATAGCGATTTGACAAAACCATTTTCGACGAGACAGGTGACATTATTGATTC CGAAGTATACAGAATCGTCCAAGAAATGCCATGACAGATGTACAAAGCTGCTTA AAGAAAAAGCAGAAGATGTAGAGAAGATTGCTCAAGTACTACTGAAAAAAGAA GTTTTGACAAGAGAAGATATGATTGATTTACTTGGTAAGCGCCCTTTCCAG AAAGGAATGATGCTTTTGTAAAGTACTTGAACGATTACGAAACGGAAAAATC AGGAAGGAAGAAGAAAAAACGAAAAACGTAATGAGCCTAAGCCATCTACAAA CTGAaagctt</p>	<p>MLLLSWSRIATKVVRPVR FRSYYGLTHIKSLHTQYRL LNRLQENKSGKNEDNED AKLNKEIPTDEEVEAIRKQ VEKYIEQTKNNTIPANWKE QKRKIDESIRLEDAVLKQ ESNRIQEERKEKEEENGPS KAKSNRTKEQGYFEGNNSR NIPPPPPPPKPLNDPS NPVSKNVNLFQIGLTFLL SFLDLLNSLEEQSEITWQ DFREKLLAKGYVAKLIVVN KSMVKVMLNDNGKNQADNY GRNFYFTIGSIDSEHKL QKAQDELDDKDFRIPVLY VQEGNWKAMFQILPTVLM IAGI IWLTRRSAQAAGGSR GGIFGLSRSKAKKFNTE VKIKFKDVAGCDEAKEEIM EFVSLKEPSRYEKMGA PRGAILSGPPGTGKILLAK ATAGEAGVPFYFVSGSEFV EMFVGVGAARVRDLFKTAR ENAPSI VFIDEIDAIGKAR QKGNFSGANDERENTLNQM LVEMDGFTPADHVVLGAT NRPDILDKALLRPGRFDRH INIDKPELEGRKAIFAVHL HHLKLAGEIFDLKNRLAAL TPGFSGADIANFCNEAALI AARSDEDAVKLNHFQOIE RVIGGVERKSKLLSPEEKK VVAYHEAGHAVCGWYLKYA DPLLKVSII PRGQ GALGYA QYLPDIFLLTEQQLKDRM TMSLGGRVSEELHFPSVTS GASDDFKKVTSMATAMVTE LGMSDKIGWVNYQKRDDSD LTKPFSDETGD IIDSEVYR IVQECHRCTKLLKEKAED VEKIAQVLLKKEVLTREDM IDLLGKRPFPERNDADF LNDYETEKIRKEEKEK NEPKPSTN*</p>	TL

Gène	Séquence génétique	Séquence protéique	Source
<i>GUS1- Wt</i>	<p>ctcgagGGTCGATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAATACCGCATCAGGAAAT TGTAACCGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAAAATCAGCTCATTTTTAAACCAAT AGGCCGAAATCGGC AAAATCCCTTATAAATCAAAAAGAAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTGTTCCA GTTTGGAAACAAGAGTCCACTATTAAAGAAGCTGGACTCCAACGTC AAAGGGCGAAAAACCGTCTATCA GGGCGATGGCCACTACGTGAACCATCACCTAATCAAGTTTTTTGGGGTCGAGGTGCCGTAAAGCAC TAAATCGGAACCCATAAGGGAGCCCCGATTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGA AAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTCACGCTGCGCGT AACCACCACCCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCGCCATTGCCATTACGCTGCG GCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCCTTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAGGGGGATGT GCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTACGACGTTGTAAAACGACGGCCAG TGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCTGTTCCGCAACTGCTGCGTACATTTCAA TTCGGCATAATGTTTTAAATGTCTCTACCGTTTTCTTAAAGTCAAATATACAATCCACCTCAGCAC CAAGAATTAACCTGCAAGTTACCTACACAGTTCTCACAACACTAATGTATTCATCTCCATGCGATACA ATCCTTTTAGTCTTTTTTCTATCACTTCACGGGGTGTATACTGCAACGGATTGAAAAGAGTAGCCAA AGTTTTCAAAGTTGACCTGTAAATACATTAGATCTTGATTATATTACGCCCTGCTTCAGTTGCGAG AGGAAGCCTTAGCTGCAATTGACAGCTTCAGGCACTTCTTGATAAAAAGTTGGCCGTTGAATGAAACG ATACGAAGATCAACTGTATTAAGAAGTGGAGAGTCAAATGCACATGAAATTAATTTCCGTGCTATTCC TCTAAAAGTAATTATATCAGCATTAAATTTTTTCTTTATGTCTTTTCAGAGCTTCTATGGTTTCTA ATAGCCCACGAGGAAACACCTGTCTTCAAAATCTTTGTAATAATCTTAAATTTCTGAAATCTTGAT GAAAGATCCAAGTTCTGTCCAATTCAGCGTCTGGAAGATAGTAGTAATTCAAATTCGTATCATCGCT AATTAATATCTTTCATCCTTAGTCTTGAATAGAATCCTATTCTTTGGCTGCTTCAGAGCTGTTG TCGACCCTCTTTGCTTTACGAACAAATTTGCACTAACACCCATTGGGATACACTATGTTGGTCTAATA TTTCGCTATTCTTTACCATATTACAGAAGTATTAGTAACATTACAGACCTCATCTGTTCTTAATAT TCTCGAAGTAAATTTTCAATTTACCCGAATGCTTACTCTTTTTTCTTCTGTTAAAAGCAAGATA AAGTGA AAAAAATGGAAGATAACTCCATAAGAAATGACGAAACTATTTTCAAAGGTTAAGGAAAGCA TAGAAGGGATCAAGATGCCATCTACCTTGACTATTAATGAAAAGCCCCAATTTGGCTTATGCTGAA CTAATTGCTGCTGATTTGTAATGCGTTAGCTCCTAATCCATAGCTATTAAGTTGGTGGACGATAA GAAAGCACCTGCTGCCAAGCTCGATGATGCTACTGAAGATGTCTTCAACAAGATAACTAGCAAATTCG CCGCCATCTTCGATAATGGTGATAAAGAGCAAGTTGCTAAATGGGTTAATCTGGCCAAAAGGAATTA GTTATCAAGAAGTTTGGCTAAATATCACAACTATTGGAACACTAGATTCTCAATTGAACCTAAGAAC CTTTATTCTTGGCGGCTTGAAGTATTCTGCCGCTGATGTAGCATGTTGGGGTGCTTAAAGATCCAATG GTATGTGCGGTTCCATCATCAAGAACAAGGTTGATGTTAACGTTTTCTCGTTGGTACACTTTGTTAGAA ATGGATCCCATCTTCGGCGAAGCTCACGATTTCTTGAGCAAATCTTACTAGAAATTAAGAAAAGTGC TAATGTGGGTAAGAAGAAGGAAACTCACAAGGCTAATTTGAAATGATTTGCCAGATGCCAAAATGG GTGAAGTCGCTCACTCGTTTTCCACCTGAACCTTCTGGATACTTACATATTGGACATGCCAAAGCTGCC TTGTTGAACCAATATTTGCTCAAGCTTACAAGGTAAGTTGATTATTAGATTGATGACACCAACCC ATCGAAGGAAAAGGAAGAAATCCAAGACTCTATTTGGAAGATTTGGATTATTAGGAATCAAGGGTG ATAGAATAACCTACTCATCTGACTACTCCAAGAAATGTACGACTACTGTGTTCAAATGATCAAGGAT GGTAAAGCTTACTGTGACGACACTCCAAGTAAAAGATGAGAGAAGAACGTATGGATGGTGTGCTTC TGCCAGAAGAGATCGTTCTGTTGAAGAGAAGTAAAGAGTTTTTACCAGAAGAAATGAAAAACGGTACTG AAGAAGGTTTGAAGAACTGTGTTGCTGCCAAGATCGATTACAAGGCTTTGAACAAGACTCTAAGAGAT CCTGTCAATTTACAGATGTAATCTAACCCCTCACACAGAACCGGATCAACTTGGAAGATCTACCCAAC TTATGATTTCTGTGCCAATTTGTTGATGCTATTGAAGGTGTTACCCACGCTTTACGTACCATTGAAT ATAGAGACCGTAACGCTCAATATGATTGGATGTTACAAGCTTTGCGTTTGAGAAAAGTCCATATTTGG GATTTGCTGCTATCAATTTGTTAGAACCTTGTGTTAAGAGAAAAGTTACAATGGATGGTTGACAA GGACTTGGTCGGAATTTGGGACGATCCAAGGTTCCAAGTGTGAGGGGTGTGAGAAGAAGAGGTATGA CTGTGCAAGGTTTGGAACTTCTGCTTATCCAAGGTTCCAGAAATGTCATTAACCTTGGAAATGG AACTTGATCTGGGCTTTCAACAAGAAGGTCATTGATCCAATGCTCCAAGACACACTGCTATCGTCAA CCCAGTAAAAATCCACTTGAAGGCTCCGAAGCTCCACAAGAACCAAGATTGAAATGAAACCAAAAC ACAAGAAAAACCCAGCTGTGGGCGAAAAGAAAGTCATTTACTACAAGACATTGTTGTCGACAAAGAT</p>	<p>MPSTLTINGKAPIVAYAE LIAARIVNALAPNSIAI KLVDKKAAPAAKLDLDATE DVFNKITSKFAAIFDNGD KEQVAKWVNLAQKELVIK NFAKLSQSLETLDSQLNL RTFILGLGLKYSAADVACW GALRSNGMCGSIIKKNVD VNVSRWYTLLEMDPIFGE AHDFLSKSLLELKKSANV GKKKETHKANFEIDLPA KMGEVVTRFPEPSGYLH IGHAKAALLNQYFAQAYK GKLIIRFDDTNP SKEKEE FQDSILEDLDDLGIKGRD ITYSSDYFQEMYDYCVQM IKDGMKAYCDDTPEKMR ERMDSVARSARRDRSVEEN LRIFTEEMKNGTEELKN VRAKIDYKALNKTLRDP VIYRCNLTPHRTGSTWK IYPTYDFCVPIVDAIEGV THALRTIEYRDRNAQYDW MLQALRLRKHVIWDFARI NFVRTLLSKRKLQWVMDK DLVGNWDDPRFPTVRGVR RRGMTVEGLRNFVLSQGP SRNVINLEWNLIAWFNKK VIDPIAPRHTAIVNPVKI HLEGSEAPQEPKIEKPK HKKNPAVGEKKVIYYKDI VVDKDDADVINVDEEVTL MDWGNVIITKKNDDGSMV AKLNLEGDFKTKHKLW LADTKDVVPVLDLVDLH ITKDRLEEDSFEDFLTP QTEFHDTAIDLNVKDMK IGDIIQFERKGYRLDAL PKDGKPYVFFTIPDGKSV NKYGAKK*</p>	HB

Gène	Séquence génétique	Séquence pro-téique	Source
<i>GUSI- Wt (suite)</i>	<p>GATGCTGACGTCATCAATGTTGATGAAGAAGTCACTTTAATGGACTGGGGTAATGTCATTATTACTAA AAAGAATGACGATGGTTCTATGGTTGCCAAATTAAGTTTGGAAAGGTGATTTCAAAAAGACCAAGCACA AGTTGACTTGGTTAGCTGATACTAAAGATGTCGTCCTGTTGATTTAGTTGACTTCGACCATTGATT ACCAAGGACAGATTGGAAGAAGACGAAAGTTTCGAAGATTTCTTGACTCCTCAAACAGAATCCACAC GGATGCCATTGCTGACTTGAATGTTAAGGATATGAAGATTGGTGATATCATCCAATTCGAAAGAAAGG GCTACTACAGATTGGATGCTTTACCCAAGGATGGTAAGCCATATGCTTTTTTACCATCCAGATGGT AAATCTGTCAACAAGTATGGTGCAAAAGAAATAAGCATCACATAAGTAATGTATATACATATTTATGT TATTTCTCAACCAGTACCTTTTGAACAATATCTTTTATAAGTGAATGGTTTGCTTTCTGAACCAGTCC TGTGTTGCTGCTTGAATCATGTAAGGATAGCAGCTTATGACATGTATGCTACCTATAGAAGTTG ACTGTAAAAGTTTATCATCCATTACCCGGTTTTGTAATTTTGACAATTTATATTTTATTGAAATGGT TCAAATAGTGACTACGAGCTGGAAGGAAAATATCAAAGTTACAAAAGGTACTTGAAGGATACCAAAG TTTGTAATTGTATTGCACTAATTTGTTGAGAGCACTATAGAAATGCTGATTTAGATGAGGATTTATT AGCCTTGGCTGGTGCCGATGAATCCGAAGAAGAAGATCAAGTTTTGACAACCTACATCTGCCAAAAGGG CAAAAAACAACGACCAATCTCTTTCCAAGAAAAGGAGAATTGAAGTCGGCAGTGTAGAGGATGATGAT GAGGAGGACGATTATAACCTTACTCTGTAGGAAATGCAGACTACGGTCCGAAGAAGAAGAAGAAGC TAATCCTTTTCCCTTGAAGGAAAGTACAAGGATGAGAGCGACAGAGACCTGGAATCCTTACCTG AAATGGAACGTGAGACTCTATATTTGAAAGATCTCAAATCATGCAGAAGTACCAGGAGAGGAAAATT TTTAGAGCACGTGGAAGAGATATGAAGGAACAACAACAGAGAGCCAAGAACGACGAAGATTCCAGAAA GACCAGAGCTTCCACTAGATCAACCCATGCTACTGGGCATTTGATATCAAGGCTTCAAACCTTTCGC AATTAAGAAAACAAGAGCGAGGAAAAACCGTCACTACAGCGATAATGAAGACGAAGACGATGAGGAA GATTACAGGGAAGAAGACTACAAGGACGATGAAGGGAGTGAATACGGGGATGATGAAGAATACAATCC TTTTGTCTAGAGGGGGCCCGGTACCCAGCTTTTGTTCCTTTAGTGAGGGTTAATCCGAGCTTGGC GTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATAGGAG CCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGGTAACCTACATTAATGCGTTGCGC TCACTGCCCGTTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGG GAGAGGGCGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTGCTC GGCTGCGGGCAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAAC GCAGGAAAAGACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGGCCCGTGTGCTGGC GTTTTTCCATAGGCTCGGCCCTTACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAA ACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTCCTCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCG ACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTCTCAATGCTC ACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGTTAGGTGCTGCTCCTCAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGG TTCAGCCCGACCGTGCCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTA TCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTT CTTGAAGTGGTGGCTAACTACGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGC CAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGTGGTAGCGGTGGT TTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTC TACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAA GGATCTTACCTAGATCCTTTAAATTAATAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAA ACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTTT ATCCATAGTTGCTGACTGCCCGTCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCA GTGCTGCAATGATACCCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCC GGAAGGGCCGAGCGAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCG GGAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCG TGGTGTACGCTCGCTTTGGTATGGCTTCAATCAGCTCCGGTTCCTAACGATCAAGGGCAGTTACA TGATCCCCATGTTGTGAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTT GGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTACTGTATGCCATCCGTAA GATGCTTTTCTGTGACTGGT<u>Gagtact</u></p>		

Gène	Séquence génétique	Séquence pro-téique	Source
<i>gusI-Sup</i>	<p>ctcgagGGTCGATATGCGGTGTGAAATACCGCACAGATGCGTAAGGAGAAAAACCGCATCAGGAAAT TGTAACGTTAATATTTTGTAAAAATTCGCGTTAAATTTTGTAAAAATCAGCTCATTTTTTAACCAAT AGGCCGAAATCGGC AAAATCCCTTATAAATCAAAAGAATAGACCGAGATAGGGTTGAGTGTGTTC GTTTGGAACAAGAGTCCACTATTAAGAAGCTGGACTCCAACGTCAAAGGGCGAAAAACCGTCTATCA GGCGATGGCCACTACTGTAACCATCACCTAATCAAGTTTTTGGGGTCGAGGTGCGGTAAAGCAC TAAATCGGAACCCATAAGGGAGCCCCGATTTAGAGCTTGACGGGAAAGCCGGCGAACGTGGCGAGA AAGGAAGGGAAGAAAGCGAAAGGAGCGGGCGCTAGGGCGCTGGCAAGTGTAGCGGTACAGCTGCGCGT AACCACCACCCCGCGCGCTTAATGCGCCGCTACAGGGCGCGTCCGCCATTGCCATTACAGGCTGC GCAACTGTTGGGAAGGGCGATCGGTGCGGGCTCTTCGCTATTACGCCAGCTGGCGAAGGGGGATGT GCTGCAAGGCGATTAAAGTTGGGTAACGCCAGGGTTTTCCAGTACAGACGTTGTA AAAACGACGGCCAG TGAATTGTAATACGACTCACTATAGGGCGAATTGGAGCTCTGTTCCGCAACTGCTGCGTACATTTCAA TTCGGCATAATGTTTTAAATGTCTCTACCGTTTTCTTAAAGTCAAATATACAATCCACCTCAGCAC CAAGAATTAACCTGCAAGTTACCTACACAGTTCTCACAACACTAATGTATTCATCTCCATGCGATACA ATCCTTTTAGTCTTTTTTCTATCACTTCACGGGGTGTACTGCAACGGATTGAAAAGAGTAGCCAA AGTTTTCAAAGTTGACCTGTAAATACATTGAGATCTTGATTATATTACGCCCTGCTTCAGTTGCGAG AGGAAGCCTTAGCTGCATTGACAGCTTCAGGCACTTCCTTGATAAAAAGTTGGCCGTTGAATGAAACG ATACGAAGATCAACTGTATTAAGAAGTGGAGAGTCAAATGCACATGAAATTAATTTCCGTGCTATTCC TCTAAAAGTAATTATATCAGCATTAAATTTTTTCTTTATGCTTTTCAGAGCTTCTATGGTTTCTA ATAGCCCACGCAGGGAACACCTGTCTTCAAAATCTTTGTAATAATCTTAAATTTCTGAAATCTGAT GAAAGATCCAAGTCTGTCCAATTCAGCGTCTGGAAGATAGTAGTAATTCAAATTCGTATCATCGCT AATTAATATCTTTCATCCTTAGTCTTGAATAGAATCCTATTCTTTGGCTGCTTCAGAGCTGTTG TCGACCTCTTTGCTTTACGAACAAATTTGCACTAACCCATTGGGATACACTATGTTGGTCTAATA TTTCGCTATTCTTACCATATTACAGAAGTATTAGTAACATTACCAGACCTCATCTGTTCTTAATAT TCTCGAAGTAAATTTTCAATTTACCCGAATGCTTACTCTTTTTTCTTCTCGTTAAAAGCAAGATA AAGTGA AAAAAATGGAAGATAACTCCATAAGAAATGACGAAACTATTTTCAAAGGTTAAGGAAAGCA TAGAAGGGATCAAGATGCCATCTACCTTGACTATTAATGAAAAGCCCCAATTTGGCTTATGCTGAA CTAATTGCTGCTGATTTGTAATGCGTTAGCTCCTAACCCATAGCTATTAAGTTGGTGGACGATAA GAAAGCACCTGCTGCAAGCTCGATGATGCTACTGAAGATGTCTTCAACAAGATAACTAGCAAATTCG CCGCCATCTTCGATAATGGTGATAAAGAGCAAGTTGCTAAATGGGTTAATCTGGCCAAAAGGAATTA GTTATCAAGAAGTTGCTAAATATCACAACTATTGAAACACTAGATTCTCAATTGAACCTAAGAAC CTTTATTCTTGGCGGCTTGAAGTATTCTGCCGCTGATGTAGCATGTTGGGGTCTTTAAGATCCAATG GTATGTGCGGTTCCATCATCAAGAACAAGGTTGATGTTAACGTTTTCTCGTTGGTACACTTTGTTAGAA ATGGATCCCATCTTCGGCGAAGCTCACGATTTCTTGAGCAAATCTTACTAGAAATTAAGAAAAGTGC TAATGTGGGTAAGAAGAAGGAAACTCACAAAGGCTAACCTTGAATTTGATTTGCCAGATGCCAAAATGG GTGAAGTCTGCTACTCGTTTTCCACCTGAACCTTCTGGATACTTACATATTGGACATGCCAAAGCTGCC TTGTTGAACCAATATTTGCTCAAGCTTACAAGGTAAGTTGATTATTAGATTGATGACACCAACCC ATCGAAGGAAAAGGAAGAAATCCAAGACTCTATTTGGAAGATTTGGATTATTAGGAATCAAGGGTG ATAGAATAACCTACTCATCTGACTACTTCCAAGAAATGTACGACTACTGTGTTCAAATGATCAAGGAT GGTAAAGCTTACTGTGACGACACTCCAAGTGAAGATGAGAGAAGAACGTATGGATGGTGTGCTTC TGCCAGAAGAGATCGTTCTGTTGAAGAGAAGTAAAGAAATTTTACCAGAAGAAATGAAAAACGGTACTG AAGAAGGTTTGAAGAACTGTGTTGTCGCAAGATCGATTACAAGGCTTTGAACAAGACTCTAAGAGAT CCTGTCAATTTACAGATGTAATCTAACCCCTCACACAGAACCGGATCAACTTGGAAGATCTACCCAAC TTATGATTTCTGTGCCAATTTGTTGATGCTATTGAAGGTGTACCACGCTTTACGTACCATTGAAT ATAGAGACCGTAACGCTCAATATGATTGGATGTTACAAGCTTTGCGTTTGAGAAAAGTCCATATTTGG GATTTCTGCTGATCAATTTGTTAGAACCTTGTGTTAAGAGAAAAGTTACAATGGATGGTTGACAA GGACTTGGTCGGAATTTGGGACGATCCAAGGTTCCAAGTGTGAGGGGTGTGAGAAGAAGAGGTATGA CTGTGCAAGGTTTGGAACTTCTGCTTATCCAAGGTTCCAGAAATGTCATTAACCTTGGAAATGG AACTTGATCTGGGCTTTCAACAAGAAGGTCATTGATCCAATGCTCCAAGACACACTGCTATCGTCAA CCCAGTAAAAATCCACTTGAAGGCTCCGAAGCTCCACAAGAACCAAGATTGAAATGAAACCAAAAC ACAAGAAAAACCCAGCTGTGGGCGAAAAGAAAGTCATTTACTACAAGACATTGTTGTCGACAAAGAT</p>	<p>MPSTLTINGKAPIVAYAE LIAARIVNALAPNSIAI KLVDKKAAPAKLDDATE DVFNKITSKFAAIFDNGD KEQVAKWVNLAQKELVIK NFAKLSQSLETLDSQLNL RTFILGLGLKYSAADVACW GALRSNGMCGSIIKNKVD VNVSRWYTLLEMDPIFGE AHDFLSKSLLELKKSANV GKKKETHKANFEIDLPA KMGEVVTRFPEPSGYLH IGHAKAALLNQYFAQAYK GKLIIRFDDTNP SKEKEE FQDSILEDLDDLGIKGR ITYSSDYFQEMYDYCVQM IKDYGKAYCDDTPEKMRE ERMDGVASARRDRSVEEN LRIFTEEMKNGTEEGLKN CIRAKIDYKALNKTLRDP VIYRCNLTPHHRGTSTWK IYPTYDFCVPIVDAIEGV THALRTIEYRDRNAQYDW MLQALRLRKHVIWDFARI NFVRTLLSKRKLQWMDVK DLVGNWDDPRFPTVRGVR RRGMTVEGLRNFVLSQGP SRNVINLEWNLIAWFNKK VIDPIAPRHTAIVNPVKI HLEGSEAPQEPKIEMKPK HKKNPAVGEKKVIYYKDI VVDKDDADVINVDEEVTL MDWGNVIITKKNDDGSMV AKLNLEGDFKKTCHKLTLW LADTKDVVPVLDLVDLHDL ITKDRLEEDSFEDFLTP QTEFHDTAIDLNVKDMK IGDIIQFERKGYRLDAL PKDGKPYVFFTIPDGKSV NKYGAKK*</p>	HB

Gène	Séquence génétique	Séquence pro-téique	Source
<i>gusI-Sup</i> (suite)	<p>GATGCTGACGTCATCAATGTTGATGAAGAAGTCACCTTAATGGACTGGGGTAATGTCATTATTACTAA AAAGAATGACGATGGTTCTATGGTTGCCAAATGAATTTGGAAGGTGATTTCAAAAAGACCAAGCACA AGTTGACTTGGTTAGCTGATACTAAAGATGTCGTCCTGTTGATTTAGTTGACTTCGACCATTGATT ACCAAGGACAGATTGGAAGAAGACGAAAGTTTCGAAGATTTCTTGACTCCTCAAACAGAATCCACAC GGATGCCATTGCTGACTTGAATGTTAAGGATATGAAGATTGGTGATATCATCCAATTCGAAAGAAAGG GCTACTACAGATTGGATGCTTTACCCAAGGATGGTAAGCCATATGCTTTTTTACCATCCAGATGGT AAATCTGTCAACAAGTATGGTGCAAAGAAATAAGCATCACATAAGTAATGTATATACATATTTATGT TATTTCTCAACCAGTACCTTTTGAACAATATCTTTTATAAGTGAATGGTTTGCTTTCTGAACCAGTCC TGTGTTGCTGCTTGAATCATGTAAGGATAGCAGCTTATGACATGTATGCTACCTATAGAACTTTG ACTGTAAAAGTTTATCATCCATTACCCGGTTTTGTAATTTTGACAATTTATATTTATTGAAATTGGT TCAAATAGTGACTACGAGCTGGAAGGAAAATATCAAAGTTACAAAAGGTACTTGAAGGATACCAAAG TTTGTAATTGTATTGCACTAATTTGTTGAGAGCACTATAGAAATGCTGATTTAGATGAGGATTTATT AGCCTTGGCTGGTGCCGATGAATCCGAAGAAGAAGATCAAGTTTTGACAACCTACATCTGCCAAAAGGG CAAAAAACAACGACCAATCTCTTTCCAAGAAAAGGAGAATTGAAGTCGGCAGTGTAGAGGATGATGAT GAGGAGGACGATTATAACCTTACTCTGTAGGAAATGCAGACTACGGTCCGAAGAAGAAGAAGAAGC TAATCCTTTTCCCTTGAAGGAAAGTACAAGGATGAGAGCGACAGAGACCTGGAATCCTTACCTG AAATGGAACGTGAGACTCTATTTTGAAGATCTCAAATCATGCAGAAGTACCAGGAGAGGAAAATT TTTAGAGCACGTGGAAGAGATATGAAGGAACAACAACAGAGAGCCAAGAACGACGAAGATTCCAGAAA GACCAGAGCTTCCACTAGATCAACCCATGCTACTGGGCATTCTGATATCAAGGCTTCAAACCTTTCGC AATTAAGAAAACAAGAGCGAGGAAAAACCGTCACTACAGCGATAATGAAGACGAAGACGATGAGGAA GATTACAGGGAAGAAGACTACAAGGACGATGAAGGGAGTGAATACGGGGATGATGAAGAATACAATCC TTTTGTCTAGAGGGGGCCCGGTACCCAGCTTTTGTCCCTTTAGTGAGGGTTAATCCGAGCTTGGC GTAATCATGGTCATAGCTGTTTCCCTGTGTGAAATTTGTTATCCGCTCACAATCCACACAACATAGGAG CCGGAAGCATAAAGTGTAAAGCCTGGGGTGCCTAATGAGTGAGGTAACCTACATTAATGCGTTGCGC TCACTGCCCGCTTCCAGTCGGGAAACCTGTCGTGCCAGTGCATTAATGAATCGGCCAACGCGCGGG GAGAGGGCGTTTTCGCTATTGGGCGCTCTTCCGCTTCCCTCGCTCACTGACTCGCTGCGCTCGGTCGTT GGCTGCGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAGGCGGTAATACGGTTATCCACAGAATCAGGGGATAAC GCAGGAAAAGACATGTGAGCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACCGTAAAAAGCCCGTGTGCTGGC GTTTTTCCATAGGCTCGGCCCTTACGAGCATCACAAAAATCGACGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAA ACCCGACAGGACTATAAAGATACCAGGCGTTCCCCCTGGAAGCTCCCTCGTGCGCTCTCCTGTTCCG ACCTGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCTTTTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTTCTCAATGCTC ACGCTGTAGGTATCTCAGTTCCGTTAGGTGCTTCCGCTCAAAGCTGGGCTGTGTGCACGAACCCCGG TTCAGCCCGACCGTCTGCGCTTATCCGGTAACCTATCGTCTTGAGTCCAACCCGGTAAGACACGACTTA TCGCCACTGGCAGCAGCCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGTATGTAGCGGTGCTACAGAGTT CTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAAGGACAGTATTTGGTATCTGCGCTCTGCTGAAGC CAGTTACCTTCGAAAAAGAGTTGGTAGCTCTTGATCCGGCAAACAACCACCGCTGGTAGCGGTGGT TTTTTTGTTTGAAGCAGCAGATTACGCGCAGAAAAAAGGATCTCAAGAAGATCCTTTGATCTTTTC TACGGGTCTGACGCTCAGTGAACGAAAACCTCACGTTAAGGGATTTTGGTCATGAGATTATCAAAAA GGATCTTACCTAGATCCTTTTAAATAAAAATGAAGTTTTAAATCAATCTAAAGTATATATGAGTAA ACTTGGTCTGACAGTTACCAATGCTTAATCAGTGAGGCACCTATCTCAGCGATCTGTCTATTTTCGTT ATCCATAGTTGCTGACTGCCCGTCTGTAGATAACTACGATACGGGAGGGCTTACCATCTGGCCCCA GTGCTGCAATGATACCCGAGACCCACGCTCACCGGCTCCAGATTTATCAGCAATAAACCCAGCCAGCC GGAAGGGCCGAGCGAGAAGTGGTCTGCAACTTTATCCGCCTCCATCCAGTCTATTAATTGTTGCCG GGAAGCTAGAGTAAGTAGTTGCCAGTTAATAGTTTGCACAACGTTGTTGCCATTGCTACAGGCATCG TGGTGTACGCTCGCTTTGGTATGGCTTCAATCAGCTCCGGTCCCAACGATCAAGGGCAGTTACA TGATCCCCATGTTGTGAAAAAAGCGGTTAGCTCCTTCGGTCTCCGATCGTTGTCAGAAGTAAGTT GGCCGAGTGTATCACTCATGGTTATGGCAGCACTGCATAATCTCTTACTGTATGCCATCCGTAA GATGCTTTTCTGTGACTGGT<u>Gagtact</u></p>		

3.3 Caractérisation des acides nucléiques

3.3.1 Dosage des acides nucléiques

Les acides nucléiques ont un maximum d'absorption à λ 260 nm. Il est donc possible de déterminer les concentrations de ces molécules dans des échantillons par mesures spectrophotométriques. Le calcul effectué est le suivant :

$$\text{Concentration } (\mu\text{g/mL}) = \text{Absorbance à } \lambda \text{ 260 nm} * C (\mu\text{g/mL})$$

C représentant la concentration en acide nucléique par unité d'absorbance, soit 50 pour les molécules d'ADN double brins et 40 pour les ARN simple brin. Les sels et protéines ayant un maximum d'absorption à respectivement λ 230 nm et λ 280 nm, il est également possible de vérifier la pureté d'un échantillon d'acides nucléiques. Les rapports $A_{260\text{nm}}/A_{230\text{nm}}$ et $A_{260\text{nm}}/A_{280\text{nm}}$ sont utilisés dans ce but, et un échantillon est considéré comme correctement purifié si le résultat est inférieur à 1,8 pour les protéines et 2 pour les sels.

Les différentes mesures sont réalisées sur un échantillon de 1 μL à l'aide de l'appareil NANODROP de la société THERMOSCIENTIFIC.

3.3.2 Détermination de la séquence nucléotidique par séquençage

3.3.2.1 Séquençage d'un gène

La réaction de séquençage est basée sur une méthode décrite par Sanger *et al.* (1977), impliquant une élongation abortive d'un brin d'ADN complémentaire au brin matrice. Cet arrêt de l'élongation se produit lorsqu'un ddNTP est incorporé aléatoirement dans le brin néosynthétisé. Ce ddNTP ne possède pas, au contraire des dNTP, d'extrémité 3' OH (remplacée par un 3' H) nécessaire à l'établissement de la liaison phosphodiester avec le 5' phosphate suivant. Dans le cas d'une réaction de séquençage, chaque ddNTP est marqué à l'aide d'un fluorochrome différent, avec un spectre d'émission spécifique. Les conditions de la réaction sont optimisées pour que chaque position soit statistiquement occupée par un ddNTP. Ceci va générer un ensemble de brins de taille différente, migrant à des positions différentes sur gel de séparation, et ayant un spectre d'émission spécifique correspondant au ddNTP incorporé à la position d'arrêt de l'élongation. Le nucléotide correspondant à cette position est donc le complémentaire de celui incorporé. La séquence du brin matrice peut alors être déterminée en examinant quel ddNTP a été incorporé à chacune des positions.

Les réactions de séquençage engagent de 2 à 20 ng/ μL d'ADN matrice. Sont ajoutés dans le mélange réactionnel l'enzyme Big Dye Terminator v3.1 (1X) de la société APPLIED BIOSYSTEMS et son tampon (1X, contient également les ddNTP marqués), 0,5 μM d'une amorce (voir tableau II.3.3 page 96 pour les séquences des amorces et leur température de fusion), et le mélange réactionnel est complété à 20 μL avec de l'eau stérile.

Le programme de réaction utilisé est le suivant : 96 °C 1 minute ; 25 cycles [dénaturation à 96 °C 10 secondes ; hybridation à 50 °C 5 secondes ; élongation à 60 °C 4 minutes]. Le produit de réaction est ensuite séquencé par la section Génotypage et Séquençage du Pôle de Génomique Fonctionnelle de l'Université de Bordeaux Segalen.

3.3.2.2 Séquençage global d'un génome

Le protocole de séquençage d'un génome entier est dérivé de celui décrit par Lefrançois *et al.* (2009). La technologie de séquençage *Illumina sequencing* consiste en la génération d'une

banque de fragments d'ADN génomique de 200 à 500 pb sur lesquels sont ligués des adaptateurs nucléotidiques de séquence connue. Un support sur lequel est fixé une molécule d'ADN simple brin complémentaire de l'un des adaptateurs est utilisé pour fixer les fragments d'ADN – auparavant dénaturés – par hybridation. Plusieurs amplifications de ces ADN sont effectuées, et chacune des copies est fixée de manière covalente sur le support. Après plusieurs cycles d'amplification-fixation, les *clusters* générés sont tout d'abord débarrassés des brins antisens complémentaires, puis ligués à un adaptateur complémentaire à une amorce de séquence connue. Un séquençage base par base est enfin effectué sur l'ensemble des clusters.

Les ADN génomiques des souches séquencées ont été extraits puis séquencés par l'EMBL de Heidelberg, en collaboration avec Lars STEINMETZ.

3.3.3 Séparation sur gel d'électrophorèse

Cette technique utilise le fait que, dans un tampon alcalin, les brins d'ADN sont chargés négativement. Si un champ électrique est appliqué dans une solution contenant des brins d'ADN, ceux-ci vont migrer vers l'anode. Si ces brins sont placés dans un gel d'agarose, qui possède un "maillage" plus ou moins dense selon sa concentration, ils seront séparés selon leur taille (plus il sont petits, plus rapidement ils traverseront le maillage du gel).

Les solutions contenant l'ADN sont déposées sur gel d'agarose 1 à 1,5 % m/v, constitué par de l'agarose dissous à chaud dans du tampon [tris 40 mM ; acide acétique 20 mM ; EDTA 1 mM ; pH 8]. Après refroidissement de la solution (température inférieure à 60 °C), le marqueur d'acides nucléiques GelRed de la société BIOTIUM est ajouté (0,5 X final). Ce marqueur est un révélateur d'acides nucléiques fluorescent aux UV. Le gel est placé dans un bain de tampon [tris 40 mM ; acide acétique 20 mM ; EDTA 1 mM ; pH 8], et un courant de 100 V est appliqué en continu, pendant 20 à 35 minutes. Le gel est ensuite placé sous lampe à UV et photographié.

3.3.4 Analyses par Southern et Northern blot

La description détaillée de ces protocoles peut être retrouvée dans l'article publié dans Plos Genetics inclus en partie III chapitre 1 page 115.

3.3.5 Transcriptomique

La description détaillée de ce protocole peut être retrouvée dans l'article publié dans Plos Genetics inclus en partie III chapitre 1 page 115.

3.4 Manipulation de fragments d'ADN

3.4.1 Digestion enzymatique

Les enzymes de restriction sont des endonucléases qui séparent deux fragments d'ADN à des positions spécifiques, la plupart étant des séquences palindromiques. Les coupures peuvent être franches (au même niveau sur les deux brins) ou décalées (les extrémités seront donc cohésives).

La digestion totale d'un échantillon d'ADN est obtenue avec 5 Unités d'activité enzymatique/ μ g d'ADN après une incubation de 90 à 120 minutes (au minimum) dans le tampon fourni par le fabricant et à température optimale de catalyse de l'enzyme. Les ADN génomiques sont digérés entre 180 et 210 minutes. Les enzymes sont ensuite inactivées par la chaleur selon les recommandations du fabricant, généralement par un traitement de 15 minutes à 65 °C.

3.4.2 Ligation de fragments d'ADN

Au contraire des nucléases, les ligases sont des enzymes catalysant la formation d'un lien phosphodiester entre deux fragments d'ADN, que les extrémités soient franches ou cohésives.

Les réactions de ligation ont été réalisées avec de la ligase du phage T4. Au mélange d'ADN est additionné 1 U/ μ g de ligase, ainsi que son tampon fourni par le fabricant (dilution 1X). Le mélange réactionnel, complété à 20 μ L avec de l'eau stérile, est incubé à 16 °C pendant 12 heures.

3.4.2.1 Clonage classique

Les fragments d'ADN linéarisés des vecteurs et inserts sont mélangés selon un ratio insert :vecteur de 2 :1. La masse engagée de chacun d'eux est calculée à l'aide de la formule :

$$\text{masse de l'insert (ng)} = \text{ratio insert :vecteur} * \frac{\text{taille de l'insert (pb)}}{\text{taille du vecteur (pb)}} * \text{masse du vecteur (ng)}$$

Une ligation est ensuite effectuée entre insert et vecteur. Le mélange réactionnel est précipité à l'éthanol, et une digestion enzymatique est réalisée (si possible) au niveau d'un site de restriction présent sur le vecteur, mais qui aurait disparu avec l'insertion de l'insert. Cette opération permet de linéariser les vecteurs qui se seraient recircularisés sans insert, augmentant ainsi l'efficacité du clonage. Après inactivation de ces enzymes, le mélange réactionnel est précipité à l'éthanol, puis utilisé pour une transformation de bactéries par électroporation. La liste des sites de restriction utilisés pour les clonages est disponible dans le tableau II.3.1 page 78.

3.4.2.2 Clonage par *gap repair*

Cette technique consiste à utiliser les capacités de recombinaison d'ADN de la levure *Saccharomyces cerevisiae* pour recirculariser un vecteur linéarisé avec une séquence-cible, soit un fragment d'ADN obtenu par digestion enzymatique ou amplification par PCR, soit située sur l'ADN génomique de la souche.

Le vecteur d'intérêt est, au préalable, linéarisé par digestion enzymatique. Les sites de restrictions utilisés sont variables selon l'expérimentation, en général, deux sites de restriction différents sont privilégiés, situés à l'intérieur de la zone à remplacer, ce qui permettra d'éviter une recircularisation du vecteur sans recombinaison. Lorsqu'un seul site de restriction est utilisé, il est possible de déphosphoryler les extrémités à l'aide d'une enzyme phosphatase alcaline, empêchant ainsi une recircularisation sans recombinaison. Sont conservées, entre vecteur et insert, des séquences homologues de 50 à 300 pb situées aux extrémités 5' et 3', qui serviront à la recombinaison.

Les fragments d'ADN linéarisés du plasmide d'intérêt sont transformés (ou co-transformés avec les inserts, un ratio insert :vecteur de 3 :1 est utilisé) dans la souche de levure qui sera ensuite étalée sur le milieu de sélection du marqueur d'auxotrophie porté par le plasmide. Survivront sur ce milieu les cellules ayant pu refermer ce plasmide par recombinaison. Le plasmide est ensuite extrait des différents clones puis vérifié par restriction enzymatique et séquençage.

3.4.3 Amplification de fragments d'ADN par PCR

L'amplification de fragments d'ADN est effectuée à l'aide de la réaction en chaîne de la polymérase. Cette réaction consiste à effectuer une copie d'une séquence d'ADN à partir d'une matrice présente en faible quantité, et ce à l'aide d'amorces nucléotidiques (fragments simples brins initiateurs de l'élongation). Les copies deviendront également les matrices de nouvelles

copies, augmentant ainsi de manière exponentielle le nombre de copies de la séquence originelle. Cette réaction réalisée *in vitro* utilise les capacités de résistance thermique des ADN polymérase des bactéries thermophiles comme *Thermophilus aquaticus*. Il est ainsi possible de réaliser en un tube une suite de réactions, allant de la séparation des brins d'ADN (dénaturation), à l'hybridation des brins amorces et matrices, puis à l'élongation avec l'enzyme polymérase et les dNTP présents dans la solution. Ce cycle est répété un certain nombre de fois (n), permettant de générer (dans les conditions idéales) 2^n copies du même fragment.

Différentes enzymes polymérase ont été utilisées dans cette étude. Pour une haute efficacité ou une haute fidélité d'amplification (taux de mutation bas), l'ADN polymérase Phusion de la société NEW ENGLAND BIOLABS a été utilisée. Les programmes de PCR et les tampons utilisés sont ceux recommandés par les différents fabricants.

Un tube de PCR classique contient généralement [0,01 à 0,2 U/ μ L d'enzyme polymérase ; tampon de l'enzyme (commercial) 1X ; au minimum 0,6 ng/ μ L d'ADN matrice ; 2 fois 0,2 μ M d'amorces (deux amorces, une dans le sens 5'-3' du brin à amplifier et une dans le sens 3'-5') ; 0,2 mM de chacun des quatre dNTP ; MgCl₂ 0,5 à 2 mM]. Le programme PCR utilisé est généralement [95 °C 0,5 à 5 minutes ; 25 à 35*(95 °C 30 secondes = dénaturation ; X °C 30 secondes = hybridation ; 72 °C 30 secondes / kpb à amplifier = élongation) ; 72 °C 4 minutes]. La température d'hybridation dépend de la température de fusion (T_m) de chacune des amorces utilisées (voir table II.3.3 page suivante pour les températures d'hybridation utilisées).

3.4.3.1 Liste des amorces utilisées

Les amorces utilisées durant cette étude sont décrites dans la table II.3.3 page suivante.

Nom	séquence(5'-3')	taille (pb)	T _m (°C)	Brin	Utilisation	Séquence génétique	Position du nucléotide en 5' de l'amorce
pCM189-A	GTTGTGGAAATGTGAGCGG	21	63	W	séquençage de l'insert du pCM189 ou pCM190	pCM189 ou pCM190	(Site <i>Bam</i> HI ggatcC = 0) + 380
pCM189-D	ACTACTACTTCTATAGACACGC	21	54	C			(Site <i>Bam</i> HI ggatcC = 0) - 68
Kan1	ATCGGAGCCCAATTATACCC	21	63	W	Vérification par PCR des délétions par <i>KANMX4</i>	<i>KANMX4</i>	(Codon Initiateur Atg = 1) + 87
Kan2	CTCCTTCATTACAGAAACGGC	21	59	C			(Codon Initiateur Atg = 1) + 713
Δ YME1 2 For	CTGGTCGGGATTCGGATGC	20	64	C	cassette de délétion Δ <i>yme1</i> :: <i>KANMX4</i>	<i>YME1</i>	(Codon Initiateur Atg = 1) - 345
Δ YME1 Rev	GGGATGAAAGAAATTAATAACCC	23	56	W			(Codon Initiateur Atg = 1) + 2536
dyme1b For	CCATTATACGTTCTTCAATAG	21	52	C	Vérification de la délétion Δ <i>yme1</i> :: <i>KANMX4</i>		(Codon Initiateur Atg = 1) - 454
dyme1b Rev	ACTCGGTTCCATGGTGTGAC	20	63	W			(Codon Initiateur Atg = 1) + 2598
Δ YTA10 For	CGTGATCGGAACACTCTCACC	20	61	C	cassette de délétion Δ <i>yta10</i> :: <i>KANMX4</i>		(Codon Initiateur Atg = 1) - 301
Δ YTA10 Rev	GAGGTCAAATGGTAACGAAGG	20	59	W			(Codon Initiateur Atg = 1) + 2582
dyta10b For	GTTGCAGCTTCGTGTACTACC	21	62	C	Vérification de la délétion Δ <i>yta10</i> :: <i>KANMX4</i>	<i>YTA10</i>	(Codon Initiateur Atg = 1) - 406
dyta10b Rev	CATTATACGGTTCGTCAAGAAGG	24	60	W			(Codon Initiateur Atg = 1) + 2734
YTA10 seq 1	TATCCCATCAAAATACATTTG	20	53	C	séquençage de la position SUP de <i>yta10-Sup</i>		(Codon Initiateur Atg = 1) + 638
YTA10 seq 2	AAAGCATTATCCAACACATC	20	54	W			(Codon Initiateur Atg = 1) + 1332
YTA12 seq 2	GGAGCTAAAATTCCTAGAG	19	52	C	séquençage de la position SUP de <i>yta12-Sup</i>	<i>YTA12</i>	(Codon Initiateur Atg = 1) + 1127
YTA12 seq 3	ACTTGTAACTGATGGGAATG	21	56	W			(Codon Initiateur Atg = 1) + 2050
Δ GUS1 For	TGTCCAATTCAGCGTCTGGAAG	22	63	C	cassette de délétion Δ <i>gus1</i> :: <i>KANMX4</i>	<i>GUS1</i>	(Codon Initiateur Atg = 1) - 358
Δ GUS1 Rev	CCAGCCAAGGCTAATAATCC	21	59	W			(Codon Initiateur Atg = 1) + 2561
dgus1b For	GGTTTCTAATAGCCACCGCAGG	22	64	C	Vérification de la délétion Δ <i>gus1</i> :: <i>KANMX4</i>		(Codon Initiateur Atg = 1) - 450
dgus1b Rev	ACACTGCCGACTTCAATTCTC	21	61	W			(Codon Initiateur Atg = 1) + 2672
Universal	ACGTTGTAATAACGACGGCCAG	21	64	C	(sur le génome nucléaire)	pRS315	(Site <i>SacI</i> gagctC = 0) - 62

TABLE II.3.3: Liste des amorces nucléotidiques utilisées dans cette étude

Une liste complémentaire d'amorces utilisées peut être retrouvée dans les articles publiés dans *Plos Genetics* et *Molecular Biology and Evolution*, inclus respectivement à la suite des chapitres 1 page 115 et 3 page 181. Les températures de fusion (T_m) ont été calculées pour une réaction de PCR contenant $[MgCl_2$ 1,5 mM ; amorces 200 nM ; cations monovalents 50 mM ; dNTP 0,2 mM]. La position du nucléotide 5' des amorces a pour référentiel le numéro attribué au nucléotide en majuscule du site indiqué. C : Crick ; W : Watson.

3.4.3.2 Amplification sur colonie de bactéries

Une colonie de bactéries est déposée dans 100 µL d'eau stérile. 10 µL seront utilisés comme matrice pour la réaction de PCR. La première étape du programme étant un passage de 95 °C pendant 3 à 5 minutes, les cellules seront lysées et leur ADNg libéré. La suite du protocole est identique à celui décrit ci-dessus. Le reste des cellules resuspendues dans l'eau pourra servir à ensemercer du milieu LBA.

3.4.3.3 Amplification sur colonie de levures

Une colonie de levures de taille moyenne est prélevée et resuspendue dans 30 µL de SDS 0,2 % m/v. Ce mélange est vortexé pendant 30 secondes, chauffé 4 minutes à 90 °C, puis centrifugé 1 minute à 16 000 g. Le surnageant est récupéré et utilisé comme matrice dans des réactions de PCR (1 à 10 µL).

3.4.3.4 PCR quantitative en temps réel

La description détaillée du protocole de PCR quantitative en temps réel utilisé avec *Podospora anserina* peut être retrouvée dans l'article publié dans Molecular Biology and Evolution inclus en partie III chapitre 3 page 181.

3.5 Isolement d'acides nucléiques

3.5.1 Précipitation à l'éthanol

L'ADN en solution est une molécule polaire, du fait de la charge négative portée par le squelette de phosphates. L'eau est, du fait de sa haute polarité, un excellent solvant pour les molécules polaires, qui auront de meilleures interactions électrostatiques avec les molécules d'eau que les cations en solution.

Le principe de précipitation à l'éthanol permet de diminuer l'interaction qu'a la molécule d'ADN avec l'eau (l'éthanol étant un solvant moins polaire que l'eau) au profit des cations présents, comme le sodium Na⁺. Cette association formera un précipité, qui peut être séparé du solvant.

À la solution d'acides nucléiques à précipiter sont additionnés 10 % v/v d'acétate de sodium 3 M et 200 % v/v d'éthanol absolu. Le mélange est refroidi 15 minutes à -80 °C puis centrifugé à 16 000 g 20 minutes. Les culots sont lavés dans 500 µL d'éthanol 70 % v/v, séchés sous cloche à vide 5 à 15 minutes puis resolubilisés dans 50 µL d'eau stérile ou de solution [tris-EDTA 10 :1 mM pH 7,5].

3.5.2 Purification sur gel d'électrophorèse

Les acides nucléiques sont séparés par électrophorèse sur gel d'agarose, puis la portion de gel contenant le fragment d'ADN d'intérêt (repéré par sa taille en kpb) est découpée. L'extraction de l'ADN du gel est effectuée à l'aide du kit commercial QIAEX II Gel Extraction Kit de la société QIAGEN, selon les recommandations du fabricant.

3.5.3 Préparation d'ADN génomique

Le protocole d'extraction d'ADNg repose sur la lyse des cellules dans une solution contenant du phénol/chloroforme saturées en eau, puis la séparation des phases organique (contenant les protéines et lipides) et aqueuse (contenant les acides nucléiques). Les ARN restants sont ensuite retirés par digestion enzymatique avec une ARNase. Le tris-EDTA est un solvant permettant de

chélater les ions bivalents, nécessaires aux nucléases, et l'alcool isoamylique est utilisé comme antimoussant et pour une meilleure visualisation de la séparation des phases.

2 mL d'une culture dense de la souche de levure contenant le plasmide à extraire sont centrifugés à 16 000 g pendant 1 minute, le culot de cellules repris dans 1 mL d'eau stérile et recentrifugé. Le culot de cellules est repris dans 200 µL de tampon [triton X100 2 % m/v ; NaCl 100 mM ; tris 10 mM pH 7,4 ; EDTA 1 mM ; SDS 1 % m/v], y sont ajoutés 200 µL de [phénol/chloroforme/alcool isoamylique 25 :24 :1] et 0,3 g de billes 0,45-0,52 mm (approximés à l'équivalent de 300 µL d'eau). Le mélange est vortexé 30 secondes 6 fois, avec une pause de 30 secondes entre chaque agitation. À ce mélange sont ajoutés 200 µL de [tris-EDTA 10 :1 mM pH 7,5]. Le mélange est ensuite centrifugé 5 minutes à 16 000 g.

La phase aqueuse est prélevée, et 200 µL de [phénol/chloroforme/alcool isoamylique 25 :24 :1] lui sont ajoutés. Le mélange est vortexé 30 secondes puis centrifugé 5 minutes à 16 000 g. La phase aqueuse est prélevée et un nouveau traitement au [phénol/chloroforme/alcool isoamylique 25 :24 :1] est effectué. La phase aqueuse est ensuite précipitée à l'éthanol.

Le culot est repris dans 400 µL de [tris-EDTA 10 :1 mM pH 7,5] et 1 µL de ARNase A à 2 U/µL est ajouté, qui va digérer les ARN contenus dans la solution. Le mélange est incubé à 37 °C pendant 20 minutes. 5 µL d'acétate d'ammonium 8 M et 1 mL d'éthanol absolu sont ajoutés à la solution qui est ensuite centrifugée 5 minutes à 16 000 g, le culot est enfin lavé avec 500 µL d'éthanol à 70 % v/v et séché. Le culot est ensuite repris dans 50 µL de solution [tris-EDTA 10 :1 mM pH 7,5], puis l'ADN en solution est dosé et vérifié par restriction enzymatique avec l'enzyme *EcoRI*. Une digestion à 37 °C pendant 1 heure 30 minutes de 5 µg d'ADNg est effectuée, puis analysé par séparation sur gel d'électrophorèse d'ADNg non digéré et digéré.

3.5.4 Récupération de plasmides

3.5.4.1 Plasmides dans des souches de bactéries

L'extraction d'un plasmide de souches de bactéries est réalisé à l'aide du kit commercial QIAprep Spin Miniprep Kit de la société QIAGEN, selon les recommandations du fabricant. Cette extraction est réalisée à l'aide d'une lyse alcaline des cellules, qui va permettre de libérer l'ADN contenu dans ces dernières sous forme dénaturée. Une acidification de la solution avec de l'acétate de potassium permet de renaturer l'ADN plasmidique mais pas chromosomique, qui formera alors un précipité qui sera éliminé.

3.5.4.2 Plasmides dans des souches de levures

L'extraction de plasmides de levure se base au départ sur le même protocole que l'extraction d'ADNg. 2 mL d'une culture dense de la souche de levure contenant le plasmide à extraire sont centrifugés à 16 000 g pendant 1 minute, le culot de cellules repris dans 1 mL d'eau stérile et recentrifugé. Le culot de cellules est repris dans 200 µL de tampon [triton X100 2 % m/v ; NaCl 100 mM ; tris 10 mM pH 7,4 ; EDTA 1 mM ; SDS 1 % m/v], y sont ajoutés 200 µL de [phénol/chloroforme/alcool isoamylique 25 :24 :1] et 0,3 g de billes 0,45-0,52 mm (approximés à l'équivalent de 300 µL d'eau). Le mélange est vortexé 30 secondes 6 fois, avec une pause de 30 secondes entre chaque agitation. Le mélange est ensuite centrifugé 5 minutes à 16 000 g, et la phase aqueuse est soumise à une précipitation à l'éthanol.

L'ADN, auparavant dissous dans de l'eau ou du tampon [tris-EDTA 10 :1 mM pH 7,5], est transformé par électroporation dans une souche d'*Escherichia coli*, puis étalé sur milieu bactérien sélectif, contenant l'antibiotique adéquat (ici de l'ampicilline à 100 mg/mL). Une extraction des plasmides est ensuite réalisée sur les souches de bactéries. Le plasmide est vérifié par restriction enzymatique.

3.5.5 Préparation d'ARN totaux

La description détaillée de ce protocole peut être retrouvée dans l'article publié dans Plos Genetics inclus en partie III chapitre 1 page 115.

3.5.6 Extraction d'acides nucléiques de *Podospora anserina*

La description détaillée des protocoles d'extraction d'acides nucléiques utilisés chez *Podospora anserina* peut être retrouvée dans l'article publié dans Molecular Biology and Evolution inclus en partie III chapitre 3 page 181.

Chapitre 4

Techniques de biochimie

Sommaire

4.1	Analyse sur mitochondries isolées de levure	102
4.1.1	Préparation de mitochondries isolées	102
4.1.2	Mesure de la consommation d'oxygène <i>ex vivo</i>	103
4.1.3	Quantification de la production d'ATP	104
4.1.4	Analyse du potentiel membranaire $\Delta\Psi$	104
4.1.5	Estimation de l'activité hydrolitique de l'ATPase	105
4.1.6	Visualisation des complexes ATP synthases sur gel	105
4.2	Caractérisation du protéome de la levure	106
4.2.1	Marquage <i>in vivo</i> des produits de la traduction mitochondriale	106
4.2.2	Purification des complexes ATP synthases	106
4.2.3	Préparation d'extraits cellulaires totaux	106
4.2.4	Fractionnement cellulaire	106
4.3	Dosage des protéines par colorimétrie	107
4.4	Analyse des extraits protéiques	107
4.4.1	Tampon de charge	107
4.4.2	Séparation par électrophorèse sur gel dénaturant	107
4.4.3	Séparation par électrophorèse sur gel en bleu natif	107
4.4.4	Transfert sur membrane	108
4.4.5	Analyse par immunodétection	108
4.4.6	Liste des anticorps utilisés	108

4.1 Analyse sur mitochondries isolées de levure

Les analyses biochimiques réalisées dans cette étude impliquent de réaliser en premier lieu une préparation de mitochondries. Basée sur un protocole décrit par Guérin *et al.* (1979), cette expérience consiste à fractionner le contenu cellulaire par différentes techniques de digestion enzymatique par la zymolyase et séparation mécanique, puis à récupérer par centrifugation différentielle les fractions enrichies en mitochondries dans un tampon isoosmotique. Elles peuvent être ensuite utilisées dans diverses expérimentations décrites ci-après.

Les expériences réalisées nécessitent l'utilisation de différentes molécules, par exemple des substrats comme le NADH, qui va donner des électrons aux NADH déshydrogénases en début de chaîne respiratoire – les électrons vont devoir passer par l'ensemble des complexes respiratoires, et donc la vitesse de consommation d'oxygène est dépendante de l'activité de chacun d'eux –, et le couple ascorbate / TMPD (pour TriMéthyl-PhénylèneDiamide) qui permet de stimuler uniquement le complexe IV (cytochrome c oxydase) en fin de chaîne respiratoire. L'éthanol peut également être utilisé comme substrat. Converti en éthanal par l'ADH (alcool déshydrogénase), il va générer une molécule de NADH à partir des NAD⁺ contenus dans les mitochondries.

Le cyanure de potassium (KCN) va, au contraire, inhiber l'activité de transfert d'électrons de ce complexe vers l'oxygène accepteur, ceci ayant pour effet de paralyser la chaîne des OXPHOS. Le CCCP (pour Carbonyl-Cyanide-m-Chloro-Phénylhydrazone) va servir de découplant, il va faciliter la fuite de protons hors de l'espace inter-membranaire. Cette fuite, détectée par la chaîne respiratoire, va stimuler cette dernière.

En ce qui concerne le complexe V, l'ATP synthase, l'ADP et l'ATP vont servir de substrats pour être soit phosphorylé (ADP) soit hydrolysé (ATP). La phosphorylation consommera une partie du gradient de protons, et stimulera la chaîne respiratoire. À l'inverse, l'hydrolyse d'ATP participera à la génération de ce gradient. Ces réactions peuvent être inhibées par l'oligomycine, qui va bloquer le passage de protons au travers du canal à protons.

4.1.1 Préparation de mitochondries isolées

Une préculture de la souche d'intérêt est utilisée pour ensemercer deux fioles de 1 L de milieu de culture à une DO_{650 nm} pré-déterminée, tenant compte du temps de culture (calculé pour 5 à 7 générations) et de la densité optique (DO) finale comprise entre 2 et 4 DO_{650 nm}/mL (correspondant à des cellules en phase exponentielle). Sauf précision, les différentes étapes du protocole suivant sont effectuées à 4 °C.

Les cellules sont récoltées par centrifugation à 4 000 g 5 minutes. Un lavage à l'eau distillée stérilisée froide est effectué. Les levures sont traitées avec une solution de [tris 0,1 M ; β-mercaptoéthanol 0,5 M ; pH 9,3] à raison de 20 mL/g de poids sec, estimé selon la formule :

$$\text{poids sec (g)} = \text{DO}_{650\text{nm}}/\text{mL} * \text{volume total de culture (L)} * 0,28$$

Les cellules sont ainsi incubées 10 minutes à 32 °C. Le contenant est complété avec un tampon [tris 10 mM ; KCl 0,5 M ; pH 7] puis centrifugé à 4 080 g 5 minutes. Le culot est lavé deux fois avec le même tampon, puis repris dans 10 mL/g de poids sec de tampon [sorbitol 1,35 M ; EGTA 1 mM ; acide citrique 10 mM ; phosphate disodique 30 mM ; pH 5,8] et complété avec 15 mg/g de poids sec de zymolyase, placé en incubation à 32 °C durant 20 minutes. La zymolyase est une enzyme effectuant une digestion de la paroi cellulaire, vérifiée au microscope optique par choc osmotique létal sur les protoplastes : 4 µL de la solution de digestion sont mélangés à 15 µL d'eau distillée, puis 4 µL de ce mélange est déposé entre lame et lamelle. Dans le cas où la digestion n'est pas complète, la durée d'incubation peut être rallongée.

Les protoplastes sont ensuite lavés deux fois avec un tampon [sorbitol 0,75 M ; mannitol 0,4 M ;

tris / maléate 10 mM ; BSA 0,1 % m / v ; pH 6,8], le culot est homogénéisé au piston de Potter entre chaque lavage et centrifugé 12 000 g 5 minutes. Les protoplastes sont ensuite repris dans un tampon [mannitol 0,6 M ; EGTA 2 mM ; tris / maléate 10 mM ; BSA 0,2 % m / v ; acide aminocaproïque 10 mM ; parabenamidine 2 mM ; pH 6,8], homogénéisés au piston de Potter puis lysés au mixer (WARING BLENDER) 3 fois 5 secondes.

Le mélange est ensuite centrifugé à basse vitesse à 750 g 8 minutes. Le surnageant est récupéré. Le culot est rehomogénéisé puis recentrifugé, le dernier culot contient les débris cellulaires et cellules entières, et n'est pas conservé. Les surnageants des deux centrifugations à basse vitesse sont centrifugés pendant 10 minutes à 12 000 g. Le culot de mitochondries obtenu est ensuite resuspendu avec un tampon [mannitol 0,6 M ; EGTA 2 mM ; tris / maléate 10 mM ; acide aminocaproïque 10 mM ; parabenamidine 2 mM ; pH 6,8], homogénéisé au piston de Potter puis recentrifugé à 750 g pendant 8 minutes. Le surnageant est récupéré et centrifugé pendant 10 minutes à 12 000 g. Un maximum de surnageant est ensuite éliminé.

Le culot de mitochondries obtenu est resuspendu à la pipette Pasteur dans le surnageant résiduel, homogénéisé au piston de Potter puis transvasé dans un tube à hémolyse. De cette préparation, 5 μ L sont prélevés et solubilisés dans 95 μ L de SDS 5 % m / v et incubés à 37 °C durant 30 minutes. Cette solution diluée est utilisée pour déterminer la concentration de protéines mitochondriales par la technique de dosage colorimétrique de Lowry.

Les mitochondries fraîches restantes après analyses sont congelées par projection sur azote liquide, et les billes formées sont conservées à -80 °C.

4.1.2 Mesure de la consommation d'oxygène *ex vivo*

Les vitesses de consommation d'oxygène en fonction de l'ajout de certaines drogues, substrats ou inhibiteurs de la chaîne respiratoire et du complexe ATP synthase sont mesurées sur mitochondries isolées fraîches.

L'état 3 traduit l'état phosphorylant des mitochondries, lorsque l'ATP synthase synthétise de l'ATP à partir d'ADP, de P_i et du gradient de protons. La consommation du gradient va être détectée par la chaîne respiratoire, qui va s'activer pour le rétablir et ainsi consommer l'oxygène ambiant, ce qui se traduit par une diminution plus ou moins rapide de la quantité d'oxygène présente dans le milieu. L'accélération de la vitesse de consommation induite par cet état peut être diminuée – voire complètement supprimée – dans les cas où l'ATP synthase est inhibée, par exemple par l'ajout d'oligomycine.

L'état 4 représente l'état des mitochondries "au repos", quand l'ATP synthase ne consomme pas le gradient et que la chaîne respiratoire n'est donc active qu'à un niveau basal. Elle ne consommera donc que très peu d'oxygène par rapport à l'état 3.

Le CCCP est un découplant, il va faciliter la fuite de protons contenus dans l'espace intermembranaire et qui constituent le gradient de protons. Comme précédemment, la chaîne respiratoire va pouvoir détecter cette fuite et s'activer pour la compenser. Cette activation est traduite par une consommation accrue d'oxygène du milieu environnant.

Les mesures d'oxygraphie effectuées sur mitochondries isolées sont réalisées à l'aide d'une électrode de Clark. Séparée du milieu environnant par une membrane perméable à l'oxygène moléculaire, cette électrode réduit l'oxygène au niveau de la cathode, produisant ainsi une différence de potentiel mesurée par l'ordinateur relié. L'intensité de cette réaction traduit la quantité d'oxygène présente dans le milieu.

L'électrode est placée dans une cuve thermostatée à 28 °C. Sous agitation constante, le tampon de respiration [mannitol 0,65 M ; EGTA 0,36 mM ; tris-phosphate 5 mM ; tris-maléate 10 mM pH 6,8] est déposé dans la cuve, puis les mitochondries à hauteur de 150 μ g / mL de protéines mitochondriales. Différentes combinaisons des molécules suivantes sont ensuite ajoutées : NADH

(4 mM) ; ADP (150 μ M) ; oligomycine (3 μ g/mL) ; CCCP (4 μ M) ; ascorbate / TMPD (respectivement 12,5 mM et 1,4 mM).

4.1.3 Quantification de la production d'ATP

Une deuxième expérience est réalisée avec les mitochondries fraîches, qui permet de mesurer la vitesse de synthèse d'ATP des mitochondries isolées. Cette expérience consiste à effectuer une cinétique de synthèse d'ATP, en stimulant la chaîne respiratoire avec le NADH puis en fournissant du substrat ADP, et enfin en prélevant régulièrement une quantité précise de la solution.

L'ATP synthétisé est ensuite mesuré à l'aide d'une réaction bioluminescente basée sur le couple luciférine / luciférase. L'oxydation de la luciférine en oxyluciférine est une réaction catalysée par l'enzyme luciférase. Cette réaction nécessite la consommation d'un ATP par luciférine oxydée. L'oxyluciférine étant une molécule fluorescente, il est donc possible de mesurer la quantité d'ATP au spectrophotomètre.

150 μ g de mitochondries sont placés dans une cuve thermostatée à 28 °C dans 1 mL de tampon de respiration (voir composition en section 4.1.2 page précédente). Sont ajoutés du NADH (4 mM) et éventuellement de l'oligomycine (3 μ g/mL, les mitochondries sont incubées 3 minutes après ajout de cette drogue avant la suite de protocole). Le temps t_0 correspond à l'ajout d'ADP (875 μ M). Toutes les 15 ou 30 secondes, 50 μ L de la solution sont prélevés et mélangés à 25 μ L de [EDTA 5 mM ; acide perchlorique 7 % v/v], puis incubés dans la glace. Les différents tubes sont centrifugés 5 minutes à 16 000 g puis 55 μ L de la solution sont prélevés. Le pH de ces prélèvements est ajusté à environ 7 avec un mélange [KOH 2 N ; MOPS 0,3 M], puis ces derniers sont conservés à -80 °C.

Les tubes sont ensuite décongelés sur glace et centrifugés à 4 °C à 16 000 g pendant 5 minutes. 200 μ L de tampon [tris 0,1 M ; EDTA 0,2 mM ; pH 7,75] sont disposés dans un tube de bioluminomètre et mélangés avec de la luciférine / luciférase provenant du kit commercial ATP Bioluminescence Assay Kit CLS II de la société ROCHE APPLIED SCIENCE. 1 μ L de la solution contenant l'ATP est ajoutée, et une mesure est réalisée sur un bioluminomètre. Une gamme étalon est réalisée avec de l'ATP 10 μ M (0 à 100 μ L). Cette gamme permettra de déterminer les quantités d'ATP dans chaque prélèvement de la cinétique, qui servira alors à déterminer la vitesse de synthèse d'ATP en nanomole d'ATP par milligramme de protéines mitochondriales par minute.

4.1.4 Analyse du potentiel membranaire $\Delta\Psi$

La rhodamine 123 est un fluorophore réagissant au potentiel membranaire des mitochondries. En effet, la différence de potentiel entre la matrice et l'espace intermembranaire permet l'entrée de cette molécule au cœur de la mitochondrie, diminuant ainsi la fluorescence de cette molécule (Baracca *et al.*, 2003). Plus le potentiel est élevé, plus la quantité de rhodamine entrant dans la mitochondrie sera grande. Il est donc possible d'observer indirectement les variations du $\Delta\Psi$ mitochondrial en suivant l'évolution de la fluorescence de la rhodamine 123 en présence de mitochondries isolées.

La fluorescence de la rhodamine 123 est observable grâce à une excitation par un faisceau lumineux de longueur d'onde λ 485 nm. L'émission de la molécule est détectable à λ 525 nm. Réalisée dans un spectrofluoromètre, cette expérience mesure les variations de fluorescence de la rhodamine en présence de mitochondries, affectées par différentes molécules ajoutées. Celles-ci sont les mêmes que dans l'expérience décrite précédemment. Le NADH est toutefois remplacé par un autre substrat, l'éthanol. En effet, le NADH est autofluorescent, et son pic d'émission atteint les λ 450 nm. Ce pic est proche du pic d'excitation de la rhodamine 123, il risquerait donc

de fausser l'expérience en excitant la rhodamine. Le KCN est également utilisé comme inhibiteur de la chaîne respiratoire, plus particulièrement du dernier complexe transporteur d'électrons, la cytochrome c oxydase.

150 µg / mL de mitochondries isolées sont placés dans une cuve dans du tampon de respiration (composition identique à celle décrite en 4.1.2 page 103). À ce mélange sont ajoutés 500 ng de rhodamine 123 ainsi que de l'éthanol (10 mM). Différentes combinaisons de molécules sont ensuite ajoutées : ADP (75 µmoles) ; oligomycine (4 µg/mL) ; CCCP (4 µmoles) ; KCN (2 mM) ; ATP (0,2 mM). La fluorescence est suivie graphiquement en temps réel.

4.1.5 Estimation de l'activité hydrolitique de l'ATPase

Les mitochondries décongelées serviront pour une cinétique d'hydrolyse d'ATP, consistant à fournir du substrat ATP aux ATPases, qui va être hydrolysé en ADP et en P_i . Les mitochondries décongelées sur glace sont tout d'abord redosées par dosage colorimétrique de Lowry. 150 µg de mitochondries sont mélangées à 900 µL de tampon [KCl 0,2 M ; $MgCl_2$ 3 mM ; tris-HCl (pH 7,5) 10 mM ; pH 8,4] préincubé à 30 °C. À ce stade, deux séries sont réalisées, une sans et une avec oligomycine (10 µg/mL). Après incubation 3 minutes à 30 °C, 5 µmoles d'ATP sont ajoutées à la solution. Après incubation 2 minutes à 30 °C, 100 µL de TCA à 50 % m / v sont mélangés à la solution. Une autre série est réalisée, mais en ajoutant le TCA avant les mitochondries (cette série servira de blanc).

Les différents tubes réalisés sont ensuite centrifugés 10 minutes à 16 000 g à 4 °C. Un prélèvement de 500 µL de chacun des tubes est effectué, et lui sont ajoutés 2,5 mL de [heptamolybdate d'ammonium 0,66 % m / v (dissous séparément) ; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,8 % m / v (dissous séparément) ; qsp H_2SO_4 0,75 N]. Le mélange est incubé 10 minutes à l'obscurité, puis la DO à λ 610 nm est mesurée. Le phosphore inorganique généré par l'hydrolyse d'ATP va s'associer avec du molybdate pour former du phosphomolybdate. Réduit par du sulfate ferreux en milieu acide, la solution prend alors une coloration bleu violet, détectable au spectrophotomètre.

En parallèle, une gamme d'étalonnage est réalisée, avec des quantités croissantes de KH_2PO_4 1 mM (0 à 300 µL, correspondant à 0 à 300 nmoles de P_i). 2,5 mL de [heptamolybdate d'ammonium 0,66 % m / v (dissous séparément) ; $FeSO_4 \cdot 7H_2O$ 0,8 % m / v (dissous séparément) ; qsp H_2SO_4 0,75 N] sont ajoutés à chaque tube de la gamme, qui est ensuite incubée 10 minutes à l'obscurité, puis la DO à λ 610 nm est mesurée.

Cette gamme permet alors de déterminer la quantité de P_i généré par l'hydrolyse ATP dans les mitochondries. La vitesse d'hydrolyse d'ATP peut alors être déterminée (en nmoles de P_i générées par milligramme de protéines mitochondriales par minute). L'oligomycine va inhiber l'activité du canal à protons, qui ne pourra plus effectuer de rotation et bloquera donc l'activité du F_1 associé. La série réalisée en présence de cette drogue permet de déterminer quelle part prennent ATP synthases ont dans cette hydrolyse, le pourcentage d'activité inhibée étant imputable aux ATP synthases complètes.

4.1.6 Visualisation des complexes ATP synthases sur gel

Les mitochondries décongelées sont redosées par dosage colorimétrique de Lowry, puis 50 µg de mitochondries sont traités à la digitonine (2 g/g de protéines) dans du tampon d'extraction [HEPES 30 mM ; acétate de potassium 150 mM ; glycérol 12 % m / v ; acide aminocaproïque 2 mM ; EDTA 1 mM EDTA ; cocktail d'inhibiteur de protéases] pendant 30 minutes dans la glace. Après centrifugation 30 minutes à 25 000 g, le surnageant est récupéré et chargé sur gel BN-PAGE. Les détails de la séparation sur ce type de gel sont disponibles en section 4.4.3 page 107.

Après électrophorèse, les gels sont incubés pendant 3 heures dans un tampon [tris 35 mM + 270 mM glycine ; pH 8,4], puis dans un tampon [tris 35 mM + 270 mM glycine ; pH 8,4 ; MgSO₄·7H₂O 14 mM ; Pb(NO₃)₂ 0,2 % m / v ; ATP 8 mM] jusqu'à apparition de bandes blanches. Le nitrate de plomb va précipiter en présence d'ADP, provenant dans ce cas de l'ATP qui va servir de substrat aux ATPases. L'ATP est hydrolysé au niveau de ces complexes, là où va se déposer le précipité blanc de nitrate de plomb.

Les complexes ayant une activité ATPasique seront donc détectables sur gel. Dans la mitochondrie, le principal complexe protéique possédant ce type d'activité est l'ATP synthase, ou plus exactement le secteur F₁. Si la biogénèse du secteur F₀ est affectée (ou dans certaines conditions d'extraction), il est possible de détecter dans ce type d'analyse une bande surnuméraire de plus faible poids moléculaire, correspondant à du F₁ libre (non fixé à la membrane par le F₀).

4.2 Caractérisation du protéome de la levure

4.2.1 Marquage *in vivo* des produits de la traduction mitochondriale

La description détaillée de ce protocole peut être retrouvée dans l'article publié dans Plos Genetics inclus en partie III chapitre 1 page 115.

4.2.2 Purification des complexes ATP synthases

La description détaillée de ce protocole peut être retrouvée dans l'article publié dans Plos Genetics inclus en partie III chapitre 1 page 115.

4.2.3 Préparation d'extraits cellulaires totaux

L'extraction de protéines totales de levure se base sur la précipitation des protéines au TCA, qui va dénaturer les protéines. Ces dernières vont alors précipiter du fait de l'exposition de surfaces non-polaires au solvant polaire. La lyse cellulaire est assurée par la soude NaOH et le β-mercaptoéthanol, un agent réducteur aidant à la dénaturation des protéines au travers de la réduction des ponts disulfure.

Une préculture en milieu sélectif est réalisée avec la souche de levure concernée. Après 24 à 48 heures d'incubation à 28 °C, la DO_{650 nm} est mesurée. Cette préculture est utilisée pour ensemercer à 0,5 DO_{650 nm}/mL de milieu sélectif. Après 2 générations, 10 DO_{650 nm} sont prélevées et traitées avec 500 µL de solution de [NaOH 1,85 M ; β-mercaptoéthanol 7,4 % v / v] sur glace pendant 10 minutes. Les échantillons sont ensuite traités avec 500 µL de TCA, 50 %, et incubés sur glace pendant 10 minutes. Une centrifugation à 16 000 g pendant 5 minutes est ensuite effectuée, le surnageant est éliminé et les culots sont recentrifugés selon les mêmes paramètres afin de bien éliminer le surnageant résiduel. Le culot est ensuite repris dans 50 µL de SDS 5 % m / v et le pH est ajusté avec une solution de tris 3 M pH 8,9. Les extraits solubilisés sont ensuite chauffés 15 minutes à 42 °C puis stockés à -20 °C.

4.2.4 Fractionnement cellulaire

Les fractionnements cellulaires réalisés dans cette étude ont consisté en des préparations de mitochondries, dont les fractions enrichies en mitochondries (culot final) et en cytoplasme (surnageant après la première centrifugation à 750 g pendant 8 minutes) ont été récupérées. Ces deux fractions ont ensuite été soumises à une extraction protéique totale, puis analysées par

Western blot. Un prélèvement de la culture initiale a été soumis au même protocole pour une extraction protéique totale.

4.3 Dosage des protéines par colorimétrie

Ce dosage colorimétrique est basé sur une méthode décrite par Lowry *et al.* (1951). La fixation d'ions cuivre sur les liaisons peptidiques en milieu alcalin forme, au voisinage des acides aminés aromatiques, un complexe cuprique qui favorise la réduction du réactif de Folin-Ciocalteu. À l'état réduit, ce produit absorbe à λ 750 nm.

5 μ L de dilutions 1/10 et 1/20 des échantillons à doser sont solubilisés dans du SDS 5 % m/v (qsp 75 μ L) et 750 μ L d'une solution de [SO₄Cu 0,01 % m/v ; NaK 0,02 % m/v ; CO₃Na₂ 3,92 % m/v (solubilisé dans NaOH 0,1 M)] sont ajoutés. Après un traitement à 37 °C pendant 3 minutes, 75 μ L de réactif de Folin (dilué 1/3) sont ajoutés, et les solutions sont chauffées à 37 °C pendant 6 minutes. L'absorbance est ensuite mesurée à λ 750 nm. Une gamme étalon de quantité croissante de protéine albumine (0 à 10 μ g, dissous dans du SDS 5 % m/v) est traitée à l'identique.

La gamme étalon permet de connaître la quantité de protéines de l'échantillon en fonction de l'absorbance. La droite théorique représentée est de type $d = Aq + B$, où d est l'absorbance, q la quantité de protéines en grammes et A et B les paramètres de l'équation. La gamme étalon fournit les paramètres A et B qui sont ensuite utilisés pour connaître la quantité q de protéines de l'échantillon mesuré qui, rapportée au volume prélevé, fournit la concentration en protéines de l'échantillon.

4.4 Analyse des extraits protéiques

4.4.1 Tampon de charge

Les protéines déposées sur gel sont au préalable diluées dans un tampon de charge 5X [tris 1,5 M pH 6,8 ; glycérol 30 % v/v ; SDS 2 % m/v ; β -mercapthoéthanol 5 % v/v ; bleu de bromophénol 1 % m/v] (1X final).

4.4.2 Séparation par électrophorèse sur gel dénaturant

Ce protocole est un dérivé de celui décrit par Schagger et von Jagow (1987). Les protéines sont déposées sur un gel acrylamide / bis-acrylamide contenant du SDS, un détergent anionique dénaturant qui permettra de maintenir les protéines sous une forme déroulée non native et chargées négativement. La mobilité électrophorétique des protéines dépendra donc en majeure partie de leur taille approximative. Différents maillages d'acrylamide peuvent être utilisés, selon le type de séparation désiré.

Les gels dénaturants SDS-PAGE et les tampons de migration (contenant également du SDS) utilisés sont issus d'un kit commercial de gels Bis-tris 4-12 % pré-coulés, le kit NuPAGE Novex 4-12 % Bis-tris Gel de la société INVITROGEN. Les protéines sont soumises à un champ électrique de 200 V constant pendant 35 à 55 minutes. Les protéines sont ensuite transférées sur membrane de nitrocellulose.

4.4.3 Séparation par électrophorèse sur gel en bleu natif

Les protéines sont déposées sur un gel acrylamide / bis-acrylamide non dénaturant dans un tampon contenant un colorant bleu natif (BN-PAGE, protocole dérivé de Schägger et von Jagow (1991)). Le bleu de Coomassie est un colorant formant un complexe stable avec les protéines, qui va stabiliser la forme anionique du colorant. La mobilité électrophorétique des protéines et complexes protéiques dépendra majoritairement de leur taille et de leur conformation tri et quadri-dimensionnelle. Différents maillages d'acrylamide peuvent être utilisés, selon le type de séparation désiré.

Les gels non dénaturants utilisés, ainsi que le tampon contenant le bleu de Coomassie, sont issus d'un kit commercial de gels Bis-tris 3-12 % pré-coulés, le kit NativePAGE Novex 3-12 % Bis-tris Gel de la société INVITROGEN. Les protéines et complexes protéiques sont soumis à un champ électrique de 150 V constants pendant 90 à 115 minutes. Les gels peuvent ensuite être utilisés dans des expériences de Western blot (et sont auparavant traités 30 minutes dans une solution de SDS 5 %) ou traités pour la détection d'activités ATPasiques.

4.4.4 Transfert sur membrane

Les protéines séparées sur gel sont transférées sur membrane de nitrocellulose à l'aide du kit iBlot Transfer Stack et de l'appareil iBlot Dry Blotting System de la société INVITROGEN. Ce transfert est basé sur le principe de l'*electroblotting*, utilisant un courant électrique permettant aux protéines chargées de migrer vers la membrane de nitrocellulose, ayant une affinité non-spécifique pour les acides aminés.

4.4.5 Analyse par immunodétection

L'immunodétection consiste à utiliser les capacités de reconnaissance des anticorps dans la détection de protéines spécifiques. Un anticorps dirigé contre la protéine-cible est tout d'abord incubé en présence de la membrane de nitrocellulose sur laquelle ont été transférées les protéines auparavant extraites. L'anticorps va se lier à sa cible, et sera détecté à l'aide d'un anticorps secondaire dirigé contre lui. Cet anticorps secondaire est lié à une enzyme, la peroxydase du Raifort (HRP pour *HorseRadish Peroxidase*). Cette enzyme va catalyser l'oxydation de son substrat, ici le luminol, et cette réaction est chromogène. La génération de photons indiquera donc la présence de l'enzyme, de l'anticorps secondaire qui lui est lié, de l'anticorps primaire reconnu, et donc de la protéine cible.

La membrane obtenue après transfert est tout d'abord colorée par traitement au rouge Ponceau [ponceau S 2 g/L ; acide acétique 5 % v/v] (environ 5 minutes), contrastée par 2 à 3 rinçages à l'eau distillée et numérisée (300 à 600 dpi). Ceci permet de vérifier visuellement la qualité de l'électrophorèse.

La membrane est ensuite lavée dans un tampon [tris 50 mM ; NaCl 140 mM ; Tween 20 0,5 mL/L ; pH 7,4] 3 fois 5 minutes, puis saturée avec la même solution additionnée de lait écrémé (en poudre, 5 % m/v) entre 30 minutes et 12 heures. La membrane est ensuite placée en incubation avec l'anticorps primaire dans le même tampon + lait de 3 à 12 heures. La solution est retirée et la membrane lavée dans le tampon sans lait 3 fois 5 minutes. Elle est ensuite placée en incubation dans une solution de tampon + lait contenant l'anticorps secondaire pendant 1 heure.

Après 3 lavages de 5 minutes au tampon sans lait, la révélation est réalisée par réaction chemiluminescente à l'aide d'un réactif ECL du kit SuperSignal West Pico Chemiluminescent Substrate de la société THERMO SCIENTIFIC et impression sur film (kit Amersham Hyperfilm ECL de la société GE HEALTHCARE) ou numérisation avec l'appareil G :BOX Chemi systems de la

société SYNGENE BIOIMAGING. Le temps d'exposition minimal est variable, et est compris entre 5 secondes et 20 minutes.

4.4.6 Liste des anticorps utilisés

Le tableau II.4.1 page ci-contre référence les caractéristiques des différents anticorps utilisés dans cette étude.

Anti-	Immunologie	Dilution	Epitope	Source
Cox2p	monoclonal / souris	1 / 5 000	Cox2p	MOLECULAR PROBES
Cox3p	monoclonal / souris	1 / 250	cytochrome c oxydase	INVITROGEN
γ	polyclonal / lapin	1 / 10 000	γ	J. VELOURS
Atp6p	polyclonal / lapin	1 / 5 000	23 premiers résidus de Atp6p	J. VELOURS
Atp9p	polyclonal / lapin	1 / 7 500	LINGVSRNPSIKDT	J. VELOURS
Yta10p	polyclonal / lapin	1 / 4 000	domaine C-terminal	T. LANGER
Yme1p	polyclonal / lapin	1 / 10 000	SDERKDIGDDKPKIPTMLNA	T. LANGER
Por1p	monoclonal / souris	1 / 1000	Por1p	MOLECULAR PROBES
Pgk1p	monoclonal / souris	1 / 500	Pgk1p	MOLECULAR PROBES
Secondaire anti-souris	polyclonal / chèvre	1 / 2 500	anticorps souris	PROMEGA
Secondaire anti-lapin	polyclonal / chèvre	1 / 2 500	anticorps lapin	PROMEGA

TABLE II.4.1: Liste des anticorps utilisés dans cette étude

Une liste complémentaire d'anticorps utilisés peut être retrouvée dans les articles publiés dans Plos Genetics et Molecular Biology and Evolution, inclus respectivement à la suite des chapitres 1 page 115 et 3 page 181. L'épitope correspond au peptide ou à la protéine entière utilisée pour l'immunisation.

Chapitre 5

Techniques de bioinformatique

Sommaire

5.1	Optimisation de séquences protéiques	112
5.2	Analyses de séquences	112
5.2.1	Alignements multiples	112
5.2.2	Analyses phylogénétiques	112
5.3	Analyse de l'hydrophobicité	112

5.1 Optimisation de séquences protéiques

L'optimisation des séquences nucléiques synthétiques conçues dans cette étude a été réalisée à l'aide du logiciel Gene Designer (Villalobos *et al.*, 2006) de la société DNA2.0.

Ce logiciel a en mémoire une table de probabilités des codons de différentes espèces, notamment *Saccharomyces cerevisiae*. Un score de probabilité est affecté à chaque codon existant en fonction de la fréquence de ce codon chez l'espèce considérée. À partir d'une séquence protéique fournie, le logiciel recrée une séquence nucléotidique (à l'aide d'un algorithme de Monte Carlo) basée sur la table sélectionnée. Les codons ayant moins de 10 % de probabilité sont par défaut écartés de la reconstruction, du fait de leur faible utilisation par l'organisme, ce qui risque d'impacter l'expression de la protéine. D'autres paramètres peuvent entrer en considération, comme le choix de ne pas introduire certains sites de restrictions, choix laissé à l'utilisateur. Les sites de restriction des enzymes *NotI* et *ClaI* ont été exclus des différentes séquences génétiques optimisées dans cette étude. D'autres paramètres peuvent être affectés lors de la génération des séquences (Villalobos *et al.*, 2006), mais ces fonctionnalités n'ont pas été utilisées.

Dans cette étude, les séquences génétiques générées au travers de ce logiciel ont été optimisées pour le biais d'utilisation de codons du génome nucléaire de *Saccharomyces cerevisiae*. De plus, ont été exclus les sites de restrictions *BamHI*, *PstI* (les deux sites de restrictions utilisés pour l'insertion de la séquence dans le vecteur, voir table II.3.1 page 78), ainsi que *NotI* et *ClaI*, qui ont été utilisés pour linéariser les vecteurs non ligués avec l'insert lors du clonage.

5.2 Analyses de séquences

5.2.1 Alignements multiples

Les alignements de séquences présentés en partie IV ont été réalisés sur le logiciel informatique CLUSTALW. Une version en ligne de ce logiciel est accessible via le site de l'EUROPEAN BIOINFORMATICS INSTITUTE (EBI). Les paramètres par défaut ont été sélectionnés pour les analyses. La mise en forme des alignements a été réalisée à l'aide du package `TeXshade` du logiciel `LATEX`. La liste des différents identifiants de chaque séquence protéique utilisée dans les alignements présentés en partie IV page 233 peut être retrouvée dans les légendes correspondantes.

5.2.2 Analyses phylogénétiques

Les analyses phylogénétiques, listes de séquences et alignements correspondants présentés en partie III chapitre 3 page 181 ont été réalisés comme indiqué dans l'article paru dans *Molecular Biology and Evolution* inclus à la suite du même chapitre.

5.3 Analyse de l'hydrophobicité

Les analyses d'hydrophobicité des protéines ont été réalisées avec le logiciel PROTSKALE via le site ExPASy du SWISS INSTITUTE OF BIOINFORMATICS (SIB). Les analyses ont été réalisées sur les séquences protéiques sauvages entières, avec pour paramètres une fenêtre de 13 acides aminés et l'échelle de scores d'hydrophobicité de Kyte et Doolittle (1982). Les scores d'hydrophobicité de chaque acide aminé sont moyennés en fonction de la fenêtre (pour 13 : les 6 précédents et les 6 suivants) puis sont ensuite reportés dans un tableur. Les graphes de comparaison des différents scores ont été réalignés manuellement selon les résultats des alignements de séquences réalisés sur ces mêmes protéines.

Troisième partie

Résultats

Chapitre 1

Une expression fonctionnelle de la sous-unité Atp9p à partir du noyau requiert une diminution d'hydrophobicité de sa première traverse membranaire

Sommaire

1.1	Délétion du gène mitochondrial <i>ATP9</i> chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	116
1.2	Expression du gène <i>ATP9</i> de <i>Saccharomyces cerevisiae</i> à partir du génome nucléaire	117
1.2.1	Modification du gène <i>ATP9</i> de levure	117
1.2.2	La version nucléaire du gène <i>ATP9</i> de levure ne complémente pas la délétion de la version mitochondriale	117
1.3	Expérimentations avec les gènes <i>ATP9</i> naturellement nucléaires de <i>Podospora anserina</i>	118
1.3.1	Les gènes <i>ATP9</i> naturellement nucléaires	118
1.3.2	L'expression allotopique des gènes <i>ATP9</i> de <i>Podospora anserina</i> complémente partiellement la délétion du gène <i>ATP9</i> de levure	119
1.4	L'hydrophobicité est un facteur important pour une relocalisation fonctionnelle d' <i>ATP9</i>	119
1.4.1	La première traverse membranaire des sous-unités Atp9p de <i>Podospora anserina</i> est moins hydrophobe comparativement à la protéine de <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	119
1.4.2	La réduction de l'hydrophobicité de la première traverse membranaire de la sous-unité Atp9p est requise pour une expression fonctionnelle depuis le noyau	120

Dans un premier temps, nous nous sommes intéressés aux éventuelles modifications à réaliser sur la protéine Atp9p de la levure *Saccharomyces cerevisiae* afin de pouvoir l'exprimer fonctionnellement depuis le noyau. Des expérimentations de relocalisation du gène *ATP9* de levure, d'expression hétérologue chez ce même organisme de gènes *ATP9* naturellement nucléaires, ainsi que de gènes chimériques montrent qu'une diminution de l'hydrophobicité au niveau de la première traverse membranaire d'Atp9p est nécessaire. Ces résultats font l'objet d'une publication parue dans le journal Plos Genetics, pour lequel je suis co-premier auteur (Bietenhader *et al.*, 2012). Les principaux résultats de cette étude sont résumés ci-après.

1.1 Délétion du gène mitochondrial *ATP9* chez *Saccharomyces cerevisiae*

Dans le but de réaliser les expériences de relocalisation du gène *ATP9* chez *Saccharomyces cerevisiae*, il a fallu tout d'abord effectuer la délétion de la copie mitochondriale de ce gène. Cette manipulation a été faite avant mon arrivée au laboratoire, en utilisant la méthode de transformation par biolistique développée par Bonnefoy et Fox (2001), et décrite en détail dans la section Matériel et Méthodes de l'article inclus à la suite de ce chapitre.

Cette manipulation a été réalisée sur la souche de type sauvage MR6 (ou WT), pour obtenir la souche RKY26 (ou $\Delta atp9 :: ARG8^m$). Le gène *ATP9* y est remplacé par une version du gène nucléaire *ARG8* recodée en code génétique mitochondrial, *ARG8^m*. Ce gène code pour une protéine mitochondriale, l'acétylornithine aminotransférase ou Arg8p, impliquée dans la biosynthèse de l'arginine. Le marqueur d'auxotrophie *ARG8^m* est placé sous le contrôle des séquences de régulation d'expression du gène *ATP9*. La souche MR6 étant dépourvue du gène *ARG8* nucléaire, le remplacement d'*ATP9* par *ARG8^m* est détecté grâce à l'acquisition de la capacité de croissance sur milieux dépourvus d'arginine (figure III.1.8 panneau A page 146). La souche $\Delta atp9 :: ARG8^m$ ne peut, comme attendu, croître sur milieu respiratoire. Ce phénotype est compensé par croisement avec une souche petite synthétique portant au sein de ses mitochondries un plasmide avec une séquence *ATP9* sauvage (figure III.1.8 panneau F page 146). La cassette de délétion *ARG8^m* confère un second avantage, celui de contre-sélectionner les cellules ρ^- / ρ^0 . Lorsque certains gènes mitochondriaux sont inactivés par mutation, des modifications génomiques de type ρ^- / ρ^0 se produisent rapidement (Rak *et al.*, 2007; Soto *et al.*, 2009). La culture de la souche $\Delta atp9 :: ARG8^m$ en milieu synthétique sans arginine permet de contourner le problème en contre-sélectionnant les ρ^- / ρ^0 , qui ne peuvent plus exprimer le gène *ARG8^m*, et deviennent donc auxotrophes pour l'arginine. Malgré cette pression de sélection, 50 à 70 % des cellules sont tout de même convertis en cellules ρ^- / ρ^0 , phénotype caractéristique des mutants nuls du secteur F₀ de l'ATP synthase (Contamine et Picard, 2000).

En plus de l'inactivation du complexe ATP synthase (figure III.1.1 panneau B page 126), d'autres phénotypes ont pu être observés, comme une modification de l'expression de différents gènes mitochondriaux (panneau C), et une réduction de synthèse notable de certaines protéines mitochondriales comme Atp6p et Atp8p. On peut également observer une absence de production de sous-unité Atp9p et l'apparition d'une nouvelle protéine encodée par le génome mitochondrial, Arg8p (figure III.1.1 panneau C page 126 ; figure III.1.8 panneau D page 146). Les complexes III et IV de la chaîne respiratoire sont très peu exprimés (figure III.1.1 panneau C page 126 ; figure III.1.8 panneau E page 146).

La délétion du gène *ATP9* a également des conséquences sur la structure mitochondriale, notamment une absence de crêtes mitochondriales et des problèmes dans la fusion des membranes internes (figure III.1.1 panneau D page 126). Ces phénotypes sont caractéristiques d'une biogénèse de l'ATP synthase altérée (Rak *et al.*, 2007; Paumard *et al.*, 2002; Soto *et al.*, 2009).

La souche $\Delta atp9 :: ARG8^m$ a ensuite été utilisée comme point de départ pour des expériences de relocalisation artificielle du gène *ATP9*. Pour plus de simplicité, je nommerai celle-ci $\Delta atp9 :: ARG8^m$ dans le reste du document, et WT (pour l'anglais *Wild Type* ou type sauvage) pour la souche d'origine MR6.

1.2 Expression du gène *ATP9* de *Saccharomyces cerevisiae* à partir du génome nucléaire

1.2.1 Modification du gène *ATP9* de levure

Comme expliqué en introduction (partie I section 4.4 page 42), il est nécessaire pour un gène mitochondrial d'être recodé et fusionné à la séquence génétique encodant une préséquence d'adressage mitochondrial (ou "MTS" pour *Mitochondrial Targetting Sequence*) pour pouvoir être exprimé à partir du génome nucléaire. Ces deux points représentent le minimum essentiel pour rendre fonctionnelle une relocalisation.

Ainsi, la séquence protéique de la sous-unité Atp9p de *Saccharomyces cerevisiae* a été fusionnée à la MTS de la protéine PaAtp9p-7 de *Podospora anserina*. Cette préséquence s'est montrée efficace pour la relocalisation du gène *ATP8* (données non fournies) et est donc fonctionnelle chez la levure. La fusion est située 6 acides aminés après le site théorique de coupure, prédit en comparant les alignements des séquences protéiques des Atp9p de *Podospora anserina* et de *Neurospora crassa*, dont le site de clivage est connu (Viebrock *et al.*, 1982) (figure III.1.9 page 147). Cette prédiction est appuyée par les résultats d'analyses *in silico* au travers du logiciel MITOPROT, disponible sur le site internet de l'INSTITUT DE GÉNÉTIQUE HUMAINE de Munich. La séquence protéique artificielle obtenue a ensuite servi de base à une traduction inverse (figure III.1.10 page 148), faite à l'aide du logiciel GENE DESIGNER (Villalobos *et al.*, 2006) développé par la compagnie DNA2.0.

1.2.2 La version nucléaire du gène *ATP9* de levure ne complémente pas la délétion de la version mitochondriale

La construction réalisée, nommée *yATP9-Nuc*, a été clonée dans un vecteur multicopies de levure permettant d'éteindre, par l'ajout de doxycycline dans le milieu de culture, l'expression du gène (plasmide pCM190, appelé 2 μ par la suite) pour donner le plasmide pAM11. Celui-ci a ensuite été introduit dans la souche $\Delta atp9 :: ARG8^m$ par transformation (souche AMY5). Il est possible de voir sur le test présenté en III.1.2 panneau A page 127, que la construction ne permet pas la restauration de la croissance de la souche $\Delta atp9 :: ARG8^m$ en milieu respiratoire, avec comme source de carbone du glycérol. Les modifications apportées au gène *ATP9* de levure ne sont donc pas suffisantes pour sa relocalisation fonctionnelle vers le génome nucléaire.

Afin de vérifier l'état de la protéine dans la cellule, des fractionnements cellulaires ont été réalisés sur les souches WT et $\Delta atp9 :: ARG8^m + yATP9-Nuc$. Les résultats de cette expérience sont présentés en figure III.1.2 panneau B page 127. L'anticorps anti-Pgk1p est dirigé contre la protéine soluble cytosolique Pgk1p, non adressée aux mitochondries, et sert de contrôle dans cette expérience. L'anticorps anti-Atp9p met en évidence un enrichissement de la protéine Atp9p dans les mitochondries de la souche sauvage.

Dans la souche $\Delta atp9 :: ARG8^m + yATP9-Nuc$, on peut voir que la protéine détectée par l'anticorps anti-Atp9p est bien coextraite avec la fraction mitochondriale, mais est en faible quantité et uniquement sous forme précurseur. En effet, on peut voir que la taille de la protéine est supérieure à celle de la souche WT, et correspond à la taille de la protéine *yAtp9p-Nuc* entière, dont la préséquence n'a pas été clivée. La MTS utilisée possède les caractéristiques d'une cible pour la peptidase MPP de la matrice mitochondriale (Taylor *et al.*, 2001), et devrait donc être importée au moins en partie dans ce compartiment pour être maturée. L'absence de forme mature de Atp9p dans la fraction mitochondriale indiquerait que cette protéine est correctement adressée à la mitochondrie, mais ne pénètre pas, du moins pas suffisamment, dans la matrice mitochondriale.

La faible quantité de protéine Atp9p détectée, en dépit du fait que le gène *yATP9-Nuc* ait une expression constitutive relativement forte et soit présent en de nombreuses copies dans la cellule (vecteur de type 2 microns, ou 2 μ), nous a amenés à penser que la protéine pouvait être dégradée par certains systèmes cellulaires. La mitochondrie possède diverses protéases, comme par exemple la i-AAA protéase (AAA pour *ATPases Associated with various cellular Activities*) (Koppen et Langer, 2007). La i-AAA protéase est un homohexamère de la protéine Yme1p, ancré dans la membrane interne mitochondriale, et dont la tête catalytique est tournée vers l'espace intermembranaire. Ce complexe protéique dégrade préférentiellement des protéines membranaires (Koppen et Langer, 2007).

Puisque la protéine codée par le gène *yATP9-Nuc* n'est pas maturée, mais néanmoins associée à la mitochondrie, il était possible de penser qu'elle s'accumulerait dans l'espace intermembranaire et pourrait être alors dégradée par la i-AAA protéase. Nous avons testé cette hypothèse en exprimant le gène *yATP9-Nuc* dans une souche dépourvue de la i-AAA protéase. La délétion du gène *YME1* a été réalisée en remplaçant sa séquence codante par le gène *KANMX4*. Pour cela l'allèle nul $\Delta yme1 :: KANMX4$ (source EUROSCARF) a été amplifié par PCR, et l'amplicon transformé dans la souche $\Delta atp9 :: ARG8^m$ exprimant le gène *yATP9-Nuc*. Les clones résistants à l'antibiotique G418, résistance conférée par le gène *KANMX4*, ont été sélectionnés puis vérifiés par PCR et Western blot à l'aide d'anticorps anti-Yme1p.

Suite à cette délétion, la protéine yAtp9p-Nuc mature était toujours absente mais une augmentation drastique du signal généré par la forme non mature de la protéine yAtp9p-Nuc a été observée (figure III.1.2 panneau C page 127). Ceci indiquerait donc que le complexe i-AAA protéase participe à la dégradation de la protéine yAtp9p-Nuc non maturée dans l'espace intermembranaire.

Il est possible de conclure deux choses de ces différentes expériences : tout d'abord, la protéine yAtp9p-Nuc est bien adressée aux mitochondries et traverse leur membrane externe, elle parvient à l'espace intermembranaire mais ne semble pas traverser la membrane interne. Enfin, bloquée dans l'espace intermembranaire (d'où sa non maturation), elle finit par être dégradée en grande partie par la i-AAA protéase.

1.3 Expérimentations avec les gènes *ATP9* naturellement nucléaires de *Podospora anserina*

1.3.1 Les gènes *ATP9* naturellement nucléaires

La protéine de *Saccharomyces cerevisiae* n'a donc pu être exprimée fonctionnellement en étant importée à partir du cytoplasme avec les modifications réalisées (recodage et ajout d'une MTS). Cette non-fonctionnalité pourrait être due soit à des modifications insuffisantes de la protéine même, soit à un contexte génétique défavorable à la relocalisation du gène *ATP9*. Une expérience à réaliser serait d'utiliser un gène *ATP9* naturellement nucléaire, ayant déjà subi les modifications nécessaires à sa relocalisation. Dans le règne des Fungi, il existe des gènes *ATP9* naturellement nucléaires. Par exemple, deux homologues de ce gène sont nucléaires chez *Podospora anserina*, appelés respectivement Pa*ATP9-5* et Pa*ATP9-7*. Nous avons décidé de les utiliser dans la suite de nos expériences. Je décrirai plus particulièrement la répartition et l'histoire phylogénétique du gène *ATP9* dans ce règne au chapitre 3 section 3.1 page 182.

Les séquences protéiques encodées par les gènes *ATP9* de *Podospora anserina* utilisées dans cette étude ont servi de base à une traduction inverse, comme celle de *Saccharomyces cerevisiae* (voir section 1.2.1 page précédente). La MTS naturelle n'a pas été remplacée et le clonage a également été réalisé dans un vecteur à origine de répllication centromérique pCM189 (nommé CEN par la suite) ou multicopies (2 μ). Les plasmides portant le gène Pa*ATP9-5* ont été nommés

pAM16 (vecteur CEN) et pAM19 (vecteur 2 μ) ; les plasmides portant le gène PaATP9-7 ont été nommés pAM17 (vecteur CEN) et pAM20 (vecteur 2 μ).

1.3.2 L'expression allotopique des gènes *ATP9* de *Podospora anserina* complémente partiellement la délétion du gène *ATP9* de levure

Après transformation avec les gènes *ATP9* de *Podospora anserina*, il s'est avéré que la souche de levure $\Delta atp9 :: ARG8^m$ était capable de croître en milieu respiratoire, comme le montrent les courbes de croissance présentées en figure III.1.3 panneau A page 128. Des analyses biochimiques ont révélé la présence d'ATP synthase assemblée (panneaux B et C) et fonctionnelle (table III.1.2 page 129) dans ces souches de levure modifiées. Ces souches présentent toutefois une vitesse de croissance en milieu respiratoire nettement inférieure à celle d'un type sauvage. Il est à noter que l'utilisation de vecteurs multicopies donne une meilleure croissance que les vecteurs centromériques (figure III.1.3 panneau A page 128). Le rendement en ATP synthase assemblée avec les sous-unités Atp9p de *Podospora anserina* est inférieur à celui d'une souche sauvage de levure (figure III.1.3 page 128). Cependant, les complexes hybrides ont une bonne efficacité catalytique (table III.1.2 page 129), indiquant que les protéines de *Podospora anserina* sont capables de remplacer efficacement la sous-unité Atp9p de *Saccharomyces cerevisiae* dans le complexe ATP synthase.

Si les gènes *ATP9* de *Podospora anserina* sont capables de complémente la délétion de la souche $\Delta atp9 :: ARG8^m$, les souches de levure modifiées ont une morphologie cellulaire aberrante, apparemment due à un défaut dans la séparation des cellules en division (figure III.1.3 panneau D page 128). Cette morphologie cellulaire particulière n'est visible qu'en milieu respiratoire, ces souches ont une morphologie sauvage en milieu fermentescible. De plus, ce phénotype n'est pas dépendant du gène de *Podospora anserina* utilisé, ni du nombre de copies du gène. Cette morphologie anormale est possiblement à l'origine de la vitesse de croissance altérée en milieu respiratoire.

Malgré le phénotype altéré de ces mutants, cette expérience démontre que la relocalisation du gène *ATP9* est possible chez *Saccharomyces cerevisiae*, moyennant des changements dans la structure de la sous-unité Atp9p.

1.4 L'hydrophobicité est un facteur important pour une relocalisation fonctionnelle d'*ATP9*

1.4.1 La première traverse membranaire des sous-unités Atp9p de *Podospora anserina* est moins hydrophobe comparativement à la protéine de *Saccharomyces cerevisiae*

Nous avons décidé de trouver quelles différences entre les constructions yATP9-Nuc et PaATP9-5 ou PaATP9-7 pouvaient expliquer les changements de structure nécessaires à une expression fonctionnelle de la sous-unité Atp9p depuis le noyau.

Lorsque l'on observe la relocalisation naturelle ou artificielle de certains gènes mitochondriaux, on s'aperçoit que certaines modifications effectuées dans les protéines correspondantes peuvent être recoupées. En effet, dans les cas des gènes *ATP6* et *COX3*, mitochondriaux pour la plupart des organismes, ceux-ci ont été relocalisés naturellement dans le génome nucléaire des algues du genre *Chlamydomonas*, comme *Chlamydomonas reinhardtii*. Cette relocalisation s'est accompagnée, dans les deux cas, d'une diminution locale de l'hydrophobicité des produits des gènes (Funes *et al.*, 2002; Pérez-Martínez *et al.*, 2000).

Ceci indiquerait que l'hydrophobicité de leurs produits est un facteur important dans la fonctionnalité de la relocalisation de certains gènes mitochondriaux. Ce facteur semble d'autant plus important pour la protéine Atp9p qui est connue pour être très hydrophobe, qualifiée de protéolipide (Sierra et Tzagoloff, 1973) et difficilement extractible en solvants non-organiques.

Nous avons comparé l'hydrophobicité des protéines γ Atp9p-Nuc, PaAtp9p-5 et PaAtp9p-7. Une analyse *in silico* effectuée à l'aide du logiciel accessible en ligne PROTSKALE sur la séquence entière de ces différentes protéines (figure III.1.4 panneau A page 130) a permis de montrer une différence théorique d'hydrophobicité. Celle-ci se situe du côté N-terminal (à partir du site de clivage de la MTS) jusqu'à la fin de la première traverse membranaire (que je nommerai TMH1 pour *Trans-Membrane Helix 1* ou hélice transmembranaire 1) des protéines Atp9p.

L'expérience montrée dans le panneau B de la figure III.1.4 (page 130) a consisté en la purification des ATP synthases de *Saccharomyces cerevisiae* et *Podospora anserina*. À cette fin, des souches de *Podospora anserina* exprimant uniquement le gène PaATP9-5 ou PaATP9-7 ont été construites. Les trois ATP synthases ont ensuite été séparées par technique de SDS-PAGE, impliquant donc un traitement dénaturant qui devrait disloquer le complexe. Comme montré dans la littérature (Sierra et Tzagoloff, 1973; Velours et Arselin, 2000), les oligomères de sous-unité Atp9p de *Saccharomyces cerevisiae* résistent aux détergents utilisés et migrent comme tels dans le gel. En ce qui concerne les PaAtp9p, les oligomères ne résistent pas à ce traitement, les sous-unités sont exclusivement retrouvées sous forme monomérique. La différence de résistance aux détergents impliquerait donc une différence d'hydrophobicité entre les trois protéines, plus faible pour celles de *Podospora anserina*.

1.4.2 La réduction de l'hydrophobicité de la première traverse membranaire de la sous-unité Atp9p est requise pour une expression fonctionnelle depuis le noyau

Les deux expériences décrites ci-dessus entrent en corrélation avec l'hypothèse d'une modification de l'hydrophobicité de la protéine Atp9p native de *Saccharomyces cerevisiae* à effectuer pour une relocalisation fonctionnelle du gène. Nous avons donc souhaité tester cette hypothèse en construisant une protéine chimérique, que je nommerai Atp9p-Hyb et le gène correspondant *ATP9-Hyb*. Cette protéine est constituée de la MTS, du N-terminus et de la TMH1 de la protéine PaAtp9p-7, fusionnés à la boucle, la TMH2 et le C-terminus de l'Atp9p de *Saccharomyces cerevisiae* (figure III.1.9 page 147). La séquence artificielle a ensuite subi le même traitement que celle de *Saccharomyces cerevisiae* (voir section 1.2.1 page 117) et le plasmide obtenu a été nommé pAM12.

La construction réalisée a été transformée dans la souche $\Delta atp9 :: ARG8^m$. La nouvelle souche obtenue présente une croissance respiratoire extrêmement lente. Un fractionnement cellulaire, réalisé comme décrit en 1.2.2 page 117, a permis de révéler une maturation de la protéine Atp9p-Hyb (figure III.1.5 page 131). La quantité de protéines détectées est toutefois très faible.

Cette dernière expérience indique donc que l'hydrophobicité élevée de la première traverse membranaire est un facteur important pour un bon adressage de la protéine au compartiment matriciel mitochondrial. Sans modification de la TMH1, la protéine reste bloquée dans l'espace intermembranaire et est dégradée par les protéases de ce compartiment (comme la i-AAA protéase). Après modification de cette traverse, la protéine peut être transloquée vers la matrice, puis éventuellement incorporée dans l'ATP synthase.

Article 1

Plos Genet., 2012 Aug ;8(8) :e1002876. Epub 2012 Aug 16.

Experimental Relocation of the Mitochondrial ATP9 Gene to the Nucleus Reveals Forces Underlying Mitochondrial Genome Evolution.

Bietenhader* M, Martos A*, Tetaud E*, Aiyar R S*,
Sellem C H, Kucharczyk R, Clauder-Münster S, Giraud M-F, Godard F, Salin B, Sagot I,
Gagneur J, Déquard-Chablat M, Contamine V, Hermann-Le Denmat S, Sainsard-Chanet A,
Steinmetz L M and di Rago J-P.

* ces auteurs ont contribué de manière égale

PMID : 22916027

Experimental Relocation of the Mitochondrial *ATP9* Gene to the Nucleus Reveals Forces Underlying Mitochondrial Genome Evolution

Mailis Bietenhader^{1,2,9}, Alexandre Martos^{1,2,9}, Emmanuel Tetaud^{1,2,9}, Raeka S. Aiyar^{3,9}, Carole H. Sellem⁴, Roza Kucharczyk^{1,2}, Sandra Clauder-Münster³, Marie-France Giraud^{1,2}, François Godard^{1,2}, Bénédicte Salin^{1,2}, Isabelle Sagot^{1,2}, Julien Gagneur³, Michelle Déquard-Chablat^{5,6}, Véronique Contamine^{5,6}, Sylvie Hermann-Le Denmat^{5,6,7}, Annie Sainsard-Chanet⁴, Lars M. Steinmetz^{3*}, Jean-Paul di Rago^{1,2*}

1 Université Bordeaux, IBGC, UMR5095 CNRS, Bordeaux, France, **2** CNRS, IBGC, UMR5095 CNRS, Bordeaux, France, **3** Genome Biology Unit, European Molecular Biology Laboratory (EMBL), Heidelberg, Germany, **4** Université Paris-Sud, Centre de Génétique Moléculaire, UPR3404, CNRS, Gif-sur-Yvette, France, **5** Université Paris-Sud, Institut de Génétique et Microbiologie, UMR 8621, Orsay, France, **6** CNRS, Orsay, France, **7** Ecole Normale Supérieure, Paris, France

Abstract

Only a few genes remain in the mitochondrial genome retained by every eukaryotic organism that carry out essential functions and are implicated in severe diseases. Experimentally relocating these few genes to the nucleus therefore has both therapeutic and evolutionary implications. Numerous unproductive attempts have been made to do so, with a total of only 5 successes across all organisms. We have taken a novel approach to relocating mitochondrial genes that utilizes naturally nuclear versions from other organisms. We demonstrate this approach on subunit 9/c of ATP synthase, successfully relocating this gene for the first time in any organism by expressing the *ATP9* genes from *Podospora anserina* in *Saccharomyces cerevisiae*. This study substantiates the role of protein structure in mitochondrial gene transfer: expression of chimeric constructs reveals that the *P. anserina* proteins can be correctly imported into mitochondria due to reduced hydrophobicity of the first transmembrane segment. Nuclear expression of *ATP9*, while permitting almost fully functional oxidative phosphorylation, perturbs many cellular properties, including cellular morphology, and activates the heat shock response. Altogether, our study establishes a novel strategy for allotopic expression of mitochondrial genes, demonstrates the complex adaptations required to relocate *ATP9*, and indicates a reason that this gene was only transferred to the nucleus during the evolution of multicellular organisms.

Citation: Bietenhader M, Martos A, Tetaud E, Aiyar RS, Sellem CH, et al. (2012) Experimental Relocation of the Mitochondrial *ATP9* Gene to the Nucleus Reveals Forces Underlying Mitochondrial Genome Evolution. *PLoS Genet* 8(8): e1002876. doi:10.1371/journal.pgen.1002876

Editor: Nils-Göran Larsson, Max Planck Institute for Biology of Aging, Germany

Received: March 15, 2012; **Accepted:** June 19, 2012; **Published:** August 16, 2012

Copyright: © 2012 Bietenhader et al. This is an open-access article distributed under the terms of the Creative Commons Attribution License, which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

Funding: MB was a recipient of a BDI fellowship from the CNRS. AM was supported by the Agence Nationale de la Recherche (ANR). RK was a postdoctoral fellow from the Ministère de la Recherche et des Technologies. This work was supported by grants from the Conseil de la Région Aquitaine and the ANR (to J-PdR), from the CNRS (to AS-C), the CNRS-ATIP Program 2006 and FRM-INE Program 2007 (to SH-LD), and the National Institutes of Health (to LMS). The study was technically supported by the European Molecular Biology Laboratory Genomics Core Facility. The funders had no role in study design, data collection and analysis, decision to publish, or preparation of the manuscript.

Competing Interests: The authors have declared that no competing interests exist.

* E-mail: JP.dirago@ibgc.u-bordeaux2.fr (J-PdR); larsms@embl.de (LMS)

9 These authors contributed equally to this work.

Introduction

Mitochondrial genomes are remnants of an ancestral prokaryotic genome that has been considerably reduced in size during the evolution of eukaryotes because of a massive loss of redundant information and gene transfer to the nucleus. Today, the main function of mitochondrial genomes is the production of a few proteins involved in oxidative phosphorylation. It is not fully understood why the mitochondrial genome has been maintained throughout two billion years of evolution. There are only two genes always found in mitochondrial genomes: those encoding cytochrome *b* and *Cox1p*, subunits of respiratory complexes III and IV respectively [1]. The other genes can be found in either mitochondrial or nuclear DNA, and sometimes in both genomes like *ATP9*, which encodes subunit 9/c of ATP synthase [2] (this

protein is called *Atp9p* in yeast; in other organisms we will henceforth refer to it as subunit 9). Several hypotheses have been proposed to account for the retention of DNA in mitochondria. One theory is that the transfer of genes from mitochondria to the nucleus is still underway [3]. Alternatively, genes may have been confined to mitochondria due to the difficulty of transporting their protein products into the organelle, an idea that stems from the enrichment of genes encoding hydrophobic proteins in organellar genomes [4]. Other views suggest that rather than being trapped in organelles, genes may have been preferentially maintained there to adjust gene expression according to the redox [5–7] or metabolic [8] state of mitochondria; this could ensure optimal energy transduction while minimizing the production of harmful reactive oxygen species.

Author Summary

The mitochondrion, centre of cellular energy production, is derived from an ancient alpha-proteobacterium. While the vast majority of its genes have been transferred to the nuclear genome during evolution, a handful of genes remain in all mitochondrial genomes for reasons that are not fully understood. To investigate the evolutionary implications of gene transfer and evaluate potential treatments for the severe diseases caused by mitochondrial mutations, researchers have been attempting to express these genes from the nucleus for decades. In this study, we successfully relocate the mitochondrial gene *ATP9* to the nucleus for the first time. This gene encodes an extremely hydrophobic protein that, when relocated, is particularly challenging to import into mitochondria. We achieve this in baker's yeast by replacing *ATP9* with a naturally nuclear version from another fungal species. The "hybrid" mitochondria effectively produce energy and resemble normal mitochondria in many aspects, although they have some difficulty importing and assembling the foreign protein. Our findings elucidate the complex cellular and protein structure adaptations required for successful mitochondrial gene transfer, either during evolution or experimentally. This study thus delivers insight into the evolution of mitochondrial genomes and energy production.

An apt organism for assessing these theories is the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, a facultative aerobe where both the nuclear and mitochondrial genomes can be easily manipulated. This organism can therefore be used to test allotropic expression, *i.e.*, whether a mitochondrial gene can be functionally transferred to the nucleus. This assay involves inactivating the mitochondrial gene by mutation and testing a nuclear version of that gene for its capacity to restore respiratory function. This test has been carried out for five yeast proteins, two hydrophilic: bI4, an intron-encoded RNA maturase [9], and Var1p, a subunit of the mitochondrial ribosome [10], and three hydrophobic: the Atp8p subunit of mitochondrial ATP synthase with one transmembrane domain [11], the Cox2p subunit of respiratory complex IV (cytochrome *c* oxidase) which has two transmembrane segments [12], and the cytochrome *b* subunit of respiratory complex III, which is a highly hydrophobic protein with eight transmembrane segments [4]. In the cases of bI4, Var1p and Atp8p, adding a mitochondrial targeting sequence (MTS) and adjusting the genetic code were sufficient for functional allotropic expression of these proteins from nuclear DNA. The relocation of *COX2* required a minimal change to the structure of the protein: a single tryptophan to arginine substitution within a transmembrane segment. Conversely, attempts to relocate the cytochrome *b* gene have been entirely unsuccessful. Altogether, these findings do not refute the hypothesis that mitochondrial gene transfer may still be underway, but they also support the theory that some genes face an insurmountable barrier to functional relocation, such as the cytochrome *b* gene which is universally present in mitochondrial genomes.

In this study, our aim was to allotopically express the *ATP9* gene in *S. cerevisiae*. The protein it encodes has only two transmembrane segments, yet is extremely hydrophobic and classified as a proteolipid because it can easily be extracted from mitochondria with organic solvents [13]. Subunit 9 is present in several copies (ten in yeast [14]), forming a ring structure that is an essential component of the ATP synthase proton-translocating domain (F_0). During proton transport, the subunit 9-ring rotates, resulting

in conformational changes that favour the production of ATP by the catalytic head of the ATP synthase (F_1) and its release into the mitochondrial matrix [15,16].

As *ATP9* is naturally present in the nuclear DNA of a number of organisms, including filamentous fungi [2] and most animals [17], it is clear that there is no insurmountable barrier to functional relocation of this gene from mitochondria to the nucleus. A previous study has shown that the yeast Atp9p fused to a MTS can be imported and processed *in vitro* by mitochondria isolated from wild-type yeast [18], but to date there exists no description of a successful *in vivo* experiment. Here we take a novel approach that achieves allotropic expression of subunit 9 in yeast by using naturally nuclear genes from the filamentous fungus *Podospora anserina*. We use an array of techniques to demonstrate that substantial adaptations, including a reduction in hydrophobicity, are required for functional nuclear expression of this protein.

Results

Nuclear Versions of the Yeast Mitochondrial *ATP9* Gene Fail to Rescue *Δatp9* Yeast

As a first step in its nuclear relocation, we deleted the *ATP9* gene from the yeast mitochondrial genome using the *ARG8^m* selection marker [19]. This was performed in a *Δarg8^m* derivative of W303-1B, henceforth designated as *WT* (strain MR6 [20], all genotypes in Table 1). The *Δatp9* strain was thus selected for its capacity to grow in the absence of external arginine (Figure 1A) and proper integration of *ARG8^m* at the *ATP9* locus was verified (Figure S1). As expected, *Δatp9* yeast is unable to grow on glycerol (Figure 1A) and devoid of assembled ATP synthase (Figure 1B). As has previously been observed in other yeast ATP synthase mutants, the *Δatp9* yeast also displayed several additional mitochondrial defects: (i) deficient synthesis of several mitochondrially-encoded proteins (Cox1p, Atp6p and Atp8p, Figure 1C); (ii) dramatically reduced amounts of respiratory complexes III and IV (<10% of *WT* levels, Figure S1E); (iii) aberrations in mitochondrial morphology including the absence of cristae and the presence of numerous septae within the mitochondrial matrix (Figure 1D); and (iv) decreased mtDNA stability leading to increased production of cytoplasmic *petites* resulting from large (>50%) deletions (ρ^-) or complete loss (ρ^0) of mtDNA (50–70% *vs.* <5% in *WT*) (see [20] and [21] and references therein for explanations of these secondary consequences).

In order to express the yeast *ATP9* gene from nuclear DNA, we synthesized a version codon-optimized for nuclear expression in yeast and fused to a mitochondrial targeting sequence (MTS) from the subunit 9 precursor encoded by the nuclear gene *PaAtp9-7* in *P. anserina* (named yAtp9-Nuc, Figure S2 and S3A). In this filamentous fungus, subunit 9 is produced by two different nuclear genes, *PaAtp9-7* and *PaAtp9-5*, that are differentially expressed during its life cycle [2]. When tested on a recoded yeast *ATP8* gene, which can be functionally expressed from nuclear DNA [17], we found the *PaAtp9-7* MTS to be effective in yeast, as evidenced by a complete rescue of a *Δatp8* strain (not shown). This experiment supports our design of the yAtp9-Nuc and its MTS (detailed in Figure S2), which we based on subunit 9 in *Neurospora crassa* [22]. Nonetheless, upon transformation with yAtp9-Nuc, *Δatp9* yeast did not grow on respiratory substrates even after more than 20 days (Figure 2A). Using antibodies against yeast Atp9p, only a protein with the size of the unprocessed yAtp9-Nuc was detected in very small amounts and exclusively in mitochondria (Figure 2B). This indicates that yAtp9-Nuc is targeted to mitochondria, but cannot cross the mitochondrial inner membrane. Since the levels of this protein are so low, we hypothesized

Table 1. Genotypes and sources of yeast strains.

Strain	Nuclear genotype	mtDNA	Source
DFS160	<i>Matx Δleu2 ura3-52 ade2-101 Δarg8::URA3 kar1-1</i>	ρ ⁰	[19]
DFS160-a	<i>Mata Δleu2 ura3-52 ade2-101 Δarg8::URA3 kar1-1</i>	ρ ⁰	[51]
NB40-3C	<i>Mata lys2 leu2-3,112 ura3-52 his3ΔHinDIII arg8::hisG</i>	ρ ⁺ <i>cox2-62</i>	[19]
SDC17-31b	<i>Matx met6 lys2 his3 ura3 Δarg8::hisG atp16::KanMX atp4::URA3</i>	ρ ⁺ <i>Arg8^m</i>	[52]
YTMT2	<i>Matx ade2 leu2-3,112 ura3-52 Δarg8::URA3</i>	ρ ⁺ <i>cox2-62</i>	This study
FY1679	<i>MATA/MATx ura3-52/ura3-52; trp1Δ 63/TRP1; leu2Δ 1/LEU2; his3Δ 200/HIS3; GAL2/GAL2</i>	ρ ⁺	[53]
MR6 (WT)	<i>Mata ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 Δarg8::HIS3</i>	ρ ⁺	[20]
MR6-α	<i>Matx ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 Δarg8::HIS3</i>	ρ ⁺	This study
RKY4	<i>Matx leu2Δ ura3-52 ade2-101 arg8::URA3 kar1-1</i>	ρ ⁻ <i>Δatp9::ARG8^m</i>	This study
RKY26 (<i>Δatp9</i>)	<i>Mata ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 Δarg8::HIS3</i>	ρ ⁺ <i>Δatp9::ARG8^m</i>	This study
FG9	<i>Mata leu2Δ ura3-52 ade2-101 arg8::URA3 kar1-1</i>	ρ ⁻ <i>ATP9</i>	This study
MB2	<i>Matx ade2-1 his3-11,15 trp1-1 leu2-3,112 ura3-1 CAN1 Δarg8::HIS3</i>	ρ ⁻ <i>ATP9</i>	This study
AMY7	RKY26 transformed with plasmid pAM16 (<i>Δatp9+PaAtp9-5</i> , CEN)	ρ ⁺ <i>Δatp9::ARG8^m</i>	This study
AMY8	RKY26 transformed with plasmid pAM17 (<i>Δatp9+PaAtp9-7</i> , CEN)	ρ ⁺ <i>Δatp9::ARG8^m</i>	This study
AMY10	RKY26 transformed with plasmid pAM19 (<i>Δatp9+PaAtp9-5</i> , 2 μ)	ρ ⁺ <i>Δatp9::ARG8^m</i>	This study
AMY11	RKY26 transformed with plasmid pAM20 (<i>Δatp9+PaAtp9-7</i> , 2 μ)	ρ ⁺ <i>Δatp9::ARG8^m</i>	This study
AMY5	RKY26 transformed with plasmid pAM11 (<i>Δatp9+γAtp9-Nuc</i> , 2 μ)	ρ ⁺ <i>Δatp9::ARG8^m</i>	This study
AMY6	RKY26 transformed with plasmid pAM12 (<i>Δatp9+Atp9-Hyb</i> , 2 μ)	ρ ⁺ <i>Δatp9::ARG8^m</i>	This study

doi:10.1371/journal.pgen.1002876.t001

that it had been degraded, most likely by the i-AAA protease (a homo-oligomer of Yme1p) that preferentially degrades membrane proteins and whose catalytic site faces the intermembrane space [23]. We confirmed the i-AAA-mediated degradation of yAtp9-Nuc by expressing the latter protein in a *Yme1* strain. In this strain, the unprocessed protein was far more abundant, while the mature form remained almost absent. These observations verify the defective *in vivo* transport of yAtp9-Nuc across the inner membrane as well as its rapid degradation in the intermembrane space (Figure 2C).

Nuclear Expression of *P. anserina* *Atp9* Genes Complements *Δatp9* Yeast

We next tested allotopic expression of subunit 9 in yeast using the naturally nuclear *Atp9* genes from *P. anserina* (*PaAtp9-7* and *PaAtp9-5*). The subunit 9 proteins encoded by these genes display 70% amino acid sequence identity with yeast Atp9p (Figure S2). We designed synthetic *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* genes codon-optimized for high expression levels in yeast under control of the Tet-off (doxycyclin-repressible) promoter and cloned into both centromeric (pCM189, CEN) and multicopy (pCM190, 2 μ) plasmids (see Figure S3B–C for nucleotide sequences). Upon transformation with each of these plasmids (pAM17 (*PaAtp9-7*, CEN), pAM20 (*PaAtp9-7*, 2 μ), pAM16 (*PaAtp9-5*, CEN) and pAM19 (*PaAtp9-5*, 2 μ)), the *Δatp9* strain regained respiratory capacity, although not to the extent of the *WT* (Figure 3A). The *PaAtp9-5* gene enabled better growth than *PaAtp9-7*, and for both genes, the multicopy plasmid was more effective than the centromeric one. Consistent with the growth measurements, *PaAtp9-5* confers more effective mitochondrial functions related to oxidative phosphorylation than *PaAtp9-7*, as evidenced by the analysis of strains AMY10 (*Δatp9+PaAtp9-5*, 2 μ) and AMY11 (*Δatp9+PaAtp9-7*, 2 μ) (Table 2). The oxygen consumption rates in AMY10 and AMY11 mitochondria (at state 3 with NADH as an

electron donor) were respectively estimated at 80% and 40% of the *WT* rate, and the rates of ATP synthesis at 50% and 25%. This decrease in oxidative phosphorylation capacity is mainly due to reduced amounts of respiratory complexes and assembled ATP synthase (Figure 3B). Oligomeric forms of the ATP synthase were much less abundant than the monomeric form in AMY10 and AMY11 (shown for AMY10 in Figure 3B).

The reduced ATP synthase levels in the strains expressing the *P. anserina* genes could be due to poor expression, transport, processing or assembly of subunit 9; our evidence indicates the latter is responsible. In a previous study [24], we found that the centromeric pCM189 plasmid enabled sufficient expression of yeast ATP synthase subunit δ, present at one copy per ATP synthase complex. The expression level of the *PaAtp9* genes from the multicopy plasmid pCM190 should thus be sufficient to produce the ten required copies of Atp9p per ATP synthase complex. Unfortunately, our yeast Atp9p antibodies did not recognize the *P. anserina* proteins (see Figure S2), and attempts to raise antibodies directly against *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* were unsuccessful. We constructed HA-tagged version of these proteins, but they failed to complement *Δatp9* yeast. We were therefore unable to directly assess the levels of processed, unprocessed, and unassembled subunit 9 by western blot. Yet several lines of evidence indicate that F_O assembly was less effective with the *PaAtp9* proteins. One is the reduced sensitivity of mitochondrial ATPase activity to oligomycin, a specific F_O inhibitor, in these strains (<40% vs. 80% for *WT*, Table 2). As Atp9p is a constituent of the F_O and the F₁ can assemble independently of F_O [25], inefficient expression of the *PaAtp9-7* and *PaAtp9-5* proteins would cause free F₁ to accumulate, reducing the sensitivity of mitochondrial ATPase activity to oligomycin. A lower yield of F_O is additionally supported by higher levels of free F₁ in the mitochondria of the modified yeast strains than in *WT* (BN-PAGE for AMY10 in Figure 3B) and by diminished Atp6p levels

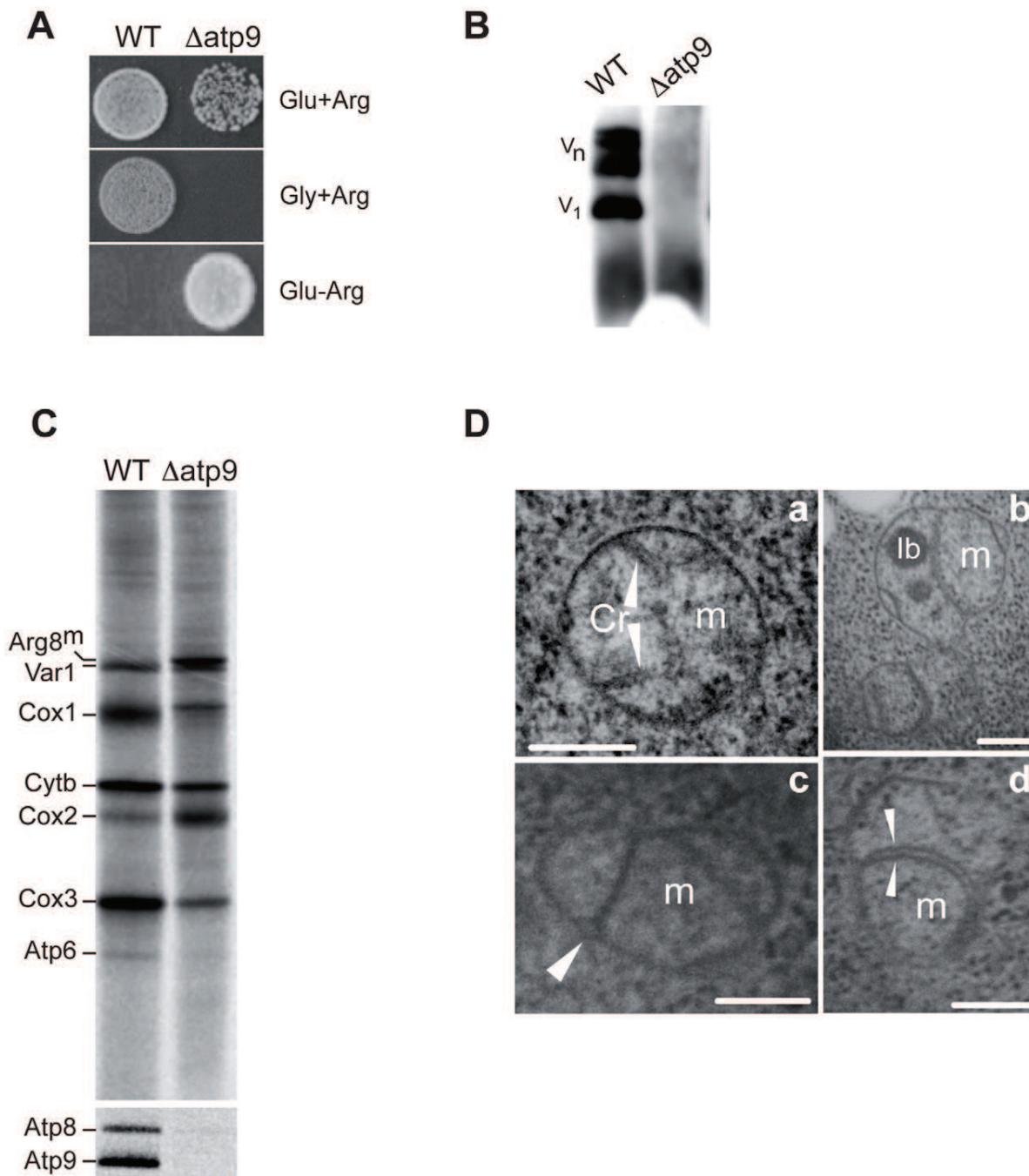


Figure 1. Deletion of the yeast mitochondrial *ATP9* gene and resulting phenotypes. A) The mitochondrial *ATP9* gene was deleted and replaced with *ARG8^m* (see Figure S1 for details) in a wild-type strain lacking the nuclear *ARG8* gene. As a result, the $\Delta atp9$ yeast cannot grow on glucose (Glu) media lacking arginine (Arg) whereas the parental strain (*WT*) does not; in addition, $\Delta atp9$ yeast cannot grow on glycerol (Gly). B) ATP synthase levels in *WT* and $\Delta atp9$. Isolated mitochondria were separated by BN-PAGE and western blotted with antibodies against Atp4p; V_1 and V_n respectively indicate monomeric and oligomeric forms of ATP synthase. C) Pulse labelling of proteins translated in mitochondria. Total proteins were prepared from cells incubated in the presence of ³⁵S methionine and cysteine as well as cycloheximide to inhibit cytosolic protein synthesis. Proteins (40,000 cpm per lane) were separated on 12% (Cox3p and Atp6p) or 17% (Atp9p and Atp8p) SDS-PAGE containing 6 M urea. D) Electron microscopy of *WT* (a) and $\Delta atp9$ (b–d) cells grown in galactose (80 nm-thin sections); m, mitochondria; Cr, cristae; lb, inclusion bodies; arrowheads in (a) point to Cr, to outer mitochondrial membrane in (c), and to septae in (d); bars, 0.2 μ m. doi:10.1371/journal.pgen.1002876.g001

(30–50%), while γ -F₁ protein levels were unaffected in both total and mitochondrial protein extracts (Figure 3C). As Atp6p is rapidly degraded when it cannot be incorporated into ATP

synthase [26], the steady state level of this protein is a good indicator of the amount of assembled subunit 9-ring. The subunit 6 deficiency correlates with the respective reductions in the rate of

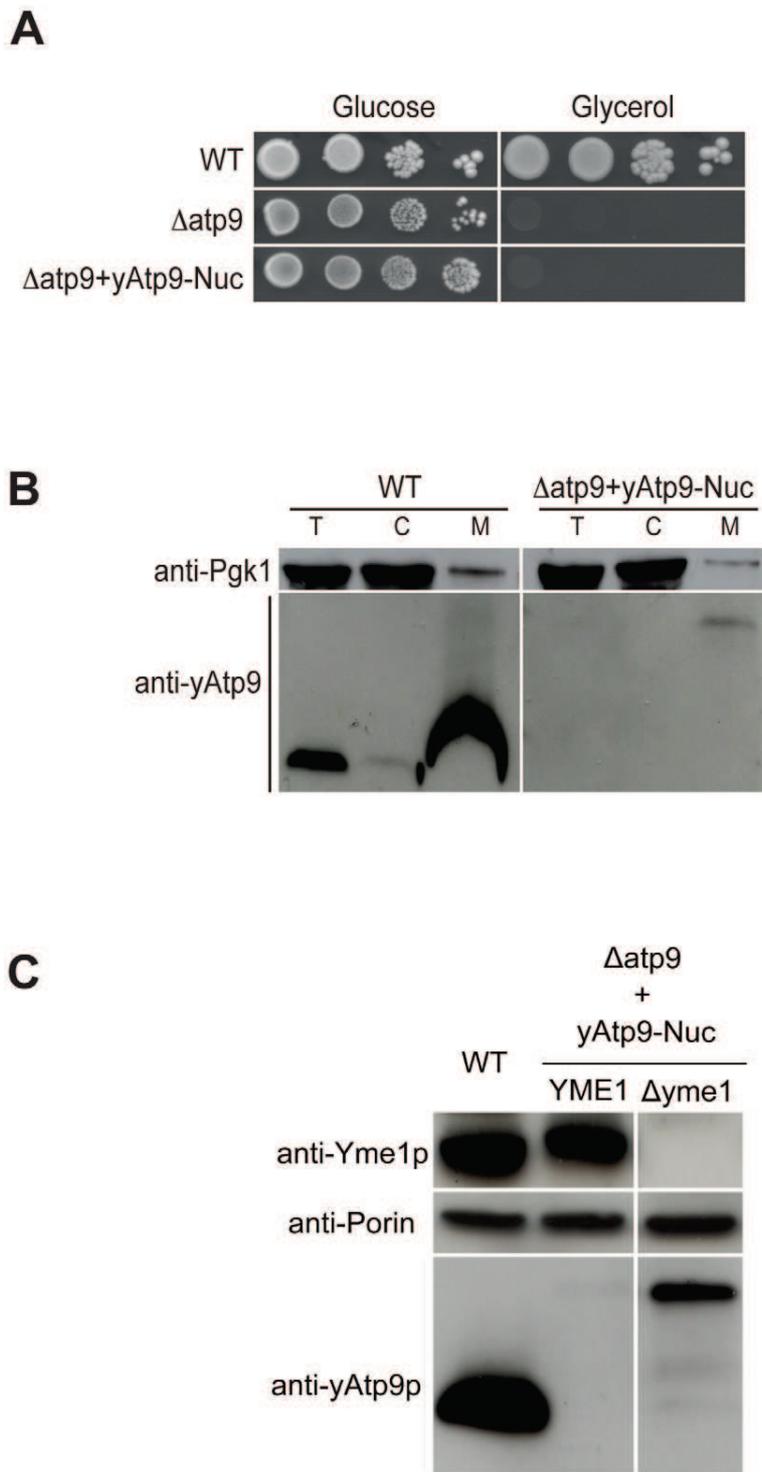


Figure 2. A nuclear version of the yeast mitochondrial *ATP9* gene fails to complement the $\Delta atp9$ yeast. We engineered a nuclear version of the yeast *ATP9* gene (*yAtp9-Nuc*) by adding a mitochondrial targeting sequence (derived from the *P. anserina Atp9-7* gene) and adjusting the genetic code for nuclear expression of the endogenous gene (see Figure S2 and S3A for amino acid and nucleotide sequences). *yAtp9-Nuc* was tested for its capacity to complement $\Delta atp9$ yeast with respect to respiratory capacity. A) Growth on rich glucose (YPGA) and glycerol (N3) media of serial dilutions of WT, $\Delta atp9$, and $\Delta atp9$ transformed with *yAtp9-Nuc*. B) Total cellular (T), mitochondrial (M) and post-mitochondrial supernatant (C) protein extracts were prepared from WT and $\Delta atp9+yAtp9-Nuc$ strains. Samples were separated via SDS-PAGE and probed with antibodies against yeast *Atp9p* and the cytosolic protein *Pgk1p* (phosphoglycerate kinase). C) Western blot of total proteins prepared from WT and $\Delta atp9$ yeast transformed with *yAtp9-Nuc* with or without the *YME1* gene ($\Delta yme1$) reveals that the *yAtp9-Nuc* protein is degraded by the *i*-AAA protease (an oligomer of *Yme1p*).

doi:10.1371/journal.pgen.1002876.g002

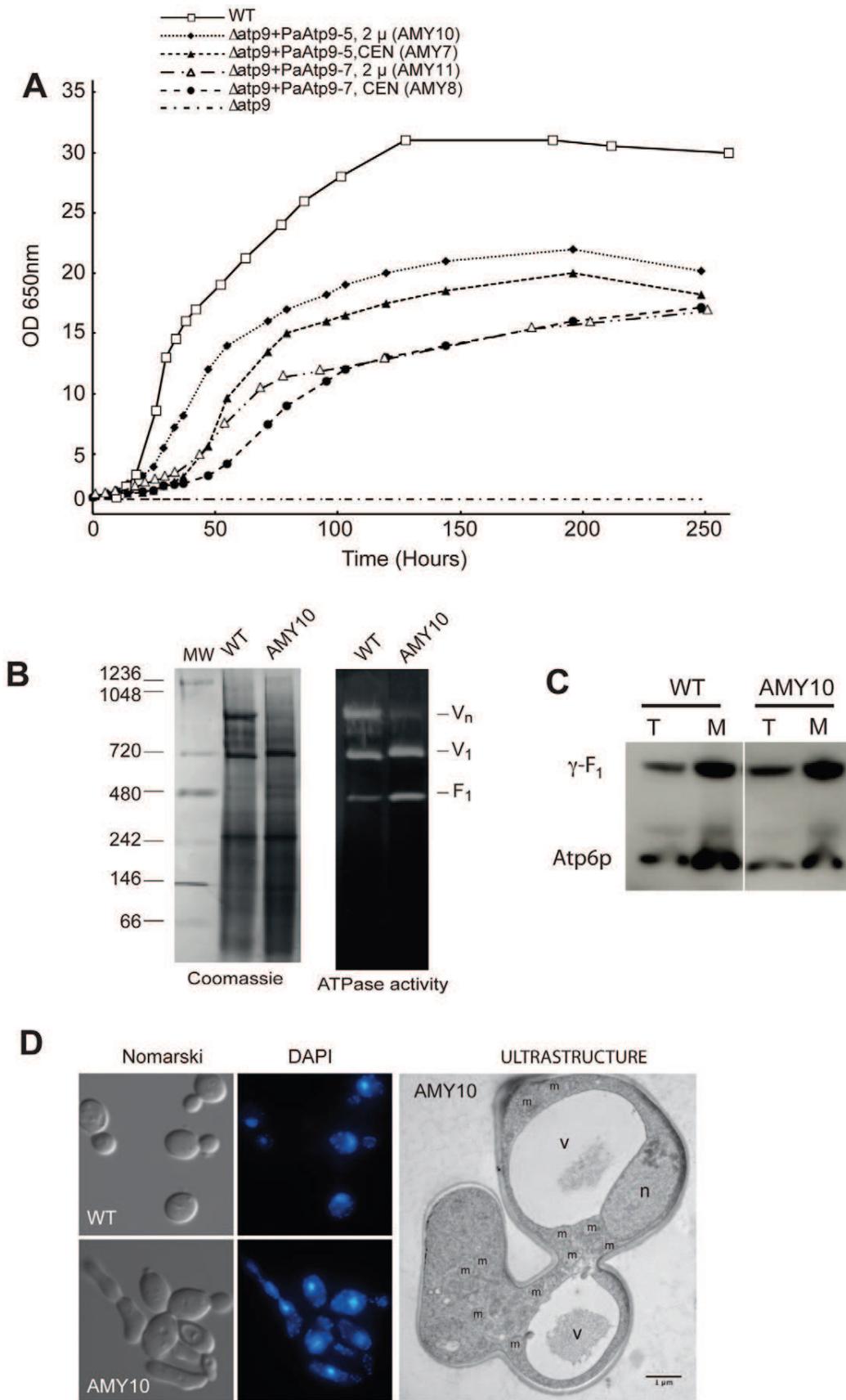


Figure 3. The *P. anserina* *Atp9* genes restore respiratory competence in Δ *atp9* yeast. The Δ *atp9* strain was transformed with CEN or 2 μ plasmids harbouring *PaAtp9-7* or *PaAtp9-5*, yielding strains AMY8 (Δ *atp9*+*PaAtp9-7*, CEN), AMY11 (Δ *atp9*+*PaAtp9-7*, 2 μ), AMY7 (Δ *atp9*+*PaAtp9-5*, CEN), and AMY10 (Δ *atp9*+*PaAtp9-5*, 2 μ). A) Growth curves of all strains in rich glycerol/ethanol medium at 28°C (subsequent panels use the same growth conditions). B) ATP synthase levels in *WT* and AMY10 revealed by separation of isolated mitochondria by BN-PAGE. The ATP synthase complexes (V_1 , monomer; V_n , oligomers) and free F_1 were revealed in-gel by their ATPase activity (right). C) Total cellular (*T*) and mitochondrial (*M*) protein extracts were prepared from *WT*, AMY7 and AMY10 grown in YPEG. Samples (20 μ g) were separated by SDS-PAGE and probed with antibodies against yeast *Atp6p* and γ - F_1 . D) Differential interference contrast microscopy (left, 'Nomarski') and DAPI staining/fluorescence microscopy (middle) of *WT* and AMY10 cells. Right ('Ultrastructure') are electron micrographs of AMY10 cells (80 nm-thin sections). *V*, vacuole; *n*, nucleus; *m*, mitochondria.
doi:10.1371/journal.pgen.1002876.g003

ATP synthesis in the yeast strains expressing the *PaAtp9* genes. On the other hand, the catalytic efficiency of ATP synthesis (number of ATP molecules synthesized per electron transferred to oxygen) was comparable to that of *WT* yeast (Table 2), meaning that once in the ATP synthase complex the *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* proteins properly interact with other F_0 components and the F_1 sector. These results show that the reduced sensitivity of mitochondrial ATPase activity to oligomycin and the higher levels of free F_1 in the modified yeast strains are most likely due to an imbalanced production of F_0 and F_1 , which is a result of less efficient F_0 assembly in these strains.

ATP synthase is known to be far from limiting for respiratory growth in yeast, since a deficit in its activity of at least 80% is required before a growth defect can be observed [27,28]. Thus, it was expected that with respective ATP synthesis levels of 50% and 25%, AMY10 and AMY11 would grow far better than we observed. This discrepancy is likely because expressing the *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* genes causes deleterious side effects in yeast. For example, the modified yeast strains displayed aberrant, pseudo-hyphal cell morphology when grown in glycerol and ethanol medium (shown for AMY10, Figure 3C). It is not clear how this phenotype arises, but it very likely impedes respiratory growth of Δ *atp9* yeast expressing the *PaAtp9* genes.

Reducing the Hydrophobicity of the First Transmembrane Segment of Subunit 9 Is Required for Its Nuclear Expression

The results described above are evidence that structural modification of subunit 9 is required for functional expression of this protein from nuclear DNA. A striking difference between the *PaAtp9* proteins and yeast *Atp9p* is reduced hydrophobicity in the

first transmembrane segment of the former, as indicated by hydrophathy plots (Figure 4A). Additional evidence of reduced hydrophobicity results from comparing the resistance of the subunit 9-ring to detergents in *P. anserina* and yeast. To make this comparison, we enriched mitochondrial extracts for ATP synthase from engineered *P. anserina* strains expressing only *PaAtp9-7* or *PaAtp9-5* (details in Text S1). On a denaturing SDS gel, the *PaAtp9* proteins were both detected only as monomers, whereas yeast *Atp9p* was mainly present as oligomeric rings (Figure 4B). These results indicate that the inter-subunit interactions responsible for maintaining the subunit 9-rings are significantly less hydrophobic in *P. anserina* than in yeast.

To test whether hydrophobicity of the first transmembrane segment of subunit 9 affects expression of this protein from nuclear DNA, we designed a hybrid gene (*Atp9-Hyb*) encoding the MTS and first transmembrane segment of the *PaAtp9-7* protein, followed by the connecting loop and second transmembrane segment of yeast *Atp9p* (see Figure S2 and S3D for protein and nucleotide sequences). Although Δ *atp9* yeast expressing *Atp9-Hyb* grew extremely slowly on glycerol (not shown), some processed hybrid protein was detected in mitochondria (Figure 5) whereas, as shown above (Figure 2B), only trace amounts of unprocessed protein were detected in Δ *atp9* yeast expressing a nuclear version of the endogenous yeast *ATP9* gene. Taken together, these data indicate that the high hydrophobicity of the first transmembrane segment of yeast *Atp9p* prevents its translocation across the mitochondrial membranes from the cytosol.

Transcription Profiling Reveals Regulatory Consequences of *ATP9* Relocation

To investigate the effects of expressing the *P. anserina* *ATP9* genes in Δ *atp9* yeast at a cellular level, we carried out whole-genome

Table 2. Respiratory and ATP hydrolysis/synthesis activities of mitochondria.

Strain Genotype (Name)	Growth medium	Oxygen consumption (nAtO ₂ /min/mg)		ATP synthesis (nmol ATP/min/mg)	ATP hydrolysis (nmol Pi/min/mg)		
		NADH+ADP	NADH+CCCP		– Oligo	+ Oligo	% Inhibition
<i>WT</i> (MR6)	Glycerol+Ethanol	653±58	1261±166	769±55	4159±316	549±60	87
Δ <i>atp9</i> + <i>PaAtp9-5</i> (2 μ) (AMY10)	Glycerol+Ethanol	516±46	1081±17	377±50	3717±866	2783±518	33
Δ <i>atp9</i> + <i>PaAtp9-7</i> (2 μ) (AMY11)	Glycerol+Ethanol	270±38	522±89	186±57	ND	ND	ND
<i>WT</i> (MR6)	Galactose	613±12	1081±107	637±18	4474±222	665±108	88
Δ <i>atp9</i> (RKY26)	Galactose	31±4	44±12	<10	3086±164	2700±180	14

Mitochondria were isolated from yeast cells grown at 28°C in rich glycerol+ethanol (YPEG) or rich galactose (YPGALA), as indicated. All cultures contained less than 5% ρ^-/ρ^0 cells, except that of Δ *atp9* where about 50% ρ^-/ρ^0 cells were scored. Additions were 0.15 mg/ml proteins, 4 mM NADH, 150 mM ADP, 4 mM CCCP, and 3 μ g/ml oligomycin (*Oligo*). The values reported are averages of triplicate assays \pm standard deviation. Respiratory and ATP synthesis activities were measured on freshly isolated, osmotically-protected mitochondria buffered at pH 6.8. For the ATPase assays, mitochondria kept at -80°C were thawed and the reaction was performed in absence of osmotic protection at pH 8.4. ND, not determined.
doi:10.1371/journal.pgen.1002876.t002

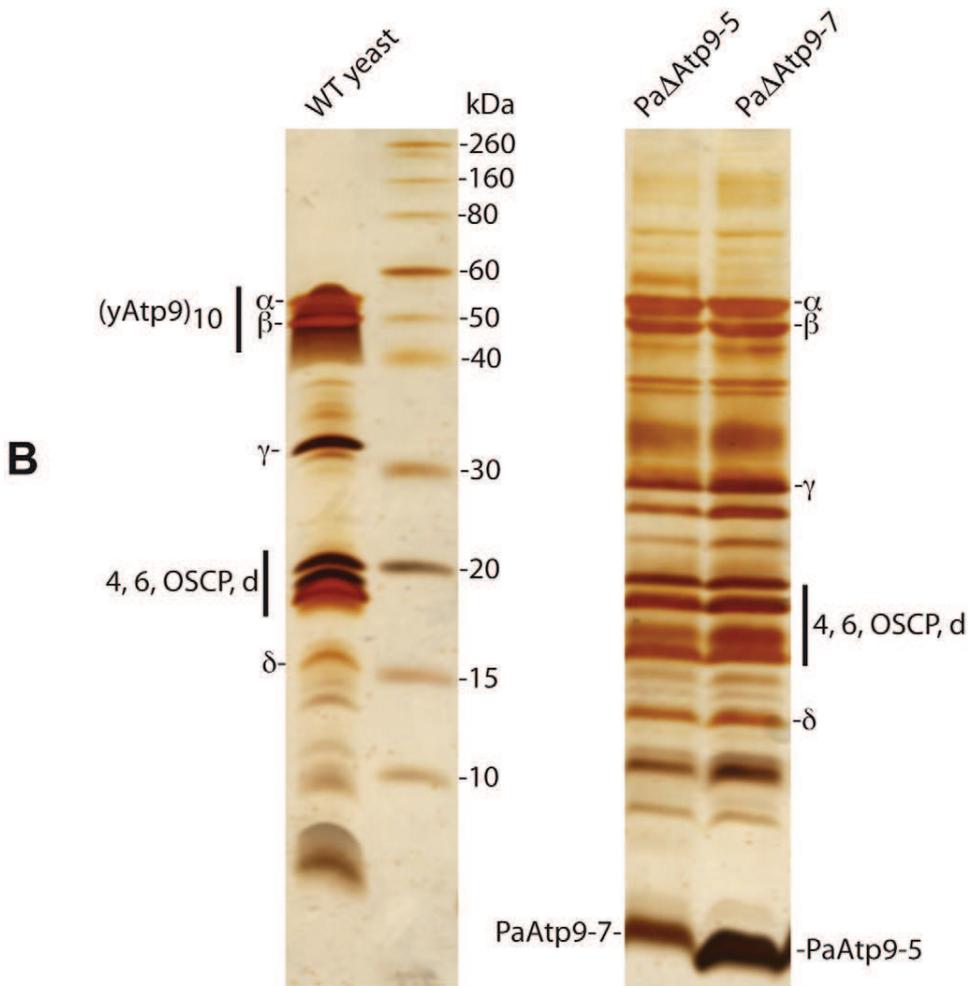
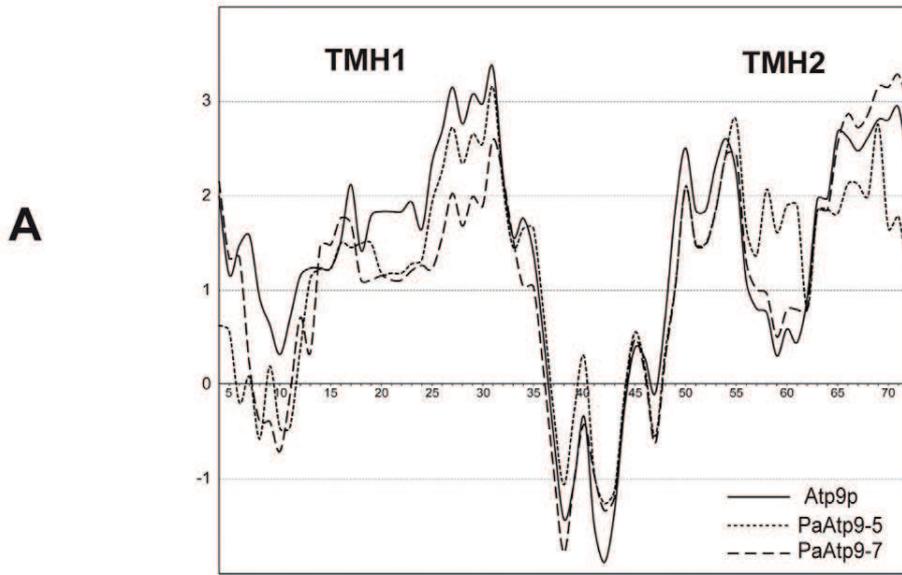


Figure 4. The *P. anserina* *Atp9* proteins are less hydrophobic than yeast *Atp9p*. A) Hydropathy profiles of the *PaAtp9-7* and *PaAtp9-5* proteins and yeast *Atp9p*, generated according to [54] with a window size of 13. B) *P. anserina* strains expressing exclusively either *PaAtp9-7* (*PaΔAtp9-5*) or *PaAtp9-5* (*PaΔAtp9-7*) were constructed and ATP synthase was enriched from their mitochondrial extracts, separated by SDS-PAGE and silver-stained along with *WT* yeast ATP synthase. Positions of some ATP synthase subunits are indicated. The *PaAtp9-5* protein is stained much more strongly than the *PaAtp9-7* protein, which may be due to the differences in their amino acid sequences. doi:10.1371/journal.pgen.1002876.g004

transcription profiling using high-resolution tiling microarrays (data browsable at <http://steinmetzlab.embl.de/atp9/>; results of analysis in Dataset S1; raw data in ArrayExpress database; functional analysis in Figure 6; intercorrelation of samples in Figure S4). Notably, no functions related to oxidative phosphorylation are enriched in genes differentially expressed between any of the relocation strains and *WT* (Figure 6), indicating that the complementation is mostly sufficient for the function of the respiratory chain. The only genes directly involved in OXPHOS whose expression changes when *ATP9* is relocated are *QCR9* and *NCA3*. Since the latter regulates translation of *ATP6* and *ATP8* [29] and the former may play a role in cytochrome *bc₁* biogenesis [30], the downregulation of these genes supports the biochemical indications of an overall decrease in respiratory chain biogenesis and assembly. Some signals of the retrograde response, a typical sign of respiratory deficiency, also suggest that the complementation is incomplete (Figure 6). At the cellular level, we also see evidence of the response to overproduction of a new hydrophobic protein in the cytoplasm via enrichment of the Gene Ontology term “response to temperature stimulus” (MGSA, posterior probability >0.85), which entails modulation of protein folding. Notably, the gene *SSA3* is among the most strongly upregulated in the relocation strains, which encodes an HSP70 chaperone protein involved in co-translational protein-membrane targeting and whose overexpression protects a yeast model of Parkinson’s disease from alpha-synuclein toxicity [31]; it is therefore possible that this protein helps to prevent toxic aggregation of the *PaAtp9* proteins. The morphological abnormalities of the relocation strains are clarified by the transcription profiles, in particular by functional enrichments like “cell separation during cytokinesis” among downregulated genes ($P=0.003$) and “cell-cell adhesion” among upregulated genes ($P=0.008$) as well as enrichments for targets of the transcription factor *PHD1* (MGSA, posterior probability >0.95), a master

regulator of pseudohyphal growth (Figure 6). Taken together, the transcriptome data corroborate the biochemical observations while providing more specific insights into the cellular outcome of relocating *ATP9* to the nucleus in yeast, particularly in terms of the difficulties in folding the foreign protein.

Discussion

Our study demonstrates that allotopic expression of the yeast mitochondrial *ATP9* gene is possible, provided that sufficient modifications to the protein structure are made. Despite previous reports that yeast *Atp9p* can be imported by isolated wild-type mitochondria [18], we found that expressing the yeast *ATP9* gene from nuclear DNA (*yAtp9-Nuc* construct, see Figure 2) does not restore *in vivo* respiratory function in a *Δatp9* strain. Although the precursor protein is correctly targeted to mitochondria, it cannot cross the mitochondrial inner membrane and is degraded in the intermembrane space by the *i*-AAA protease (Figure 2).

We achieve allotopic expression of ATP synthase subunit 9 using the nuclear *Atp9* genes of *P. anserina* (*PaAtp9-5* and *PaAtp9-7*). Remarkably, despite only 70% sequence identity between these proteins and yeast *Atp9p*, the production of functional ATP synthase was significantly restored (30–40%) in *Δatp9* yeast and the ‘hybrid’ enzymes displayed high catalytic efficiency. This indicates that the high hydrophobicity of yeast *Atp9p* relative to the *P. anserina* proteins impedes expression of the former from nuclear DNA. This constraint is also evident in the case of ATP synthase subunit 6, which contains five membrane-spanning segments. In the few species where this protein is nuclear-encoded, the first three transmembrane segments of subunit 6 are significantly less hydrophobic than the ones encoded by mitochondrial genomes [32]. Several of our results indicate that reducing the hydropho-

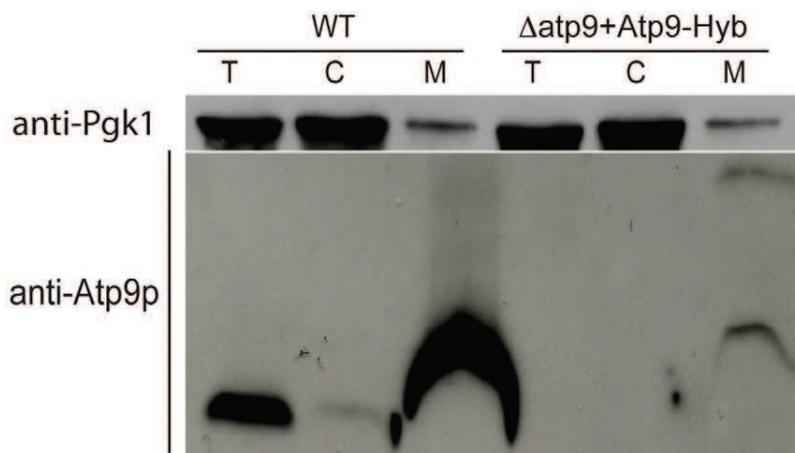


Figure 5. Reducing the hydrophobicity of the first transmembrane segment of yeast *Atp9p* improves its import into mitochondria. The *Δatp9* strain was transformed with a hybrid *Atp9* gene (*Atp9-Hyb*) encoding the mitochondrial targeting sequence (MTS) and first transmembrane segment (TMH1) of the *PaAtp9-7* protein, followed by the connecting loop and second transmembrane segment (TMH2) of yeast *Atp9p* (see Figure 2A for amino acid sequence and Figure S3E for nucleotide sequence). Total cellular (*T*), mitochondrial (*M*) and post-mitochondrial supernatant (*C*) protein extracts were prepared from *WT* and *Δatp9+Atp9-Hyb* strains. Samples were separated by SDS-PAGE and probed with antibodies against yeast *Atp9p* and the cytosolic protein Pgk1p (phosphoglycerate kinase). doi:10.1371/journal.pgen.1002876.g005

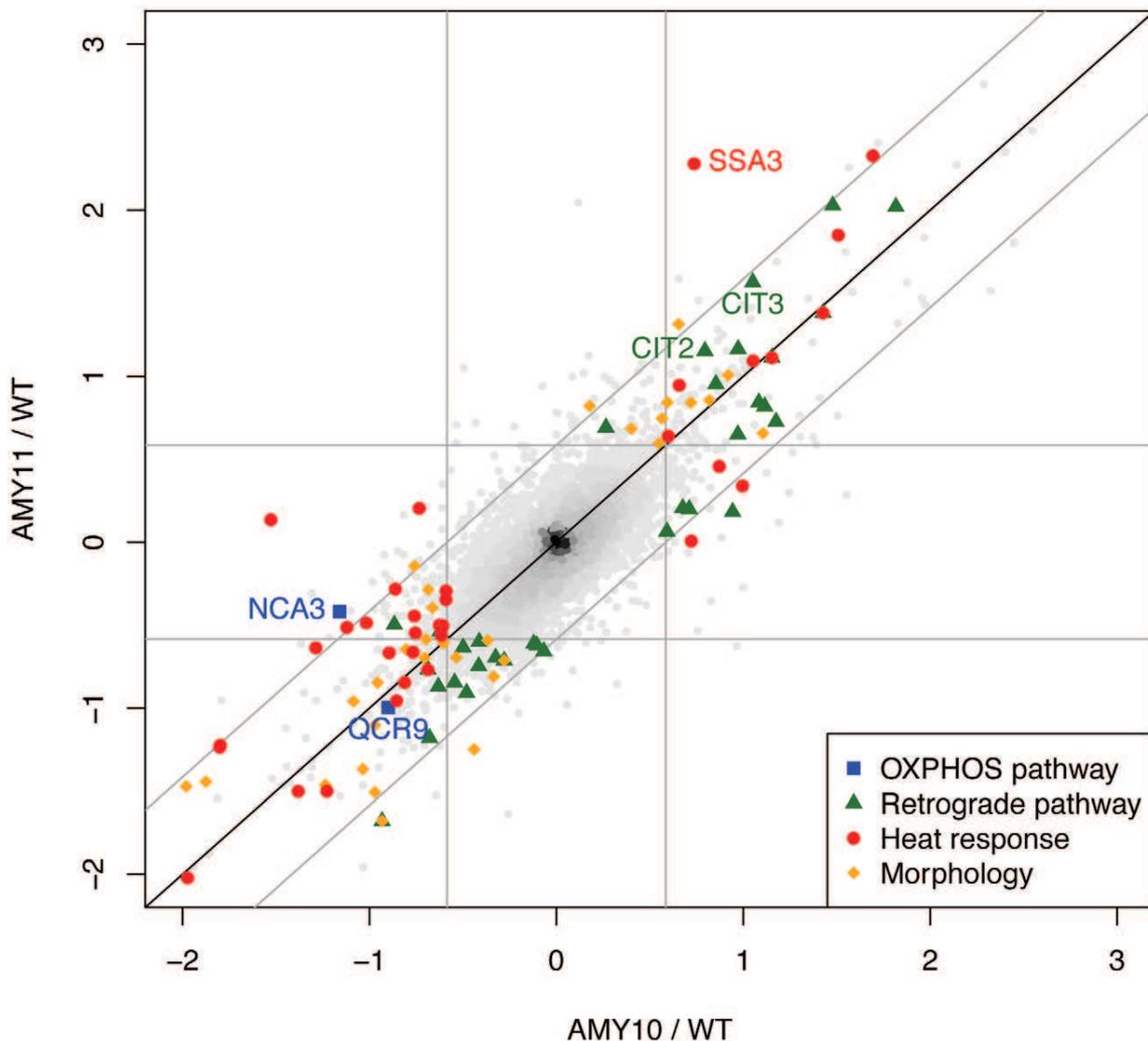


Figure 6. Transcriptome profiles of yeast strains expressing *P. anserina Atp9* genes indicate functional OXPHOS and regulatory responses to the nuclear relocation of *ATP9*. For all genes in the yeast genome, the expression levels in AMY11 (expressing *PaAtp9-7*) are plotted against those of AMY10 (*PaAtp9-5*), both displayed as \log_2 ratios to *WT* expression levels; differentially expressed genes in the main functionally relevant categories are indicated by colours. The square formed by the grey lines delineates the boundaries of statistically significant expression differences (see Text S1) between either strain and the *WT*; genes beyond the diagonal grey lines are differentially expressed between AMY10 and AMY11. For clarity, genes in the categories listed are only indicated if they were differentially expressed relative to *WT* in at least one strain. Categories were defined as follows: OXPHOS pathway - subunits (1/35 differentially expressed) and biogenesis factors (1/42); Retrograde pathway - transcriptional targets of the factors Gcn4p (29/126) and Rtg3p (6/31), plus *CIT2* and *CIT3*; Heat response - Gene Ontology (GO)-annotated “response to heat” genes (28/199); Morphology - Phd1p targets (23/81), plus GO “cell-cell adhesion” (2/4) and “cytokinesis, completion of separation” genes (6/11). All categories except OXPHOS were significantly enriched among differentially expressed genes (according to Fisher’s exact test with multiple hypothesis testing correction, or to Model Gene Set Analysis (MGSA); see Text S1). doi:10.1371/journal.pgen.1002876.g006

bicity of subunit 9 is also required for nuclear relocation. Hydropathy plots (Figure 4A) indicate significantly lower hydrophobicity in the first transmembrane segment of the *P. anserina Atp9* proteins; in addition, the *P. anserina* subunit 9-rings can be dissociated much more easily with detergents than the yeast *Atp9p*-ring (Figure 4B). Finally, when substituting the first transmembrane segment of yeast *Atp9p* with that of the *PaAtp9-7* protein (*Atp9-Hyb* construct), mature protein was detected in mitochondria (Figure 5), which was not observed with nuclear expression of the endogenous yeast *ATP9* gene (Figure 2B). From

these results, we conclude that reducing the hydrophobicity of the first transmembrane segment of subunit 9 is necessary for this protein to cross the mitochondrial inner membrane, after which it can be inserted into the membrane and correctly folded for incorporation into ATP synthase (Figure 7). These results clearly demonstrate the importance of protein structure and hydrophobicity in transferring mitochondrial genes to the nucleus.

Additional adaptations beyond protein structure are required to optimize allotopic expression of subunit 9; in particular, transcriptional evidence of the retrograde response in the

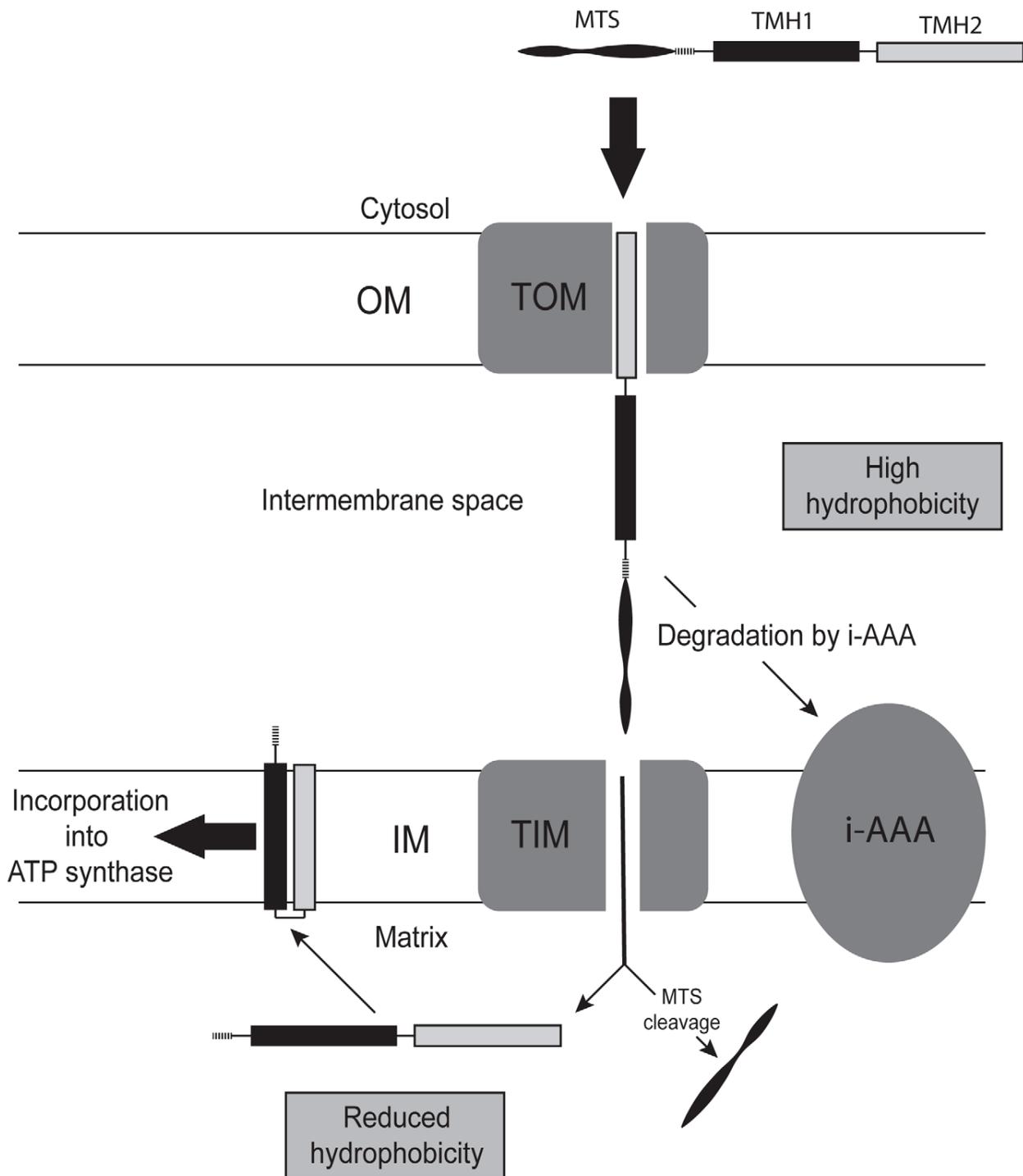


Figure 7. Model of how a reduction in the hydrophobicity of subunit 9 permits its functional expression from nuclear DNA. When the hydrophobicity of subunit 9 is too high, the protein cannot cross the inner mitochondrial membrane (IM) and is degraded in the intermembrane space by the i-AAA protease. With reduced hydrophobicity, subunit 9 can cross the IM and is processed by the matrix processing peptidase (MPP), properly inserted into the IM, and assembled into ATP synthase (see text for details). OM, outer mitochondrial membrane; MTS, mitochondrial targeting sequence; TMH, transmembrane segment; TOM, translocase of the OM; TIM, translocase of the IM.
doi:10.1371/journal.pgen.1002876.g007

relocation strains indicates that their mitochondria are not functioning optimally (Figure 6). Indeed, although the ATP synthase in *Δatp9* yeast expressing the *P. anserina Atp9* genes is

catalytically efficient, the yield in complex assembly is quite low compared to wild-type yeast (30–40%). One possible reason is that the *P. anserina* proteins are more exposed to proteases than the native

yeast Atp9p, the latter being inserted into the membrane during its own synthesis in mitochondria [26]. The upregulation of *SSA3* in the relocation strains, a gene that has been implicated in cotranslational import [31], may similarly have facilitated the transport of the *PaAtp9* proteins across the outer mitochondrial membrane; this, however, would not protect them from mitochondrial proteases. In addition, yeast ATP synthase assembly is a remarkably evolved and sophisticated system: multiple factors execute highly specific functions ranging from synthesis to oligomerization of the individual subunits [25,26]. The factors that assemble *ATP9* depend on its expression from the mitochondria; it is therefore natural that this process would be less efficient when the protein is coming from an unexpected direction. Decreased biogenesis of ATP synthase is also supported by the reduced expression of *NC43*, a gene that regulates expression of Atp6p and Atp8p [29]. Effective nuclear expression of subunit 9 may also require adaptations beyond mitochondrial biogenesis, as suggested by the aberrant cellular morphology of strains expressing the *P. anserina* *Atp9* genes (Figure 3C). We have therefore undertaken the selection of mutations that improve allotopic expression of subunit 9, a strategy that could bring new insight into the mechanisms involved in organellar gene transfer during the evolution of eukaryotes. Exploration of these mechanisms holds promise for developing therapeutic strategies for human diseases caused by mitochondrial DNA mutations. There is no report thus far with strong functional and biochemical evidence that allotopically expressed proteins are properly incorporated into OXPHOS complexes in human cells [33,34]. Our yeast-based approach has potential to unravel the general adaptations necessary for expressing mitochondrial proteins from nuclear DNA.

A recent survey of the *ATP9* gene in 26 fungal species has revealed a strong diversity of genomic locations of this gene, especially in the *Pezizomycotina* subphylum which is comprised primarily of filamentous fungi [2]. Phylogenetic data indicate that early in the evolution of this group of fungi, *ATP9* was transferred to the nucleus twice, which was eventually followed by independent mitochondrial gene loss events. As a result, five different distributions of the *ATP9* gene between the nuclear and mitochondrial genomes can be found in filamentous fungi. The complete lack of functional expression of yeast Atp9p from the nucleus and partial complementation by a naturally nuclear version of this protein demonstrate that effective nuclear relocation of the *ATP9* gene requires multifactorial adaptations; it would therefore probably not occur during evolution unless it conferred significant benefits to the organism. This idea is supported by a recent study in *P. anserina* where subunit 9 is produced by two nuclear genes (*PaAtp9-5* and *PaAtp9-7*) and where the ancestral mitochondrial gene copy has been lost [2]. *PaAtp9-5* is strongly expressed in germinating spores, where a high rate of ATP synthase production is necessary. In the sexual reproduction phase, when external nutrients become limited, the fungus ceases vegetative growth and produces spores. This phase does not require large quantities of neosynthesized ATP synthase, and subunit 9 is thus produced almost exclusively at a much lower level by *PaAtp9-7*. Complex regulation of *ATP9* has also been observed in the filamentous fungus *Neurospora crassa*, where one nuclear copy of this gene co-exists with one mitochondrial version; this may be regarded as an intermediate stage of evolution at which the loss of the mitochondrial gene cannot be tolerated [35]. In mammals, as in *P. anserina*, subunit 9 is produced exclusively from multiple nuclear isogenes that are transcriptionally regulated to modulate its production in a cell- and tissue-specific manner [36]. A well-documented case is the pronounced downregulation of subunit 9 in the thermogenic brown adipose tissue (BAT) upon cold acclimation [37]. As a result, the amount of ATP synthase is

decreased tenfold in BAT, and due to the concomitant induction of an uncoupling protein (UCP), the proton-motive force of the inner mitochondrial membrane is converted into heat rather than ATP.

It is clearly more effective for cells to respond to changes in their environment by modulating the activity of nuclear genes than mitochondrial genes, which are devoid of gene-specific transcriptional regulation [19,38]. The *ATP9*-mediated regulation of ATP synthase production in fungi and mammals requires a nuclear location of this gene. Notably, the nuclear relocation of *ATP9* occurred independently in fungi and mammals, and in both kingdoms the regulation of this gene was specialized such that it could modulate ATP synthase production according to certain environmental factors. An intriguing question is why this important regulatory function has been attributed to a gene that is so difficult to relocate to the nucleus. Many of the other structural genes of mitochondrial ATP synthase can be transferred much more easily, such as those encoding the F₁ subunits that are, almost without exception, nuclear [1,39]. Subunit 9 may be preferentially used as a regulatory target to modulate production of the enzyme because it can do so safely, without accumulating potentially harmful assembly intermediates. In mammals, it is the only subunit whose expression is transcriptionally regulated; when its expression is diminished, the other ATP synthase subunits that are in excess are eliminated by proteolytic degradation [38]. Due to its extremely hydrophobic nature, it may be safer to control subunit 9 at the level of synthesis rather than by proteolytic degradation, similarly to what has been reported for the Cox1p subunit of complex IV [40,41].

As described in the introduction, several hypotheses have been proposed to account for the retention of DNA in mitochondria: (i) gene transfer from mtDNA is still underway; (ii) some genes have been confined to the organelle because expressing them from the nucleus would be problematic; and (iii) some genes have been preferentially retained in order to optimize mitochondrial function. In the case of *ATP9*, our study demonstrates that this gene can, in principle, be relocated to the nucleus in yeast; nevertheless, the adaptations required to optimize its nuclear expression are many and complex in nature. Thus, there must be a compelling reason for *ATP9* to become nuclear, such as the requirement for more specialized regulation of ATP synthase activity by complex, multicellular organisms. Otherwise it would remain in the organelle, as in all unicellular organisms including *S. cerevisiae* where ATP synthase expression is not subject to any specialized regulation beyond the general glucose-induced repression of respiratory functions [25]. Accordingly, we would like to introduce the hypothesis that variations in the gene content of mitochondria are influenced by not only protein structure, but also the lifestyle of the organism.

Materials and Methods

Yeast Strains and Culture Medium

The *S. cerevisiae* strains used and their genotypes are listed in Table 1. For details on growth procedures, see *Text S1*.

Deletion of the Mitochondrial *ATP9* Gene

We deleted the *ATP9* gene using the *ARG8^o*-based procedure described by T. Fox and colleagues [19]. For details, see *Text S1*.

Synthetic *ATP9* Genes

The coding sequences of all synthetic *Atp9* genes used in this study (yAtp9-Nuc, *PaAtp9-5*, *PaAtp9-7*, and Atp9-Hyb) were designed for optimal expression in yeast using the Gene Designer software by DNA2.0 (www.dna20.com; corresponding amino-acid

sequences in Figure S2; nucleotide sequences in Figure S3). The synthetic genes were first cloned into pJ204 and then into the yeast expression vectors pCM190 and/or pCM189 (from ATTC) using *Bam*HI and *Pst*I restriction sites at their 5' and 3' ends (all plasmids in Table S1).

Deletion of *YME1* in Strain AMY5

We deleted the *YME1* gene in the AMY5 strain ($\Delta atp9+yAtp9$ -Nuc) using a PCR-amplified null allele of this gene (*yme1::KanMX4*, from Euroscarf). For details, see *Text S1*.

In Vivo Labelling of Mitochondrial Translation Products

Cells were grown overnight in CSM galactose to early exponential phase (10^7 cells/ml). One ml of cells was harvested by centrifugation and washed with 40 mM potassium phosphate pH 6.0 containing 2% galactose. The cells were suspended in 500 μ l of the same buffer and 15 μ l of a freshly prepared aqueous solution of cycloheximide (7.5 mg/ml) was added. The cell suspension was incubated at 24°C for 5 min prior to addition of 50 μ Ci of 35 S-methionine (100 Ci/mmol, GE Healthcare, Piscataway, NJ). The reaction was terminated after 10 min by adding 500 μ l of 20 mM methionine and 75 μ l of 1.8 M NaOH, 1 M β -mercaptoethanol and 0.01 M PMSF. An equal volume of 50% TCA was added and the mixture was centrifuged for 5 min at 14,000 rpm. The precipitated proteins were washed once with 0.5 M Tris (free base), twice with water, and finally resuspended in 45 μ l of Laemmli buffer [42].

Respiratory and ATP Synthesis/Hydrolysis Activities of Isolated Mitochondria

Mitochondria were prepared by the enzymatic method as described [43]. For details on measurements of respiratory and ATP synthesis/hydrolysis activities, see *Text S1*.

Northern and Southern Blot Analyses

Northern blot analyses were performed using total cellular RNA extracted from yeast cells as previously described [44]. The Southern blot analyses were done using mitochondrial DNA isolated as previously described [45]. See *Text S1* for details.

Miscellaneous Procedures

Proteins were separated by SDS-PAGE as previously described [42]. Blue-native PAGE was carried out according to [46]. Protein amounts were determined by the Lowry procedure [47] in the presence of 5% SDS. Western blot analyses were performed as described in [48]. Polyclonal antibodies raised against yeast ATP synthase (from J. Velours) were used at dilutions of 1:10,000 for subunit 4; 1:5,000 for Atp6p; 1:7,500 for Atp9p; 1:5,000 for γ -F₁. Polyclonal antibodies against cytochrome *b* (from T. Langer), Yme1p (from T. Langer) and Arg8p (from T. Fox) were used at dilutions of 1:2,000, 1:10,000, and 1:200 respectively. Monoclonal antibodies against Cox2p, Pkg1 and porin (from Molecular Probes) were used at a dilution of 1:500. Nitrocellulose membranes were incubated with rabbit peroxidase-labeled antibodies at a 1:10,000 dilution and revealed with ECL reagent (Amersham Biosciences International). Electron microscopy analyses of yeast were performed as previously described [49].

Purification of ATP Synthase

Yeast ATP synthase was purified as previously described [50]. A modified version of this protocol was used to purify ATP synthase from the *P. anserina* strains expressing either *PaAtp9-7* or *PaAtp9-5* (see below and *Text S1* for details).

Construction of *P. anserina* Strains for Purification of ATP Synthase

Two *P. anserina* strains were constructed to facilitate purification of ATP synthase exclusively containing either the subunit 9 encoded by *PaAtp9-7* (strain $\Delta 5$) or that encoded by *PaAtp9-5* (strain $\Delta 7$). In both strains the C-terminus of ATP synthase subunit *j* (equivalent of yeast subunit \hat{i}) was fused to a (His)₆ tag, followed by a nourseothricin resistance gene cassette (*nat1*) 540 nt downstream from the potential polyA site of the *j* subunit gene. For details, see *Text S1*.

Transcription Profiling

For each analyzed strain, two biological replicates were cultured (see *Text S1* for growth conditions), harvested, and hybridized to whole-genome tiling arrays as previously described, except that polyA RNA was isolated using the QIAGEN Oligotex mRNA isolation kit prior to cDNA synthesis [30]. Raw tiling array data were processed as described in *Text S1*. Data can be browsed at <http://steinmetzlab.embl.de/atp9>, normalized data is provided in Dataset S1, and raw data is available from the ArrayExpress database (accession: E-MTAB-1115).

Supporting Information

Dataset S1 Normalized gene expression levels from transcription profiles. Gene expression values per ORF across the entire yeast genome for *WT* and strains expressing the *PaAtp9* genes grown in rich ethanol/glycerol media, summarized following normalization by the median intensity of all probes per ORF. Rows correspond to ORFs, columns to strains (MR6, AMY7, AMY8, AMY10, and AMY11), including both the expression levels (columns 2–6) and false discovery rates (columns 7–10) indicating whether the expression level is significantly different from the *WT* (the cutoff used in this study was $FDR < 0.1$). Values are NA if there were insufficient probes to estimate the intensity levels, and 0 if the probe intensity levels were deemed below background (see *Text S1*).

(ZIP)

Figure S1 Construction of $\Delta atp9$ yeast and additional phenotypic properties. A) Schematic of the wild-type (*WT*) and deleted *atp9::ARG8^m* loci ($\Delta atp9$). The broken arrow indicates the main transcription initiation site of the polycistronic unit which contains *ATP9*. Positions and sizes of restriction fragments (*a–e*) used to confirm replacement of *ATP9* with *ARG8^m* by Southern blot (B) are indicated. B) Southern blot analysis. Mitochondrial DNA was extracted from *WT*, a ρ^0 derivative of *WT*, and $\Delta atp9$, and hybridized to 32 P-labeled *ATP9* and *ARG8^m* probes. Positions and sizes of the bound DNA fragments (*a–e*) are indicated in A). The *ATP9* probe is the PCR fragment amplified with the primers 9-4 (5'-TATGCAATTAGTATTAGCAGC) and 9-67 (5'-GAATGTTATTAATTTAATCAAATGAG), and the *ARG8^m* probe is the entire *atp9::ARG8^m* cassette amplified with the primers OligoproATP9 and OligoTermATP9 (primer sequences in *Text S1*). C) Northern blot analysis of mitochondrial transcripts: Total RNA from *WT* and $\Delta atp9$ was hybridized to radiolabelled probes specific to *ATP9*, *ARG8^m*, *ATP6,8* (long (*L*) and short (*S*)), *COX1* and *15S rRNA*. D) Western blots of mitochondrial proteins. E) BN-PAGE of respiratory chain complexes III and IV: proteins from *WT* and $\Delta atp9$ mitochondria were extracted with digitonin and revealed by western blotting with antibodies against Cox1p or cytochrome *b*. F) Complementation of $\Delta atp9$ by a synthetic ρ^- strain carrying only *ATP9* (ρ^- ATP9, strain MB2). The two strains were crossed 'drop on drop' and incubated for two days on rich

glucose with non-mated control strains on the same plate. The plate was then replicated on rich glycerol and photographed after 5 days of incubation.

(PNG)

Figure S2 Protein sequences and alignments. Amino acid sequences and alignments of the proteins encoded by the *Atp9* genes from *P. anserina* (PaAtp9-7 and PaAtp9-5), *N. crassa* (NcAtp9), *S. cerevisiae* (Atp9p), a nuclear version of the *S. cerevisiae* protein (yAtp9-Nuc, see Figure S3A for nucleotide sequence), and a chimeric protein (Atp9-Hyb, Figure S3E for nucleotide sequence) composed of the mitochondrial targeting sequence (MTS) and first transmembrane segment (TMH1) of the *PaAtp9-7* protein by followed by the TMH2 segment of the yeast protein. The underlined amino acids in Atp9p correspond to the peptide used to raise antibodies against the yeast protein (this sequence is not conserved in *P. anserina*, which is why the yeast antibody is ineffective for the *PaAtp9* proteins). The arrowhead points to the site of cleavage of the MTS by mitochondrial processing peptidase (MPP) in *N. crassa* [22]. Based on the *N. crassa* cleavage site, it is likely that *PaAtp9-7* is cleaved after the Glycine 64 residue. Mature *PaAtp9-7* is thus predicted to contain a sequence of six residues (VVAETA) at the N-terminus that has no counterpart in yeast Atp9p. We have nonetheless maintained this sequence as we found that it did not hinder allotropic expression of *ATP8*. Protein lengths are indicated on the right.

(PNG)

Figure S3 Construction of *P. anserina ATP9* gene cassettes. A) Sequence of *PaAtp9-7* cDNA cloned into pFL61 (pMB6C). When this plasmid was transformed into the Δ *atp9* strain RKY26, the resulting strain did not grow on glycerol media, but accumulated revertants following several rounds of selection. We isolated a revertant (strain MBE2) and sequenced the plasmid insert, revealing a precise deletion of the 5' UTR (boxed sequence). We thus used synthetic genes optimized for yeast expression in

subsequent experiments. B) Sequence of a synthetic version of *PaAtp9-5* optimized for expression in yeast, cloned into pCM189 (pAM16) or pCM190 (pAM19). C) Sequence of a synthetic version of *PaAtp9-7* optimized for expression in yeast, cloned into pCM189 (pAM17) or pCM190 (pAM20). D) Sequence of the hybrid/chimeric gene (Atp9-Hyb) encoding the MTS and first transmembrane segment of *PaAtp9-7*, followed by the connecting loop and second transmembrane segment of the protein encoded by yeast *ATP9* (pAM12). Capitalized bases indicate coding sequences. Restriction sites used for cloning are underlined.

(PDF)

Figure S4 Correlation matrix demonstrating gene expression similarities among *ATP9* relocation strains. Clustering reveals that greater gene expression differences in the relocation strains are induced by gene (*PaAtp9-5 vs. PaAtp9-7*) than by plasmid type (centromeric *vs.* multicopy), and that the biological replicates for each strain (indicated by numbers) display strong reproducibility. Samples were clustered hierarchically using the Euclidean distance between the pairwise Pearson correlation coefficients, which were computed between vectors of all per-gene normalized intensities per sample. Strains were grown in rich ethanol/glycerol media.

(PDF)

Table S1 Plasmids used in this study.

(DOCX)

Text S1 Supplementary methods.

(DOC)

Author Contributions

Conceived and designed the experiments: ET RSA AS-C LMS J-PdR MB AM. Performed the experiments: MB AM ET RSA CHS RK SC-M M-FG FG BS IS. Analyzed the data: MB AM ET RSA M-FG IS JG LMS J-PdR. Contributed reagents/materials/analysis tools: MD-C VC SH-LD. Wrote the paper: RSA LMS J-PdR.

References

- Gray MW, Burger G, Lang BF (1999) Mitochondrial evolution. *Science* 283: 1476–1481.
- Déquad-Chablat M, Sellem CH, Golik P, Bidard F, Martos A, et al. (2011) Two Nuclear Life Cycle-Regulated Genes Encode Interchangeable Subunits c of Mitochondrial ATP Synthase in *Podospora anserina*. *Mol Biol Evol* 28: 2063–2075.
- Palmer JD (1997) Organelle genomes: going, going, gone! *Science* 275: 790–791.
- Claros MG, Perea J, Shu Y, Samatey FA, Popot JL, et al. (1995) Limitations to *in vivo* import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b. *Eur J Biochem* 228: 762–771.
- Allen JF (1993) Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. *J Theor Biol* 165: 609–631.
- Allen JF (2003) Why chloroplasts and mitochondria contain genomes. *Comp Funct Genomics* 4: 31–36.
- Race HL, Herrmann RG, Martin W (1999) Why have organelles retained genomes? *Trends Genet* 15: 364–370.
- Amiott EA, Jaehning JA (2006) Mitochondrial transcription is regulated via an ATP “sensing” mechanism that couples RNA abundance to respiration. *Mol Cell* 22: 329–338.
- Banroques J, Delahodde A, Jacq C (1986) A mitochondrial RNA maturase gene transferred to the yeast nucleus can control mitochondrial mRNA splicing. *Cell* 46: 837–844.
- Sanchirico M, Tzellas A, Fox TD, Conrad-Webb H, Periman PS, et al. (1995) Relocation of the unusual VARI1 gene from the mitochondrion to the nucleus. *Biochem Cell Biol* 73: 987–995.
- Nagley P, Farrell LB, Gearing DP, Nero D, Meltzer S, et al. (1988) Assembly of functional proton-translocating ATPase complex in yeast mitochondria with cytoplasmically synthesized subunit 8, a polypeptide normally encoded within the organelle. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85: 2091–2095.
- Supekova L, Supek F, Greer JE, Schultz PG (2010) A single mutation in the first transmembrane domain of yeast COX2 enables its allotropic expression. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107: 5047–5052.
- Michon T, Galante M, Velours J (1988) NH₂-terminal sequence of the isolated yeast ATP synthase subunit 6 reveals post-translational cleavage. *Eur J Biochem* 172: 621–625.
- Stock D, Gibbons C, Arechaga I, Leslie AG, Walker JE (2000) The rotary mechanism of ATP synthase. *Curr Opin Struct Biol* 10: 672–679.
- Boyer PD (1997) The ATP synthase—a splendid molecular machine. *Annu Rev Biochem* 66: 717–749.
- Saraste M (1999) Oxidative phosphorylation at the fin de siècle. *Science* 283: 1488–1493.
- Dyer MR, Gay NJ, Walker JE (1989) DNA sequences of a bovine gene and of two related pseudogenes for the proteolipid subunit of mitochondrial ATP synthase. *Biochem J* 260: 249–258.
- Farrell LB, Gearing DP, Nagley P (1988) Reprogrammed expression of subunit 9 of the mitochondrial ATPase complex of *Saccharomyces cerevisiae*. Expression *in vitro* from a chemically synthesized gene and import into isolated mitochondria. *Eur J Biochem* 173: 131–137.
- Steele DF, Butler CA, Fox TD (1996) Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5253–5257.
- Rak M, Tetaud E, Godard F, Sagot I, Salin B, et al. (2007) Yeast cells lacking the mitochondrial gene encoding the ATP synthase subunit 6 exhibit a selective loss of complex IV and unusual mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 282: 10853–10864.
- Soto IC, Fontanesi F, Valledor M, Horn D, Singh R, et al. (2009) Synthesis of cytochrome c oxidase subunit 1 is translationally downregulated in the absence of functional F1F0-ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 1793: 1776–1786.
- Viebrock A, Perz A, Sebald W (1982) The imported preprotein of the proteolipid subunit of the mitochondrial ATP synthase from *Neurospora crassa*. Molecular cloning and sequencing of the mRNA. *EMBO J* 1: 565–571.
- Van Dyck L, Langer T (1999) ATP-dependent proteases controlling mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Mol Life Sci* 56: 825–842.

24. Duvezin-Caubet S, Caron M, Giraud MF, Velours J, di Rago JP (2003) The two rotor components of yeast mitochondrial ATP synthase are mechanically coupled by subunit delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100: 13235–13240.
25. Ackerman SH, Tzagoloff A (2005) Function, structure, and biogenesis of mitochondrial ATP synthase. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol* 80: 95–133.
26. Rak M, Zeng X, Briere JJ, Tzagoloff A (2009) Assembly of F0 in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta* 1793: 108–116.
27. Mukhopadhyay A, Uh M, Mueller DM (1994) Level of ATP synthase activity required for yeast *Saccharomyces cerevisiae* to grow on glycerol media. *FEBS Lett* 343: 160–164.
28. Kucharczyk R, Ezkurdia N, Couplan E, Procaccio V, Ackerman SH, et al. (2010) Consequences of the pathogenic T9176C mutation of human mitochondrial DNA on yeast mitochondrial ATP synthase. *Biochim Biophys Acta* 1797: 1105–1112.
29. Pelissier P, Camougrand N, Velours G, Guerin M (1995) NCA3, a nuclear gene involved in the mitochondrial expression of subunits 6 and 8 of the Fo-F1 ATP synthase of *S. cerevisiae*. *Curr Genet* 27: 409–416.
30. Couplan E, Aiyar RS, Kucharczyk R, Kabala A, Ezkurdia N, et al. (2011) A yeast-based assay identifies drugs active against human mitochondrial disorders. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 11989–11994.
31. Flower TR, Chesnokova LS, Froelich CA, Dixon C, Witt SN (2005) Heat shock prevents alpha-synuclein-induced apoptosis in a yeast model of Parkinson's disease. *J Mol Biol* 351: 1081–1100.
32. Funes S, Davidson E, Claros MG, van Lis R, Perez-Martinez X, et al. (2002) The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F1F0-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem* 277: 6051–6058.
33. Bokori-Brown M, Holt IJ (2006) Expression of algal nuclear ATP synthase subunit 6 in human cells results in protein targeting to mitochondria but no assembly into ATP synthase. *Rejuvenation Res* 9: 455–469.
34. Figueroa-Martinez F, Vazquez-Acevedo M, Cortes-Hernandez P, Garcia-Trejo JJ, Davidson E, et al. (2011) What limits the allotopic expression of nucleus-encoded mitochondrial genes? The case of the chimeric Cox3 and Atp6 genes. *Mitochondrion* 11: 147–154.
35. Bitner-Eddy P, Monroy AF, Brambl R (1994) Expression of mitochondrial genes in the germinating conidia of *Neurospora crassa*. *J Mol Biol* 235: 881–897.
36. Houstek J, Andersson U, Tvrdik P, Nedergaard J, Cannon B (1995) The expression of subunit c correlates with and thus may limit the biosynthesis of the mitochondrial F0F1-ATPase in brown adipose tissue. *J Biol Chem* 270: 7689–7694.
37. Kramarova TV, Shabalina IG, Andersson U, Westerberg R, Carlberg I, et al. (2008) Mitochondrial ATP synthase levels in brown adipose tissue are governed by the c-Fo subunit P1 isoform. *FASEB J* 22: 55–63.
38. Fox TD (1996) Translational control of endogenous and recoded nuclear genes in yeast mitochondria: regulation and membrane targeting. *Experientia* 52: 1130–1135.
39. Lang BF, Gray MW, Burger G (1999) Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet* 33: 351–397.
40. Perez-Martinez X, Broadley SA, Fox TD (2003) Mss51p promotes mitochondrial Cox1p synthesis and interacts with newly synthesized Cox1p. *EMBO J* 22: 5951–5961.
41. Barrientos A, Zambrano A, Tzagoloff A (2004) Mss51p and Cox14p jointly regulate mitochondrial Cox1p expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J* 23: 3472–3482.
42. Laemmli UK (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* 227: 680–685.
43. Guerin B, Labbe P, Somlo M (1979) Preparation of yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*) with good P/O and respiratory control ratios. *Methods Enzymol* 55: 149–159.
44. Schmitt ME, Brown TA, Trumpower BL (1990) A rapid and simple method for preparation of RNA from *Saccharomyces cerevisiae*. *Nucleic Acids Res* 18: 3091–3092.
45. di Rago JP, Netter P, Slonimski PP (1990) Pseudo-wild type revertants from inactive apocytochrome b mutants as a tool for the analysis of the structure/function relationships of the mitochondrial ubiquinol-cytochrome c reductase of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 265: 3332–3339.
46. Schagger H, Pfeiffer K (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *EMBO J* 19: 1777–1783.
47. Lowry OH, Rosebrough NJ, Farr AL, Randall RJ (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent. *J Biol Chem* 193: 265–275.
48. Arselin G, Vaillier J, Graves PV, Velours J (1996) ATP synthase of yeast mitochondria. Isolation of the subunit h and disruption of the ATP14 gene. *J Biol Chem* 271: 20284–20290.
49. Lefebvre-Legendre L, Salin B, Schaeffer J, Brethes D, Dautant A, et al. (2005) Failure to assemble the alpha 3 beta 3 subcomplex of the ATP synthase leads to accumulation of the alpha and beta subunits within inclusion bodies and the loss of mitochondrial cristae in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 280: 18386–18392.
50. Talbot JC, Dautant A, Polidori A, Pucci B, Cohen-Bouhacina T, et al. (2009) Hydrogenated and fluorinated surfactants derived from Tris(hydroxymethyl)acrylamidomethane allow the purification of a highly active yeast F1-F0 ATP-synthase with an enhanced stability. *J Bioenerg Biomembr* 41: 349–360.
51. Godard F, Tetaud E, Duvezin-Caubet S, di Rago JP (2011) A genetic screen targeted on the FO component of mitochondrial ATP synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 286: 18181–18189.
52. Duvezin-Caubet S, Rak M, Lefebvre-Legendre L, Tetaud E, Bonnefoy N, et al. (2006) A “petite obligate” mutant of *Saccharomyces cerevisiae*: functional mtDNA is lethal in cells lacking the delta subunit of mitochondrial F1-ATPase. *J Biol Chem* 281: 16305–16313.
53. Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B (1998) The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* 440: 325–331.
54. Kyte J, Doolittle RF (1982) A simple method for displaying the hydropathic character of a protein. *J Mol Biol* 157: 105–132.

Supporting Information

Experimental Relocation of the Mitochondrial *ATP9* Gene to the Nucleus Reveals Forces Underlying Mitochondrial Genome Evolution

Maïlis Bietenhader, Alexandre Martos, Emmanuel Tetaud, Raeka S. Aiyar, Carole H. Sellem, Roza Kucharczyk, Sandra Clauder-Münster, Marie-France Giraud, François Godard, Bénédicte Salin, Isabelle Sagot, Julien Gagneur, Michelle Déquard-Chablat, Véronique Contamine, Sylvie Hermann-Le Denmat, Annie Sainsard-Chanet, Lars M. Steinmetz and Jean-Paul di Rago

Text S1. Supplementary Methods.

Yeast cell culture. The following media were used for growing yeast: Rich media, YPGA: 1% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) peptone, 2% (w/v) glucose, and 40 mg/L adenine; N3: 1% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) peptone, 2% (w/v) glycerol, 50 mM potassium phosphate pH 6.2, and 40 mg/L adenine; YPGALA: 1% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) peptone, 2% (w/v) galactose, and 40 mg/L adenine; N3: 2% glycerol, 1% yeast extract, 1% bactopectone, 20 mg/ml adenine, 50 mM phosphate buffer, pH 6.2; YPEG: 2% (w/v) glycerol, 3% (w/v) ethanol, 1% (w/v) yeast extract, 1% (w/v) bactopectone, 40 mg/L adenine. Minimal medium (WO): (0.17% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids and without ammonium sulfate, 0.5% ammonium sulfate, 2% glucose or galactose and other supplements depending on the strain's auxotrophic markers. Complete synthetic medium (CSM): 0.17% (w/v) yeast nitrogen base without amino acids and without ammonium sulfate, 0.5% (w/v) ammonium sulfate (w/v), 2% glucose or galactose, and 0.8% (w/v) of a CSM mixture of amino acids and bases (BIO-101). Solid media contained 2% (w/v) agar.

Deletion of the yeast mitochondrial *ATP9* gene. The plasmid pDS24 containing *ARG8^m* was used for PCR amplification of an *atp9::ARG8^m* DNA cassette with primers OligoproATP9 (5'-AAAAGaattcATGCAATTAGTATTAGCAGCTAAATATATTGGAGCAGGTATCTCAACAATGACACATTTAGAAAGAAGTAG) and OligotermATP9 (5'-AAAAtctagaTTATACACCGAATAATAATAAGAATGAAACCATTAAACAGAATAAACCTGTA

TTAAGCATATACAGCTTCGATAGC). Near the 5' ends of these primers are restriction sites (in lower-case letters) for *EcoRI* (in OligoproATP9) and *XbaI* (in OligotermATP9) that are followed by sequences homologous to *ATP9* (capital letters) and *ARG8^m* (capital letters in bold). The resulting PCR product is designed to delete and replace a 131 bp region internal to the coding sequence of *ATP9* with *ARG8^m* from nucleotides 49 to 179. After digestion with *XbaI* and *EcoRI*, the product was cloned into the plasmid pJM2 that contains *COX2* as a genetic marker for mitochondrial transformation . The resulting plasmid (pRK1) was introduced by co-transformation with the nuclear selectable *LEU2* plasmid (Yep351, from ATTC) into the ρ^0 strain DFS160 by microprojectile bombardment using a biolistic PDS-1000/He particle delivery system (Bio-Rad) as previously described . Mitochondrial transformants (RKY4) were identified among the Leu⁺ nuclear transformants by their ability to produce respiring clones when mated to the non-respiring NB40-3C strain bearing a deletion in *COX2* . The transformants were purified by subcloning and crossed to MR6 , producing arginine prototrophs with the MR6 nucleus, of which some (RKY26) harbored the expected replacement of *ATP9* with *ARG8^m*, as confirmed by DNA sequencing and the experiments shown in Figures 1 and S1.

Construction of the ρ^- synthetic *ATP9* strains FG9 and MB2 –The wild-type *ATP9* locus, from position -228 upstream of the initiator codon to position +98 downstream of the stop codon, was PCR-amplified from strain SDC17-31b mtDNA using primers 5'-AATAAGATATATAAATAAGTCCC and 5'-GAATGTTATTAATTTAATCAAATGAG. The PCR product was blunt-end ligated into the *EcoRV* site of pMOS (pMOS Blue Blunt Ended Cloning Kit from GE Healthcare), yielding plasmid pMOS-ATP9. The *ATP9* insert was removed by digestion with *Bam* HI + *Xba* I and ligated to pJM2 cut with the same enzymes, creating plasmid pJM2-*ATP9*. The ρ^0 strain DFS160-a was bombarded with this plasmid and plasmid Yep351. Mitochondrial transformants (FG9) were identified among Leu⁺ nuclear transformants by their ability to produce respiring clones when mated to YTMT2, a cytoductant of NB40-3C into DFS160. The mtDNA of FG9 was transferred via cytoduction into MR6- α (obtained from MR6 by HO-mediated mating type switching), to yield the strain MB2.

Deletion of *YME1* in strain AMY5. To delete *YME1* in the strain AMY5 (Δ atp9 + *yAtp9*-Nuc), we

PCR-amplified a null allele of the gene (*yme1::KanMX4*) from the Euroscarf strain Y17144 using the primers 5'- CCTTTTACGTTTCTGGTCGG and 5- GGGATGAAAGAAATTAATAACCC. In the resulting PCR product the *KanMX4* gene is flanked by the 356 bp upstream and 291 bp downstream of the *YME1* coding sequence. Cells from AMY5 were transformed with 5 µg of the PCR product and plated on CSM medium lacking arginine and uracil supplemented with 200 mg per liter of G418. Clones resistant to the drug were tested for the *YME1* deletion by PCR and by measuring their sensitivity to ethidium bromide at 36°C (a typical phenotype conferred by the loss of *YME1*).

Construction of *P. anserina* strains for purification of ATP synthase. Using *P. anserina* genomic DNA, three PCR products were generated: PCR1, with primers catcatcatcatcatCATTAAAGTAGACGACGCTGTT (His tag) + gggaagctTCTACTGATTCCCAACGTATC (*HindIII* site); PCR2, with primers cttaatgatgatgatgatATGGGAAGCCTTGGCGTTG (His tag) and gcaccaCCATGGCTCCCTTCTTCGC (*NcoI* site); PCR3, with primers aggagCCATGGTGGTGCTGCAAAAG (*NcoI* site) and ggagatctGGTTACATGTCTCTGTTGCTG (*Bgl* II site). The PCR1 and PCR2 products were fused by amplification with primers gcaccaCCATGGCTCCCTTCTTCGC and gggaagctTCTACTGATTCCCAACGTATC. The resulting fragment was fused to PCR3 with primers ggagatctGGTTACATGTCTCTGTTGCTG and gggaagctTCTACTGATTCCCAACGTATC, and the fusion product was cut with *BglII* and *HindIII* and cloned in the *papi508* vector containing the *nat1* cassette. The resulting plasmid was linearized by *NcoI* and used for transforming protoplasts of a $\Delta ku70$ strain (this strain is competent for *in vivo* homologous recombination, see . Nourseothricin-resistant clones were isolated and the correct integration of the modified subunit *j* gene was verified by PCR and sequencing for the correct integration of the modified *j* subunit gene. They were then crossed with either a $\Delta 5^{gpd7gpd}$ strain lacking the native *PaAtp9-5* gene and carrying an ectopic *PaAtp9-7* gene under control of the 5'- and 3'-UTR sequences of *PaGpd* gene, or a $\Delta 7$ strain lacking the *PaAtp9-7* gene . The progeny of the crosses produced the expected strains with the His-tagged *j* subunit gene and where only *PaAtp9-5* or *PaAtp9-7* is expressed.

Purification of ATP synthase from the *P. anserina* strains expressing either *PaAtp9-7* or *PaAtp9-*

5. Mitochondria were prepared from strains of *P. anserina* expressing either *PaAtp9-5* or *PaAtp9-7* and where a (His)₆-tag was added to the C-terminus of subunit *j* (the equivalent of the yeast subunit *i*), using a protocol adapted from . Two-day-old cultures on 30 Petri dishes were used to inoculate 60 flasks of liquid MTR rich medium . Mycellium (500 g) was collected after two days of incubation and treated for 3 hours with 30 g of glucanex in TPS1 buffer. Protoplasts were harvested by gaze filtration and washed successively with 0,66M saccharose (in 50mM Phosphate buffer), 0,6M sorbitol and 0,8M sorbitol (in 0,1M Tris-HCl pH 7,5). Mitochondria were released by osmotic shock in 0,33M saccharose in a potter followed by differential centrifugation, and were frozen as small beads in liquid nitrogen. A purification protocol, adapted from the one used to prepare yeast ATP synthase, was developed to isolate the two ATP-synthase isoforms of *P. anserina*. Submitochondrial particles (SMP) were prepared from the mitochondria according to (MacLennan et al. 1968) and centrifuged at 48000 *g* for 45 min at 4°C. Pellets were suspended at 10 mg of starting mitochondrial proteins per mL of buffer "A" (150 mM potassium acetate, 10% (V/V) glycerol, 2 mM PMSF, 2 mM ε-ACA, 30 mM HEPES pH 7.4 and EDTA-free protease inhibitor cocktail) containing 0.75% H₁₂-TAC (w/v). After 30 min of incubation at 4°C, the extract was clarified by centrifugation (30 min, 4°C, 25000 *g*). The supernatant was diluted with two volumes of washing buffer "W" (50 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 10 mM imidazole, 20 mM sodium phosphate pH 7.9) and mixed with Ni-NTA-agarose beads (Qiagen) (0.25 mL of slurry per 10 mg of starting mitochondrial proteins) pre-equilibrated in buffer "W". After an overnight incubation at 4°C, beads were washed with 25 volumes of buffer "W" containing 0.1% H₁₂ –TAC (w/v). ATP synthase was eluted with buffer "E" (50 mM NaCl, 10% (v/v) glycerol, 250 mM imidazole, 0.1 % H₁₂-TAC, 20 mM sodium phosphate pH 7.9). Enzyme purity was assessed by silver staining on a 12% Tricine SDS-PAGE.

Respiratory and ATP synthesis/hydrolysis activities of isolated mitochondria. ATPase activity was assayed by measuring the release of inorganic phosphate from ATP at 37°C in the presence or absence of oligomycin at pH 8.4 . Oxygen consumption rates were measured with a Clark electrode in

respiration buffer (0.65 M mannitol, 0.36 mM EGTA, 5 mM Tris phosphate, 10 mM Tris maleate pH 6.8) as previously described . For ATP synthesis rate measurements, mitochondria (0.3 mg.ml⁻¹) were placed in a 2-ml thermostatically controlled chamber at 28°C in respiration buffer. The reaction was started by the addition of 4 mM NADH, 1 mM ADP and stopped by adding 3.5% perchloric acid, 12.5 mM EDTA. Samples were then neutralized to pH 6.5 with KOH and 0.3 M MOPS. ATP was quantified by luciferin/luciferase assay (ThermoLabsystems) on an LKB bioluminometer.

Northern and Southern blot analyses. RNA was separated on a horizontal 1% (w/v) agarose, 6% (v/v) formaldehyde gel in MOPS buffer (20 mM MOPS; 5 mM sodium acetate; 1 mM EDTA), and transferred to a Nytran membrane (Schleicher & Schuell). The membrane was hybridized with specific radiolabelled DNA probes in 50% (v/v) formamide, 5x SSPE, 0.5% SDS, 7% PEG-5000, 5x Denhardt's solution, 100 µg/ml carrier DNA at 42 °C. For the Southern blot analyses, mitochondrial DNA was digested with restriction enzymes, electrophoresed on a horizontal 0.8% agarose gel in 1X TAE buffer (Tris-acetate 20 mM, 50 mM EDTA pH 8), transferred to a Nytran membrane (Schleicher & Schuell), and hybridized with specific DNA probes in 6x SSC, 1x Denhardt's solution, 0.1% SDS, 100 µg/ml carrier DNA at 60°C. The DNA probes were as follows: for *COXI*, plasmid pYGT21 ; for 15sRNA, plasmid pYJL23 (provided by J. Lazowska); for *ATP9*, a PCR product amplified from strain FY1679 mtDNA with primers 5'-TATGCAATTAGTATTAGCAGC and 5'-GAATGTTATTAATTTAATCAAATGAG; for *ATP6*, a PCR product amplified from strain FY1679 mtDNA with primers 5'-GTATGATTCCATATTCATTTG and 5'-ATGTATCTTTTAAGTATGATGCTG; and for *ARG8^m*, a PCR product amplified from plasmid pRK1 with primers 5'-ATGACACATTTAGAAAGAAGTAGA and 5'-TTAAGCATATACAGCTTCGATAGC . The DNA probes were labelled with [α -³²P]dCTP using the Rediprime II Kit and purified on MicroSpin[™] G-25 columns from Amersham Biosciences.

Transcription Profiling. The strains MR6, AMY7, AMY8, AMY10, and AMY11 were grown in rich ethanol-glycerol media (YPEG). Two biological replicates of each strain were cultured, harvested and hybridized to whole-genome tiling arrays as previously described, except that polyA RNA was

isolated prior to cDNA synthesis (Couplan et al., PNAS 2011). Raw tiling array data was processed to provide normalized intensity values for each probe in each hybridization. The expression level of each transcript was estimated by the median value of the probe intensities of the transcript across both arrays per strain and condition. Transcripts were called expressed if their expression level was above background levels according to a previously described procedure. The distribution of background microarray signal intensities was estimated from the intensities of the probes outside transcript boundaries. The cut-off for an expression level to be significantly above background was then set at an estimated false discovery rate (FDR) of 0.1. Next, significance for differential expression between conditions of interest was determined using limma's moderated t-test and corrected for multiple testing using the Benjamini-Hochberg method. Genes differentially expressed in glycerol were selected according to a FDR < 0.1 and a fold-change > 1.5 in either direction. Functional enrichments were calculated using the Ontologizer tool on Gene Ontology and transcription factor targets. Data can be browsed at <http://steinmetzlab.embl.de/atp9>, results of the analysis are in Dataset S1, and raw data was deposited in the ArrayExpress database (<http://www.ebi.ac.uk/arrayexpress/>, accession number E-MTAB-1115).

References

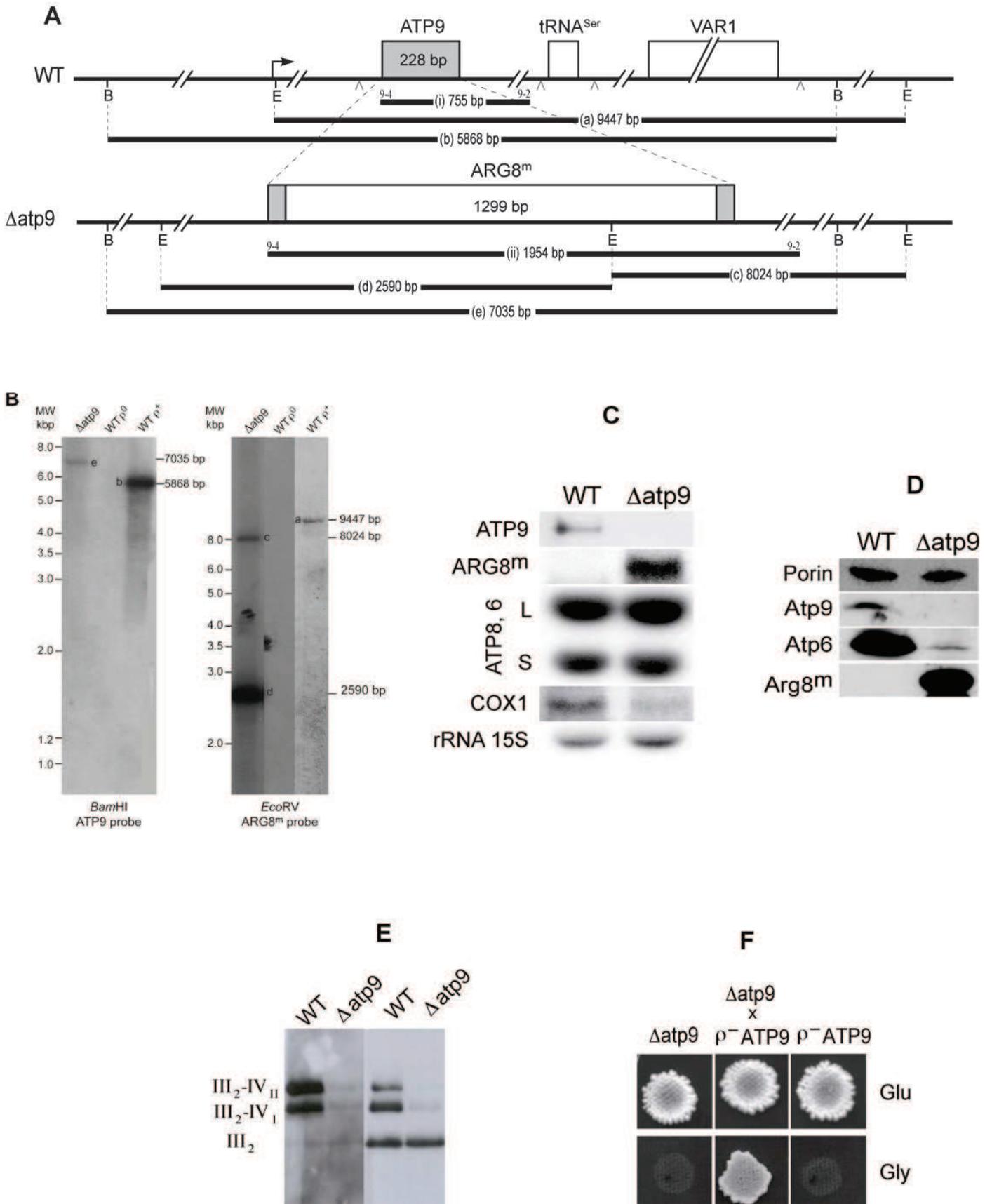
- Ashburner M, Ball CA, Blake JA, Botstein D, Butler H, Cherry JM, Davis AP, Dolinski K, Dwight SS, Eppig JT et al. 2000. Gene ontology: tool for the unification of biology. The Gene Ontology Consortium. *Nat Genet* **25**: 25-29.
- Bauer S, Gagneur J, Robinson PN. 2010. GOing Bayesian: model-based gene set analysis of genome-scale data. *Nucleic Acids Res* **38**: 3523-3532.
- Benjamini Y, Drai D, Elmer G, Kafkafi N, Golani I. 2001. Controlling the false discovery rate in behavior genetics research. *Behav Brain Res* **125**: 279-284.
- Bonnefoy N, Fox TD. 2001. Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Methods Cell Biol* **65**: 381-396.
- David L, Huber W, Granovskaia M, Toedling J, Palm CJ, Bofkin L, Jones T, Davis RW, Steinmetz LM. 2006. A high-resolution map of transcription in the yeast genome. *Proc Natl Acad Sci U S A* **103**: 5320-5325.
- Déquard-Chablat M, Sellem CH, Golik P, Bidard F, Martos A, Bietenhader M, di Rago JP, Sainsard-Chanet A, Hermann-Le Denmat S, Contamine V. 2011. Two Nuclear Life Cycle-Regulated Genes Encode Interchangeable Subunits c of Mitochondrial ATP Synthase in *Podospora anserina*. *Mol Biol Evol* **28**: 2063-2075.
- Duvezin-Caubet S, Caron M, Giraud MF, Velours J, di Rago JP. 2003. The two rotor components of yeast mitochondrial ATP synthase are mechanically coupled by subunit delta. *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**: 13235-13240.
- El-Khoury R, Sellem CH, Coppin E, Boivin A, Maas MF, Debuchy R, Sainsard-Chanet A. 2008. Gene deletion and allelic replacement in the filamentous fungus *Podospora anserina*. *Curr Genet* **53**: 249-258.
- Foury F, Roganti T, Lecrenier N, Purnelle B. 1998. The complete sequence of the mitochondrial genome of *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett* **440**: 325-331.
- Godard F, Tetaud E, Duvezin-Caubet S, di Rago JP. 2011. A genetic screen targeted on the FO component of mitochondrial ATP synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **286**: 18181-18189.
- Guerin B, Labbe P, Somlo M. 1979. Preparation of yeast mitochondria (*Saccharomyces cerevisiae*) with good

- P/O and respiratory control ratios. *Methods Enzymol* **55**: 149-159.
- MacIsaac KD, Wang T, Gordon DB, Gifford DK, Stormo GD, Fraenkel E. 2006. An improved map of conserved regulatory sites for *Saccharomyces cerevisiae*. *BMC Bioinformatics* **7**: 113.
- Rak M, Tetaud E, Godard F, Sagot I, Salin B, Duvezin-Caubet S, Slonimski PP, Rytka J, di Rago JP. 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.
- Rigoulet M, Guerin B. 1979. Phosphate transport and ATP synthesis in yeast mitochondria: effect of a new inhibitor: the tribenzylphosphate. *FEBS Lett* **102**: 18-22.
- Smyth GK, Yang YH, Speed T. 2003. Statistical issues in cDNA microarray data analysis. *Methods Mol Biol* **224**: 111-136.
- Somlo M. 1968. Induction and repression of mitochondrial ATPase in yeast. *Eur J Biochem* **5**: 276-284.
- Steele DF, Butler CA, Fox TD. 1996. Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **93**: 5253-5257.
- Szczepanek T, Lazowska J. 1996. Replacement of two non-adjacent amino acids in the *S.cerevisiae* bi2 intron-encoded RNA maturase is sufficient to gain a homing-endonuclease activity. *EMBO J* **15**: 3758-3767.
- Weber ER, Rooks RS, Shafer KS, Chase JW, Thorsness PE. 1995. Mutations in the mitochondrial ATP synthase gamma subunit suppress a slow-growth phenotype of yme1 yeast lacking mitochondrial DNA. *Genetics* **140**: 435-442.

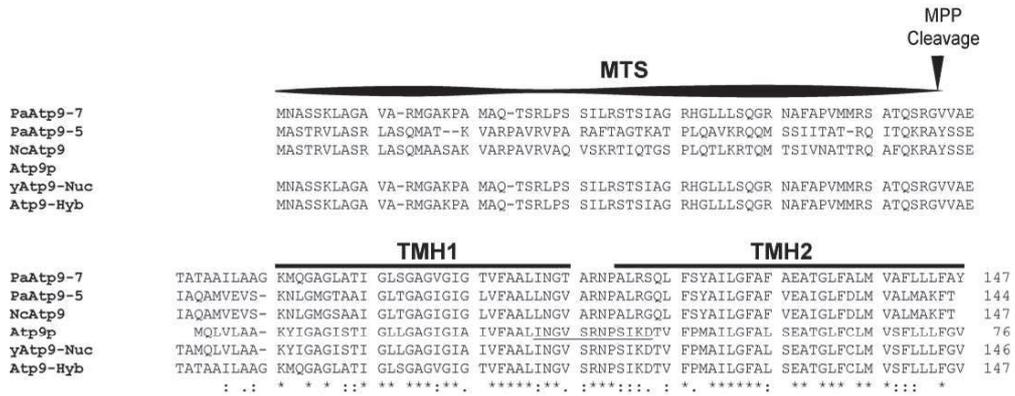
Table S1 – Plasmids used in this study

Name	Insert	Source
pDS24		[1]
Yep351		ATCC
pJM2		[2]
pMOS		GE Healthcare
pFL61		[3]
pCM189		ATCC
pCM190		ATCC
pJ204		DNA 2.0
pRK1	<i>atp9::ARG8^m</i> cloned in pJM2	This study
pJM2-ATP9	<i>ATP9</i> cloned in pJM2	This study
pMOS-ATP9	<i>ATP9</i> cloned in pMOS	This study
pAM13	<i>PaAtp9-5</i> cloned in pJ204	This study
pAM14	<i>PaAtp9-7</i> cloned in pJ204	This study
pAM5	<i>yAtp9-Nuc</i> cloned in pJ204	This study
pAM6	<i>Atp9-Hyb</i> cloned in pJ204	This study
pAM16	<i>PaAtp9-5</i> cloned in pCM189	This study
pAM17	<i>PaAtp9-7</i> cloned in pCM189	This study
pAM19	<i>PaAtp9-5</i> cloned in pCM190	This study
pAM20	<i>PaAtp9-7</i> cloned in pCM190	This study
pAM11	<i>yAtp9-Nuc</i> cloned in pCM190	This study
pAM12	<i>Atp9-Hyb</i> cloned in pCM190	This study

1. Steele DF, Butler CA, Fox TD (1996) Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93: 5253-5257.
2. Bonnefoy N, Fox TD (2001) Genetic transformation of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Methods Cell Biol* 65: 381-396.
3. Minet M, Dufour ME, Lacroute F (1992) Complementation of *Saccharomyces cerevisiae* auxotrophic mutants by *Arabidopsis thaliana* cDNAs. *Plant J* 2: 417-422.



Bietenhader, Figure S2



A

yAtp9-Nuc (plasmid pAM11)

ggatccATGAATGCCTCTTCTAAGCTGGCCGGTGTGTTGCCAGAATGGGGCGAAACCAGCTATGGCACAAACA
 AGTAGACTTCCATCATCTATCTTAAGGTCGACATCTATTGCGGGCCGTCATGGTTTGTATTATCTCAGGGAAGG
 AATGCTTTTGCGCCTGTTATGATGAGGTCGGCCACTCAATCAAGAGGTGTCGTAGCAGAACTGCCATGCAATTA
 GTCTTAGCCGCTAAGTACATAGGAGCAGGTATAAGCACTATTGGTTTATTGGGAGCGGGTATTGGGATTGCTATC
 GTTTTTGTGCCTTAATTAACGGTGTGTCTAGAAATCCCTCTATCAAGGACACTGTTTTTCCAATGGCAATCCTT
 GGCTTTGCATTAAGTGAAGCAACAGGCCTTTTCTGTTTGTATGGTTAGCTTCCTTCTGCTATTTCGGAGTCTAA ctg
cag

B

PaAtp9-5 (plasmids pAM16 and PAM19)

ggatccATGGCATCTACCAGAGTATTAGCCTCACGTCTTGCATCTCAAATGGCAACTAAAGTAGCCAGACCTGCT
 GTCAGAGTTCTGCAAGGGCCTTCACGGCAGGTACCAAGGCAACGCCACTTCAAGCTGTAAGAGACAGCAAATG
 TCATCCATTATCACGGCTACTAGACAGATTACGCAAAGAGGGCCTACTCAAGTGAATCGCACAAAGCTATGGTT
 GAAGTATCTAAGAACTTAGGGATGGGTACGGCGCTATAGGCTAACAGGTGCGGGTATAGGTATAGGGCTTGTA
 TTTGCAGCTCTTCTAAATGGAGTTGCTAGAAATCCTGCCTTAAGAGGTCAACTGTTCTCTACGCAATTTTAGGT
 TTCGTTTTCGTAGAGGCTATCGGGTTATTTCGATTTGATGGTAGCACTGATGGCGAAATTTACCTAG ctgcag

C

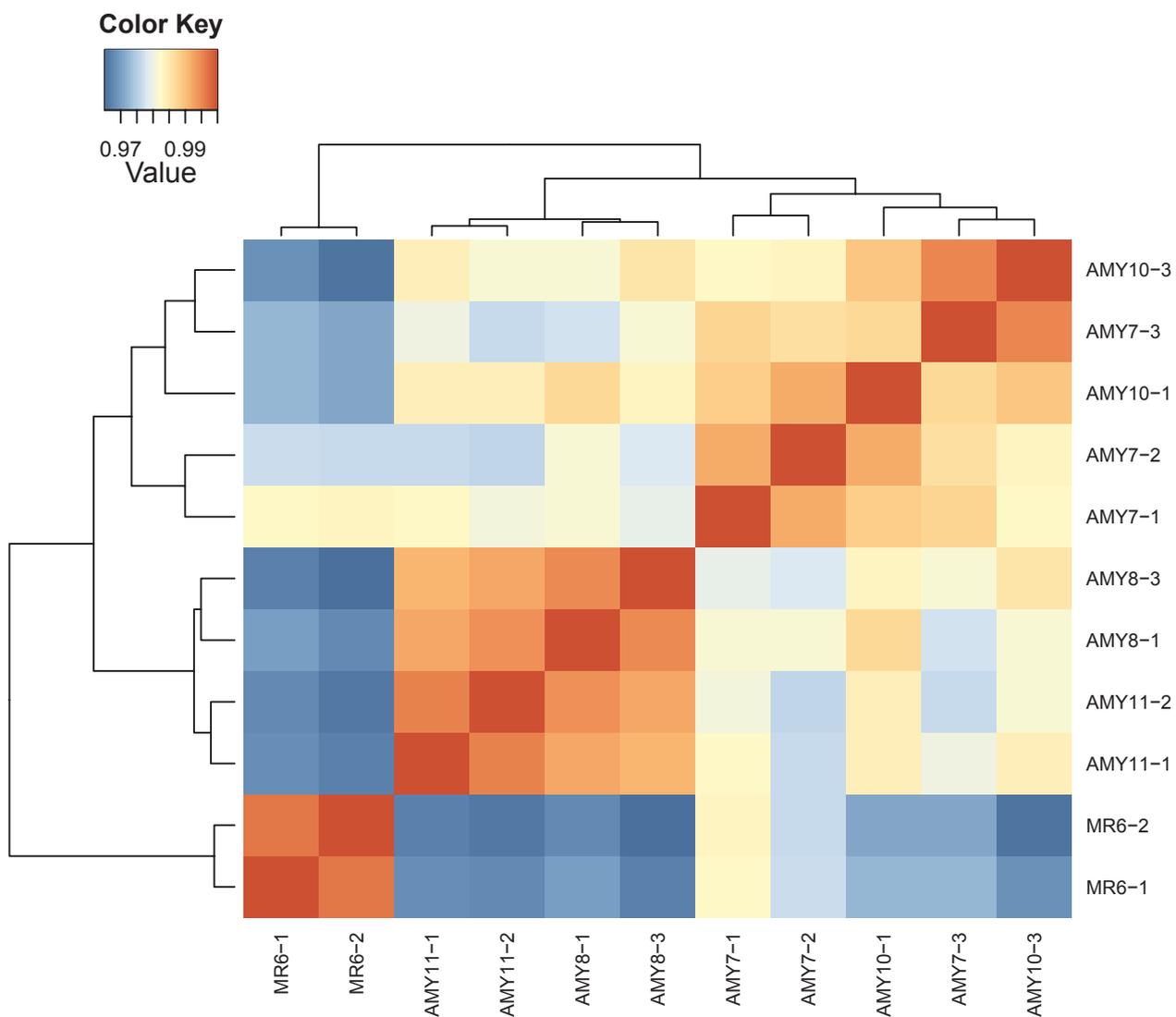
PaAtp9-7 (plasmids pAM17 and pAM20)

ggatccATGAACGCAAGTAGTAAATTAGCAGGGCCTGTCGCTAGAATGGGGCCAAGCCAGCAATGGCTCAAAC
 TCTCGTCTGCCAGTAGCATACTTCGTTCTACGTCGATTGCGAGGAGGCATGGATTATTGTTATCACAAAGGCAGA
 AATGCCTTCGCCCTGTATGATGAGAAGCGCAACACAGTCCAGAGGCGTCGTTGCCGAGACAGCCACTGCCGCT
 ATTCTGGCGGCAGGAAAAATGCAAGGTGCTGGTTTGGCGACTATAGGCTGTCTGGAGCTGGAGTAGGTATTGGT
 ACTGTTTTTGCAGCCTTGATAAATGGAACGGCTAGAAACCCAGCGTTGAGGAGTCAGTTATTCAGTTATGCTATT
 CTAGGTTTTGCTTTTCGCCGAGCAACAGGTCTGTTTCGCTCTAATGGTCGCATTCTTTTCTGCTATTTGCTTACTAG
ctgcag

D

Atp9-Hyb (plasmid pAM12)

ggatccATGAACGCTTCTTCAAACCTGGCTGGAGCTGTTGCTAGAATGGGTGCTAAACCTGCCATGGCACAGACT
 AGCAGATTGCCTTCTCCATCTGAGGTCTACTTCCATAGCAGGTAGACACGGATTGTTGCTATCCAGGGCCGT
 AATGCATTTGCACCCGTGATGATGCGTTCTGCCACACAAAGTAGGGGAGTAGTCGCTGAAACAGCTACAGCGGCA
 ATTCTTGCCGCTGGCAAAATGCAAGGGGCAGGTCTTGCAACAATTGGATTGTCTGGCGCTGGTGTGGGATTGGG
 ACTGTGTTTGCAGCGCTTATAAATGGTGTATCAAGAAATCCATCCATAAAGATACGGTCTTTCCAATGGCCATT
 TTAGGATTCGCTTTATCAGAAGCTACTGGTTTATTTGTTTGTATGGTGAGCTTTCTATTGTTATTCGGCGTTTGA
ctgcag



Chapitre 2

Des adaptations supplémentaires sont nécessaires pour optimiser la croissance des souches avec un gène *ATP9* relocalisé

Sommaire

2.1	Sélections de mutations (SUP) améliorant l'expression du gène <i>ATP9</i> relocalisé	152
2.1.1	Tests des différentes constructions du gène <i>ATP9</i>	152
2.1.2	Mutants secondaires	153
2.1.3	Effet des mutations sur l'accumulation de la protéine Atp9p-Hyb	153
2.1.4	Analyses génétiques des mutations SUP	155
2.2	Identification des mutations SUP par séquençage	156
2.2.1	Séquençage des mutants	156
2.2.2	Mutations ne participant pas au phénotype des souches SUP	160
2.2.3	Mutations SUP et catégories fonctionnelles	160
2.3	Influence des mutations SUP sur l'expression des gènes <i>yATP9-Nuc</i> , <i>PaATP9-5</i> et <i>PaATP9-7</i>	163
2.3.1	Fonctionnalité du gène <i>yATP9-Nuc</i> dans le contexte SUP	163
2.3.2	Les mutations SUP améliorent-elles l'expression des gènes <i>PaATP9-5</i> ou <i>PaATP9-7</i> ?	163
2.3.3	Influence des mutations SUP sur le fonctionnement mitochondrial	164
2.4	Analyse des mécanismes d'action des mutations SUP	170
2.4.1	La m-AAA protéase	171
2.4.2	La m-AAA protéase : le gène <i>YTA10</i>	171
2.4.3	La m-AAA protéase : le gène <i>YTA12</i>	177
2.4.4	La glutamyl-tRNA synthétase	177
2.4.5	La protéine Ent5p	178

L'étude décrite au chapitre précédent démontre que l'atténuation de l'hydrophobicité de la première traverse transmembranaire est une étape importante pour une expression fonctionnelle du gène *ATP9* relocalisé chez *Saccharomyces cerevisiae*. De plus, les cellules exprimant un *ATP9* nucléaire de manière fonctionnelle ont une croissance ralentie et une morphologie cellulaire anormale. Ces défauts montrent qu'il y a d'autres adaptations à réaliser, dans ou hors de la séquence d'Atp9p, afin d'obtenir un phénotype similaire à celui d'une souche sauvage. Ce chapitre décrit les différentes expérimentations réalisées afin de répondre à ces questions. Nous avons, dans un premier temps, sélectionné des souches ayant une meilleure expression du gène *ATP9* relocalisé, puis identifié les mutations responsables.

2.1 Sélections de mutations (SUP) améliorant l'expression du gène *ATP9* relocalisé

2.1.1 Tests des différentes constructions du gène *ATP9*

J'ai tout d'abord tenté d'obtenir des mutants de réversion à l'aide de la souche $\Delta atp9 :: ARG8^m + yATP9-Nuc$. Cette construction, décrite au chapitre 1 page 115, encode la protéine native de *Saccharomyces cerevisiae* fusionnée à la MTS de la protéine PaAtp9p-7. La protéine yAtp9p-Nuc est bien située dans le compartiment mitochondrial mais n'est pas maturée dans cette souche. Elle ne peut donc croître sur milieu respiratoire, comme le glycérol / éthanol.

L'ensemble des tentatives d'obtention de mutants respiratoire-positifs à partir de cette souche se sont révélées infructueuses. J'avais espéré au départ obtenir une ou des mutations impliquées dans la diminution d'hydrophobicité, mais il semblerait que les modifications à réaliser soient trop complexes pour l'obtention d'une protéine fonctionnelle.

L'utilisation des souches $\Delta atp9 :: ARG8^m$ exprimant les gènes *ATP9* de *Podospora anserina* aurait été difficile, étant donné que ces souches ont une croissance respiratoire trop rapide pour pouvoir sélectionner dans de bonnes conditions des mutations améliorant leur croissance respiratoire. Je n'ai donc pas mené de sélection de mutations à partir de ces souches.

Nous nous sommes ainsi tournés vers la souche $\Delta atp9 :: ARG8^m + ATP9-Hyb$. La construction exprimée dans cette souche est une protéine hybride, possédant la MTS, le N-terminus et la TMH1 (moins hydrophobe) de la protéine PaAtp9p-7 fusionnés à la boucle, la TMH2 et le C-terminus de la protéine native de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette protéine est bien transportée dans la mitochondrie, et une petite quantité est maturée. Cette souche a une croissance extrêmement lente sur milieu respiratoire, rendant plus aisée la sélection de mutations améliorant les propriétés de cellules de levure exprimant la sous-unité Atp9p depuis le noyau. La construction de cet hybride et les phénotypes de la souche l'exprimant sont décrits dans le chapitre 1 page 115.

Après 31 jours de culture, je suis parvenu à isoler un mutant ayant une capacité de croissance améliorée sur milieu respiratoire (figure 2.1.1 ci-contre). Nommée AMY42, je l'appellerai SUPi (pour mutant SUP initial) dans la suite du document. Ce mutant présente une croissance toujours très faible sur milieu respiratoire, mais tout de même nettement supérieure à celle de la souche parentale (figure III.2.2), que je nommerai SUP0.

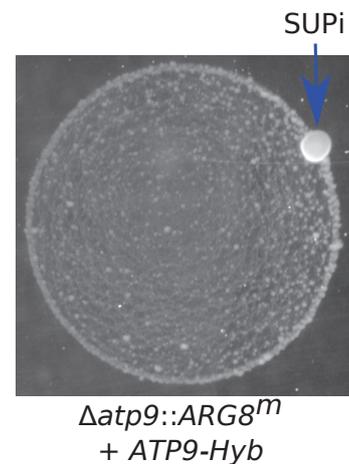


FIGURE III.2.1: Une sélection sur milieu respiratoire a permis d'obtenir un mutant de réversion SUPi

Agrandissement x5 d'une goutte de dépôt (10^6 cellules) de la souche $\Delta atp9 :: ARG8^m + ATP9-Hyb$ (AMY6) après 31 jours de culture en milieu respiratoire riche N3 à 28 °C. Le fond de pousse de la souche est visible, mais la vitesse de croissance est extrêmement lente sur ce type de milieu. Le clone de réversion initial (SUPi) obtenu est indiqué par une flèche bleue.

2.1.2 Mutants secondaires

Ce mutant de réversion initial SUP_i a ensuite été utilisé comme base pour de nouvelles expériences de sélection de mutations. Après plusieurs cycles de sélection successifs par réplique velours, des clones à meilleure croissance sont apparus. Plusieurs clones ont ainsi été prélevés. Je décrirai trois de ces clones (AMY79, AMY80 et AMY81) que j'appellerai respectivement SUP1, SUP2 et SUP3. Le test en gouttes présenté en figure III.2.2 montre que ces trois souches ont une vitesse de croissance similaire entre elles et supérieure à la souche parente SUP_i, mais qui reste toutefois nettement inférieure à celle du type sauvage.

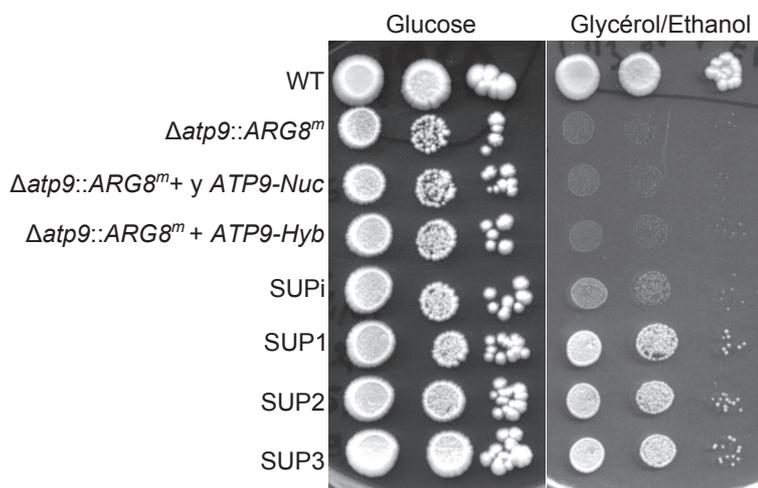
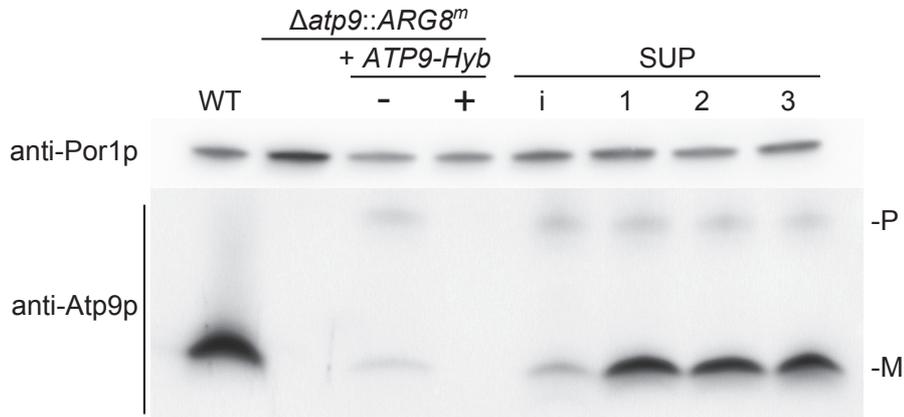


FIGURE III.2.2: Les mutants SUP1, SUP2 et SUP3 sélectionnés ont une meilleure croissance sur milieu respiratoire

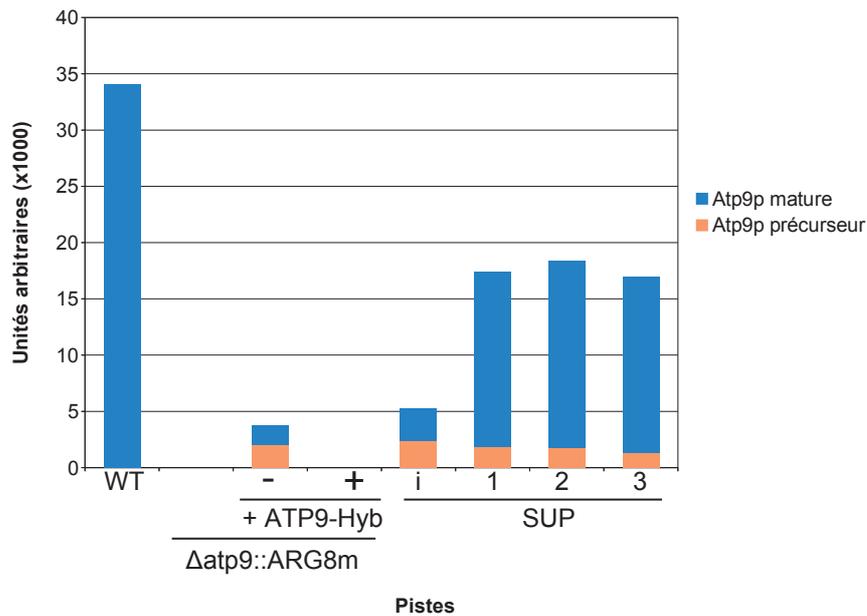
Photographie d'un test en gouttes après 6 jours de culture en milieu fermentescible riche YPGA (glucose) et respiratoire riche YPEG (glycérol/éthanol) à 28 °C. La souche $\Delta atp9::ARG8^m$ (souche RKY26) ne peut croître sur milieu respiratoire du fait de l'absence de F_0 fonctionnel. L'ajout de la construction $yATP9-Nuc$ (souche AMY5) ne permet pas de compléter la délétion. La construction $ATP9-Hyb$ (souche AMY6 ou SUP0) permet une légère croissance de la souche, mais le temps d'incubation de ce test ne permet pas de la distinguer. La souche SUP_i (souche AMY42) est le mutant de réversion initial, obtenu à partir de la souche SUP0. Ce mutant a une croissance nettement plus rapide que sa souche parentale. Les souches SUP1, SUP2 et SUP3 (respectivement souches AMY79, AMY80 et AMY81) sont des clones issus la souche SUP_i, sélectionnés pour leur vitesse de croissance supérieure.

2.1.3 Effet des mutations sur l'accumulation de la protéine Atp9p-Hyb

J'ai réalisé une extraction totale des protéines des souches SUP afin de vérifier l'effet global des mutations sur l'accumulation de la protéine Atp9p-Hyb. Les protéines de ces extraits ont été séparées sur gel dénaturant, puis transférées sur une membrane par Western blot. Les résultats de détection de protéines à l'aide d'anticorps sont montrés en figure III.2.3(a) page suivante. La protéine Por1p, une sous-unité du complexe mitochondrial porine, sert de contrôle de charge. L'accumulation de protéine Atp9p-Hyb dans un fond $\Delta atp9::ARG8^m$ est extrêmement faible, comme déjà montré en figure III.1.5 page 131. Dans le mutant de réversion SUP_i, l'accumulation de protéine Atp9p-Hyb mature est légèrement améliorée, et l'est nettement dans les mutants SUP1, SUP2 et SUP3 (figure III.2.3(b) page suivante), la quantité de protéine précurseur est constante dans les différents mutants. Une quantité de protéine Atp9p-Hyb mature équivalente à environ la moitié de la protéine Atp9p sauvage (45 à 48 %) est détectée dans les clones SUP secondaires, contre 5 % pour la souche SUP0 et 8 % pour la souche SUP_i.



(a) Expérience de Western blot réalisée sur les différents mutants SUP



(b) Quantification des signaux de protéine Atp9p sauvage et Atp9p-Hyb

FIGURE III.2.3: La protéine Atp9p-Hyb est mieux accumulée dans les mutants SUP

(a) Détection des protéines Atp9p (souche sauvage MR6) et Atp9p-Hyb, exprimée dans les fonds génétiques $\Delta atp9 :: ARG8^m$ (souche AMY6), SUP^i (AMY42), $SUP1$ (AMY79), $SUP2$ (AMY80) et $SUP3$ (AMY81). La protéine est indétectable car absente dans la souche RKY26 (piste $\Delta atp9 :: ARG8^m$). Les extraits protéiques ont été réalisés sur des cultures de ces souches en phase exponentielle de croissance en milieu fermentescible synthétique (CSM-UR, complété en uracile pour $\Delta atp9 :: ARG8^m$ et uracile + arginine pour la souche WT). Une culture de la souche $\Delta atp9 :: ARG8^m + ATP9-Hyb$ a également été réalisée en présence de doxycycline, qui éteint l'expression du gène $ATP9-Hyb$ (piste sans doxycycline : - ; piste avec doxycycline : +). La protéine hybride précurseur (P) ou maturée (M) est détectable à l'aide de l'anticorps anti-Atp9p de levure, dirigé contre la boucle qui est identique entre la protéine native et la construction. La protéine Por1p mitochondriale sert de contrôle de charge.

(b) Quantification des signaux de protéines Atp9p et Atp9p-Hyb détectés en (a). Ces valeurs ont été corrigées par rapport au contrôle de charge Por1p. La protéine Atp9p mature est représentée par la couleur bleue, et la précurseur en orange. L'axe des abscisses correspond aux différentes pistes du Western blot, et l'axe des ordonnées aux valeurs de quantification en unités arbitraires. Les mutations SUP accroissent de manière importante la quantité totale de protéine Atp9p-Hyb accumulée dans la cellule, plus particulièrement sous sa forme mature.

2.1.4 Analyses génétiques des mutations SUP

Les mutations des différentes souches SUP ont donc un effet important sur la relocalisation du gène *ATP9-Hyb*. Nous nous sommes penchés sur la nature de ces différentes mutations. J'ai, dans un premier temps, vérifié si le gène *ATP9-Hyb* avait été modifié et serait responsable du phénotype observé. Une deuxième étape m'a permis de déterminer si le fond génétique était responsable du phénotype observé. Enfin, je me suis attelé à l'identification de l'ensemble des mutations des différentes souches SUP.

2.1.4.1 Les mutations SUP ne sont pas situées sur le plasmide portant le gène *ATP9-Hyb*

Les plasmides des souches SUP1, SUP2 et SUP3 ont en tout premier lieu été extraits et la phase codante du gène *ATP9-Hyb* a été séquencée. Les résultats de séquençage montrent que, dans aucun des trois plasmides, la séquence codante du gène n'est modifiée. Les mutations à l'origine du phénotype observé sont donc situées soit sur une autre zone du plasmide, soit dans le génome de ces souches.

Une seconde analyse a permis de vérifier si les mutations étaient situées ailleurs sur le plasmide. Pour cela, j'ai transformé la souche $\Delta atp9 :: ARG8^m$ avec chacun des plasmides des souches SUP séparément ($\Delta atp9 :: ARG8^m + SUP1$, $SUP2$ ou $SUP3 ATP9-Hyb$, nommées respectivement AMY56, AMY57 et AMY58), et ai contrôlé leur vitesse de croissance en milieu respiratoire. Les souches $\Delta atp9 :: ARG8^m$ transformées n'ont pas montré d'amélioration de croissance en milieu respiratoire, comparativement à la souche $\Delta atp9 :: ARG8^m$ transformée avec le gène *ATP9-Hyb*. Les mutations de réversion obtenues n'étaient donc pas localisées sur les plasmides issus des clones SUP.

J'ai ensuite entrepris l'analyse du fond génétique de mutants SUP secondaires. Pour cela, les mutants SUP1, SUP2 et SUP3 ont tout d'abord été débarrassés de leur plasmide à l'aide de l'acide 5-fluoroorotique. Les souches obtenues ont ainsi été nommées respectivement AMY53, AMY54 et AMY55. Pour plus de clarté dans la suite du document, je parlerai respectivement de "fond SUP1", "fond SUP2" et "fond SUP3" pour désigner ces souches $\Delta atp9 :: ARG8^m$ dépourvues de plasmides, et portant les mutations SUP.

J'ai ensuite transformé les trois fonds SUP avec le plasmide d'origine portant le gène *ATP9-Hyb* (respectivement nommées AMY62, AMY68 et AMY74). Leur vitesse de croissance en milieu respiratoire est similaire à celle de leur souche SUP d'origine respective. Cette expérience montre que le fond génétique est responsable du phénotype de croissance améliorée observé pour les souches SUP, les mutations doivent donc être localisées dans leur génome nucléaire et/ou mitochondrial.

2.1.4.2 Les mutations SUP sont nucléaires récessives

Une analyse génétique simple nous a permis de déterminer que les mutations sont nucléaires récessives. En effet, j'ai croisé les souches SUPi, SUP1, SUP2 et SUP3 avec un fond génétique sauvage ρ^0 (souche D273-10b α /60). Le diploïde obtenu ayant une croissance beaucoup plus faible que les souches SUP haploïdes sur milieu respiratoire (figure III.2.4 page suivante), les allèles SUP ont été compensés par les allèles sauvages apportés par la souche testrice du croisement. Les mutations SUP sont donc récessives. De plus, la souche D273-10b α /60 sauvage étant ρ^0 , les diploïdes obtenus dépendent uniquement des génomes mitochondriaux et du gène *ATP9-Hyb* des souches SUP pour leur croissance en milieu respiratoire. La croissance extrêmement ralentie de ces diploïdes sur ce milieu montre que les mutations SUP – justement sélectionnées pour leur capacité à améliorer cette vitesse de croissance sur milieu respiratoire – sont donc situées dans le génome nucléaire.

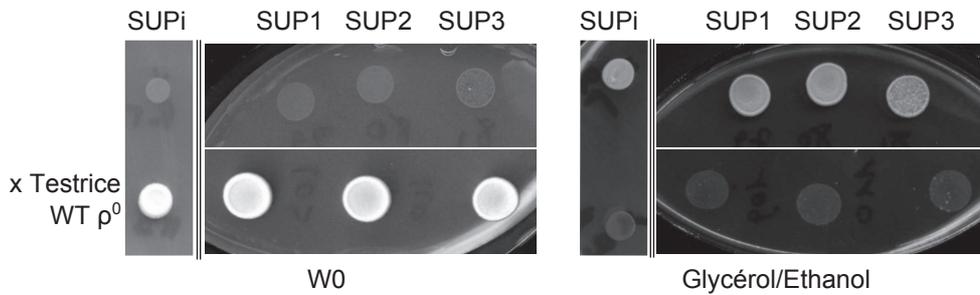


FIGURE III.2.4: Les mutations SUP sont situées dans le génome nucléaire et sont récessives

Photographie de croisements-tests effectués sur les souches SUP. Les souches SUPi (AMY42), SUP1 (AMY79), SUP2 (AMY80) et SUP3 (AMY81) ont été croisées avec la souche D273-10b α /60 (Testrice WT ρ^0). Le diploïde est ensuite déposé sur milieu fermentescible minimum W0 et milieu respiratoire riche YPEG (glycérol/éthanol). Le temps d'incubation à 28 °C pour les tests des souches SUP1, SUP2 et SUP3 a été de 2 jours, et 5 jours pour la souche SUPi. Le fond génétique D273-10b α /60 possède des marqueurs d'auxotrophie différents du fond SUP et de la souche parentale MR6, dérivée du fond génétique W303-1b après délétion du gène Δ arg8 :: HIS3 et correction de la mutation can1-1. Le croisement de ces deux fonds génétique donne un diploïde prototrophe, qui a donc une capacité de croissance sur milieu fermentescible minimum (W0). Les diploïdes ayant une croissance extrêmement faible sur milieu respiratoire, les mutations SUP sont compensées par les allèles nucléaires dominants sauvages de la souche D273-10b α /60 testrice. Les mutations SUP sont nucléaires récessives.

2.2 Identification des mutations SUP par séquençage

2.2.1 Séquençage des mutants

Nous avons donc décidé d'identifier précisément les mutations impliquées dans les différents fonds génétiques SUP décrits précédemment. Les mutants SUP ayant subi plusieurs cycles de sélection sur milieu respiratoire, il était fort probable que plusieurs mutations soient apparues dans ces souches. Une analyse de génétique classique aurait alors été longue et fastidieuse, voire impossible.

Nous avons donc décidé d'entreprendre, en collaboration avec Lars STEINMETZ de l'EUROPEAN MOLECULAR BIOLOGY LABORATORY (EMBL) à Heidelberg, un séquençage complet du génome des différents mutants SUP. Ce type d'expérimentation permet de déterminer la séquence génétique exacte des génomes des souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées. Dans le but d'écarter les mutations issues de polymorphismes nous avons décidé de séquencer également la souche WT (souche MR6), puis de comparer les données obtenues sur les souches SUP avec ce fond génétique parental. J'ai, pour cela, extrait les ADN génomiques des souches SUPi, SUP1, SUP2, SUP3 et WT, puis envoyé ces extraits à l'EMBL pour séquençage, effectué par technique de séquençage *paired-end Illumina*.

La liste complète des mutations identifiées est reportée en tables III.2.1 page 159 pour chacune des souches SUP. La souche SUPi correspond au mutant initial, le premier mutant de réversion à partir duquel ont été isolés les clones SUP1, SUP2 et SUP3 après plusieurs cycles de sélection sur milieu respiratoire. L'ensemble de ces mutations sont des modifications ponctuelles, des SNPs (pour *Single Nucleotide Polymorphisms* ou polymorphisme d'un seul nucléotide). Aucune modification chromosomique majeure, ni remaniement de séquences n'ont été détectés. De même, aucune mutation non-sens n'a été identifiée dans cette analyse.

TABLE III.2.1: Identification des mutations de l'ensemble des clones SUP

Listes des mutations identifiées chez les mutants SUPi (AMY42), SUP1 (AMY79), SUP2 (AMY80) et SUP3 (AMY81) par séquençage global. Les extraits d'ADN génomique ont été réalisés à partir de cultures en milieu fermentescible synthétique (CSM-UR). Ch. : Chromosome ; ORF : cadre ouvert de lecture ; N/D : Non Disponible.

SUPi										
Position génomique		Codon	Base	Type sauvage		Mutant		Type de mutation	Locus	
Ch.	Position			Codon / Base	Acide aminé	Codon / Base	Acide aminé		ORF	Gène
4	00182728	97	290	TTT	F	TTA	L	Faux sens	YDL153C	SAS10
4	00412087	88	262	ACT	T	AAT	N	Faux sens	YDL022W	GPD1
5	00032675	264	791	AGA	R	AGG	R	Synonyme	YEL063C	CAN1
5	00115973	N/D	N/D	G	N/D	R	N/D	N/D	N/D	N/D
5	00116028	N/D	N/D	G	N/D	R	N/D	N/D	N/D	N/D
5	00116086	N/D	N/D	G	N/D	R	N/D	N/D	N/D	N/D
5	00116145	N/D	N/D	C	N/D	M	N/D	N/D	N/D	N/D
5	00116644	160	477	GCT	A	TCT	S	Faux sens	YEL021W	URA3
8	00282746	185	552	GGC	G	TGC	C	Faux sens	YHR089C	GAR1
9	00286491	276	825	GGC	G	TGC	C	Faux sens	YIL036W	CST6
17	00073448	N/D	N/D	T	N/D	C	N/D	N/D	N/D	N/D
17	00074051	98	293	TTT	F	TTC	F	Synonyme	Q0250	COX2
17	00074225	156	467	GGT	G	GGA	G	Synonyme	Q0250	COX2
17	00074327	190	569	ATT	I	ATC	I	Synonyme	Q0250	COX2
17	00074414	219	656	GGA	G	GGG	G	Synonyme	Q0250	COX2

SUP1										
Position génomique		Codon	Base	Type sauvage		Mutant		Type de mutation	Locus	
Ch.	Position			Codon / Base	Acide aminé	Codon / Base	Acide aminé		ORF	Gène
4	00182728	97	290	TTT	F	TTA	L	Faux sens	YDL153C	SAS10
4	00412087	88	262	ACT	T	AAT	N	Faux sens	YDL022W	GPD1
4	01077692	610	1827	GTC	V	CTC	L	Faux sens	YDR307W	PMT7
5	00032675	264	791	AGA	R	AGG	R	Synonyme	YEL063C	CAN1
5	00115989	N/D	N/D	C	N/D	Y	N/D	N/D	N/D	N/D
5	00115997	N/D	N/D	T	N/D	Y	N/D	N/D	N/D	N/D
5	00116028	N/D	N/D	G	N/D	R	N/D	N/D	N/D	N/D
5	00116086	N/D	N/D	G	N/D	R	N/D	N/D	N/D	N/D
5	00116577	137	410	GCG	A	GCA	A	Synonyme	YEL021W	URA3
5	00116644	160	477	GCT	A	TCT	S	Faux sens	YEL021W	URA3
7	00040049	343	1026	GTT	V	ATT	I	Faux sens	YGL245W	GUS1
9	00286491	276	825	GGC	G	TGC	C	Faux sens	YIL036W	CST6
11	00101190	174	519	CGT	R	AGT	S	Faux sens	YKL182W	FAS1
12	00005741	46	136	TTT	F	TCT	S	Faux sens	YLL066W-B	N/D
13	00446400	563	1686	GTT	V	TTT	F	Faux sens	YMR089C	YTA12
17	00073367	N/D	N/D	A	N/D	W	N/D	N/D	N/D	N/D
17	00073448	N/D	N/D	T	N/D	C	N/D	N/D	N/D	N/D
17	00073498	N/D	N/D	A	N/D	G	N/D	N/D	N/D	N/D
17	00074051	98	293	TTT	F	TTC	F	Synonyme	Q0250	COX2
17	00074225	156	467	GGT	G	GGA	G	Synonyme	Q0250	COX2
17	00074327	190	569	ATT	I	ATC	I	Synonyme	Q0250	COX2
17	00074414	219	656	GGA	G	GGG	G	Synonyme	Q0250	COX2

SUP2										
Position génomique		Codon	Base	Type sauvage		Mutant		Type de mutation	Locus	
Ch.	Position			Codon / Base	Acide aminé	Codon / Base	Acide aminé		ORF	Gène
4	00182728	97	290	TTT	F	TTA	L	Faux sens	YDL153C	<i>SAS10</i>
4	00329705	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	N/D	ARS413	N/D
4	00412087	88	262	ACT	T	AAT	N	Faux sens	YDL022W	<i>GPD1</i>
5	00032675	264	791	AGA	R	AGG	R	Synonyme	YEL063C	<i>CAN1</i>
5	00115989	N/D	N/D	C	N/D	Y	N/D	N/D	N/D	N/D
5	00115997	N/D	N/D	T	N/D	Y	N/D	N/D	N/D	N/D
5	00116028	N/D	N/D	G	N/D	R	N/D	N/D	N/D	N/D
5	00116086	N/D	N/D	G	N/D	R	N/D	N/D	N/D	N/D
5	00116145	N/D	N/D	C	N/D	M	N/D	N/D	N/D	N/D
5	00116577	137	410	GCG	A	GCA	A	Synonyme	YEL021W	<i>URA3</i>
5	00116644	160	477	GCT	A	TCT	S	Faux sens	YEL021W	<i>URA3</i>
5	00346422	397	1190	ATT	I	ATC	I	Synonyme	YER093C	<i>TSC11</i>
7	00756025	143	427	ACT	T	AGT	S	Faux sens	YGR132C	<i>PHB1</i>
9	00286491	276	825	GGC	G	TGC	C	Faux sens	YIL036W	<i>CST6</i>
14	00243975	763	2286	ATG	M	GTG	V	Faux sens	YNL216W	<i>RAP1</i>
17	00073448	N/D	N/D	T	N/D	C	N/D	N/D	N/D	N/D
17	00074051	98	293	TTT	F	TTC	F	Synonyme	Q0250	<i>COX2</i>
17	00074225	156	467	GGT	G	GGA	G	Synonyme	Q0250	<i>COX2</i>
17	00074327	190	569	ATT	I	ATC	I	Synonyme	Q0250	<i>COX2</i>
17	00074414	219	656	GGA	G	GGG	G	Synonyme	Q0250	<i>COX2</i>

SUP3										
Position génomique		Codon	Base	Type sauvage		Mutant		Type de mutation	Locus	
Ch.	Position			Codon / Base	Acide aminé	Codon / Base	Acide aminé		ORF	Gène
4	00182728	97	290	TTT	F	TTA	L	Faux sens	YDL153C	<i>SAS10</i>
4	00412087	88	262	ACT	T	AAT	N	Faux sens	YDL022W	<i>GPD1</i>
4	00767081	297	890	GAC	D	GAA	E	Faux sens	YDR153C	<i>ENT5</i>
5	00032675	264	791	AGA	R	AGG	R	Synonyme	YEL063C	<i>CAN1</i>
5	00115989	N/D	N/D	C	N/D	Y	N/D	N/D	N/D	N/D
5	00115997	N/D	N/D	T	N/D	Y	N/D	N/D	N/D	N/D
5	00116028	N/D	N/D	G	N/D	R	N/D	N/D	N/D	N/D
5	00116086	N/D	N/D	G	N/D	R	N/D	N/D	N/D	N/D
5	00116145	N/D	N/D	C	N/D	M	N/D	N/D	N/D	N/D
5	00116577	137	410	GCG	A	GCA	A	Synonyme	YEL021W	<i>URA3</i>
5	00116644	160	477	GCT	A	TCT	S	Faux sens	YEL021W	<i>URA3</i>
5	00190840	317	948	GGT	G	TGT	C	Faux sens	YER017C	<i>YTA10</i>
5	00230262	156	467	AGT	S	AGC	S	Synonyme	YER040W	<i>GLN3</i>
9	00286491	276	825	GGC	G	TGC	C	Faux sens	YIL036W	<i>CST6</i>
14	00066555	13	38	GGT	G	GGC	G	Synonyme	YNL299W	<i>TRF5</i>
15	01015479	725	2173	GAA	E	GCA	A	Faux sens	YOR361C	<i>PRT1</i>
17	00073448	N/D	N/D	T	N/D	C	N/D	N/D	N/D	N/D
17	00074051	98	293	TTT	F	TTC	F	Synonyme	Q0250	<i>COX2</i>
17	00074225	156	467	GGT	G	GGA	G	Synonyme	Q0250	<i>COX2</i>
17	00074327	190	569	ATT	I	ATC	I	Synonyme	Q0250	<i>COX2</i>
17	00074414	219	656	GGA	G	GGG	G	Synonyme	Q0250	<i>COX2</i>

2.2.2 Mutations ne participant pas au phénotype des souches SUP

En ce qui concerne les mutations intergéniques, silencieuses et faux-sens situées en amont du gène *URA3*, celles-ci proviennent du plasmide pAM12 portant le gène hybride. Fourni par la société ATCC, le vecteur de clonage pCM190 est un plasmide d'expression levure à origine de répllication de type 2 micron (2 μ) et portant le gène de sélection *URA3*. La séquence déposée par le fournisseur (ftp://ftp.atcc.org/pub/vector_seqs/pCM190.html) montre que l'ensemble de ces mutations sont déjà présentes sur le plasmide. Ce sont donc des faux positifs.

D'autres mutations intergéniques et silencieuses sont situées sur le chromosome mitochondrial, en amont ou dans le gène *COX2*. Ces mutations sont retrouvées dans l'ensemble des mutants séquencés. Le séquençage d'un autre mutant du laboratoire, génétiquement indépendant de la souche SUP0 (et donc de ses descendants SUPi et SUP1 à 3) mais descendant de la souche $\Delta atp9 :: ARG8^m$ a permis de retrouver l'ensemble des mutations localisées sur le gène *COX2*. Il semblerait donc que ces mutations proviendraient de la souche $\Delta atp9 :: ARG8^m$ parentale. Il est possible que le gène *COX2* porté par le plasmide pJM2, utilisé pour la transformation mitochondriale par biolistique, soit porteur de ces mutations et ait recombinaison avec le gène *COX2* du génome mitochondrial de la souche $\Delta atp9 :: ARG8^m$. De plus, les expériences décrites en section 2.1.4.2 page 155 montrent que les mutations sont nucléaires récessives. Il est donc peu probable que ces mutations mitochondriales aient un impact sur le contexte génétique SUP.

Une mutation silencieuse est retrouvée dans les souches SUP dans le gène *CAN1*. Ce gène a été modifié lors de la construction de la souche WT (MR6), où la mutation de résistance à la canavanine (*can1-1*), présente dans la souche parentale W303-1b, a été corrigée (restauration vers un allèle sauvage) pour permettre une bonne expression du marqueur *ARG8^m* en milieu synthétique ou minimal (Rak *et al.*, 2007). Cette mutation silencieuse est retrouvée dans l'ensemble des mutants SUP, ainsi que dans le mutant du laboratoire génétiquement indépendant cité précédemment, elle ne fait donc pas partie de celles sélectionnées avec les souches SUP.

2.2.3 Mutations SUP et catégories fonctionnelles

Nous nous sommes intéressés plus avant aux mutations contenues spécifiquement dans les génomes nucléaires des souches SUP. La table 2.2.3 page ci-contre liste les fonctions des différents cadres de lecture affectés par les mutations SUP.

Mutations communes à tous les clones séquencés				
Gène	Fonction	Localisation	Délétion	Référence
<i>SAS10</i>	Production du 18S ARN _r et assemblage de la petite sous-unité ribosomale	Noyau	Létal	Karbstein (2011)
<i>CST6</i>	<i>Basic leucine zipper</i> (bZIP) facteur de transcription de la famille ATF/CREB	Noyau	Viable	Cottier <i>et al.</i> (2012)
<i>GPD1</i>	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase NAD-dépendante	Cytoplasme	Viable	Albertyn <i>et al.</i> (1994)
SUPi				
Gène	Fonction	Localisation	Délétion	Référence
<i>GARI</i>	Sous-unité du complexe H/ACA snoRNP pseudouridylase	Noyau	Létal	Bousquet-Antonelli <i>et al.</i> (1997)
SUP1				
Gène	Fonction	Localisation	Délétion	Référence
<i>GUS1</i>	Glutamyl-tRNA synthétase	Cytoplasme	Létal	Ibba et Soll (2000)
<i>YTA12</i>	Sous-unité de la m-AAA protéase	Mitochondries	Viable	Koppen et Langer (2007)
<i>FAS1</i>	Synthétase des acides gras	Cytoplasme	Létal	Kolter (2007)
<i>PMT7</i>	Potentielle mannosyltransférase	RE	Viable	Gentzsch et Tanner (1996)
<i>YLL066W-B</i>	N/D	N/D	N/D	Niu <i>et al.</i> (2008)
SUP2				
Gène	Fonction	Localisation	Délétion	Référence
<i>RAP1</i>	Régulation de l'expression (<i>DNA-binding protein</i>)	Nucléosome	Létal	Morse (2000)
<i>PHB1</i>	Sous-unité du complexe prohibitine	Mitochondries	Viable	Artal-Sanz et Tavernarakis (2009)
<i>ARS413</i>	Séquence auto-répliquante	N/D	N/D	Dhar <i>et al.</i> (2012)
<i>TSC11</i>	Sous-unité du complexe TORC2	Membranes	Létal	Ho <i>et al.</i> (2005)
SUP3				
Gène	Fonction	Localisation	Délétion	Référence
<i>GLN3</i>	Activateur transcriptionnel de gènes répression catabolique de l'azote	Noyau	Viable	Magasanik et Kaiser (2002)
<i>TRF5</i>	Sous-unité du complexe TRAMP Poly(A) polymérase non canonique	Noyau	Viable	Wery <i>et al.</i> (2009)
<i>PRT1</i>	Sous-unité eIF3b du complexe cœur du facteur initiateur de la traduction eIF3	Cytoplasme	Létal	Hinnebusch (2011)
<i>ENT5</i>	Impliqué dans le recrutement de la clathrine et dans le trafic Golgi-endosomes	Cytoplasme	Viable	Eugster <i>et al.</i> (2004)
<i>YTA10</i>	Sous-unité de la m-AAA protéase	Mitochondries	Viable	Koppen et Langer (2007)

TABLE III.2.2: Les gènes portant une mutation SUP ont des fonctions variées

Tableau listant les gènes ayant une mutation SUP identifiés dans le tableau III.2.1 page 159. Un résumé de leur fonction est fourni dans la colonne correspondante, ainsi que leur localisation générale. La viabilité de la délétion du gène est indiquée. Un article de référence est cité pour chacun des gènes listés.

L'ensemble des mutations identifiées peut être classé dans cinq grandes catégories fonctionnelles (figure III.2.5), plus un gène de fonction inconnue. N'ayant aucune donnée sur cet ORF (pour *Open Reading frame* ou cadre ouvert de lecture), je n'en dirai pas plus dans le reste du document.

La moitié des gènes mutés peut être rangée dans un ensemble "expression génétique", comprenant transcription et traduction. Deux de ces mutations sont communes à toutes les souches SUP, les gènes *SAS10*, impliqué dans la maturation des ARN ribosomiques 18S (Karbstein, 2011) et *CST6*, un facteur de traduction (Cottier *et al.*, 2012). Dans la souche SUPi, une mutation supplémentaire (gène *GARI*) touche la maturation de l'ARN_r 18S (Bousquet-Antonelli *et al.*, 1997). Ces modifications sont vraisemblablement les mutations de réversion primaires (clone SUPi) obtenues à partir de la souche $\Delta atp9::ARG8^m + ATP9-Hyb$ (voir figure 2.1.1 page 152). La mutation du gène *GUS1*, qui encode la glutamyl-tRNA synthétase, a attiré notre attention. Cette synthétase jouerait un rôle dans la coordination de l'expression des génomes nucléaire et mitochondrial (voir section IV page 248).

Un gène, *TSC11*, affecte la morphologie cellulaire (Ho *et al.*, 2005). Il est possible que cette mutation participe à la correction du phénotype aberrant observé lors de l'expression en milieu respiratoire des gènes de *Podospora anserina*. Cette mutation peut également avoir un autre effet que celui envisagé. Il faut prendre en compte en effet que celle-ci n'apparaît que dans une seule des souches SUP. De plus, il n'a pas été possible de vérifier si l'expression du gène *ATP9-Hyb* (protéine exprimée dans les souches arborant les mutations SUP) entraînait ce phénotype anormal.

Quatre autres gènes portant une mutation SUP sont impliqués dans le métabolisme de la levure. Parmi eux, le gène *GPD1* est commun à tous les clones SUP. Cette mutation est intéressante, puisque qu'elle pourrait affecter le métabolisme du glycérol, un substrat requérant des mitochondries fonctionnelles pour pouvoir être métabolisé (Albertyn *et al.*, 1994). Les autres mutations affectent le gène *ENT5* qui encode une protéine impliquée dans le trafic membranaire intracellulaire (voir partie IV IV page 251), le gène *PMT7* encodant une mannosyltransférase similaire à Pmt1p (Gentsch et Tanner, 1996), et enfin le gène *FAS1* encodant une synthétase d'acides gras (Kolter, 2007).

Une catégorie rassemble trois gènes ayant des fonctions reliées : les gènes *YTA10* et *YTA12* qui encodent les deux sous-unités de la m-AAA protéase, un complexe protéique mitochondrial impliqué dans le contrôle qualité des protéines de ce compartiment (Koppen et Langer, 2007), et

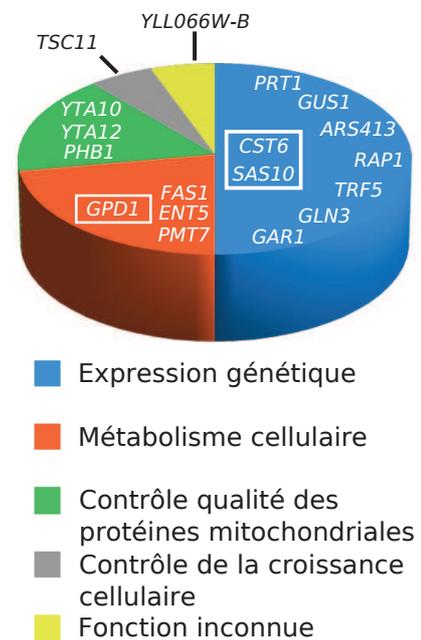


FIGURE III.2.5: Les mutations SUP identifiées peuvent être rassemblées en quelques grandes catégories

Diagramme répartissant les différents gènes portant les mutations SUP dans différentes catégories fonctionnelles. La légende est représentée sous le diagramme. Les gènes sont placés dans ce graphique en fonction de leur rôle global dans la cellule. Les gènes encadrés sont retrouvés dans tous les clones séquencés.

le gène *PHB1* qui encode une sous-unité de la prohibitine, un complexe protéique mitochondrial qui a de multiples fonctions, notamment la régulation de l'activité du complexe m-AAA protéase (Artal-Sanz et Tavernarakis, 2009). Les mutations dans ces trois gènes affectent donc une même cible, la m-AAA protéase, au niveau de sa structure ou de sa régulation. L'importance d'une telle adaptation pour optimiser l'expression allotopique de la sous-unité Atp9p est renforcée par le fait que les mutations de ces trois gènes sont apparues indépendamment dans les trois souches SUP secondaires (SUP1 à 3). Cette observation nous a amené à nous intéresser sur le rôle du complexe de la m-AAA protéase dans les phénotypes des mutants SUP.

2.3 Influence des mutations SUP sur l'expression des gènes *yATP9-Nuc*, *PaATP9-5* et *PaATP9-7*

Une hypothèse que nous avons souhaité tester fut de savoir si les mutations SUP étaient uniquement actives sur le gène *ATP9-Hyb* utilisé pour leur sélection ou si elles pouvaient influencer aussi sur le phénotype obtenu avec d'autres gènes *ATP9*, la version nucléaire du gène de levure et les gènes *ATP9* de *Podospora anserina*. Le fond SUPi primaire n'étant pas optimal pour l'expression du gène *ATP9-Hyb* et les trois fonds génétiques secondaires ayant des phénotypes similaires, je ne décrirai ci-après que les expérimentations réalisées dans le fond SUP3.

2.3.1 Fonctionnalité du gène *yATP9-Nuc* dans le contexte SUP

J'ai tout d'abord transformé le fond SUP3 avec le plasmide pAM11, portant le gène *ATP9* de levure relocalisé (*yATP9-Nuc*). La nouvelle souche résultante AMY78 ne peut croître en milieu respiratoire (figure III.2.6 page 165(b)). Cette donnée indique que cette construction n'est aucunement affectée par les mutations SUP identifiées, du moins au niveau de sa fonctionnalité. Nous avons montré précédemment que l'hydrophobicité de la première traverse transmembranaire était un élément essentiel à modifier pour rendre fonctionnelle la protéine Atp9p exprimée à partir du noyau. La construction *yATP9-Nuc* n'étant pas modifiée à ce niveau, les mutations SUP n'agissent apparemment que sur une protéine Atp9p dont l'hydrophobicité aurait déjà été ajustée.

2.3.2 Les mutations SUP améliorent-elles l'expression des gènes *PaATP9-5* ou *PaATP9-7* ?

2.3.2.1 Influence sur la croissance

J'ai ensuite introduit par transformation les plasmides pAM16 ou pAM19 (gène *PaATP9-5* vecteurs CEN ou 2 μ), pAM17 ou pAM20 (gène *PaATP9-7* vecteurs CEN ou 2 μ) dans le fond SUP3, donnant respectivement les souches AMY49, AMY99, AMY77, et AMY75. Les tests présentés en figure III.2.6(a) page 165 montrent que la croissance respiratoire des souches $\Delta atp9 :: ARG8^m + PaATP9-5$ ou -7 est nettement améliorée en milieu respiratoire en présence des mutations SUP. Afin de déterminer à quel point la croissance de ces souches avait été améliorée, j'ai réalisé une cinétique de croissance de celles-ci en milieu respiratoire. Les résultats de ces mesures sont présentés dans la figure III.2.6(b) page 165.

Pour la souche $\Delta atp9 :: ARG8^m + PaATP9-5$ (AMY7 pour le vecteur CEN ou AMY10 pour le vecteur 2 μ), on note une différence de vitesse de croissance due au nombre de copies du gène. Cette observation avait déjà été effectuée auparavant (voir chapitre 1 page 115), et indiquerait que les défauts à l'origine de la vitesse de croissance amoindrie de ces souches pourraient être

palliés par une plus forte expression de ce gène. Les deux souches ont néanmoins toujours une vitesse de croissance en milieu respiratoire inférieure à la souche WT. Il en est de même pour les souches exprimant le gène PaATP9-7. La présence de plusieurs copies du gène semble améliorer la croissance des souches concernées en milieu respiratoire. Il existe cependant une différence entre les gènes PaATP9-5 et PaATP9-7, qui est traduite par une meilleure croissance des souches exprimant le gène PaATP9-5.

Dans le contexte génétique SUP3, l'expression du gène PaATP9-5 permet de retrouver une vitesse de croissance similaire au type sauvage, tant en multicopies qu'en simples copies. C'est également le cas pour les souches exprimant le gène PaATP9-7, bien qu'il existe encore pour celui-ci une différence de croissance en fonction du nombre de copies du gène. La croissance des souches exprimant ce gène n'est pas de type sauvage, mais elle est améliorée par rapport au contexte sans les mutations SUP.

La combinaison de ces deux gènes avec les contextes génétiques SUP permet donc d'améliorer de manière significative la croissance des souches en milieu respiratoire. Des résultats similaires ont été obtenus en utilisant les autres fonds génétiques secondaires SUP1 et SUP2. Les mutations SUP ne sont donc pas spécifiques au gène *ATP9-Hyb*. Elles sont actives sur d'autres gènes *ATP9* relocalisés à condition que la contrainte d'hydrophobicité sur la première traverse membranaire de la sous-unité Atp9p soit respectée.

2.3.2.2 Morphologie cellulaire

J'ai décrit au chapitre 1 page 115 que les souches $\Delta atp9 :: ARG8^m$ exprimant un gène *ATP9* de *Podospora anserina* ont un phénotype cellulaire anormal (figure III.1.3 page 128). J'ai réalisé des observations microscopiques sur les différentes souches SUP exprimant ces mêmes gènes. Il s'est avéré que dans ces contextes génétiques SUP, les aberrations de morphologie cellulaire avaient été corrigées. (figure III.2.7 page 166).

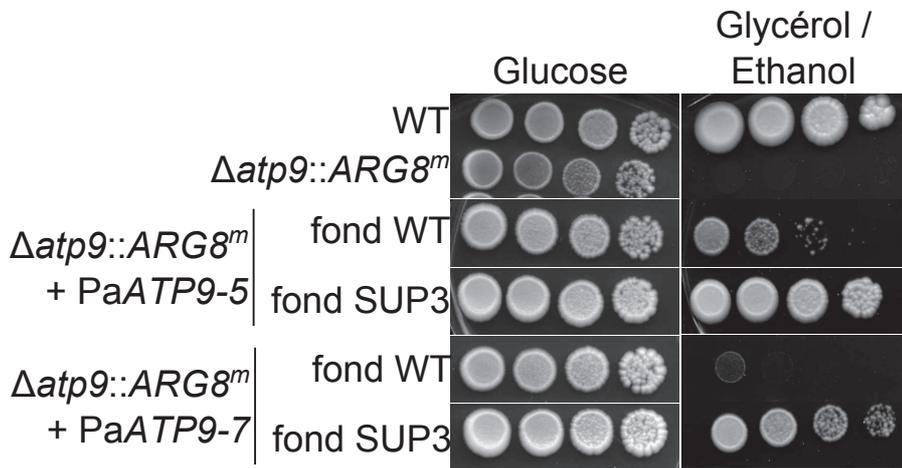
2.3.3 Influence des mutations SUP sur le fonctionnement mitochondrial

Afin de mieux caractériser l'impact des mutations SUP sur les oxydations phosphorylantes, nous avons décidé de déterminer les caractéristiques biochimiques de certaines des souches portant ces mutations. Je ne décrirai ici que les expériences réalisées sur le fond génétique SUP3 exprimant le gène PaATP9-5, cette combinaison permettant de retrouver un phénotype de croissance respiratoire sauvage. J'ai également réalisé cette expérience sur une souche avec un fond nucléaire SUP3 mais dont le génome mitochondrial a été remplacé par le génome sauvage de la souche MR6 par cytoduction afin de savoir si, en tant que telles, les mutations SUP affectent le fonctionnement mitochondrial.

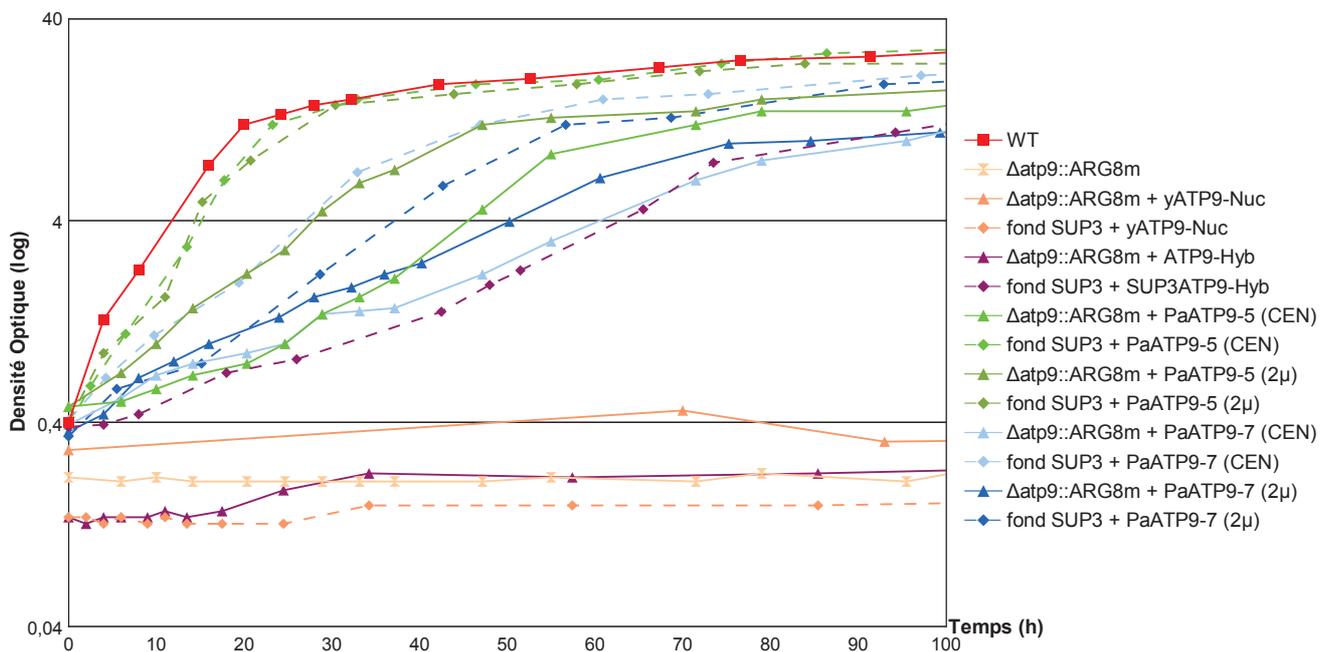
2.3.3.1 Caractérisation quantitative des OXPHOS

Les données présentées dans le tableau III.2.3 page 167 montrent qu'il existe peu de différences entre la souche sauvage utilisée et le fond génétique SUP3 avec un génome mitochondrial sauvage, indiquant que les mutations SUP n'ont pas un impact significatif sur les OXPHOS lorsque le gène *ATP9* est exprimé sous une forme native dans la mitochondrie.

La souche SUP3, contenant le gène *ATP9-Hyb*, sur un vecteur de type 2μ , montre de faibles valeurs de respiration et de synthèse d'ATP. La fraction insensible à l'oligomycine de l'activité d'hydrolyse d'ATP mitochondriale est beaucoup plus importante que dans une souche sauvage de levure, indiquant un défaut spécifique dans l'expression du F_0 , auquel appartient la sous-unité Atp9p. En conséquence, des secteurs F_1 libres s'accumulent. Ceux-ci sont toujours capables d'hydrolyser l'ATP mais ne sont plus sensibles à l'oligomycine qui se fixe au F_0 . Ces données entrent en corrélation avec la faible vitesse de croissance observée avec cette souche (voir



(a) Croissance du mutant fond SUP3 exprimant les gènes *ATP9-5* ou *ATP9-7*



(b) Comparaison de la croissance des différentes souches avec ou sans mutations SUP3

FIGURE III.2.6: Les mutations des fonds génétiques SUP sont actives sur les gènes de *Podospora anserina*

(a) Photographie d'un test en gouttes des souches WT (MR6), $\Delta atp9::ARG8^m$ (RKY26), $\Delta atp9::ARG8^m + PaATP9-5$ (plasmide CEN, souche AMY7) ou $PaATP9-7$ (plasmide CEN, souche AMY8), fond SUP3 + $PaATP9-5$ (plasmide CEN, souche AMY49) ou $PaATP9-7$ (plasmide CEN, souche AMY77). Les souches ont été déposées sur milieu fermentescible riche YPGA (glucose) et sur milieu respiratoire riche YPEG (glycérol/éthanol) et incubées respectivement pendant 3 jours et 6 jours à 28 °C. La vitesse de croissance des souches exprimant les gènes de *Podospora anserina* est inférieure à celle de la souche WT, et est nettement améliorée dans le fond génétique SUP3.

(b) Cinétique de croissance incluant les souches présentées en (a) ainsi que les souches $\Delta atp9::ARG8^m + yATP9-Nuc$ (AMY5), $\Delta atp9::ARG8^m + ATP9-Hyb$ (AMY6), $\Delta atp9::ARG8^m + PaATP9-5 (2\mu)$ (AMY10) ou $PaATP9-7 (2\mu)$ (AMY11), fond SUP3 + $yATP9-Nuc$ (AMY78), fond SUP3 + SUP3ATP9-Hyb (AMY81), fond SUP3 + $PaATP9-5 (2\mu)$ (AMY99) ou $PaATP9-7 (2\mu)$ (AMY75). Les souches ont été pré-adaptées en milieu respiratoire riche YPEG (glycérol/éthanol) à 28 °C. En phase exponentielle de croissance, 50 mL du même milieu a étéensemencé avec une quantité précise de cellules (rapportée en unités de DO_{650nm}), puis incubée à 28 °C. La DO de chaque culture a été mesurée régulièrement au cours du temps à $\lambda 650nm$. Les lignes pleines symbolisent un fond génétique nucléaire sauvage, les lignes en pointillés le fond génétique SUP3. La couleur de la courbe est identique pour chaque souche portant le même plasmide. La légende est signalée dans le panneau de droite.

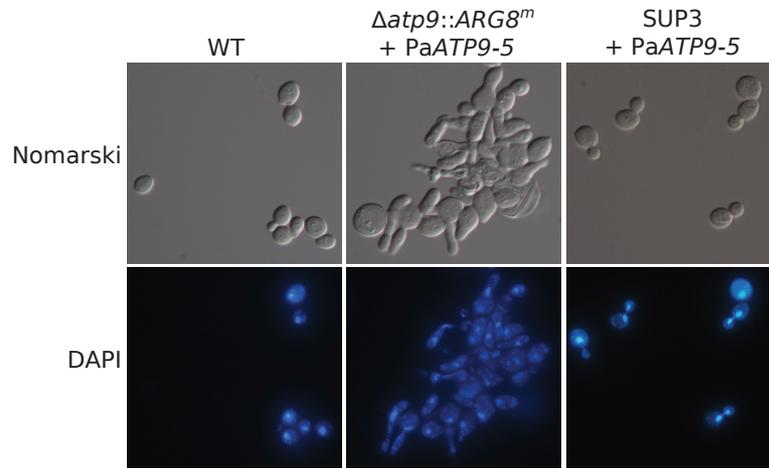


FIGURE III.2.7: Morphologie cellulaire des souches exprimant le gène PaATP9-5 de *Podospora anserina*

Photographies des souches WT (MR6), $\Delta atp9 :: ARG8^m + PaATP9-5$ (plasmide CEN, souche AMY7) et fond SUP3 + PaATP9-5 (plasmide CEN, souche AMY49) en phase exponentielle de croissance, cultivées en milieu respiratoire riche YPEG (glycérol/éthanol) à 28 °C. Une partie de la culture est fixée puis traitée au colorant DAPI. Les souches sont ensuite observées au microscope à fluorescence sous lumière visible (Nomarski) ou sous exposition aux UVs à λ 450 nm (DAPI) (grossissement $\times 1000$). Comme montré dans le chapitre 1, la souche $\Delta atp9 :: ARG8^m + PaATP9-5$ présente un phénotype aberrant qui n'apparaît qu'en milieu respiratoire, et est indépendant du nombre de copies du gène. La présence des mutations du fond SUP3 permet une restauration d'un phénotype sauvage aux souches dépendantes du gène de *Podospora anserina* pour leur respiration.

figure III.2.6 page ci-contre). L'efficacité de synthèse d'ATP, c'est à dire le nombre d'ATP formé par électron transféré à l'oxygène accepteur, est relativement bonne, indiquant qu'une fois assemblée le complexe hybride est bien fonctionnel.

Les données obtenues sur les souches $\Delta atp9 :: ARG8^m + PaATP9-5$ montrent une altération de l'activité de synthèse d'ATP, qui est nettement inférieure à celles du WT. Le ratio P/O, ou vitesse de synthèse d'ATP / vitesse de consommation d'oxygène à l'état phosphorylant, représente le nombre de molécules d'ATP synthétisée par O_2 consommé, donc le rendement des réactions des OXPHOS. Ce ratio est expérimentalement estimé entre 1,1 et 1,2 pour une souche sauvage de *Saccharomyces cerevisiae* (Vanrolleghem *et al.*, 1996). Dans les souches exprimant le gène PaATP9-5 en fond SUP3, le ratio P/O ne dépasse pas 0,73, indiquant une perte de l'efficacité catalytique.

Celle-ci peut-être due au fait que les sous-unités Atp9p de *Podospora anserina* n'interagissent pas de façon optimale au sein du complexe ATP synthase de levure. Les activités d'hydrolyse d'ATP sensibles à l'oligomycine représentent environ le tiers de celles de la souche sauvage, indiquant que l'efficacité d'assemblage des sous-unités Atp9p de *Podospora anserina* en levure, même si elle est améliorée comparativement au fond SUP3, n'est pas encore optimale. Ces données pourraient être expliquées soit par une légère incompatibilité de la protéine PaAtp9p-5 utilisée avec les autres sous-unités de l'ATP synthase de *Saccharomyces cerevisiae*, soit par une moindre quantité de ce complexe dans les souches avec ATP9 exprimé depuis le noyau. Cependant, la quantité d'ATP synthases présentes, reflétée par le pourcentage d'inhibition par l'oligomycine de l'activité d'hydrolyse d'ATP, est également inférieure au WT. Ceci indiquerait que ces mitochondries contiennent moins d'ATP synthases complètement assemblées.

Souches	Consommation d'oxygène (nAtO ₂ / min / mg)				Synthèse d'ATP		Hydrolyse d'ATP (nmol P _i / min / mg)		
	NADH			Asc./TMPD	(nmol ATP / min/ mg)	P/O	Oligo.		% d'inhib.
	Etat 3	Etat 4	CCCP	CCCP			-	+	
WT	653 ± 58	N/D	1261 ± 166	1848 ± 212	769 ± 55	1,17	4159 ± 316	549 ± 60	87
fond SUP3 ρ ⁰ + WT ADNmt	593	258	1095	1476	578	0,97	2538	317	88
fond SUP3 + SUP3ATP9-Hyb	216 ± 51	146 ± 18	485 ± 127	803 ± 159	190 ± 7	0,88	4758 ± 221	3807 ± 330	20
Δatp9 :: ARG8 ^m + PaATP9-5 (CEN)	309 ± 29	152 ± 51	527 ± 48	843 ± 204	219 ± 83	0,71	3638 ± 154	2385 ± 57	34
fond SUP3 + PaATP9-5 (CEN)	384 ± 41	108 ± 46	716 ± 67	1060 ± 101	300 ± 13	0,78	3355 ± 634	1912 ± 485	43
Δatp9 :: ARG8 ^m + PaATP9-5 (2μ)	516 ± 46	189 ± 63	1081 ± 17	1673 ± 69	377 ± 28	0,73	2615 ± 692	1825 ± 45	30
fond SUP3 + PaATP9-5 (2μ)	376 ± 17	188 ± 32	723 ± 33	1063 ± 97	384 ± 23	1,02	3230 ± 53	2029 ± 225	37

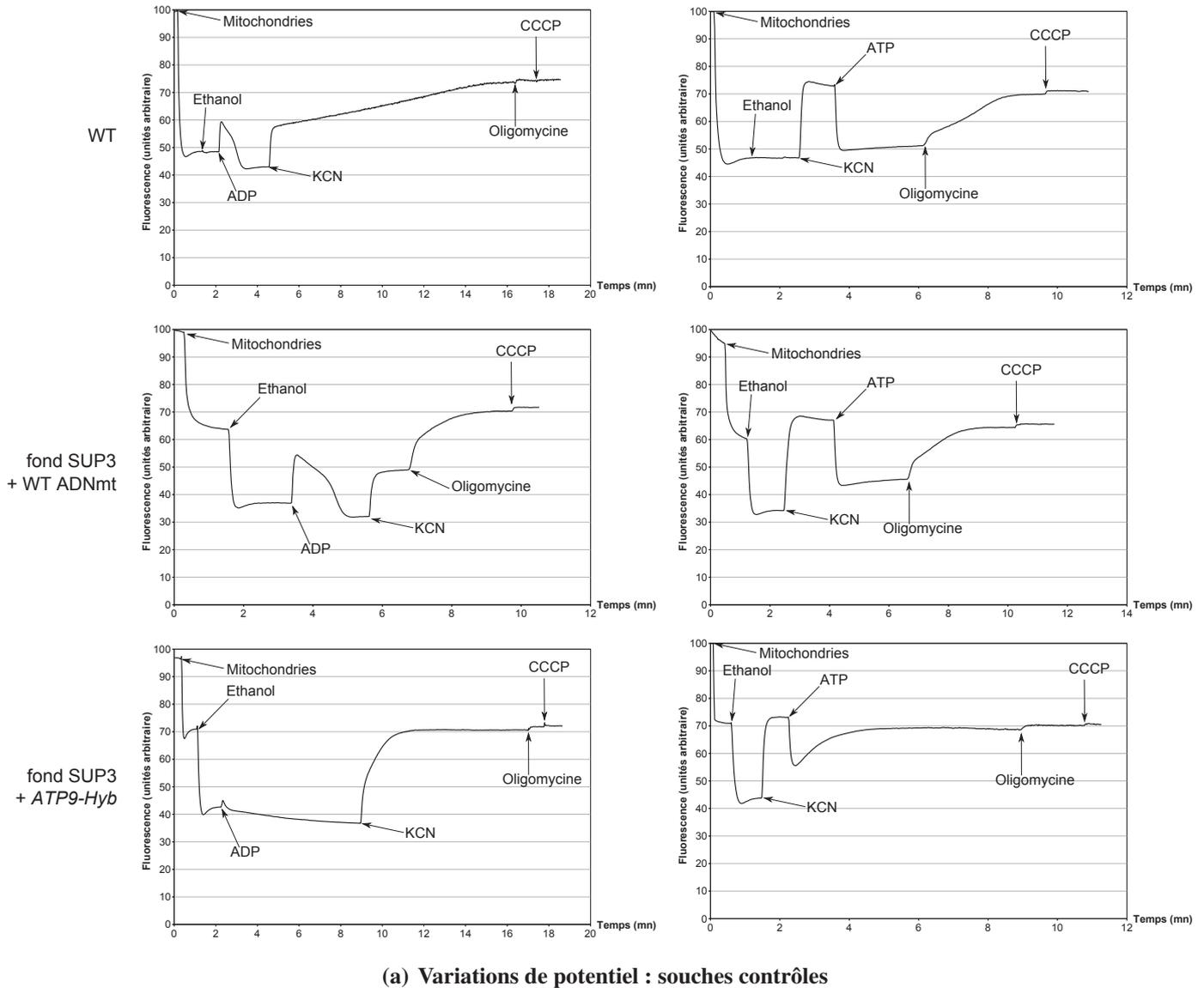
TABLE III.2.3: Les mutations SUP affectent légèrement les oxydations phosphorylantes

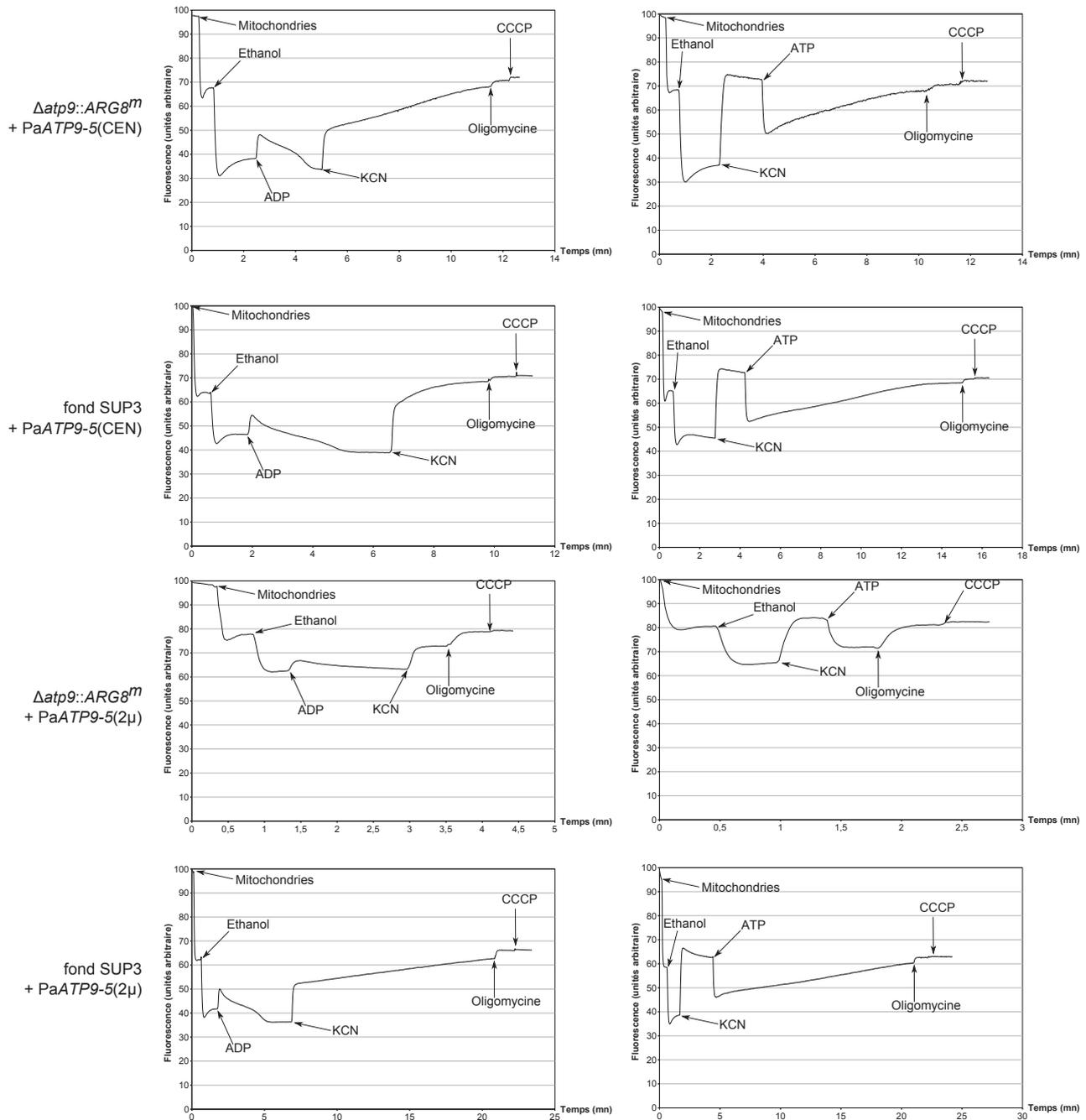
Tableau regroupant les données de caractérisation quantitative des mitochondries des souches WT (MR6), Δatp9 :: ARG8^m + PaATP9-5 (CEN souche AMY7 ou 2μ souche AMY10), fond SUP3 ρ⁰ + WT ADNmt (AMY108), SUP3 (fond SUP3 + SUP3ATP9-Hyb, AMY81), fond SUP3 + PaATP9-5 (CEN souche AMY49 ou 2μ souche AMY99). Les souches ont été cultivées en milieu respiratoire YPEG et récoltées en phase exponentielle. Les mesures de vitesse de consommation d'oxygène et de synthèse d'ATP sont réalisées sur mitochondries fraîches, les cinétiques d'hydrolyse d'ATP sur mitochondries surgelées à l'azote liquide, conservées à -80 °C. Asc. : Ascorbate ; Oligo. : Oligomycine ; d'inhib. : d'inhibition. Les mutations SUP ont un impact modéré sur les différentes souches étudiées. Une légère augmentation de la quantité d'ATP synthèses peut être notée.

La comparaison des données obtenues à partir des différents fonds SUP3 montrent une augmentation du rapport P/O, de part une légère augmentation des vitesses de synthèse d'ATP et un ajustement des vitesses de consommation d'oxygène. De plus, la part d'activité d'hydrolyse d'ATP sensible à l'oligomycine est augmentée. Il semblerait donc que les mécanismes mis en place par les mutations dans le fond SUP3 aient pour conséquence une optimisation des OXPHOS dans ces souches, impliquant probablement l'optimisation de la biogénèse des ATP synthases.

2.3.3.2 Variations du potentiel mitochondrial

Les figures III.2.8(a) et III.2.8(b) page ci-contre présentent les profils établis en utilisant le protocole décrit en partie II section 4.1.4 page 104. Les profils obtenus montrent tout d'abord que les souches avec un ADN mitochondrial sauvage en fond SUP3 et WT sont similaires. L'expression du gène PaATP9-5 dans un fond génétique nucléaire sauvage ou SUP3, en l'absence de la copie mitochondriale du gène ATP9 natif de levure, permet une énergisation correcte de la membrane comme montré en figure III.2.8(b) page ci-contre. Comme attendu, l'énergisation de la membrane est nettement moins efficace encore avec le gène hybride ATP9-Hyb.





(b) Variations de potentiel : souches exprimant le gène PaATP9-5

FIGURE III.2.8: Analyse des capacités d'énergisation des membranes mitochondriales

Profils d'énergisation des membranes de mitochondries extraites des souches (a) MR6 (WT), AMY108 (fond SUP3 + WT ADNmt) ou AMY81 (fond SUP3 + SUP3ATP9-Hyb), (b) AMY7 ($\Delta atp9 :: ARG8^m + PaATP9-5 CEN$), AMY49 (fond SUP3 + PaATP9-5 CEN), AMY10 ($\Delta atp9 :: ARG8^m + PaATP9-5 2\mu$) ou AMY99 (fond SUP3 + PaATP9-5 2 μ). Les souches ont été cultivées en milieu respiratoire YPEG et récoltées en phase exponentielle. Les profils sont réalisées sur mitochondries fraîches. La souche exprimant le gène SUP3ATP9-Hyb a des capacités d'énergisation très altérées, qui ne sont pas compensées par les mutations du fond SUP3. Les mutations SUP ne semblent pas avoir d'impact fort sur les capacité d'énergisation des mitochondries exprimant le gène PaATP9-5 sur vecteur simple ou multicopies.

2.3.3.3 Visualisation des ATPases

Les complexes membranaires des mitochondries préparées précédemment ont été extraits à l'aide d'un détergent doux, la digitonine. Ces complexes ont été séparés sur gel non-dénaturant, traité ensuite pour révéler les activités ATPasiques. Ces activités sont en majorité assurées par le secteur F_1 de l'ATP synthase, libre ou associé au F_0 . Le gel présenté en figure III.2.9 montre que, dans les conditions utilisées, les complexes ATP synthases sont présents principalement sous forme de monomères et dimères dans la souche sauvage. La souche fond SUP3 ρ^0 + WT ADNmt (souche AMY108) présente également des dimères d'ATP synthase. Les mutations SUP ne semblent donc pas affecter de manière perceptible la biogénèse des oligomères de ce complexe lorsque la sous-unité Atp9p est exprimée sous une forme native depuis le génome mitochondrial.

Les mutants exprimant la protéine Atp9p depuis le noyau, que ce soit dans un fond génétique nucléaire sauvage ou SUP3, ne présentent pas de dimères d'ATP synthase, tout du moins de dimères stables dans les conditions d'extraction utilisées. La quantité de monomère étant égale ou inférieure aux souches sauvages, il y aurait donc globalement moins de complexes ATP synthases dans les souches avec *ATP9* relocalisé par rapport à la souche sauvage, ce qui entre en corrélation avec les données biochimiques présentées dans le tableau III.2.3 page 167.

2.4 Analyse des mécanismes d'action des mutations SUP

Nous avons décidé d'analyser l'effet indépendant de certaines des mutations SUP, ce qui permettrait de déterminer quels mécanismes sont mis en jeu par les mutations SUP, mais également si chacune des mutations est capable de les mettre en place de manière indépendante. Il peut exister en effet une inter-dépendance ainsi qu'une synergie des effets des mutations SUP pour qu'un phénotype de croissance améliorée soit visible.

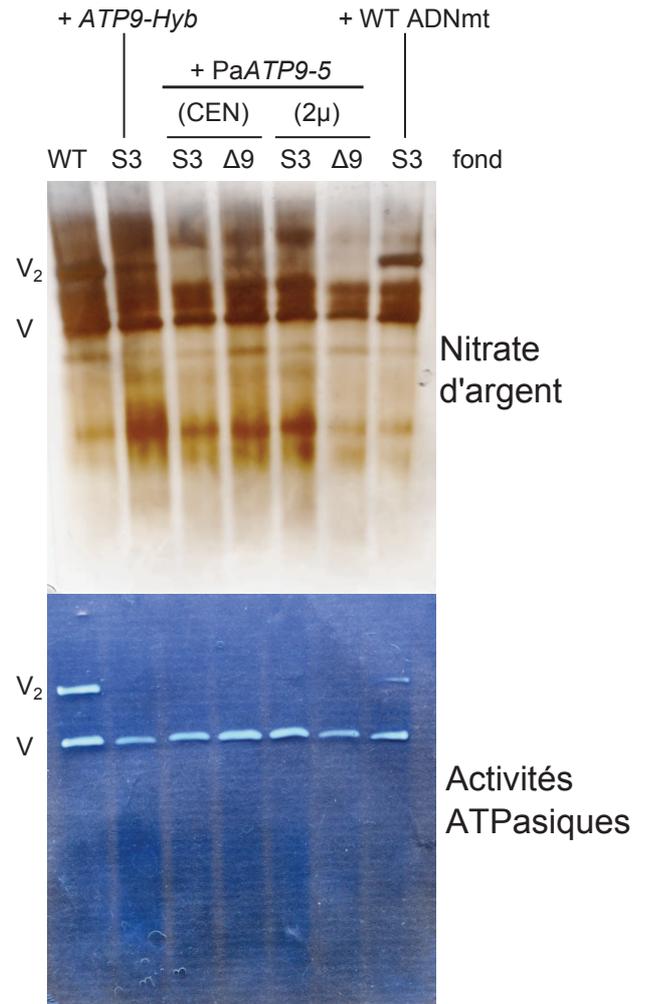


FIGURE III.2.9: Visualisation en BN-PAGE des complexes ATP synthase

Analyse BN-PAGE des protéines mitochondriales des souches WT (MR6), $\Delta\text{atp9}::\text{ARG8}^m$ + PaATP9-5 (CEN souche AMY7 ou 2μ souche AMY10), fond SUP3 ρ^0 + WT ADNmt (AMY108), SUP3 (fond SUP3 + SUP3ATP9-Hyb, AMY81), fond SUP3 + PaATP9-5 (CEN souche AMY49 ou 2μ souche AMY99). Les souches ont été cultivées en milieu respiratoire YPEG et récoltées en phase exponentielle. Les complexes protéiques ont été extraits à l'aide de 2 g/g de protéines de détergent digitonine, puis séparés sur gels par électrophorèse en bleu natif. Le gel a ensuite été incubé dans une solution de révélation des activités ATPasiques au nitrate de plomb, décoloré puis coloré au nitrate d'argent. $\Delta 9$: $\Delta\text{atp9}::\text{ARG8}^m$; V : ATP synthases monomériques; V_2 : ATP synthases dimériques.

2.4.1 La m-AAA protéase

Comme indiqué plus haut, une cible préférentielle des mutations SUP est la m-AAA protéase. Les gènes *YTA10* et *YTA12* encodent les deux sous-unités du complexe m-AAA protéase, un complexe hétéro-hexamérique ancré dans la membrane interne mitochondriale. La tête catalytique du complexe est dirigée vers la matrice mitochondriale (Lee *et al.*, 2011; Koppen et Langer, 2007). La m-AAA protéase est une métallopeptidase ATP-dépendante de la famille des AAA protéases, et est impliquée dans le contrôle qualité des protéines mitochondriales (Koppen et Langer, 2007). La m-AAA protéase fait également partie d'un supercomplexe protéique, associée au complexe prohibitine.

La prohibitine est un complexe protéique composé de deux sous-unités, Phb1p et Phb2p, et est impliqué dans divers mécanismes mitochondriaux. Ce complexe permettrait, entre autres, de moduler l'activité de protéolyse du complexe m-AAA protéase (Koppen et Langer, 2007). La structure et les fonctions de ce complexe seront abordées plus en détail en partie IV section IV page 241.

Le séquençage des mutants SUP a révélé la présence de mutations ayant potentiellement un effet direct (une modification dans chaque sous-unité du complexe) ou indirect (un changement dans la sous-unité Phb1p du complexe prohibitine) sur l'activité du complexe m-AAA protéase. Ces mutations sont d'autant plus intéressantes qu'elles apparaissent de manière indépendante dans les trois souches SUP secondaires SUP1, SUP2 et SUP3 (voir table III.2.1 page 159). Nous avons décidé d'étudier de plus près l'effet de ces mutations sur la relocalisation du gène *ATP9*. Je me suis concentré sur la mutation contenue dans la sous-unité Yta10p et notre but a été de vérifier si son effet est isolé ou s'il entre en synergie avec les autres mutations SUP identifiées.

2.4.2 La m-AAA protéase : le gène *YTA10*

2.4.2.1 Clonage de l'allèle *yta10-Sup*

J'ai, dans un premier temps, cloné l'allèle *yta10* muté, que j'appellerai *yta10-Sup*, de la souche SUP3. Pour cela, j'ai utilisé une construction plasmidique fournie par Thomas LANGER de l'INSTITUT DE GÉNÉTIQUE de Cologne. Le plasmide qu'il nous a fourni est un vecteur d'expression de levure centromérique et portant un gène de sélection *TRP1* (YCplac22) et le gène sauvage *YTA10* sous contrôle du promoteur du gène *ADHI*, encodant l'alcool déshydrogénase. À partir de cette construction, j'ai réalisé une expérience de *gap repair*, résumée dans la figure III.2.10 page suivante.

Pour cela, j'ai tout d'abord restreint le plasmide au niveau des sites situés dans le gène *YTA10-Wt*. Cette digestion va permettre de retirer une portion de séquence d'environ 1 000 paires de bases (la région codante en comporte 2 286) portant la mutation SUP. Après purification par électrophorèse sur gel d'agarose, le vecteur linéarisé et débarrassé de cette séquence est transformé dans la souche contenant l'allèle *yta10-Sup* (fond SUP3).

Les transformants sont cultivés sur un milieu dépourvu de tryptophane ou leucine. Seules les levures ayant recircularisé le plasmide vont pouvoir survivre sur ce type de milieu. Cette recircularisation passe par une recombinaison homologue avec le gène *yta10-Sup* (voir figure III.2.10 étape 3) qui va alors reconstituer sur le plasmide le gène *yta10-Sup*. Une récupération du plasmide (nommé pAM24) est ensuite réalisée sur ces souches.

2.4.2.2 Effet de la mutation *yta10-Sup* dans un contexte sauvage

Afin de pouvoir introduire la mutation *yta10-Sup* dans un contexte sauvage, j'ai tout d'abord réalisé la délétion du gène *YTA10* dans la souche sauvage MR6. Pour cela, j'ai utilisé une

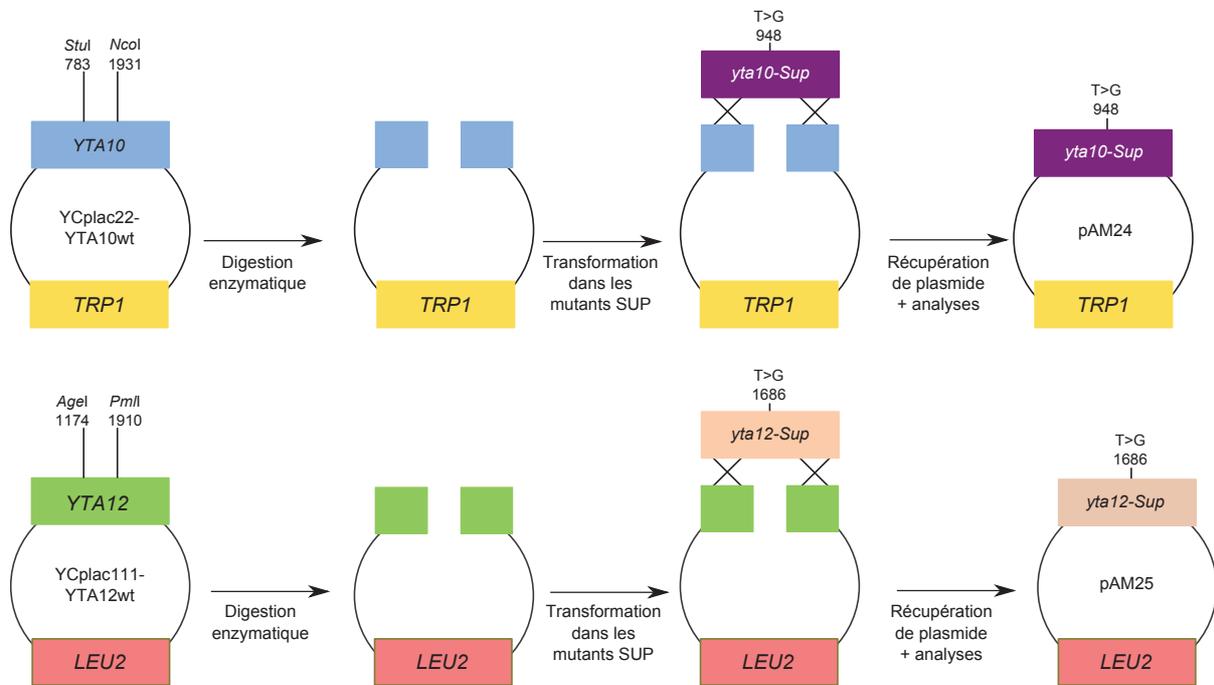


FIGURE III.2.10: Clonage des gènes *YTA10* et *YTA12* mutés par technique de *gap repair*

Schéma récapitulant les différentes étapes de clonage par *gap repair*. L'allèle sauvage est déjà cloné dans un vecteur d'expression levure. Le plasmide est linéarisé au niveau du site de la mutation, puis le vecteur est transformé dans le fond génétique contenant l'allèle muté (souche *AMY81* ou *SUP3* pour *yta10-Sup* et souche *AMY79* ou *SUP1* pour *yta12-Sup*). Les vecteurs sont recircularisés par recombinaison, intégrant l'allèle *SUP* au vecteur. Les sites de digestion enzymatique et le site de la mutation sont indiqués pour chaque plasmide. L'intégration de l'allèle *SUP* est vérifiée par séquençage.

cassette de délétion $\Delta yta10 :: KANMX4$ amplifiée à partir de la souche de la banque de délétion EUROSCARF. La souche $\Delta yta10 :: KANMX4$ (*AMY137*) a ensuite été transformée avec les plasmides YCplac22-*YTA10wt* (souche *AMY180*) ou YCplac22-*YTA10sup* (souche *AMY181*), portant respectivement les allèles *YTA10-Wt* sauvage ou muté *yta10-Sup*.

Un test en gouttes, présenté en figure III.2.11 page ci-contre, ne montre aucune différence de croissance respiratoire entre la souche sauvage et les deux transformants, indiquant qu'en tant que telle la mutation *yta10-Sup* n'a pas un impact très important sur le fonctionnement mitochondrial.

2.4.2.3 Effet de la mutation *yta10-Sup* dans une souche avec *ATP9* relocalisé

La souche $\Delta atp9 :: ARG8^m$ a subi le même protocole que celui décrit en 2.4.2.2 page précédente. Le gène *YTA10* y a été remplacé par la cassette de résistance à la kanamycine *KANMX4*. La souche obtenue (*AMY138*), que je désignerai par $\Delta atp9 \Delta yta10$, a ensuite été co-transformée avec le plasmide portant le gène *ATP9-Hyb* et le plasmide YCplac22-*YTA10wt* (souche *AMY198*) ou YCplac22-*YTA10sup* (souche *AMY203*). Rappelons que le gène encodant la protéine hybride *Atp9p-Hyb* confère une très faible croissance respiratoire en fond sauvage. Si le gène *yta10-Sup* est seul capable d'améliorer l'expression de cette protéine, cela devrait se traduire par une amélioration de la croissance respiratoire de la souche.

Le test de croissance présenté en figure III.2.12 page 174 montre que les souches exprimant un *ATP9-Hyb* avec un allèle *yta10-Sup* ou un allèle *YTA10-Wt* sauvage ont la même croissance respiratoire. La mutation *yta10-Sup* seule n'a donc aucune incidence sur le mécanisme d'optimisation de la relocalisation du gène *ATP9-Hyb*. Une seconde expérience a été réalisée, en co-transformant cette fois le gène *PaATP9-5* avec les gènes *YTA10* sauvage (souche *AMY195*) ou

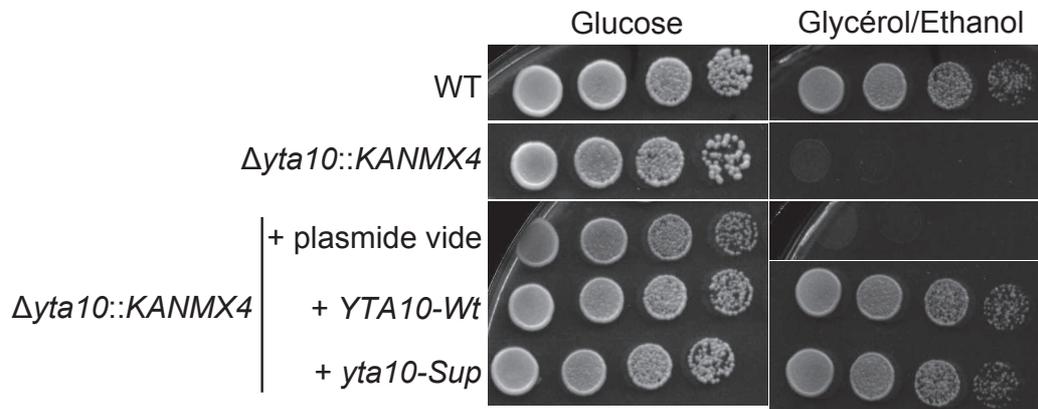


FIGURE III.2.11: Mutation *yta10-Sup* dans un contexte sauvage

Photographie d'un test en gouttes des souches WT (MR6), $\Delta yta10 :: KANMX4$ (AMY137), $\Delta yta10 :: KANMX4 +$ plasmide vide (AMY179), $\Delta yta10 :: KANMX4 + YTA10-Wt$ (AMY180) ou *yta10-Sup* (AMY181). Les souches ont été déposées sur milieu fermentescible riche YPGA (glucose) ou milieu respiratoire riche YPEG (glycérol/éthanol) 2 jours à 28 °C. L'allèle SUP complète bien la délétion $\Delta yta10 :: KANMX4$ mais ne semble pas affecter le phénotype de croissance de la souche WT.

muté (souche AMY200) dans le contexte $\Delta atp9 \Delta yta10$. La mutation n'a également aucun effet sur la croissance des souches exprimant cette version du gène *ATP9* (figure III.2.12 page 174). Des observations microscopiques ont été réalisées sur ces dernières souches et montrent (figure III.2.13 page suivante) que la mutation a un effet limité sur les défauts de morphologie cellulaire de ces souches. Il semble atténué, mais est toujours présent de manière significative.

La mutation portée par le gène *yta10-Sup* a été obtenue au second cycle de sélection à partir du clone initial SUPi décrit en section 2.1.1 page 152. Les mutations primaires de réversion, présentes dans le clone SUPi sont peut être nécessaires pour permettre à la mutation *yta10-Sup* d'améliorer l'expression allotopique de la sous-unité Atp9p. Nous avons donc décidé de réaliser les mêmes expériences afin d'analyser l'impact de cette mutation en fond SUPi.

2.4.2.4 La mutation SUP du gène *YTA10* en fond SUPi accroît la résistance de la sous-unité Atp9p exprimée depuis le noyau à la dégradation par la m-AAA protéase

J'ai donc effectué la délétion du gène *YTA10* dans la souche SUPi, avec le même protocole que celui décrit précédemment. La souche obtenue (AMY119), désignée SUPi + $\Delta yta10 :: KANMX4$, a ensuite été transformée avec chacun des plasmides YCplac22-YTA10wt ou YCplac22-YTA10sup pour obtenir les souches AMY232 et AMY234.

Le test présenté en figure III.2.14 page 175 montre que l'introduction dans le fond génétique SUPi d'un allèle *yta10-Sup* améliore la croissance sur milieu respiratoire de la souche. Ce résultat indiquerait donc que les mutations obtenues durant le second cycle de sélection entrent en synergie avec le système apparu avec les mutations de réversion. De plus, cette expérience montre que l'allèle muté *yta10-Sup* combiné aux mutations de réversion est suffisant pour une telle optimisation.

Cette observation est corrélée avec les résultats de Western blot présentés en figure III.2.15(a) page 175. Ces expériences réalisées à partir d'extraits protéiques cellulaires totaux permettent de vérifier l'état de l'accumulation de la protéine Atp9p-Hyb dans les cellules. Une quantification des signaux des protéines détectées par l'anticorps anti-Atp9p, rapportée aux signaux de la protéine Por1p, est présentée en figure III.2.15(b) page 176.

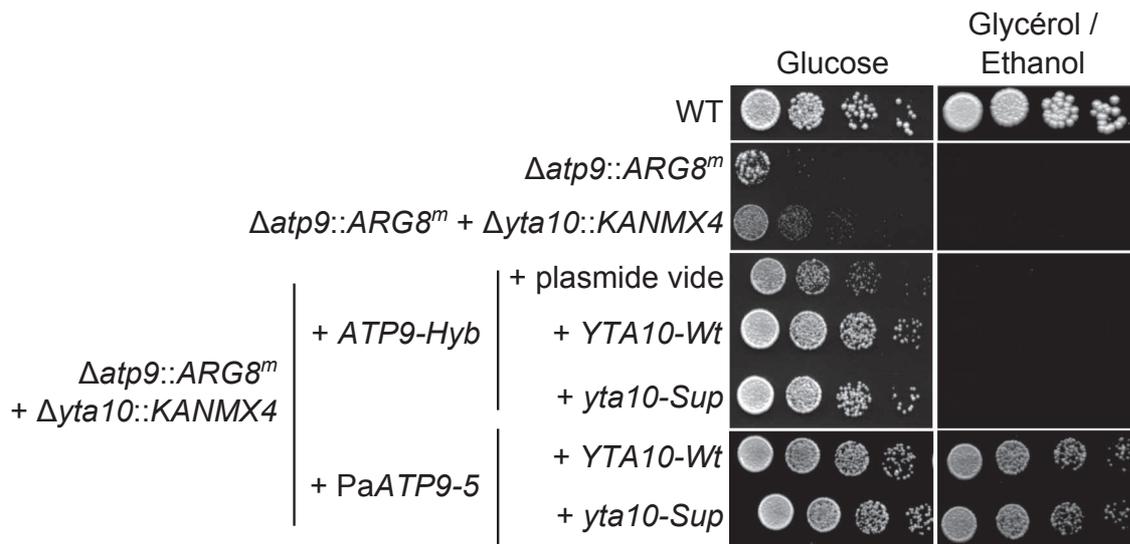


FIGURE III.2.12: Mutation *yta10-Sup* dans un contexte sauvage avec *ATP9* relocalisé

Photographie d'un test en gouttes des souches WT (MR6), $\Delta atp9::ARG8^m$ (RKY26), $\Delta atp9 \Delta yta10$ (AMY138), $\Delta atp9 \Delta yta10 + ATP9-Hyb + plasmide Ycplac22$ vide (AMY193) ou + YTA10-Wt (AMY198) ou + *yta10-Sup* (AMY203), $\Delta atp9 \Delta yta10 + PaATP9-5 + YTA10-Wt$ (AMY195) ou + *yta10-Sup* (AMY200). Les doubles délétants $\Delta atp9 \Delta yta10$ ont été cultivés en milieu fermentescible synthétique sans arginine, uracile ni tryptophane (CSM-URT), afin de conserver les plasmides et leur caractère ρ^+ . Les souches ont été déposées sur milieu fermentescible riche YPGA (glucose) 2 jours ou milieu respiratoire riche YPEG (glycérol / éthanol) 5 jours à 28 °C. L'allèle SUP du gène YTA10 ne semble pas avoir d'effet seul dans un contexte nucléaire sauvage. Celui-ci n'améliore pas la croissance respiratoire de la souche exprimant le gène ATP9-Hyb. L'introduction de ce même allèle dans une souche exprimant le gène PaATP9-5 de *Podospora anserina* ne présente également aucune amélioration de vitesse de croissance.

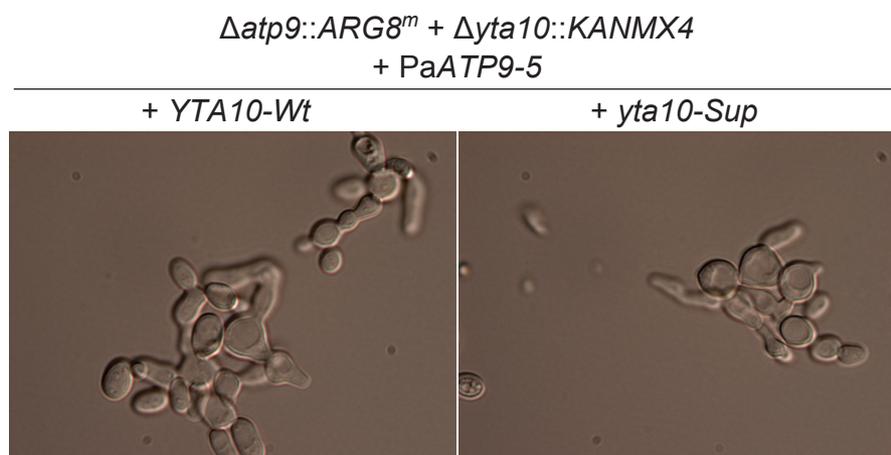


FIGURE III.2.13: Morphologie cellulaire des souches exprimant le gène PaATP9-5 et l'allèle *yta10-Sup*

Photographies des souches $\Delta atp9 \Delta yta10 + PaATP9-5 + YTA10-Wt$ (AMY195) ou + *yta10-Sup* (AMY200) en phase exponentielle de croissance, cultivées en milieu respiratoire riche YPEG (glycérol / éthanol) à 28 °C (grossissement $\times 1000$). La souche exprimant l'allèle sauvage de YTA10 montre le phénotype anormal précédemment évoqué, et ce phénotype est partiellement conservé dans les souches exprimant l'allèle SUP.

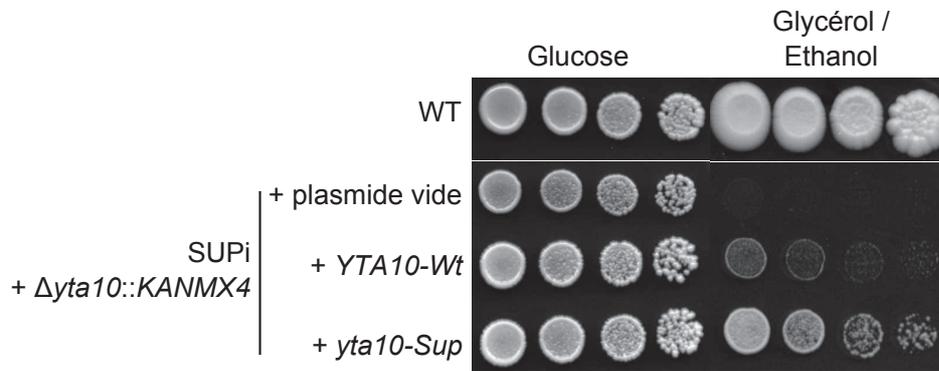


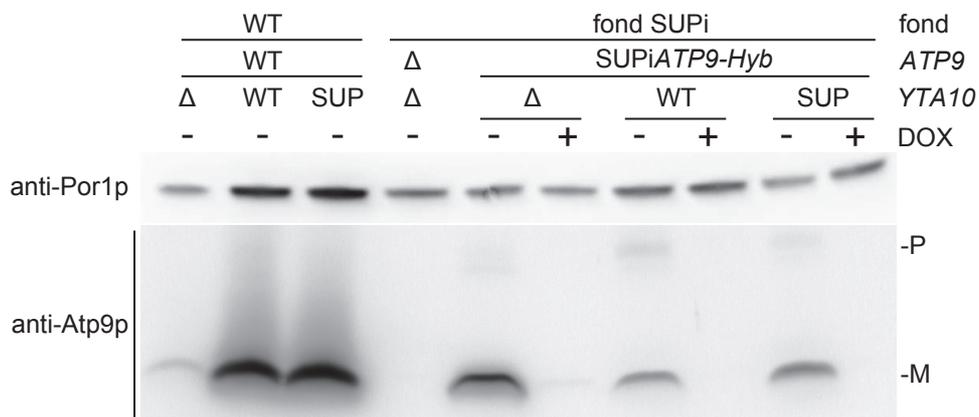
FIGURE III.2.14: Mutation *yta10-Sup* dans le contexte SUPi initial

Photographie d'un test en gouttes des souches WT (MR6), SUPi Δ yta10::KANMX4 + plasmide Ycplac22 vide (AMY231) ou + YTA10-Wt (AMY232) ou + yta10-Sup (AMY234). Les différentes souches avec fond SUPi Δ yta10::KANMX4 ont été cultivées en milieu fermentescible synthétique sans arginine, uracile ni tryptophane (CSM-URT), afin de conserver les plasmides et leur caractère ρ^+ . Les souches ont été déposées sur milieu fermentescible riche YPGA (glucose) 2 jours ou milieu respiratoire riche YPEG (glycérol/éthanol) 10 jours à 28 °C. L'allèle SUP du gène YTA10 est actif dans ce contexte. La croissance respiratoire de la souche exprimant le gène ATP9-Hyb est nettement améliorée par l'allèle SUP de ce gène.

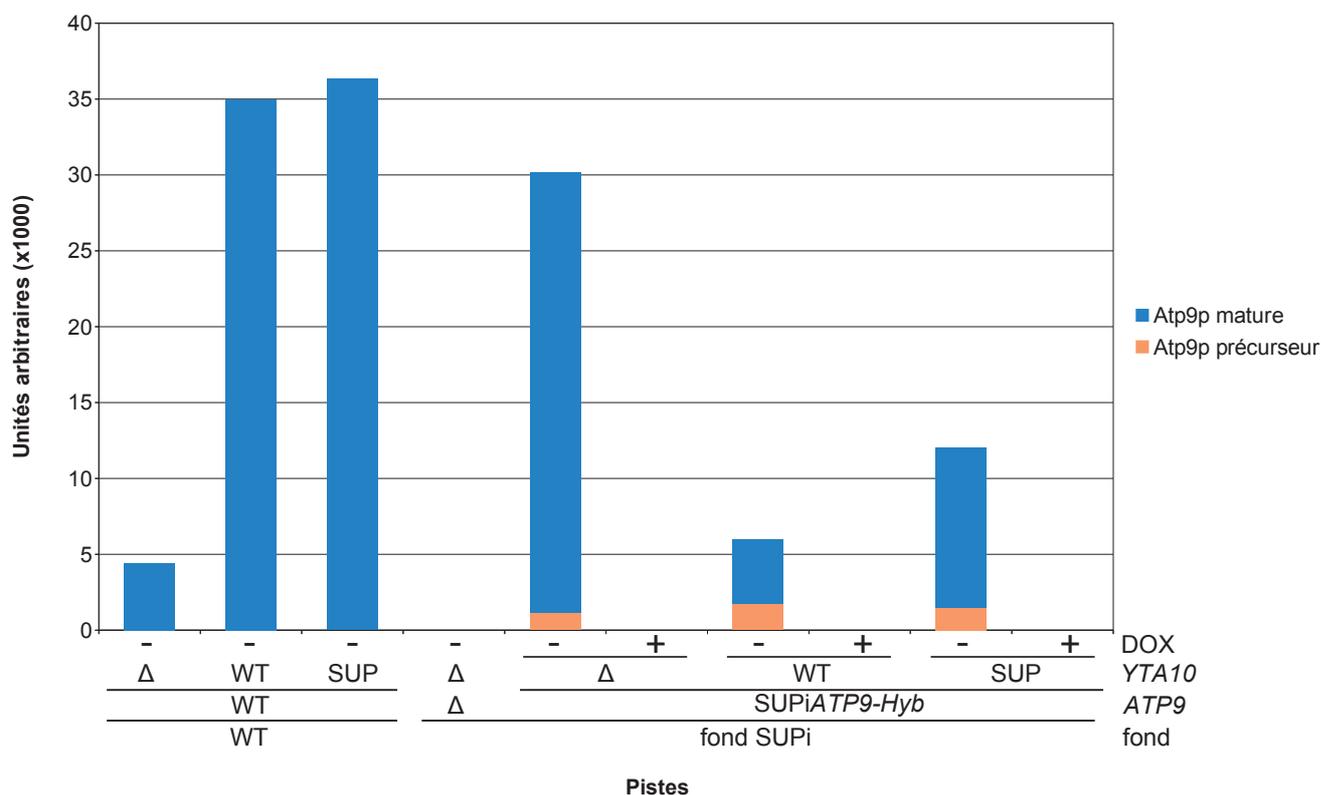
Cette quantification montre que la délétion du gène *YTA10* dans la souche sauvage entraîne une forte diminution de la quantité de protéine Atp9p accumulée, comme montré dans la littérature par Paul et Tzagoloff (1995). La réintroduction de l'allèle sauvage *YTA10-Wt* restaure une bonne accumulation de la protéine, et cette accumulation ne semble pas être affectée par l'allèle muté *yta10-Sup*.

La délétion du gène *YTA10* dans la souche SUPi exprimant le gène *ATP9-Hyb* a un effet contraire. En effet, si l'on compare l'accumulation de la protéine Atp9p-Hyb dans cette souche avec celle du même fond génétique mais possédant un allèle *YTA10-Wt*, on peut voir que l'absence d'activité du complexe m-AAA protéase permet une accumulation beaucoup plus importante de protéine Atp9p-Hyb mature, proche du taux d'accumulation de la protéine Atp9p native. Ceci indique que le complexe m-AAA protéase dégraderait une grande quantité d'Atp9p-Hyb mature, et que la diminution de son activité permettrait une accumulation plus importante de sous-unité Atp9p-Hyb.

L'effet de la mutation SUP de ce gène va dans le sens de cette hypothèse. En effet, l'allèle *yta10-Sup* permet, quant à lui, d'accumuler plus de protéine Atp9p-Hyb mature que l'allèle sauvage (figure III.2.15(b) page suivante) mais moins qu'en l'absence complète de la m-AAA protéase. La mutation survenue dans ce gène diminuerait donc partiellement l'activité de dégradation du complexe m-AAA protéase et ainsi protégerait la protéine Atp9p-Hyb de la dégradation après son transport dans la matrice mitochondriale.



(a) Expérience de Western blot réalisée sur les souches exprimant l'allèle *yta10-Sup*



(b) Quantification des signaux de protéine Atp9p sauvage et Atp9p-Hyb

FIGURE III.2.15: L'allèle *yta10-Sup* a un effet sur l'accumulation de protéine Atp9p exprimée depuis le noyau

(a) Détection des protéines Atp9p (souches sauvage MR6) et Atp9p-Hyb, exprimée dans les fonds génétiques WT (MR6), $\Delta yta10 :: KANMX4$ (AMY137), $\Delta yta10 :: KANMX4 + YTA10\text{-Wt}$ (AMY180) ou *yta10-Sup* (AMY181), SUPi $\Delta atp9 \Delta yta10$ (AMY226), SUPi $\Delta yta10 :: KANMX4 + \text{plasmide } Ycplac22 \text{ vide}$ (AMY231) ou + YTA10-Wt (AMY232) ou + *yta10-Sup* (AMY234). La protéine est indétectable car absente dans la souche SUPi $\Delta atp9 \Delta yta10$ (piste $\Delta atp9 :: ARG8^m$). Les extraits protéiques ont été réalisés sur des cultures en phase exponentielle de croissance en milieu fermentescible synthétique (CSM-URT, complété en tryptophane et uracile pour SUPi $\Delta atp9 \Delta yta10$ et tryptophane, uracile et arginine pour la souche WT). Les cultures ont été effectuées en présence (pistes +) ou en absence (pistes -) de doxycycline, qui éteint l'expression du gène ATP9-Hyb. La protéine hybride précurseur (P) ou maturée (M) est détectable à l'aide de l'anticorps anti-Atp9p de levure, dirigé contre la boucle qui est identique entre la protéine native et la construction. La protéine Por1p mitochondriale sert de contrôle de charge.

(b) Quantification des signaux de protéines Atp9p et Atp9p-Hyb détectés en (a). Ces valeurs ont été corrigées par rapport au contrôle de charge Por1p. La protéine Atp9p mature est représentée par la couleur bleue, et la précurseur en orange. L'axe des abscisses correspond aux différentes pistes du Western blot, et l'axe des ordonnées aux valeurs de quantification en unités arbitraires. L'allèle *yta10-Sup* a clairement un impact sur l'accumulation de la protéine Atp9p-Hyb. La mutation protège la protéine hybride de l'activité de dégradation du complexe m-AAA protéase.

2.4.3 La m-AAA protéase : le gène *YTA12*

Nous avons également entrepris de tester l'effet de la mutation *yta12-Sup* seule, mais cette étude n'a pu, dans le temps imparti, être menée à son terme. Je présenterai néanmoins les étapes déjà réalisées.

2.4.3.1 Clonage de l'allèle *yta12-Sup*

Le clonage de l'allèle *yta12-Sup* a été réalisé de la même manière que décrit en section 2.4.2.1 page 171. La figure III.2.10 page 172 résume les différentes étapes réalisées dans le cadre du clonage de l'allèle SUP de ce gène. La construction de départ, l'allèle sauvage *YTA12-Wt* cloné dans le vecteur YCplac111 (centromérique, promoteur du gène *ADHI* de levure, gène d'auxotrophie *LEU2*) nous a été gracieusement fourni par Thomas LANGER. Une section du gène contenant le site correspondant à la mutation SUP de *yta12-Sup* a été éliminée par digestion enzymatique, et le vecteur linéarisé a ensuite été introduit dans le clone SUP1 portant l'allèle *yta12-Sup*. Des clones auxotrophes pour la leucine ont été isolés et leurs plasmides extraits. J'ai pu ainsi obtenir des plasmides portant l'allèle muté *yta12-Sup* (pAM25).

Malgré plusieurs tentatives je n'ai pu obtenir la délétion du gène *YTA12* dans la souche SUPi ($\Delta yta12 :: KANMX4$), une étape nécessaire pour pouvoir tester l'impact de la mutation *yta12-Sup* seule sur l'expression allotopique de la sous-unité Atp9p. Ce travail devra être poursuivi.

2.4.4 La glutamyl-tRNA synthétase

Nous avons trouvé qu'un des clones SUP (SUP1) porte une mutation dans le gène *GUS1*, qui encode une glutamyl-tRNA synthétase. Il a été montré par Hubert BECKER de l'INSTITUT DE BIOLOGIE MOLÉCULAIRE ET CELLULAIRE de Strasbourg que, lors de l'adaptation des cellules de levure à la respiration (transition diauxique) cette synthétase est en grande partie importée dans les mitochondries et participe à une réaction de transamidation, permettant d'augmenter la production de glutamyl-tRNA dans les mitochondries (Frechin *et al.*, 2009). J'aborderai plus avant la structure et les fonctions de cette protéine en partie IV, section IV page 248.

Nous avons décidé d'examiner de plus près l'effet de la mutation située dans ce gène, afin de déterminer comment elle affecte la protéine correspondante et si cet effet a des répercussions sur l'expression allotopique du gène *ATP9*. Je n'ai également pu arriver au bout de cette étude, mais je décrirai ci-après les premières étapes réalisées.

2.4.4.1 Synthèse de l'allèle *gus1-Sup*

L'allèle sauvage *GUS1-Wt*, ainsi que l'allèle muté *gus1-Sup* nous ont été généreusement fournis par Hubert BECKER. Les deux allèles, synthétisés chimiquement, sont clonés dans le vecteur pRS315 (centromérique, gène d'auxotrophie *LEU2*) et sont sous contrôle du promoteur natif du gène *GUS1*.

2.4.4.2 Délétion de l'allèle WT et remplacement par l'allèle SUP du gène essentiel *GUS1*

Le gène *GUS1* est essentiel pour *Saccharomyces cerevisiae*. Son remplacement par une cassette de délétion implique d'avoir constamment un allèle fonctionnel présent dans la cellule. J'ai tout d'abord transformé les souches WT et le mutant de réversion initial SUPi avec les deux plasmides portant les allèles sauvages et mutés du gène *GUS1*. Les nouvelles souches obtenues (WT + *GUS1-Wt* : AMY284 / + *gus1-Sup* : AMY285 ; SUPi + *GUS1-Wt* : AMY288 / + *gus1-Sup* : AMY289) ont ensuite été transformées avec une cassette de délétion $\Delta gus1 :: KANMX4$ préparée à partir d'une souche diploïde hétérozygote de la banque Euroscarf. Des clones résistants à la généticine ont été sélectionnés puis vérifiés par PCR afin de déterminer

si la copie nucléaire – et non plasmidique – du gène *GUS1* a été délétée comme attendu. Voici les noms des souches obtenues :

- WT + $\Delta gus1 :: KANMX4 + GUS1-Wt$: AMY286
- WT + $\Delta gus1 :: KANMX4 + gus1-Sup$: AMY287
- SUPi + $\Delta gus1 :: KANMX4 + GUS1-Wt$: AMY295
- SUPi + $\Delta gus1 :: KANMX4 + gus1-Sup$: AMY296

2.4.4.3 Phénotype de croissance

J'ai ensuite vérifié la croissance des souches obtenues sur milieu respiratoire. Le résultat de ce test est présenté en figure III.2.16. La souche sauvage ne semble pas affectée par la mutation *gus1-Sup*. Au contraire, ce même allèle *gus1-Sup* introduit dans le mutant de réversion initial SUPi améliore légèrement le phénotype de croissance respiratoire, démontrant que la mutation *gus1-Sup* améliore bien l'expression allotopique du gène *ATP9*.

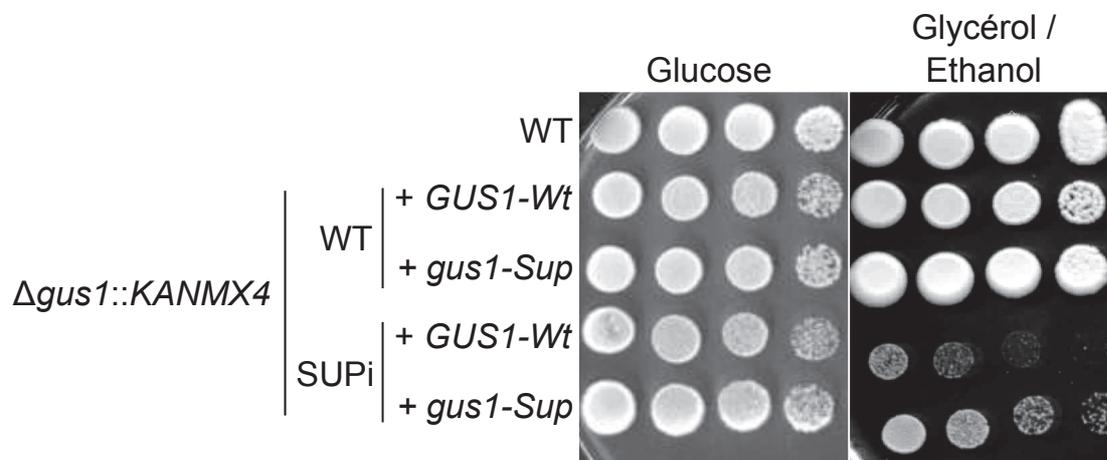


FIGURE III.2.16: L'allèle SUP du gène *GUS1* a un effet sur le contexte SUP

Photographie d'un test en gouttes des souches WT (MR6), WT $\Delta gus1 :: KANMX4 + GUS1-Wt$ (AMY286) ou + *gus1-Sup* (AMY287), SUPi $\Delta gus1 :: KANMX4 + GUS1-Wt$ (AMY295) ou + *gus1-Sup* (AMY296). Les souches ont été déposées sur milieu fermentescible riche YPGA (glucose) 3 jours ou milieu respiratoire riche YPEG (glycérol/éthanol) 10 jours à 28 °C. L'allèle SUP du gène *GUS1* est actif dans le contexte SUPi initial. La croissance respiratoire de la souche sauvage ne semble pas affectée, et celle du contexte SUPi est légèrement améliorée par l'allèle SUP.

Des analyses en cours, en collaboration avec Hubert BECKER, ont été entreprises afin de comprendre les mécanismes d'action de cette mutation. Déjà, il a été montré que les propriétés de la glutamyl-tRNA synthétase sont modifiées, à savoir une perte de l'amélioration de l'activité d' amino-acylation, induite normalement par son association à sa protéine d'ancrage Arc1p (voir partie IV section "La glutamyl-tRNA synthétase" page 248).

2.4.5 La protéine Ent5p

L'une des mutations SUP améliorant l'expression de la sous-unité Atp9p depuis le noyau affecte un gène impliqué dans le trafic membranaire intracellulaire, le gène *ENT5*. La protéine encodée par ce gène est capable de se lier, par l'intermédiaire de la clathrine (une protéine "manteau" des vésicules qui transportent les cargos protéiques vers la vacuole), à des protéines transmembranaires synthétisées au niveau de l'appareil de Golgi, et d'aider leur transport vers la vacuole pour y être dégradées.

Lorsque la protéine Atp9p est exprimée depuis le noyau, celle-ci devrait être synthétisée dans le réticulum endoplasmique, et de là être dirigée vers la mitochondrie. Toutefois, comme les niveaux d'accumulation dans les mitochondries de la sous-unité Atp9p exprimée allotopiquement sont faibles, et ce malgré l'utilisation de systèmes d'expression forte, il est possible qu'une fraction des Atp9p n'atteigne pas la mitochondrie et soit dirigée dans la vacuole où elle serait dégradée.

Un scénario intéressant serait que la mutation *ent5-Sup* rende moins efficace le transport de la protéine Atp9p vers la vacuole permettant ainsi un acheminement plus important de cette protéine dans la mitochondrie. Cette hypothèse est en cours d'étude, en collaboration avec Sylvie FRIANT du laboratoire de Génétique Moléculaire Génomique Microbiologie de Strasbourg. À l'heure actuelle, il a déjà été montré que la mutation *ent5-Sup* affecte l'interaction de Ent5p avec la clathrine (voir partie IV section "Le gène *ENT5*" page 251). Les expériences actuellement en cours visent à déterminer si la sous-unité Atp9p exprimée allotopiquement est bien dirigée en partie dans la vacuole et si la mutation *ent5-Sup* diminue le transport d'Atp9p vers la vacuole.

Chapitre 3

Quelles sont les forces impliquées dans le maintien dans la mitochondrie ou la relocalisation au noyau du gène *ATP9* ?

Sommaire

3.1	Histoire phylogénétique du gène <i>ATP9</i> dans le règne des Fungi	182
3.1.1	La répartition du gène <i>ATP9</i> chez les champignons	182
3.1.2	Scénario évolutif	183
3.2	L'expression des isoformes nucléaires du gène <i>ATP9</i> est régulée au cours du cycle de vie de <i>Podospora anserina</i>	183
3.2.1	La délétion de chaque isoforme affecte des étapes différentes du cycle de vie de <i>Podospora anserina</i>	183
3.2.2	L'expression des isoformes des gènes <i>PaATP9</i> est régulée au cours du cycle de vie de <i>Podospora anserina</i>	184
3.2.3	Les gènes <i>PaATP9-5</i> et <i>PaATP9-7</i> sont interchangeables	184
3.3	La relocalisation du gène <i>ATP9</i> permettrait de moduler la production d'ATP synthases chez <i>Podospora anserina</i>	185

Les chapitres précédents montrent que la relocalisation du gène *ATP9* chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* est en principe possible mais il s'agit d'un processus requérant de nombreuses modifications génétiques. Pour éviter d'être contre-sélectionnée ou tout simplement perdue avant son adaptation, une version de ce gène naturellement relocalisée aurait tout à gagner à conférer un avantage à la cellule. Nous avons testé cette hypothèse chez *Podospora anserina* dans une étude menée en collaboration avec les équipes de Annie SAINSAARD-CHANET du CENTRE DE GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE de Gif-sur-Yvette et Sylvie HERMANN LE DENMAT de l'INSTITUT DE GÉNÉTIQUE ET MICROBIOLOGIE d'Orsay. Nous avons montré, dans un article paru dans le journal *Molecular Biology and Evolution* (Dequard-Chablat *et al.*, 2011), que *Podospora anserina*, un champignon filamenteux, possédait deux isoformes nucléaires du gène *ATP9* dont l'expression est régulée au cours du cycle de vie de l'organisme, et que ces régulations permettent sans doute de moduler la production d'ATP synthase en fonction des besoins. La présence de plusieurs gènes *ATP9* nucléaires chez cet organisme nous a également amené à entreprendre une étude sur l'histoire phylogénétique du gène *ATP9* et à l'établissement d'un scénario évolutif le concernant dans le règne Fungi. Les informations décrites ci-dessous résument l'article paru, lui-même inclus à la suite de ce chapitre. Pour plus de détails sur les matériels et méthodes mis en œuvre dans cette étude, voir page 2 ainsi que les *Supplemental Informations* de l'article.

3.1 Histoire phylogénétique du gène *ATP9* dans le règne des Fungi

3.1.1 La répartition du gène *ATP9* chez les champignons

Les séquences des gènes *ATP9* de 26 espèces de champignons entièrement séquencés ont été récupérées par diverses méthodes de criblage de banques de données (liste des séquences dans le tableau III.3.3 page 208). Les noms des espèces considérées sont listés en table III.3.1 page 192. Parmi les espèces listées, 24 font partie des ascomycètes et basidiomycètes, deux phyla regroupant près de 98 % des espèces de champignons connues (James *et al.*, 2006; Hibbett *et al.*, 2007). La table présente également la localisation des isoformes des gènes *ATP9*. Mis à part les ascomycètes, les champignons possèdent uniquement une version mitochondriale de ce gène. La localisation du gène *ATP9* chez les ascomycètes montre une grande variabilité. Cinq combinaisons de localisations des différentes isoformes ont été identifiées :

- 1 gène mitochondrial + 0 gène nucléaire
- 1 gène mitochondrial + 1 gène nucléaire
- 1 gène mitochondrial + 2 gènes nucléaires
- 0 gène mitochondrial + 1 gène nucléaire
- 0 gène mitochondrial + 2 gènes nucléaires

Des alignements de séquences des protéines Atp9p de ces différents champignons sont présentés en figures III.3.1 page 194 (panneaux A et B). Ces alignements montrent une forte similarité entre la partie mature des différentes protéines Atp9p, quelle que soit la localisation génomique du gène. Les principales différences sont localisées en N ou C-terminal de la protéine. Toutefois, la préséquence d'adressage mitochondrial est très divergente et permet de distinguer deux groupes de gènes.

Le premier, qualifié de Pa*ATP9-5 (like)*, regroupe les protéines dont la préséquence et la partie mature sont homologues à celle de la protéine PaAtp9p-5 de *Podospora anserina*. De manière similaire, le second groupe distinctif regroupe les homologues de la protéine PaAtp9p-7 de *Podospora anserina*. Les gènes *ATP9* ce groupe sont nommés Pa*ATP9-7 (like)*.

Un dernier groupe de séquences, ne comprenant que la partie mature de la protéine, prend en compte l'ensemble des protéines Atp9p encodées au niveau mitochondrial (et ne possédant donc pas de MTS). Cet ensemble est composé de deux sous-groupes de séquences protéiques appartenant soit au phylum des ascomycètes filamenteux (Pezizomycotina), soit à celui des basidiomycètes, levures et champignons basals. Les gènes de ce groupe sont désignés par *ATP9mt*.

Nous avons utilisé ces alignements de séquences pour la construction d'arbres phylogénétiques, en utilisant les techniques d'inférence bayésienne, de maximum de parcimonie et de maximum de ressemblance. Les valeurs de contrôle de ces différents arbres sont relativement faibles du fait de la petite taille de la protéine. Cependant, les arbres issus de ces différentes méthodes de calcul présentent tous le même schéma général. Un arbre représentatif est montré en figure III.3.1 page 194 panneau C (des arbres additionnels sont disponibles en figure III.3.4 page 213 panneaux A à D). Les alignements de séquences et les arbres phylogénétiques sont cohérents avec l'hypothèse de deux relocalisations indépendantes du gène *ATP9* mitochondrial chez les ascomycètes filamenteux.

Ces paralogues seraient issus d'une double relocalisation d'un gène mitochondrial, au contraire des gènes *ATP9* chez les mammifères, issus d'une duplication de la séquence existante (De Grassi *et al.*, 2006). L'inclusion dans l'étude phylogénétique (figure III.3.4 page 213) des autres *ATP9* nucléaires connus (Funes *et al.*, 2002; De Grassi *et al.*, 2006) montre que ces événements de relocalisation ont été réalisés de manière indépendante entre les différents règnes des Fungi, métazoaires et plantes.

3.1.2 Scénario évolutif

Les répartitions des différentes espèces considérées au sein des sous-groupes est en accord avec la classification AFTOL (*Assembling the Fungal Tree Of Life*, McLaughlin *et al.* (2009)) et les études phylogénétiques basées sur 6 séquences différentes (James *et al.*, 2006). La présence des deux versions nucléaires des gènes PaATP9-5 (*like*) et PaATP9-7 (*like*) dans les Dothideomycètes (situés à la base des Pezizomycotina) et Sordariomycètes, deux groupes éloignés phylogénétiquement, indiquerait que les deux versions nucléaires étaient présentes chez l'ancêtre commun de l'ensemble des Pezizomycotina.

Ces données nous ont permis de dégager un scénario évolutif du gène *ATP9* chez les champignons (figure III.3.1 page 194 panneau D). Ce scénario impliquerait la relocalisation des gènes *ATP9* nucléaires chez l'ancêtre commun des Pezizomycotina, puis la perte de une ou deux versions de ce gène en fonction des différents groupes étudiés. Ces différentes pertes engendreraient les répartitions décrites précédemment. Par exemple, *Neurospora crassa* aurait perdu le gène PaATP9-7 (*like*), et le gène *ATP9mt* pour *Podospora anserina*.

Ce scénario évolutif est en corrélation avec la théorie exposée par Blanchard et Lynch (2000), à savoir que la version mitochondriale d'un gène en cours de relocalisation serait dans un premier temps conservée, puis perdue après que la version nucléaire soit adaptée à son nouvel environnement génétique. Par exemple, les Dothideomycètes et les Sordariales, ne possèdent plus de gène *ATP9* mitochondrial et ont un (Pleosporales) ou deux (Sordariales et Capnodiales) isoformes nucléaires. Les différentes répartitions montrent que différentes possibilités d'évolution de ces isoformes existent en plus de la perte de la version mitochondriale. Cette donnée indiquerait que la fonctionnalité de la version nucléaire ne serait pas la seule donnée à prendre en compte pour la conservation des différentes isoformes.

3.2 L'expression des isoformes nucléaires du gène *ATP9* est régulée au cours du cycle de vie de *Podospora anserina*

3.2.1 La délétion de chaque isoforme affecte des étapes différentes du cycle de vie de *Podospira anserina*

Une analyse quantitative des ESTs (*Expressed Sequence Tags* pour étiquette de séquence exprimée) a montré que le gène PaATP9-5 de *Podospira anserina* est exprimé de manière plus importante que le gène PaATP9-7 au cours de la germination de l'organisme (Espagne *et al.*, 2008) (figure III.3.2 page 196 panneau A). La délétion de ce gène a été réalisée dans une souche sauvage de *Podospira anserina* au préalable transformée avec une construction du gène PaATP9-5 sous contrôle de son promoteur natif (désignée par 5⁵). La copie nucléaire du gène a ensuite été remplacée par une cassette de résistance à la nourséothricine. La nouvelle souche $\Delta 5 + 5^5$ a ensuite été croisée avec une souche WT, et la génération F1 a été analysée. Les ascospores $\Delta 5$ ne portant pas la construction 5⁵ n'ont pas pu entrer en phase de germination. Ceci indique que la délétion du gène PaATP9-5 est létale pour *Podospira anserina*.

Le gène PaATP9-7 a été directement délété par une cassette de résistance à l'hygromycine dans la souche sauvage. La délétion n'est pas létale. Différents croisements ont ensuite été réalisés. Une souche mâle $\Delta 7$ a tout d'abord été croisée avec une souche femelle WT. Ce croisement n'a conféré aucun phénotype évident aux souches résultantes. Au contraire, les croisements d'une souche femelle $\Delta 7$ avec une souche mâle $\Delta 7$ ou WT ont conféré le même phénotype. La génération F1 a en effet produit des périthèces de taille hétérogène, avec un contenu désorganisé et pauvre en ascospores matures (figure III.3.2 panneau B page 196). Ceci indique un effet délétère maternel de la délétion du gène PaATP9-7 de *Podospira anserina*.

Les deux gènes *ATP9* de *Podospora anserina* ont donc des fonctions non redondantes ; *PaATP9-5* est un gène essentiel, et notamment en phase de germination, et *PaATP9-7* est important lors de la phase de reproduction de l'organisme.

3.2.2 L'expression des isoformes des gènes *PaATP9* est régulée au cours du cycle de vie de *Podospora anserina*

Les phénotypes obtenus avec la délétion de chaque gène *ATP9* ont amené les groupes de Annie SAINARD-CHANET et Sylvie HERMANN LE DENMAT à effectuer une analyse de l'expression de ces isoformes au cours du cycle de vie du champignon. Des expériences de RT-qPCR (*Retro-Transcription Quantitative PCR*, ou PCR quantitative par rétro-transcription) ont été réalisées sur des extraits cellulaires prélevés à différents moments du cycle de vie de *Podospora anserina*, indiqués sur le schéma III.3.2 page 196 panneau A. Chaque quantification des gènes *PaATP9* a été rapportée au gène contrôle *PaPDF2* encodant la sous-unité régulatrice A de la phosphatase PP2A, exprimé en continu de manière stable dans les cellules. Les résultats de ces quantifications sont représentés dans les graphiques III.3.3 panneaux A à D page 198. Je me concentrerai sur la description du graphique en panneau D.

Les gènes *PaATP9* sont régulés au niveau transcriptionnel au cours du cycle de vie de *Podospora anserina*. En début de phase de germination, la quantité de transcrits du gène *PaATP9-5* est largement supérieure à celle de *PaATP9-7* (10 à 100 000 fois supérieure). Cette situation évolue en fin de phase, où cet écart diminue, et l'expression du gène *PaATP9-5* diminue alors que celle de *PaATP9-7* augmente. En phase de croissance, la tendance suit celle de la phase précédente. La quantité de transcrit du gène *PaATP9-7* est supérieure à celle de *PaATP9-5*, bien que cette différence soit moins importante dans ce cas (d'environ 100 fois). En phase de reproduction sexuelle, l'expression de *PaATP9-5* remonte progressivement pour rejoindre celle du gène *PaATP9-7*.

Les phénotypes obtenus lors de la délétion de chacun des gènes sont en accord avec les mesures réalisées ici. Les transcrits sont abondants en phase de germination, et sont essentiels lors de son déclenchement. Les transcrits du gène *PaATP9-7* sont indispensables à la maturation des ascospores, et ceux-ci sont abondants lors de la reproduction sexuelle.

3.2.3 Les gènes *PaATP9-5* et *PaATP9-7* sont interchangeableables

Les différences d'expression entre les deux gènes, ainsi que le fait que les deux protéines matures partagent seulement 66 % d'identité entre elles, nous ont amené à émettre l'hypothèse que ces deux protéines pourraient ne pas être équivalentes au niveau fonctionnel. Nous avons alors interverti les séquences codantes des gènes *PaATP9*. Le tableau III.3.2 page III.3.2 résume les phénotypes obtenus en fonction des génotypes testés.

Le gène *PaATP9-5* a été mis sous contrôle des séquences 5' et 3' du gène *PaATP9-7* (gène 5^7), et a été utilisé dans la transformation d'une souche $\Delta 7$. La souche résultante avait la capacité de produire des spores. Inversement, le gène *PaATP9-7* mis sous contrôle des 5' et 3' UTR du gène *PaATP9-5* (gène 7^5) complémente la délétion $\Delta 5$, et permet l'initiation de la germination. De manière surprenante, l'expression du gène 7^5 dans un contexte $\Delta 7$ améliore la production d'ascospores, qui reste toutefois inférieure à celle de la souche WT. Des données de RT-PCR quantitative ont montré que l'expression de la construction 7^5 est approximativement doublée par rapport à celle du gène *PaATP9-5*. Ceci indiquerait qu'une légère augmentation de l'expression de l'un des deux gènes *ATP9* permettrait de compenser significativement ce défaut. Une dernière expérience réalisée a consisté à exprimer les deux gènes 7^5 et 5^7 dans un contexte $\Delta 5\Delta 7$. La souche obtenue n'a montré aucun défaut dans la germination ou la production d'ascospores, et a

présenté un phénotype sauvage. L'ensemble de ces données montre que les deux gènes Pa*ATP9* de *Podospora anserina* sont interchangeables.

3.3 La relocalisation du gène *ATP9* permettrait de moduler la production d'ATP synthases chez *Podospora anserina*

Les expériences décrites précédemment montrent que les gènes *ATP9* de *Podospora anserina* sont régulés au niveau de la transcription au cours du cycle de vie de ce champignon. D'autres données semblent indiquer que les autres gènes de structure de l'ATP synthase ne sont pas régulés au cours du cycle de vie, du moins au niveau de la transcription (Carole SELLEM du CENTRE DE GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE de Gif-sur-Yvette, communication personnelle). Ces données suggèrent que les gènes *ATP9* de *Podospora anserina* sont utilisés pour moduler la production de l'ATP synthase en fonction des besoins énergétiques. Lors de la germination la production d'ATP synthase doit être importante. Dans la phase de reproduction sexuée, lorsque les nutriments du milieu deviennent moins abondants (Espagne *et al.*, 2008), il n'est plus nécessaire de produire de grandes quantités d'ATP synthase et la sous-unité est alors exprimée à des niveaux beaucoup plus faibles. Une telle régulation apporte un bénéfice évident à l'organisme. J'aborderai plus en détail cette hypothèse dans la partie IV section IV page 255, dans laquelle je mentionnerai également les régulations du même type existantes chez les mammifères.

Article 2

Molecular Biology and Evolution, 2011, Jul ;28(7) :2063-75. Epub 2011 Jan 27.

*Two nuclear life cycle-regulated genes encode interchangeable subunits c of mitochondrial ATP synthase in *Podospora anserina*.*

Déquard-Chablat* M, Sellem* CH,
Golik P, Bidard F, Martos A, Bietenhader M, di Rago JP, Sainsard-Chanet A,
Hermann-Le Denmat S, Contamine V.

* ces auteurs ont contribué de manière égale

PMID : 21273631

Two Nuclear Life Cycle–Regulated Genes Encode Interchangeable Subunits *c* of Mitochondrial ATP Synthase in *Podospora anserina*

Michelle Déquard-Chablat,^{†,1,2} Carole H. Sellem,^{†,3} Pawel Golik,^{4,5} Frédérique Bidard,^{1,2} Alexandre Martos,⁶ Mailis Bietenhader,⁶ Jean-Paul di Rago,^{*,6} Annie Sainsard-Chanet,^{1,3} Sylvie Hermann-Le Denmat,^{*,1,2,7} and Véronique Contamine^{*,1,2}

¹Univ Paris-Sud, Orsay, France

²Institut de Génétique et Microbiologie (IGM), Centre National de la Recherche Scientifique, Orsay, France

³Centre National de la Recherche Scientifique, Centre de Génétique Moléculaire (CGM), Gif-sur-Yvette, France

⁴Faculty of Biology, Institute of Genetics and Biotechnology, University of Warsaw, Warsaw, Poland

⁵Institute of Biochemistry and Biophysics, Polish Academy of Sciences, Warsaw, Poland

⁶Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires (IBGC), Centre National de la Recherche Scientifique, Université Victor Segalen Bordeaux2, Bordeaux, France

⁷Ecole Normale Supérieure, Paris, France

[†]These authors contributed equally to this work.

*Corresponding author: E-mail: sylvie.hermann-ledenmat@igmors.u-psud.fr; veronique.contamine@igmors.u-psud.fr; JP.Dirago@ibgc.cnrs.fr.

Associate editor: Richard Thomas

Abstract

An F₁F₀ ATP synthase in the inner mitochondrial membrane catalyzes the late steps of ATP production via the process of oxidative phosphorylation. A small protein subunit (subunit *c* or ATP9) of this enzyme shows a substantial genetic diversity, and its gene can be found in both the mitochondrion and/or nucleus. In a representative set of 26 species of fungi for which the genomes have been entirely sequenced, we found five *Atp9* gene repartitions. The phylogenetic distribution of nuclear and mitochondrial *Atp9* genes suggests that their evolution has included two independent transfers to the nucleus followed by several independent episodes of the loss of the mitochondrial and/or nuclear gene. Interestingly, we found that in *Podospora anserina*, subunit *c* is exclusively produced from two nuclear genes (*PaAtp9-5* and *PaAtp9-7*), which display different expression profiles through the life cycle of the fungus. The *PaAtp9-5* gene is specifically and strongly expressed in germinating ascospores, whereas *PaAtp9-7* is mostly transcribed during sexual reproduction. Consistent with these observations, deletion of *PaAtp9-5* is lethal, whereas *PaAtp9-7* deletion strongly impairs ascospore production. The *P. anserina* *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* genes are therefore nonredundant. By swapping the 5' and 3' flanking regions between genes we demonstrated, however, that the *PaAtp9* coding sequences are functionally interchangeable. These findings show that after transfer to the nucleus, the subunit *c* gene in *Podospora* became a key target for the modulation of cellular energy metabolism according to the requirements of the life cycle.

Key words: ATP synthase, mitochondria, subunit *c*, transcriptional regulation, gene partition, *Podospora anserina*.

Introduction

An F₁F₀ type ATP synthase catalyzes the final step of oxidative phosphorylation in mitochondria. This ATP synthase is composed of a hydrophobic F₀ subcomplex located in the inner mitochondrial membrane and involved in proton translocation, and a hydrophilic F₁ subcomplex that catalyzes ATP synthesis in the matrix space (Devenish et al. 2008; for review). The F₁ contains five subunits in a 3 α /3 β /1 γ /1 δ /1 ϵ stoichiometry. The F₀ consists of several copies of subunit *c* (ten copies in yeast *Saccharomyces cerevisiae*; Stock et al. 1999) arranged in a ring, and one copy of each of subunits *a*, *b*, *d*, F6, and OSCP (Rak et al. 2009; for review). Subunits *b*, *d*, F6, and OSCP form the “peripheral stalk” that lies to one side of the complex connecting the

F₀ and the F₁ subcomplexes. The ATP synthase utilizes energy from the proton gradient established across the inner membrane during the transfer of electrons to oxygen by the respiratory complexes. The flow of protons through F₀ induces the rotation of the subunit *c* ring and the $\gamma/\delta/\epsilon$ subcomplex (or “central stalk”) of F₁. This rotation leads to conformational changes to the catalytic sites in F₁ so as to favor the synthesis of ATP and its release into the mitochondrial matrix. Finally, additional subunits associated with F₀ (*e*, *f*, *g*, and A6L in human) contribute to complex assembly and/or oligomerization (Devenish et al. 2008).

Some of the genes encoding the mitochondrial ATP synthase are nuclear and some are mitochondrial (mt), except in a few organisms such as the green algae *Chlamydomonas*

© The Author 2011. Published by Oxford University Press on behalf of the Society for Molecular Biology and Evolution. All rights reserved. For permissions, please e-mail: journals.permissions@oup.com

Mol. Biol. Evol. 28(7):2063–2075. 2011 doi:10.1093/molbev/msr025 Advance Access publication January 27, 2011 2063

reinhardtii (Funes et al. 2002) and some parasite species (reviewed in Feagin 2000), where all the genes are nuclear. Mitochondrial genomes encode only a limited number of ATP synthase subunits, usually subunit *a* or 6 (*Atp6* gene), subunit A6L (*Atp8* gene), and subunit *c* or 9 (*Atp9* gene). In some plants, subunits α (*Atp1* gene) and *b* (*Atp4* gene) are also encoded by the mt genome. In many early-branching animals, *Atp9* is absent from mt genomes, although it is still present in mt genomes in demosponges except for *Amphimedon queenslandica*, for which there is evidence of a recent transposon-mediated transfer to the nuclear genome (Erpenbeck et al. 2007). The absence of the *Atp8* gene from the mt genome of the placozoan *Trichoplax adhaerens* and that of the copepod *Paracyclops nana* was also recently reported (Signorovitch et al. 2007; Ki et al. 2009). In ciliates, only the *Atp9* gene has been identified in the mt genome (de Graaf et al. 2009) and in trypanosomatids, for example, *Trypanosoma brucei*, only the *Atp6* gene is mitochondrial (Feagin 2000). In fungi, subunit *c* is usually mitochondrially encoded, but it can also be encoded by both the nuclear and the mt genomes as in Ascomycota *Neurospora crassa* (van den Boogaart et al. 1982), *Aspergillus nidulans* (Brown et al. 1985), and *Fusarium oxysporum* (reviewed in Lavin et al. 2008). In animals, the *Atp9* gene is nuclear and is absent from the mt genome (Anderson et al. 1981; De Grassi et al. 2006).

In the human genome, *Atp9* is represented by a family of three nuclear genes encoding isoforms of subunit *c* (P1, P2, and P3). All three share an identical mature sequence of 76 amino acids, but have different mitochondrial-targeting sequences (MTSs) (Dyer and Walker 1993; De Grassi et al. 2006). The P3 isoform has been found in all vertebrates analyzed, whereas P2 is common to all mammals and P1 common to all mammals and Aves (De Grassi et al. 2006). Only one of these three isoforms, P1, is known to be actively regulated in mammals, and responds to cold acclimation (Houštěk et al. 1995; Andersson et al. 1997; Kramarova et al. 2008). Physiological regulation of *Atp9* gene expression has been also reported in the fungus *N. crassa*. The nuclear gene is constitutively expressed during vegetative growth, and transcripts of the mt gene are only detectable, and accumulate, during conidia germination (van den Boogaart et al. 1982; Bittner-Eddy et al. 1994).

Here, we report the highly regulated expression of the two *Atp9* genes identified in the nuclear genome of the filamentous fungus *Podospora anserina* (Ridder et al. 1991; Espagne et al. 2008; this study). The expression patterns of the two *Atp9* genes differ substantially during the fungus life cycle. The temporal expression patterns correspond to the developmental defects associated with deletion of the genes. The polypeptides encoded display only 44% identity, but we show that they are functionally interchangeable subunits *c* of the *P. anserina* mitochondrial ATP synthase. We also reveal that the complex diversity of *Atp9* gene distribution between mt and nuclear genomes in fungi is indicative of active gene transfer from the mitochondria to the nucleus for a gene en-

coding a highly hydrophobic polypeptide essential for ATP synthase activity.

Materials and Methods

DNA and Protein Sequences

The amino acid sequences of fungal ATP9 polypeptides were retrieved from various databases (see [supplementary table S1, Supplementary Material](#) online) using the following procedures. We first performed BlastP searches using the sequences of the *P. anserina* and *S. cerevisiae* proteins. If this failed to detect a homologous protein, we then performed TblastN searches at the NCBI Web site (whole-genome shotgun reads database wgs), the PEDANT3 Web site and the Broad Institute (individual genomes at <http://www.broad.mit.edu/science/data#>). Database annotation was manually modified for four retrieved sequences to correct the length and position of intronic regions ([supplementary materials and methods](#) and [supplementary table S1, Supplementary Material](#) online).

Phylogenetic Analysis

Atp9 protein sequences were aligned using MUSCLE 3.7 (Edgar 2004). To estimate phylogenetic relationships, the protein sequences were analyzed using the maximum likelihood (ML), maximum parsimony (MP), and Bayesian inference (BI) methods. For ML analysis, the PhyML program run from the SeaView interface was used (Guindon and Gascuel 2003; Gouy et al. 2010). The number of invariable sites and across site rate variation was optimized. Reliability of nodes was assessed by 1,000 bootstrap replicates. For MP analysis, PAUP* (Swofford 2003) version 4.0b10 was used, with 1,000 bootstrap replicates to assess the reliability of nodes. BI analysis was performed using MrBayes version 3.1.2 (Ronquist and Huelsenbeck 2003). Trees were visualized using Dendroscope (Huson et al. 2007).

P. anserina Strains, Growth Conditions, and Transformation

Strains used in this study were all derived from the S wild-type strain (Rizet 1952) to ensure a homogenous genetic background. For homologous recombination, we used the phleomycin-resistant strain $\Delta PaKu70$ (El-Khoury et al. 2008). Details concerning standard culture conditions, media, protoplast formation, protoplast transformation, and genetic methods are available at <http://podospora.igmors.u-psud.fr>. The standard growth medium and ascospore germination medium used were M2 and G, respectively. Agar plates were used to collect projected ascospores. When necessary, hygromycin (Euromedex, Souffelweyersheim, France), nourseothricin (Werner Bio-Agents, Jena, Germany) or phleomycin (Euromedex, Souffelweyersheim, France) were added to the protoplast regeneration medium at a concentration of 100, 50, and 10 $\mu\text{g/ml}$, respectively.

Deletions of the *PaAtp9-5* (*A5*) and *PaAtp9-7* (*A7*) Genes

Deletions of the *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* genes were performed by gene replacement with a nourseothricin-resistance and a hygromycin-resistance cassette, respectively. As inactivation of the *PaAtp9-5* gene may be lethal, prior deletion of the *PaAtp9-5* gene, we constructed a wild-type strain containing an ectopic copy of the gene (hereafter the 5⁵ transgene). Polymerase chain reaction (PCR) amplification, cloning steps, and strain construction are described in [supplementary materials and methods](#), and all primers used are listed in [supplementary table S2 \(Supplementary Material online\)](#).

Construction of Chimeric 7⁵ and 5⁷ Transgenes

Chimeric 7⁵ and 5⁷ fragments were obtained by fusion-PCR amplification to produce a *PaAtp9-7* coding sequence (CDS) flanked by 5' (585 bp) and 3' (739 bp) regions of *PaAtp9-5* (7⁵ transgene) and a *PaAtp9-5* CDS flanked by 5' (1,456 bp) and 3' (1,403 bp) regions of *PaAtp9-7* (5⁷ transgene). PCR amplification steps and strain construction are described in [supplementary materials and methods \(Supplementary Material online\)](#).

Analyses of *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* Gene Expression by Real-Time Quantitative PCR

The expression level of the two *PaAtp9* genes was determined along the life cycle of the wild-type strain grown at 27 °C ([fig. 2A](#)). At least three biological replicates were done for each point of gene expression analysis. Samples were collected as described below and stored at –80 °C until total RNA extraction. Ejected mature ascospores (G0) were recovered on agar plates for 5 days. For the G8 and G16 samples (the germination stage), ascospores were first retrieved on agar plates covered with cellophane layers, which were then transferred to G medium to promote initiation of germination; samples were collected after 8 and 16 h. For the G24 and G48 samples, ascospores were recovered directly from G medium covered with cellophane layers and mycelium was collected from germinating ascospores after growth for 24 and 48 h, respectively. For growth stage kinetics, mycelium from 48-h culture on M2 was minced in liquid M2 medium and 150 µl of the suspension was laid on Petri dishes containing M2 medium. After growth for 4 days, bands (0.6 mm) of mycelium were scraped from the apical growing zone (A; see [fig. 2A](#)) and from more mature zones (B, C, and D areas corresponding to approximately 2-, 3-, and 4-day-old mycelium, respectively; [fig. 2A](#)). Preparation of samples during sexual reproduction will be fully detailed elsewhere (Bidard F, Imbeaud S, Ichanté JL, Mucchielli MH, Debuchy R, Berteaux-Lecellier V, in preparation). Briefly, a female of mating type mat– and a male mat+ were crossed on M2 Petri dish covered with sterile cheesecloth (nylon cloth). Plates were exposed to light to promote perithecia development. Developing perithecia were then collected by scraping at the indicated times after fertilization ([fig. 2A](#)). R0 corresponds to myce-

lium after 96 h of growth in M2 under light and just before fertilization.

All samples (40–80 mg of ascospores or mycelium) were frozen in liquid nitrogen and ground for 1 min at 2,600 revolutions per minute using a Mikro-Dismembrator (Sartorius Stedim France, Aubagne, France). Total RNA was isolated using the RNeasy Plant Mini Kit (Qiagen) according to the manufacturer's protocol that includes a DNase I treatment. RNA integrity was checked by measuring optical density and agarose gel electrophoresis. Complementary DNA was synthesized from 2 µg of total RNA using the SuperScript III First Strand kit (Invitrogen, Cergy Pontoise, France) and oligo (dT)₂₀ primer. Real-time PCR measurements were determined using a LightCycler 2.0 system (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Germany) and the LightCycler FastStart DNA Master^{Plus} SYBR Green I kit. Experimental conditions of real-time amplification reaction including normalization are described in [supplementary materials and methods \(Supplementary Material online\)](#).

Results

Distribution of *Atp9* Gene in Nuclear and Mitochondrial Genomes of Fungi

The mt genome of the filamentous fungus *P. anserina* lacks an *Atp9* CDS (Cummings et al. 1990), but a nuclear gene coding for the subunit *c* of mitochondrial ATP synthase was identified several years ago (Ridder et al. 1991). The genome sequence of *P. anserina* was recently reported (Espagne et al. 2008) and surprisingly contains a second nuclear gene encoding a polypeptide homologous to the subunit *c* of ATP synthase. The two coding sequences (formally Pa_5_9140 and Pa_7_20 and hereafter referred to as *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7*) are on chromosomes 5 and 7 and both contain two introns. *PaAtp9-5* codes for a polypeptide of 144 amino acids and *PaAtp9-7*, for a polypeptide of 147 amino acids, with 44% overall sequence identity between the two. The identity is 66% in the putative mature part of the protein.

Identification of two *Atp9* genes in the nuclear genome of *P. anserina* prompted us to look for *Atp9* genes in different species representative of fungi. We selected 26 species for which both complete nuclear and complete mt genome sequences were available ([table 1; supplementary table S1, Supplementary Material online](#)). We also included the Dothideomycetes *Pyrenophora tritici-repentis* and the Sordariomycetes *Chaetomium globosum* and *Magnaporthe grisea* for which supercontigs of mt genomes were considered. Most of the 26 species are members of the phyla Ascomycota and Basidiomycota that include most (98%) described fungal species (James et al. 2006; Hibbett et al. 2007). In Basidiomycota, Zygomycota, and Chytridiomycota, there is a single *Atp9* gene, in all cases in the mt genome. The *Atp9* gene location and copy number in Ascomycota are highly diverse ([table 1](#)). In Saccharomycotina and Taphrinomycotina, there is only a single *Atp9* gene in the mt genome. In Pezizomycotina, containing the vast majority

Table 1. Distribution of the *Atp9* Gene in Nuclear and Mitochondrial Genomes in Fungi.

Species	Name Abbreviation	Nuclear Genome	Mitochondrial Genome
Ascomycota			
Pezizomycotina			
Eurotiomycetes			
Eurotiales			
<i>Aspergillus nidulans</i>	ASPNI	1 ^a	+
<i>Penicillium marneffeii</i>	PENMA	1 ^a	+
Onygenales			
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	PARBR	—	+
<i>Trichophyton rubrum</i>	TRIRU	—	+
Sordariomycetes			
Hypocreales			
<i>Fusarium graminearum</i>	FUSGR	1 ^a	+
Sordariales			
<i>Neurospora crassa</i>	NEUCR	1 ^a	+
<i>Sordaria macrospora</i>	SORMA	1 ^a	+
<i>Podospora anserina</i>	PODAN	2	—
<i>Chaetomium globosum</i>	CHAGL	2 ^b	— ^c
<i>Magnaporthe grisea</i>	MAGGR	2	— ^c
Dothideomycetes			
Capnodiales			
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	MYCGR	2	+
Pleosporales			
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	PYRTR	1 ^d	— ^c
<i>Stagonospora nodorum</i>	STANO	1 ^d	—
Saccharomycotina			
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	SACCE	—	+
<i>Candida glabrata</i>	CANGL	—	+
<i>Ashbya gossypii</i>	ASHGO	—	+
<i>Kluyveromyces lactis</i>	KLULA	—	+
<i>Candida albicans</i>	CANAL	—	+
<i>Yarrowia lipolytica</i>	YARLI	—	+
Taphrinomycotina			
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	SCHPO	—	+
Basidiomycota			
Agaricomycotina			
<i>Pleurotus ostreatus</i>	PLEOS	—	+
<i>Schizophyllum commune</i>	SCHCO	—	+
<i>Cryptococcus neoformans</i>	CRYNE	—	+
Ustilagomycotina			
<i>Ustilago maydis</i>	USTMA	—	+
Zygomycota			
<i>Rhizopus oryzae</i>	RHIOR	—	+
Chytridiomycota			
<i>Allomyces macrogynus</i>	ALLMA	—	+

NOTE.—+, presence; —, absence of an *Atp9* gene in the corresponding genome. Numbers indicate the copy number of the *Atp9* gene in the nuclear genome.

^a Nuclear genes encoding PaATP9-5-like polypeptides (see fig. 1 and text for details).

^b In this case, sequences of amplified cDNA fragments were checked (supplementary materials and methods).

^c TblastN analyses of supercontigs of the mitochondrial genome failed to reveal any *Atp9mt* open reading frame.

^d Nuclear genes encoding PaATP9-7-like polypeptides (see fig. 1 and text for details).

of filamentous fruit body-producing species including *P. anserina*, the *Atp9* gene is differently distributed between the nuclear and mt genome in different species, and the copy number is between 1 and 3 (table 1 and fig. 1D) with five different *Atp9* gene distributions: 1) a single gene in the mt genome (Onygenales); 2) a single gene in the nuclear genome (Pleosporales); 3) one copy in each of the mt and nuclear genomes (Eurotiales, Hypocreales, and Sordariales, *N. crassa*, and *Sordaria macrospora*); 4) two copies in the nuclear genome (Sordariales, *P. anserina*, *Cha. globosum*, and *M. grisea*); and 5) two copies in the nuclear genome and one in the mt genome (Capnodiales, *Mycosphaerella graminicola*). This diversity is indicative

of an active process of *Atp9* gene transfer from the mitochondria to the nucleus during the evolution of filamentous fungi, probably near the root of the Pezizomycotina subphylum, followed by gene loss in some lineages (see fig. 1D and Discussion).

Alignments of the putative mature part of the 36 proteins and alignments of the putative MTSs of the 15 proteins encoded in the nucleus are shown separately in figure 1A and B. The mature part of each nuclearly encoded protein was considered to be the sequence that aligned with the complete sequence of mitochondrially encoded polypeptides. The alignments are available in Supplementary Material online.

Phylogenetic trees were inferred from mature protein sequences using BI, ML, and MP as described in Materials and Methods and [supplementary materials and methods](#) ([Supplementary Material](#) online). All the methods yielded an essentially identical topology, although support values were variable and generally low. It should, however, be remembered that the *Atp9* sequences are relatively short and conservative, and even when much longer and more informative sequences offering a comprehensive sampling of fungal taxonomy are used, many of the deeper nodes of the fungal tree of life do not receive significant statistical support (James et al. 2006). The fact that different phylogenetic methods lead to the same conclusions gives the present study additional credibility. A representative tree obtained using BI is shown in [figure 1C](#), and the ML and MP trees are shown in [supplementary figure S1A](#) and [S1B](#) ([Supplementary Material](#) online), respectively. Inclusion of the MTS sequence in the analysis also resulted in a very similar topology (BI tree in [supplementary fig. S1C](#), [Supplementary Material](#) online).

The alignment and the phylogenetic tree reveal that all sequences deduced from the nuclear *Atp9* genes fall into two distinct subgroups, and these two groups correspond to *P. anserina* ATP9-5 and ATP9-7 homologs ([fig. 1C](#)). These subgroups branch off deep in the tree and are close to another group consisting of the mitochondrial *Atp9* sequences from Pezizomycotina, whereas the mitochondrial *Atp9* sequences of Saccharomycotina, Taphrinomycotina, Basidiomycota, and basal fungi (Zygomycota and Chytridiomycota) form a separate clade. Such tree topology, together with obvious differences in MTS sequences, strongly suggest that the nuclear *Atp9-5* and *Atp9-7*-like genes were independently acquired by separate events of transfer from the mitochondrial to the nuclear genome. The position of relevant groups in the tree and the distribution of these genes in distantly related members of Pezizomycotina strongly suggest that these two gene transfer events occurred very early in the evolution of filamentous fungi, before the divergence of the lineages leading to Eurotiomycetes, Sordariomycetes, and Dothideomycetes.

Phylogenetic relationships between the *Atp9* sequences within each of the major groups (nuclear *Atp9-5* like, nuclear *Atp9-7* like, Pezizomycotina mitochondrial *Atp9*, non-Pezizomycotina mitochondrial *Atp9*; [fig. 1C](#)) are generally consistent with the established Assembling the Fungal Tree Of Life (AFTOL) classification of fungi (McLaughlin et al. 2009) and the phylogeny based on six gene sequences (James et al. 2006).

Divergences between the ATP9-5-like and ATP9-7-like mature sequences were mainly at the C and N terminal ends but there were also differences concerning residues in the transmembrane domains (TMHs; [fig. 1A](#)). The putative MTS of the ATP9-5 and ATP9-7 homologs are very different ([fig. 1B](#)). Also, the MTS of ATP9-5 homologs (including the functionally characterized MTS of *N. crassa*; Schmidt et al. 1984) are well conserved in sequence and length, whereas those of ATP9-7 homologs are more divergent. The differences between the MTS of the two groups

are consistent with two independent events of gene transfer from the mitochondria to the nucleus rather than nuclear gene duplication ([fig. 1D](#) and Discussion).

For species with two copies of the *Atp9* gene in the nuclear genome, one was *Atp9-5* type and one *Atp9-7* type ([fig. 1A–C](#)). For species with a single copy in the nuclear genome, it was either the *Atp9-5* type (*N. crassa*, *So. macrospora*, *F. graminearum*, *A. nidulans*, and *Penicillium marneffei*) or the *Atp9-7* type (*Pyr. tritici-repentis* and *Stagonospora nodorum*): all the species with only the *Atp9-5* type gene contain a mitochondrial *Atp9* gene, whereas those with the *Atp9-7* type gene do not ([table 1](#) and [fig. 1D](#)).

The presence of *Atp9-5* and *Atp9-7* homologs in both Sordariomycetes and Dothideomycetes, which are placed on distant parts of the Pezizomycotina tree (James et al. 2006; McLaughlin et al. 2009) strongly suggests that they were already present in the early ancestral filamentous fungi. The observed distribution of these sequences in modern genomes can be explained by independent gene loss events in different lineages ([fig. 1D](#)).

Nuclear-encoded subunit *c* proteins are also found outside fungi, for example, in *C. reinhardtii* (Funes et al. 2002) and in human (Dyer and Walker 1993; De Grassi et al. 2006). In order to determine their relationship to the ATP9-5 and ATP9-7-like polypeptides of Pezizomycotina, we included them in the phylogenetic analyses ([supplementary fig. S1D](#), [Supplementary Material](#) online for the BI tree). The sequences from *C. reinhardtii* (CHLREIN-ATP9A and CHLREIN-ATP9B) and *Homo sapiens* (ATP5G1, ATP5G2, and ATP5G3, for isogenes P1, P2, and P3, respectively) were classified in the branch containing the mtDNA-encoded polypeptides from nonfilamentous fungi, which strongly suggests that the events that led to the transfer of the respective genes to the nuclear genomes were separate from those that occurred in Pezizomycotina.

PaAtp9-5 Deletion is Lethal, Whereas *PaAtp9-7* Deletion Specifically Affects Ascospore Production

To study the functions of the *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* genes, we generated single deletions of each gene (hereafter $\Delta 5$ and $\Delta 7$) as follows and analyzed the phenotypic effects on *P. anserina* life cycle ([fig. 2A](#)). Expressed sequence tag (EST) analysis found that in the wild-type strain, *PaAtp9-5* were more abundant than *PaAtp9-7* EST during ascospore germination, which is critical to trigger *P. anserina* life cycle (Espagne et al. 2008; Debuchy R, personal communication). Therefore, inactivation of the *PaAtp9-5* gene may be deleterious. As a consequence, before constructing a *PaAtp9-5* deletion, we introduced into the genome of the wild-type strain a 5⁵ transgene that encompasses the *PaAtp9-5* CDS with 5' (585 bp) and 3' (739 bp) flanking regions. The *PaAtp9-5* CDS in the recipient *PaAtp9-5* 5⁵ transgenic strain was then replaced with a nourseothricin-resistance cassette to obtain a $\Delta 5$ 5⁵ strain. This was then crossed with the wild-type strain to segregate the 5⁵ transgene, and the progeny was analyzed. Ascospores of the $\Delta 5$ that did not express the transgene were smaller than wild-type and $\Delta 5$ 5⁵ ascospores;

they were also less pigmented and unable to initiate the germination stage, which triggers *P. anserina* life cycle. Thus, deletion of *PaAtp9-5* confers a lethal phenotype that cannot be complemented by *PaAtp9-7*.

The $\Delta 7$ strain was obtained directly by the replacement of the *PaAtp9-7* CDS in the wild-type strain with a hygromycin-resistance cassette. This manipulation revealed that unlike *PaAtp9-5*, *PaAtp9-7* is not an essential gene. The sexual reproduction of the $\Delta 7$ strain was then characterized. We compared the $\Delta 7$ homozygous cross and the two reciprocal heterozygous crosses (i.e., female $\Delta 7$ fertilized by wild-type male gametes and wild-type female fertilized by $\Delta 7$ male gametes). The heterozygous cross of a wild-type female with a $\Delta 7$ male resulted in no evident defect. The reciprocal heterozygous cross and the homozygous $\Delta 7$ cross both gave similar defects: the perithecia differentiated from $\Delta 7$ female organs were heterogeneous in size, unlike wild-type perithecia (fig. 2B). Microscopic observations revealed disorganization of the content of $\Delta 7$ perithecia associated with a substantial deficit in ascospore formation. Indeed, very few, or even no, mature ascospores were produced (fig. 2B). The rare wild-type or $\Delta 7$ mature ascospores formed in the $\Delta 7$ perithecia (developed from heterozygous cross) were, however, normally pigmented and able to initiate the germination stage (data not shown). Thus, the $\Delta 7$ ascospores issued from the three crosses displayed no defects during germination or subsequent growth (growth stage).

In conclusion, the absence of the *PaAtp9-7* gene from male gametes does not affect sexual reproduction, although its absence from female gametes is deleterious. *PaAtp9-7* deletion thus has a maternal effect. Also, the *PaAtp9-7* gene is necessary for efficient formation and production of ascospores but is inessential for germination. The *P. anserina* *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* genes are clearly nonredundant: *PaAtp9-5* is essential to trigger ascospore germination and *PaAtp9-7* is important for sexual reproduction.

Expression of *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* Genes along *P. anserina* Life Cycle

We analyzed the expression of the *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* genes by real-time quantitative PCR (RT-qPCR) experiments with total RNA extracted at different stages of the fungus life cycle (fig. 2A). RT-qPCR results (fig. 3) are reported as values for each *PaAtp9* gene normalized

to that for the reference gene *PaPDF2*, which encodes protein phosphatase PP2A regulatory subunit A and is stably expressed (supplementary materials and methods, Supplementary Material online, for details).

In nongerminated ascospores (G0), *PaAtp9-5* mRNA was thousand times more abundant than *PaAtp9-7* mRNA (fig. 3A). During the germination process, which occurs on specific G medium, the *PaAtp9-5* gene was strongly expressed, whereas *PaAtp9-7* transcripts were barely detectable. A peak of *PaAtp9-5* expression was observed during the initiation of ascospore germination (times 8 and 16 h; G8 and G16). At these times, *PaAtp9-7* expression was at its lowest level. Thereafter (times 24 and 48 h; G24 and G48), the amount of *PaAtp9-5* mRNA decreased, whereas that of *PaAtp9-7* mRNA increased such that, after 48 h of germination *PaAtp9-5* transcripts were only 20-fold more abundant than *PaAtp9-7* transcripts (legend for fig. 3). The pattern of *PaAtp9-5* expression was consistent with the failure of $\Delta 5$ ascospores to initiate germination. Reciprocally, the very low abundance of *PaAtp9-7* transcripts during germination is fully consistent with $\Delta 7$ ascospores not displaying any germination defect.

Mycelium arising from 48-h germinating ascospore (G48) was used to inoculate M2 medium and grown for 4 days. Expression of the two genes was studied in four different regions of the mycelium: the actively growing zone (fig. 3B, zone A) and three quiescent areas corresponding to about 2-, 3-, and 4-day-old mycelium (zones B, C, and D, respectively; see also fig. 2A). Overall, the abundance of *PaAtp9* transcripts was higher in the actively growing zone than other samples, and *PaAtp9-7* transcripts are more abundant than *PaAtp9-5* transcripts. The $\Delta 7$ deletion strain did not display any abnormalities of mycelium growth during the corresponding stage. It appears that *PaAtp9-5* transcripts, despite their low abundance, are sufficient to ensure mycelium growth.

We studied *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* gene expression in perithecia collected at various times after fertilization (see Materials and Methods). The samples analyzed correspond to: the time of fertilization (R0), the first developmental steps of fertilized female organs (R12), the formation and maturation of asci (R24 and R48), and the formation and maturation of ascospores (R72 and R96). At fertilization (R0), *PaAtp9-7* mRNA was almost 40-fold more abundant than *PaAtp9-5* mRNA (fig. 3C). During sexual reproduction, *PaAtp9-7* mRNA remained more abundant, except when

←
nomenclature is as follows: ATP9A for PaATP9-5-like polypeptide, ATP9B for PaATP9-7-like polypeptide. If only one nuclear gene is present in the fungus, the nomenclature is ATP9. Protein sequences were aligned using MUSCLE 3.7 and manually adjusted. Dotted arrows indicate the position of the TMH. (B) Alignments of the N-terminal parts (putative MTS) of ATP9 proteins encoded by nuclear genes. Putative MTS of ATP9-5 and ATP9-7 homologs were aligned separately. The small vertical arrow indicates the proteolytic cleavage site determined experimentally for the *N. crassa* ATP9 nuclear encoded protein (NEUCR-ATP9). (C) Phylogenetic tree constructed for the alignment in (A) using the BI method (see Materials and Methods). Numbers next to selected nodes correspond to Bayesian posterior probabilities. (D) Evolutionary model for the origin of the *Atp9* genetic diversity in the Pezizomycotina subphylum. The topology of the tree, which is drawn according to the six-gene phylogenetic fungal tree of life (James et al. 2006), is schematic and the branch lengths are not meaningful. ATP9mt denotes a mitochondrially encoded *Atp9* sequence, ATP9-5 and ATP9-7 denote homologs of PaATP9-5 and PaATP9-7, respectively. See text for details.

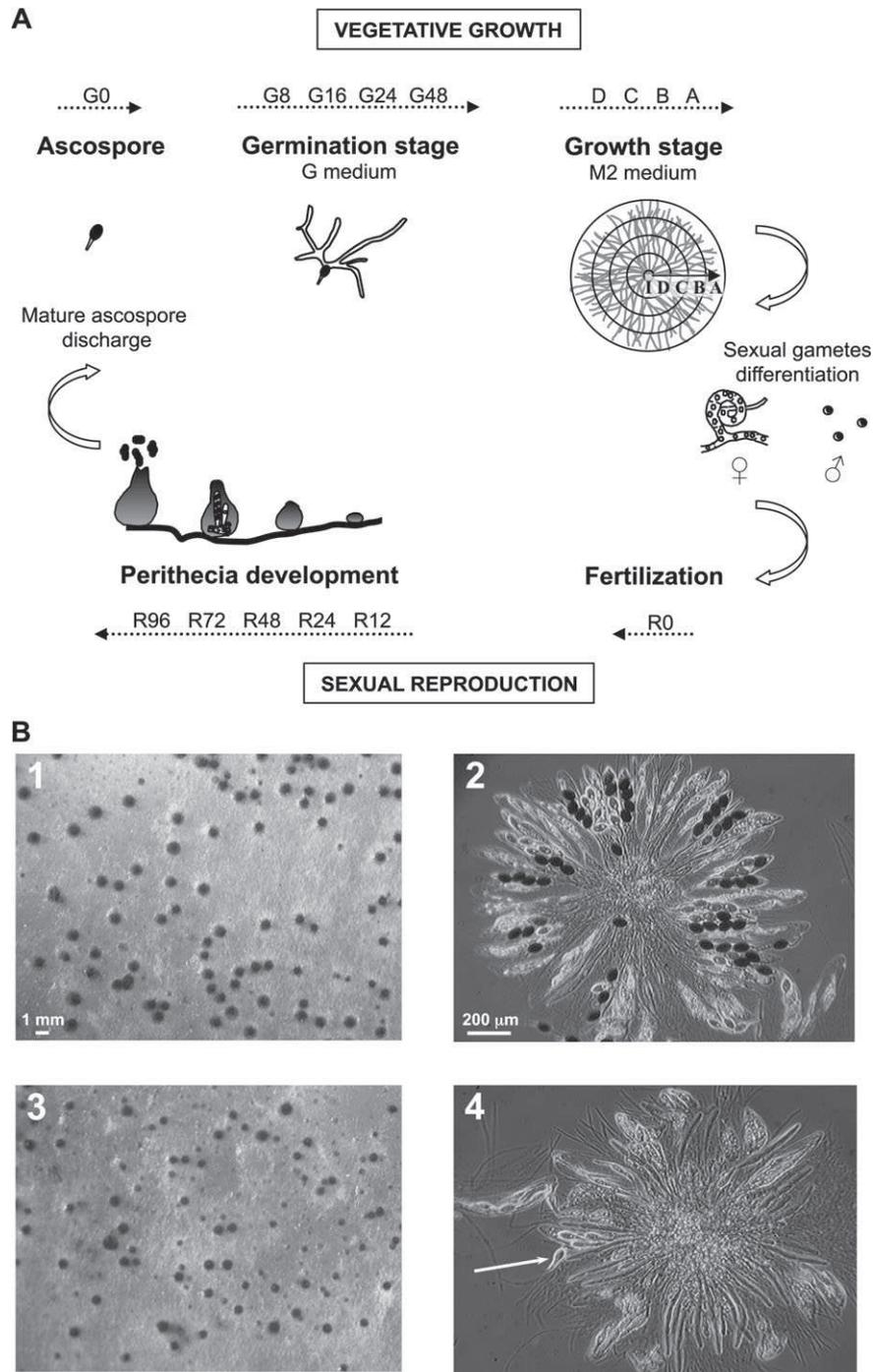


Fig. 2. Schematic representation of *Podospora anserina* life cycle and perithecia developed from wild-type or $\Delta 7$ female organs. (A) The *P. anserina* life cycle includes two phases: vegetative growth and sexual reproduction. The ascospore germination process (germination stage) is a critical step initiating growth to yield a mycelium, which is composed of a complex network of interconnected cells. After 48 h of germination on G medium (G48), small pieces of mycelium were transferred to M2 medium to continue the life cycle (growth stage). In standard culture conditions, the fungus displays a linear growth rate of 0.7 cm per day. On the schematic view of fungus growth in an M2 Petri dish, the arrow indicates the direction of mycelium extension; I, inoculation area; A, apical growing zone; B, C, and D, mature zones (Materials and Methods). During the growth stage, female (large ascogonia) and male (small conidia) gametes both differentiated from the same mycelium. However, fertilization occurs only between gametes of opposite mating type so that a strain can be either used as a female or a male. After fertilization, the female organs develop into fruiting bodies (perithecia, see [B]), which are the sites of caryogamy, meiosis, and asci and ascospore formation. After 96 h of fertilization, mature ascospores begin to be ejected from mature perithecia: this is the completion of one cycle. Times points chosen for RT-qPCR analyses (fig. 3) are indicated along the life cycle (G0, G8–G48; D, C, B, A; R0, R12–R96). Numberings correspond to time in hours. The scheme is not to scale. (B) Optical and microscopic views of perithecia resulting from wild-type (views 1 and 2) or $\Delta 7$ (views 3 and 4) homozygote crosses. Pigmented structures on views 1 and 3 are representative of perithecia developed from mycelium from wild-type or $\Delta 7$ female organs 96 h after fertilization, respectively. Views 2 and 4: rosettes of asci representative of the content of wild-type or $\Delta 7$ mature perithecium, respectively. Perithecia were collected 96 h after fertilization and examined under the microscope. Wild-type fruiting bodies

mature ascospores began to be ejected (fig. 3C; R96) and the two *PaAtp9* genes were similarly strongly expressed. The increase in *PaAtp9-5* transcript abundance was between 24 and 48 h after fertilization and continued until 96 h. This is fully consistent with the accumulation of *PaAtp9-5* transcripts in mature ascospores (fig. 3A; G0). The stronger expression of *PaAtp9-7* during sexual reproduction agrees with the failure of the $\Delta 7$ strain to produce ascospores.

The expression patterns of the *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* genes differed through the *P. anserina* life cycle (fig. 3D). *PaAtp9-5* mRNA was abundant during germination but less so during growth and sexual reproduction. By contrast, *PaAtp9-7* transcripts were nearly undetectable during germination but prominent during growth and sexual reproduction. *PaAtp9* transcripts were most abundant during ascospore germination (germination stage), which is critical to trigger *P. anserina* life cycle.

The *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* Genes Encode Functionally Interchangeable Polypeptides

The putative mature sequences of the PaATP9-5 and PaATP9-7 polypeptides share only 66% identity. It is therefore possible that *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* do not encode equivalent subunits *c* of the mitochondrial ATP synthase. We constructed two chimeric transgenes: *PaAtp9-7* CDS flanked by 5' (585 bp) and 3' (739 bp) regions of *PaAtp9-5* (7^5 transgene) and *PaAtp9-5* CDS flanked by 5' (1,456 bp) and 3' (1,403 bp) regions of *PaAtp9-7* (5^7 transgene). The expression of these chimeric transgenes was verified by RT-qPCR (supplementary materials and methods, Supplementary Material online). The transgenes were introduced into various genetic backgrounds and ascospore germination and ascospore production processes were studied (table 2).

First, presence of the 7^5 transgene rescued the failure of $\Delta 5$ ascospore to initiate germination (table 2, compare row 2 with rows 4 and 8). On the contrary, the presence of the 5^7 transgene did not complement the $\Delta 5$ (rows 9 and 10). Thus, driving expression of *PaAtp9-7* by 5' and 3' flanking regions of *PaAtp9-5* is sufficient to allow initiation of germination. Second, the defect in ascospore production associated with the *PaAtp9-7* deletion ($\Delta 7$) was efficiently rescued by the expression of the 5^7 transgene (table 2, compare rows 5 and 3). So, reciprocally, driving expression of *PaAtp9-5* by 5' and 3' flanking regions of *PaAtp9-7* is sufficient to ensure ascospore production, although not as well as when the PaATP9-7 polypeptide is present.

Surprisingly, the 7^5 transgene also improved ascospore production in the $\Delta 7$ context albeit to a lesser extent (about 30% of the wild type; table 2, rows 7 and 8). The expression of the *PaAtp9-5* gene during sexual reproduction is weak (fig. 3C), so this finding was unexpected. RT-qPCR analyses showed that 7^5 transgene expression

was about double *PaAtp9-5* expression (data not shown), suggesting that a moderate increase in *PaAtp9* gene expression may be sufficient to improve ascospore production significantly.

In the $\Delta 5 \Delta 7$ context, the expression of 5^7 and 7^5 chimeric transgenes gave rise to wild-type ascospore germination and wild-type ascospore production (table 2, row 6), evidence that the *PaAtp9* coding sequences are functionally interchangeable. These various experiments show that specific transcriptional regulation of the *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* genes is required for the normal progression of the *P. anserina* life cycle. In addition, *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* genes encode functionally interchangeable subunits *c* demonstrating that they are both bona fide components of the *P. anserina* mitochondrial ATP synthase.

Discussion

Many fungal species contain only one *Atp9* gene encoding the subunit *c* of ATP synthase in the mt genome. Here, we report two functional *Atp9* genes (named *PaAtp9-7* and *PaAtp9-5*) in the nuclear genome of *P. anserina*. There are also two functional *Atp9* genes in the filamentous fungus *N. crassa*, but one is on the mt genome and one in the nuclear genome (van den Boogaart et al. 1982; Bittner-Eddy et al. 1994). We looked at the *Atp9* gene distribution in 26 species representative of fungi, and for which the entire genome sequences are available. In addition to the situation in *P. anserina* and close relatives *Cha. globosum* and *M. grisea* (e.g., two nuclear *Atp9* genes with no mt *Atp9* gene), we found two novel *Atp9* gene distributions in the Pezizomycotina subphylum to which *P. anserina* and *N. crassa* belong: 1) two nuclear *Atp9* genes coexisting with one mt *Atp9* gene in *Myc. graminicola*, and 2) one nuclear *Atp9* gene with no mt *Atp9* gene, in both *Pyr. tritici-repentis* and *Sta. nodorum*.

Our phylogenetic analyses of 36 fungal *Atp9* genes clearly defined two subgroups for nuclear genes (*Atp9-5* or *Atp9-7* like) that are both distinct from mt genes. The two *Atp9* genes of *P. anserina* and all species with two nuclear *Atp9* genes fall into the two nuclear subgroups. The polypeptides encoded by the *Atp9-5* and *Atp9-7*-like genes have different putative MTS. Therefore, the *Atp9-7* and *Atp9-5*-like genes presumably result from two independent gene transfers from the mitochondrion rather than from a duplication event in the nuclear genome (fig. 1D).

Position of the branches containing the polypeptides encoded by the nuclear *Atp9-5* and *Atp9-7*-like genes in the tree (fig. 1C) suggests that they were both transferred to the nuclear genome at an early stage of the evolution of filamentous fungi. Presence of both an *Atp9-5* and an *Atp9-7* homolog in the genome of the last common ancestor of

← contain mature asci with four dark pigmented (mature) ascospores. Fruiting bodies developed from $\Delta 7$ female organs appeared disorganized: the center of the rosette contains a mass of crosier cells, which are specific cells that normally develop into asci. Only a few asci contain ascospores that are moreover unpigmented (arrow). Scales are indicated.

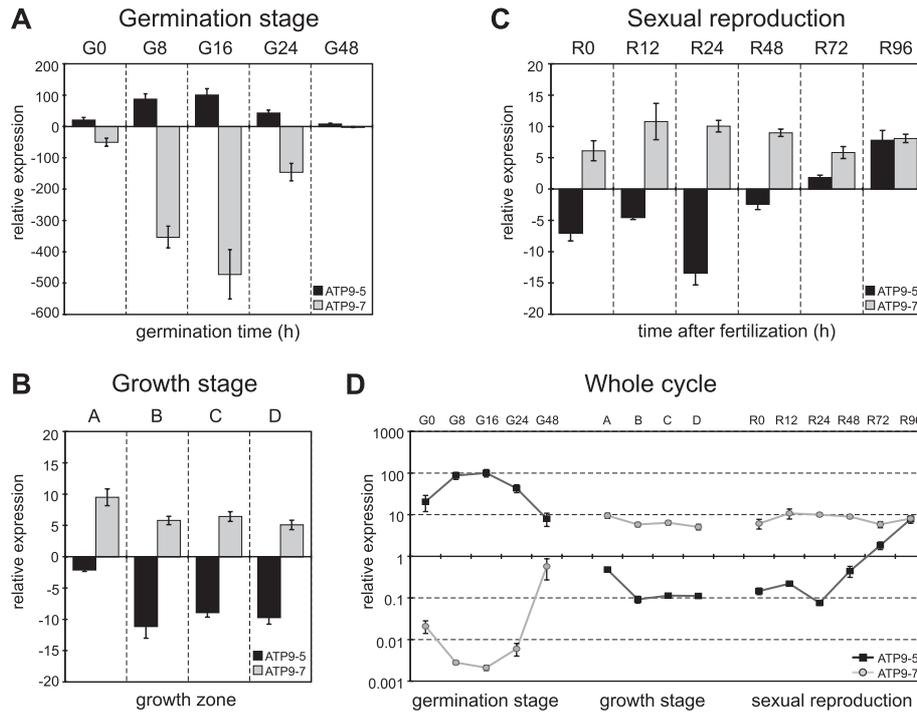


FIG. 3. Expression of *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* genes along the *Podospora anserina* life cycle. *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* transcripts were quantified by RT-qPCR experiments during the germination stage on G medium (A), growth stage on M2 medium (B), and sexual reproduction on M2 medium (C). Numbering indicates the time of growth in hours. Relative expression of each *PaAtp9* gene normalized to the reference gene *PaPDF2* is presented in histograms (A, B, C) or curves (D). Reported values are means of at least three biological replicates \pm standard deviation. Due to expression variation, the scale of the y axis differs between the panels. (A) G0 corresponds to mature ascospores. The *PaAtp9-5/PaAtp9-7* expression ratios were: $1,340 \pm 430$ (G0), $68,100 \pm 24,800$ (G8), $60,800 \pm 11,800$ (G16), $7,500 \pm 2,100$ (G24), 21 ± 6.6 (G48). (B) Quantification of mRNA in samples from four zones of a 4-day mycelium (fig. 2A). A, apical growing zone; B, C, and D, 2-, 3-, and 4-day-old mycelia, respectively. The *PaAtp9-5/PaAtp9-7* expression ratios were: -18 ± 2.7 (zone A), -60 ± 10 (zone B), -59 ± 3 (zone C), -50 ± 4 (zone D). (C) R0 corresponds to mycelia grown for 96 h on M2 medium, that is, just before fertilization. R12 to R96 correspond to different times of perithecia development after fertilization (see text for details). The *PaAtp9-5/PaAtp9-7* expression ratios were: -36 ± 7 (R0), -50 ± 16 (R12), -135 ± 24 (R24), -22 ± 9 (R48), -3.3 ± 1.2 (R72), -1.06 ± 0.2 (R96). (D) Overview of *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* expression variations presented in (A, B, C). Note the logarithm scale of the y axis.

Sordariomycetes and Dothideomycetes, which would be close to the last common ancestor of all Pezizomycotina according to the six-gene phylogeny of James et al. (2006), seems to be the most parsimonious explanation (excluding scenarios involving horizontal gene transfer

[HGT], discussed below) for the observed distribution of these sequences in modern fungi.

The lack of *Atp9-7*-like sequences in Eurotiomycetes is most likely a secondary trait resulting from the loss of the relevant gene in this lineage (fig. 1D). Generally, the

Table 2. Genotype–Phenotype Relationships.

Row	Genotype			Phenotype	
	Locus <i>PaAtp9-5</i>	Locus <i>PaAtp9-7</i>	Transgene ^a	Ascospore Germination	Ascospore Production ^b
1	+	+	None	+	+++
2	$\Delta 5$	+	None	–	nt
3	+	$\Delta 7$	None	+	–
4	$\Delta 5$	+	7^5	+	+++
5	+	$\Delta 7$	5^7	+	++
6	$\Delta 5$	$\Delta 7$	$5^7 7^5$	+	+++
7	+	$\Delta 7$	7^5	+	+
8	$\Delta 5$	$\Delta 7$	7^5	+	+
9	$\Delta 5$	+	5^7	–	nt
10	$\Delta 5$	$\Delta 7$	5^7	–	nt

NOTE.— $\Delta 5$ and $\Delta 7$: deletion of the *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* gene, respectively. nt, could not be tested; +, no defect at the germination stage; –, absence of ascospore germination after ten days of observation.

^a Transgenes are reported as follows: the number refers to the CDS and the superscript number to the origin of 5' and 3' flanking regions.

^b Ascospore production efficiency estimated for homozygous crosses by counting the number of asci ejected in 15–60 min, twice a day for 4 days; +++, ++, and + correspond to 85–100%, 60–80%, and 20–40% of the wild-type asci production, respectively; –, no or few asci ejected.

transfer of a functional gene from the organelle to the nuclear genome, with the required acquisition of a targeting sequence and regulatory elements, has to be a rare event occurring with a much lower probability than gene loss, particularly for genes with at least partially redundant functions. Transfer of a functional gene from the nucleus to the mitochondrial genome is even less likely, with no proof of it occurring naturally whatsoever. This means that any parsimonious scenario explaining the observed distribution of nuclear and mitochondrial *Atp9* genes has to assume that the presence of either *Atp9-5*-like, *Atp9-7*-like, or mitochondrial *Atp9* genes is ancestral, whereas the lack of any of these sequences can be due to independent gene loss events. With the mtDNA-encoded *Atp9* still present, either nuclear gene (or both of them) can be lost (as in the case of Onygenales). A single nuclear *Atp9-7*-like gene is sufficient to support the respiratory function, and *Atp9-5* and/or mitochondrial *Atp9* can be lost (as in Pleosporales, where both are absent). No example of a genome with a nuclear *Atp9-5* homolog being the only subunit *c* gene was found.

An alternative scenario would have to involve HGT to maintain consistency with the fungal tree of life phylogeny. The presence of *Atp9-7* genes in some Sordariales (*P. anserina*, *Cha. globosum*, and *M. grisea*) could be due to an HGT event, and HGT in filamentous fungi is well documented (Mallet et al. 2010). The three members of Sordariales that contain an *Atp9-7*-like sequence do not, however, form a clade in the phylogeny described by James et al. (2006), and the hypothetical HGT to the ancestor of these taxa would still have to be followed by a loss of the gene from the clade containing *N. crassa* and *S. macrospora*. The advantage in parsimony of the HGT scenario over the multiple-gene loss scenario is not therefore significant, and multiple independent gene loss events need to be postulated even when HGT is considered.

Functional gene transfer to the nucleus implies that the genes gained regulatory elements for appropriate expression and, most often, a targeting sequence. We show that expression of the *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* nuclear genes is highly regulated along the life cycle of *P. anserina* and that the regulation of transcription was coherent with the requirement for the genes during fungal development. The *PaAtp9-5* gene was massively expressed at the germination stage but was weakly expressed during growth and sexual reproduction. The *PaAtp9-7* gene was prominently expressed during sexual reproduction and was probably not expressed during the ascospore germination process. The loss of *PaAtp9-5* prevented ascospore germination, and deletion of *PaAtp9-7* strongly impaired ascospore production. Thus, both *P. anserina* genes play important roles in fungal development indicating that during evolution they have acquired necessary, but nonredundant, elements to supplant the ancestor mitochondrial gene and to diverge.

The ATP9-5 and ATP9-7 polypeptide sequences are not identical, so it is plausible that the corresponding subunits *c* possess different functional features. However, when the flanking regions were switched between genes, the whole

developmental process of the fungus was quite normal; this demonstrates that the expression levels of these genes are more important than any differences in their polypeptide sequences. It also suggests that the MTS of the ATP9-5 and ATP9-7 polypeptides both allow efficient mitochondrial import. Nevertheless, when expressed under the control of *PaAtp9-7* flanking regions, ATP9-5 alone was unable to promote a wild-type level of ascospore production. In addition, a small amount of ATP9-7 appears sufficient to ensure an ascospore production suggesting some specificity of the ATP9-7 polypeptide at this stage of *P. anserina* development.

In mammals, the subunit *c* is produced from nuclear isoforms (P1, P2, and P3) that encode polypeptides differing only by their MTS (De Grassi et al. 2006). Only expression of the P1 gene appears to be actively regulated at the transcriptional level in response to various physiological stimuli; such regulation has been described in brown adipose tissue (BAT), which is a specialized thermogenic organ (Houšťek et al. 1995; Andersson et al. 1997). Upon cold acclimation, the expression of P1 is tenfold downregulated in BAT, leading to a major decrease in the amount of mitochondrial ATP synthase (Andersson et al. 1997). The other subunits of ATP synthase continue to be synthesized at the same rate, which results in their overproduction relative to subunit *c* and ultimately to their degradation. Thus, it is the production of subunit *c* (via the control of P1 expression) that determines the amount of mitochondrial ATP synthase in mammals (Kramarova et al. 2008). Our studies show that the highest level of *P. anserina Atp9* transcripts (mainly due by the expression of *PaAtp9-5*) is during ascospore germination, a process involving substantial biomass production, and hence with large energy demands. Thus, transcriptional controls of *PaAtp9-5* (and *PaAtp9-7*) expression may similarly modulate mitochondrial ATP synthase production in this fungus. Preliminary results from a whole-genome microarray approach comparing late and early growing stages (equivalent to zones B and A, respectively; fig. 3C) are consistent with the *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* expression patterns indicated by RT-qPCR, and suggest that the other genes (mitochondrial or nuclear) encoding subunits of the *P. anserina* ATP synthase are not expressed differently in these two conditions (Bidard F and Debuchy R, personal communication). Although the nuclear relocation of *Atp9* genes occurred independently in fungi and mammals, this event has in both cases, been followed by the establishment of complex transcriptional regulation. This regulation of the *Atp9* gene may determine the production of mitochondrial ATP synthase and thereby provide benefits to development. This evolutionary convergence may reflect substantial constraints on the assembly of the ATP synthase making ATP9 the most likely choice as the subunit for regulating the whole enzyme in mitochondria.

Our findings are also pertinent to the enigmatic question of the retention of genes in mitochondria. One view is that transfer of genes to the nucleus is active (as exemplified here for the *Atp9* gene in the Pezizomycotina subphylum) and

still underway (see Adams and Palmer 2003 for a review). Alternatively, genes may have been trapped in organelles because they encode highly hydrophobic proteins that might be difficult to transport back to mitochondria for appropriate assembly or because their products are toxic if present in the cytosol. Another view, known as the CORR (colocation for redox regulation of gene expression) hypothesis, is that genes may have been preferentially maintained in organelles to ensure optimal energy transduction activity (Race et al. 1999; Allen 2003). Our observations indicate that the nuclear relocation of an mitochondrial gene may be exploited so as to allow implementation of specific regulatory mechanisms involved in development and cell differentiation. We recently found evidence (Bietenhader M, Martos A, Tetaud E, Aiyar RS, Kucharczyk R, Godard F, Salin B, Sagot I, Gagneur J, Déquard-Chablat M, Contamine V, Sellem CH, Hermann-Le Denmat S, Annie Sainsard-Chanet A, Steinmetz LM, di Rago JP, in preparation) that in the yeast *S. cerevisiae* the transfer of the mitochondrial *Atp9* gene to the nucleus is a very complex process: it appears to have required a number of cellular accommodations in addition to gene recoding and mitochondrial-targeting information, so as to optimize expression of the gene from the nucleus. Thus, if transfer of the *Atp9* gene to the nucleus does not confer any significant advantage to the cell, the gene is likely to stay within the organelle. Clearly, the presence of *Atp9* in the nucleus of *P. anserina* is exploited to modulate energy metabolism through the life cycle of the fungus; this may explain why despite the difficulties of transferring this gene to the nucleus, it finally succeeded in escaping from the organelle.

Supplementary Material

Supplementary figure S1 and tables S1 and S2 are available at *Molecular Biology and Evolution* online (<http://www.mbe.oxfordjournals.org/>).

Acknowledgments

We are much indebted to Prof. Marguerite Picard (IGM, France) and Dr Robert Debuchy (IGM, France) for the fruitful input they provided at the start of this work. M.B. is a recipient of a doctoral fellowship from the Centre National de la Recherche Scientifique (Bourse de Docteur Ingénieur). This work was supported by research projects granted by the Centre National de la Recherche Scientifique-Action Thématique et Incitative sur Programme 2006 (to S.H.L.D), the Fondation pour la Recherche Médicale-Installation Nouvelle Equipe Program 2007 (to S.H.L.D), the Conseil Régional d'Aquitaine (to J.P.d.R.), and the Operational Program Innovative Economy POIG.02.02.00-14-024/08-00 (to P.G.).

References

Adams KL, Palmer JD. 2003. Evolution of mitochondrial gene content: gene loss and transfer to the nucleus. *Mol Phylogenet Evol.* 29:380–395.

- Allen JF. 2003. Why chloroplasts and mitochondria contain genomes. *Comp Funct Genomics.* 4:31–36.
- Anderson S, Bankier AT, Barrell BG, et al. (14 co-authors). 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature* 290:457–465.
- Andersson U, Houštěk J, Cannon B. 1997. ATP synthase subunit c expression: physiological regulation of the P1 and P2 genes. *Biochem J.* 323:379–385.
- Bittner-Eddy P, Monroy AF, Brambl R. 1994. Expression of mitochondrial genes in the germinating conidia of *Neurospora crassa*. *J Mol Biol.* 235:881–897.
- Brown TA, Waring RB, Scazzocchio C, Davies RW. 1985. The *Aspergillus nidulans* mitochondrial genome. *Curr Genet.* 9:113–117.
- Cummings DJ, McNally KL, Domenico JM, Matsuura ET. 1990. The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of *Podospira anserina*. *Curr Genet.* 17:375–402.
- de Graaf RM, van Alen TA, Dutilh BE, Kuiper JWP, van Zoggel HJAA, Huynh MB, Görtz HD, Huynen MA, Hackstein JHP. 2009. The mitochondrial genomes of the ciliates *Euplotes minuta* and *Euplotes crassus*. *BMC Genomics.* 10:514.
- De Grassi A, Lanave C, Saccone C. 2006. Evolution of ATP synthase subunit c and cytochrome c gene families in selected Metazoa classes. *Gene* 371:224–233.
- Devenish RJ, Prescott M, Rodgers AJW. 2008. The structure and function of mitochondrial F₁F₀-ATP synthases. *Int Rev Cell Mol Biol.* 267:1–58.
- Dyer MR, Walker JE. 1993. Sequences of members of the human gene family for the c subunit of mitochondrial ATP synthase. *Biochem J.* 293:51–64.
- Edgar RC. 2004. MUSCLE: multiple sequence alignment with high accuracy and high throughput. *Nucleic Acids Res.* 32:1792–1797.
- El-Khoury R, Sellem CH, Coppin E, Boivin A, Maas MF, Debuchy R, Sainsard-Chanet A. 2008. Gene deletion and allelic replacement in the filamentous fungus *Podospira anserina*. *Curr Genet.* 53:249–258.
- Erpenbeck D, Voigt O, Adamski M, Adamska M, Hooper JN, Wörheide G, Degnan BM. 2007. Mitochondrial diversity of early-branching metazoa is revealed by the complete mt genome of a haplosclerid demosponge. *Mol Biol Evol.* 24:19–22.
- Espagne E, Lespinet O, Malagnac F, et al. (35 co authors). 2008. The genome sequence of the model ascomycete fungus *Podospira anserina*. *Genome Biol.* 9:R77.
- Feagin JE. 2000. Mitochondrial genome diversity in parasites. *Int J Parasitol.* 30:371–390.
- Funes S, Davidson E, Claros MG, van Lis R, Pérez-Martínez X, Vázquez-Acevedo M, King MP, González-Halphen D. 2002. The typically mitochondrial DNA-encoded ATP6 subunit of the F₁F₀-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem.* 277:6051–6058.
- Gouy M, Guindon S, Gascuel O. 2010. SeaView version 4: a multiplatform graphical user interface for sequence alignment and phylogenetic tree building. *Mol Biol Evol.* 27:221–224.
- Guindon S, Gascuel O. 2003. A simple, fast, and accurate algorithm to estimate large phylogenies by maximum likelihood. *Syst Biol.* 52:696–704.
- Hibbett DS, Binder M, Bischoff JF, et al. (67 coauthors). 2007. A higher-level phylogenetic classification of the fungi. *Mycol Res.* 111:509–547.
- Houštěk J, Andersson U, Tvrdík P, Nedergaard J, Cannon B. 1995. The expression of subunit c correlates with and thus may limit the biosynthesis of the mitochondrial F₀F₁-ATPase in brown adipose tissue. *J Biol Chem.* 270:7689–7694.
- Huson DH, Richter DC, Rausch C, DeZulian T, Franz M, Rupp R. 2007. Dendroscope: an interactive viewer for large phylogenetic trees. *BMC Bioinformatics.* 8:460.

- James TY, Kauff F, Schoch CL, et al. (70 co-authors). 2006. Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny. *Nature* 443:818–822.
- Ki JS, Park HG, Lee JS. 2009. The complete mitochondrial genome of the cyclopid copepod *Paracyclops nana*: a highly divergent genome with novel gene order and atypical gene numbers. *Gene* 435:13–22.
- Kramarova TV, Shabalina IG, Andersson U, Westerberg R, Carlberg I, Houštěk J, Nedergaard J, Cannon B. 2008. Mitochondrial ATP synthase levels in brown adipose tissue are governed by the c-F₀ subunit P1 isoform. *FASEB J*. 22:55–63.
- Lavín JL, Oguiza JA, Ramírez L, Pisabarro AG. 2008. Comparative genomics of the oxidative phosphorylation system in fungi. *Fungal Genet Biol*. 45:1248–1256.
- Mallet LV, Becq J, Deschavanne P. 2010. Whole genome evaluation of horizontal transfers in the pathogenic fungus *Aspergillus fumigatus*. *BMC Genomics*. 11:171.
- McLaughlin DJ, Hibbett DS, Lutzoni F, Spatafora JW, Vilgalys R. 2009. The search for the fungal tree of life. *Trends Microbiol*. 17:488–497.
- Race HL, Herrmann RG, Martin W. 1999. Why have organelles retained genomes? *Trends Genet*. 15:364–370.
- Rak M, Zeng X, Brière JJ, Tzagoloff A. 2009. Assembly of F₀ in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochim Biophys Acta*. 1793: 108–116.
- Ridder R, Künkele KP, Osiewacz HD. 1991. Sequence of the nuclear ATP synthase subunit 9 gene of *Podospora anserina*: lack of similarity to the mitochondrial genome. *Curr Genet*. 20: 349–351.
- Rizet G. 1952. Les phénomènes de barrage chez *Podospora anserina*. I. Analyse génétique des barrages entre souche S et s. *Rev Cytol Biol Veg*. 13:51–92.
- Ronquist F, Huelsenbeck JP. 2003. MrBayes 3: Bayesian phylogenetic inference under mixed models. *Bioinformatics* 19: 1572–1574.
- Schmidt B, Wachter E, Sebald W, Neupert W. 1984. Processing peptidase of *Neurospora* mitochondria. Two step cleavage of imported ATPase subunit 9. *Eur J Biochem*. 144:581–588.
- Signorovitch AY, Buss LW, Dellaporta SL. 2007. Comparative genomics of large mitochondria in placozoans. *PLoS Genet*. 3: e13.
- Stock D, Leslie AG, Walker JE. 1999. Molecular architecture of the rotary motor in ATP synthase. *Science* 286:1700–1705.
- Swofford DL. 2003. PAUP*. Phylogenetic analysis using parsimony (*and other methods). Version 4.0b10. Sunderland (MA): Sinauer Associates.
- van den Boogaart P, Samallo J, Agsteribbe E. 1982. Similar genes for a mitochondrial ATPase subunit in the nuclear and mitochondrial genomes of *Neurospora crassa*. *Nature* 298: 187–189.

Supplementary Materials and Methods

DNA and protein sequences

Among retrieved sequences, four were manually modified for alignments and phylogenetic studies: SORDA-ATP9, CHAGL-ATP9A, CHAGL-ATP9B and MYCGR-ATP9B (fig. 1). In the case of *C. globosum*, the two putative *ATP9* nuclear genes were annotated in PEDANT3 (CHGG_09630 and CHGG_02320) but alignment with *P. anserina* homologous genes and proteins suggested that the automatic annotation might not be correct for introns. Thus, we determined experimentally the sequence of each cDNA. For this, *C. globosum* (strain DSM2 62.110, DMSZ, Germany) was grown for two days under *P. anserina* growth conditions. Total RNA was extracted and reverse transcribed using oligo dT. cDNAs were amplified by PCR using primers designed according to our own intron annotation (CHG1-5'/CHG1-3'R, CHG2-5'/CHG2-3'R; for all primers used in this study, see supplementary table S2). Sequencing of the resulting purified PCR fragments confirmed our annotation for the two genes and revealed an error for two bases inside the first intron of the CHGG_02320 gene (CHAGL-ATP9B).

Phylogenetic analysis

A dataset containing sequences encoded both in the nuclear and in the mitochondrial genome presents a significant challenge with regard to the choice of a model for amino acid substitution. In ML analysis, JTT or Blosum62 amino acid substitution models were used. The choice of either model did not affect the results of the analysis and led to the same tree topology. For Bayesian inference, model jumping between different fixed-rate models was used.

In BI analysis, 500 000 generations of each MCMC search were sampled every 10 generations, and burnin values corresponded to 25% of the samples.

Deletions of the *PaAtp9-5* ($\Delta 5$) and *PaAtp9-7* ($\Delta 7$) genes

As inactivation of the *PaAtp9-5* gene may be lethal, we first constructed a wild-type strain containing an ectopic copy of the gene (hereafter the 5^5 transgene). A PCR fragment amplified from wild-type genomic DNA using primer pair 1/12 (supplementary table S2) was digested with *Hind*III and *Not*I and inserted into the pBC-Hygro vector that confers resistance to hygromycin (Silar P. 1995. Two new easy to use vectors for transformation. *Fungal Genet Newsl* 42: 73). The resulting 5^5 /Hygro^R plasmid, containing the *PaAtp9-5* CDS with 5' (585 bp) and 3' (739 bp) flanking regions, was used to transform wild-type protoplasts. Integrity of the 5^5 transgene was checked by PCR analyses (UP/RP primer pair) of genomic DNA extracted from hygromycin-resistant transformants. One *PaAtp9-5* 5^5 strain was crossed with the $\Delta PaKu70$ strain (phleomycin resistant; El-Koury et al. 2008) to obtain a $\Delta PaKu70$ *PaAtp9-5* 5^5 strain subsequently used as a recipient for *PaAtp9-5* gene replacement.

To delete the *PaAtp9-5* CDS, its 5' (980 bp) and 3' (690 bp) flanking regions were amplified by PCR from wild-type genomic DNA using primer pairs 1/10 and 12/11. The PCR fragments were digested with *Nco*I/*Not*I and *Not*I/*Sac*II, respectively, and inserted between the *Nco*I/*Sac*II sites of the Papi508 vector conferring resistance to nourseothricin (El-Koury et al. 2008). The resulting plasmid was linearized with *Not*I and used to transform $\Delta PaKu70$ *PaAtp9-5* 5^5 protoplasts. The nourseothricin resistant transformants were screened for correct deletion of the *PaAtp9-5* CDS by PCR

analyses of the 5' and 3' borders using primer pairs 2/UP and 3/RP. The $\Delta PaKu70$ allele was then segregated after crossing with the wild-type strain to obtain a $\Delta PaAtp9-5$ 5^5 strain (or $\Delta 5$ 5^5).

To delete the *PaAtp9-7* CDS, we used the plasmid 326DD10 that contains a 3452 bp genomic insert encompassing the 593 bp *PaAtp9-7* CDS (Espagne et al. 2008). First, we amplified by PCR a fragment containing 5'(1456 bp) and 3'(1403 bp) flanking regions of *PaAtp9-7* together with the vector part of p326DD10 using divergent primers that introduce *AscI* sites (15/16). Second, a hygromycin cassette was amplified by PCR from a derivative of pBC-Hygro devoid of the internal *MluI* site (gift of R. Debuchy) using primer pair 13/14 that includes *MluI* sites. These two PCR products were digested with the compatible *AscI* and *MluI* enzymes and ligated together to yield plasmid 326DD10-Hygro. Finally, $\Delta PaKu70$ *PaAtp9-7* protoplasts were transformed with a PCR fragment amplified from plasmid 326DD10-Hygro (primer pair 17/18) and containing the hygromycin cassette flanked by 5' (1014 bp) and 3' (1122 bp) borders of *PaAtp9-7*. The hygromycin resistant transformants were screened for correct deletion of *PaAtp9-7* by PCR analyses of the 5' and 3' borders using primer pairs 19/21 and 20/22 and by Southern blotting. The $\Delta PaKu70$ allele was then segregated after crossing with the wild-type strain to obtain a $\Delta PaAtp9-7$ strain (or *D7*).

In all cases, genomic DNA was extracted by a previously described miniprep method (Lecellier G, Silar P. 1994. Rapid methods for nucleic acids extraction from Petri dish-grown mycelia. *Curr Genet.* 25:122-123).

Construction of chimeric 7^5 and 5^7 transgenes

A strain bearing a *PaAtp9-7* transgene bordered by 5' and 3' flanking regions of *PaAtp9-5* (hereafter 7^5 transgene) was constructed as followed. First, 5' (681 bp) and 3' (199 bp) flanking regions of *PaAtp9-5* CDS were amplified by PCR from wild-type genomic DNA with primer pairs 4/5 and 8/9, respectively. Second, the CDS of *PaAtp9-7* was amplified from wild-type genomic DNA with primer pair 6/7. A chimaeric 7^5 fragment was then obtained by PCR amplification using a mix of the three PCR fragments thus obtained and the external primer pair 4/9. This fragment was digested with *Hind*III and *Bsr*GI and ligated between the corresponding sites in plasmid 5^5 /Hygro^R. The resulting 7^5 /Hygro^R plasmid, containing the *PaAtp9-7* CDS bordered by 5' (585 bp) and 3' (739 bp) flanking regions of *PaAtp9-5*, was used to transform wild-type protoplasts. The hygromycin-resistant transformants were screened for the integrity of the 7^5 transgene by PCR analyses of genomic DNA using primer pair UP/RP and by sequencing. One 7^5 transgenic strain (with a wild-type background) was selected and used for further experiments.

A strain bearing a *PaAtp9-5* transgene bordered by 5' and 3' flanking regions of *PaAtp9-7* (hereafter called the 5^7 transgene) was constructed as followed. The 3.5 kb *PaAtp9-7* *Xba*I-*Spe*I insert from the 326DD10 plasmid was inserted into the *Xba*I site of the pPable vector conferring phleomycin resistance (Coppin E, Debuchy R. 2000. Co-expression of the mating-type genes involved in internuclear recognition is lethal in *Podospora anserina*. *Genetics*. 155:657-669). The resulting plasmid was named pPable-7-20. The 5' (428 bp) and 3' (400 bp) flanking regions of the *PaAtp9-7* CDS were amplified by PCR from wild-type genomic DNA with primer pairs 23/24 and 25/26, respectively. The CDS of *PaAtp9-5* was amplified from wild-type genomic DNA with primer pair 27/28. A chimeric 5^7 fragment was then obtained by PCR

amplification using a mix of the three PCR fragments obtained and the external primer pair 23/26. This fragment was digested with *PshAI* and *BglIII* and inserted between the corresponding sites in pPable-7-20. The resulting 5⁷/Phleo^R plasmid, containing the *PaAtp9-5* CDS bordered by 5' (1456 bp) and 3' (1403 bp) flanking regions of *PaAtp9-7*, was used to transform $\Delta 7$ protoplasts. The phleomycin-resistant transformants were tested for the integrity of the 5⁷ transgene by PCR with genomic DNA using primer pairs 23/29 and 26/30. One $\Delta 7$ 5⁷ strain was isolated and used for further experiments.

Analyses of *PaAtp9-5* and *PaAtp9-7* gene expression by real-time quantitative RT-qPCR

Gene-specific oligonucleotides were designed to amplify a 170 bp *PaAtp9-5* fragment (ATP5 and ATP5rev) and 219 bp or 152 bp *PaAtp9-7* fragments (ATP7/ATP7rev and ATP7b/ATP7brev, respectively). Two primer pairs were used to determine *PaAtp9-7* expression because one (ATP7/ATP7rev) appeared to give variable C_q (quantification cycle; according to Real-Time PCR Data Markup Language, <http://www.rdml.org>) when *PaAtp9-7* was very weakly expressed (germination stage; fig. 3A). When *PaAtp9-7* was more strongly expressed (growth stage and sexual reproduction), the two primer pairs gave similar C_q. The steady state levels of the mRNAs for the 5⁷ and 7⁵ transgenes were determined using primer pairs ATP5/5C7rev and ATP7b/ATP5brev that produce 171 bp and 187 bp PCR fragments, respectively. In this case, expression was measured using mycelium of $\Delta 5 \Delta 7$ 7⁵ and $\Delta 5 \Delta 7$ 7⁵ 5⁷ strains grown on M2 for 96 hours. The 5⁷ transgene was expressed as strongly as the *PaAtp9-7* gene in the same growth conditions. The 7⁵ transgene appeared to be

expressed twice as strongly as *PaAtp9-5* (see Results). Initially, three reference genes were used for normalization: *GPD*, (glyceraldehyde 3-phosphate deshydrogenase, formally Pa_3_5110), *PDF2* (protein phosphatase PP2A regulatory subunit A, Pa_7_6690) and *UBC* (ubiquitin, Pa_4_7790). However, although all three were stably expressed during the growth stage and sexual reproduction, only *PDF2* expression remained constant during the germination stage. Thus, only the *PaPDF2* gene was used as a reference gene to normalize gene expression results for *PaAtp9-5*, *PaAtp9-7*, and the transgenes. Primer pair PDF2/PDF2rev gives rise to a 294 bp fragment.

Each real-time amplification reaction contained 25 ng of cDNA, 0.5 μ M of primers and 2 μ l of enzyme mix in a final volume of 10 μ l. The PCR conditions were: 10 min at 95°C followed by 45 cycles at 95°C for 10 sec, 60°C for 10 sec and 72°C for 15 sec. To confirm amplification specificity, the PCR products were subjected to a final melting curve program from 65 °C to 95°C with a heating rate of 0.1°C per sec and continuous fluorescence measurement. Only one peak was observed. Amplification efficiencies for each primer pair were determined from the slope of the standard curve plotted with the C_q value of three serial dilutions of a mixture of all cDNA samples used in the quantification for each kinetic. Efficiencies were between 1.96 and 2.06. To evaluate mRNA levels, we calculated each relative expression level (fig. 3) using the formula $N0a/N0pdf = E_{pdf}^{C_{qpdf}} / E_a^{C_{qa}}$, where $N0$ are the initial quantities of cDNA for *PaPDF2* (pdf) or each *PaAtp9* (a) gene; E_{pdf} and E_a , the respective amplification efficiencies corresponding to the relevant primer pair; and C_{qpdf} and C_{qa} , the C_q values obtained for each gene for the sample considered.

Supplemental Table S1. Sequences used for phylogenetic analysis of ATP9 subunits

Species	Gene origin	Protein name	Accession number ^(a)
<i>Aspergillus nidulans</i>	Nuclear <i>PaAtp9-5</i> like	ASPNI-ATP9	P16000
	Mitochondrial	ASPNI-ATP9mt	Q37408
<i>Penicillium marneffei</i>	Nuclear <i>PaAtp9-5</i> like	PENMA-ATP9	B6QLG4
	Mitochondrial	PENMA-ATP9mt	Q6V9D7
<i>Paracoccidioides brasiliensis</i>	Mitochondrial	PARBR-ATP9mt	Q1XA92
<i>Tricophyton rubrum</i>	Mitochondrial	TRIRU-ATP9mt	Q01554
<i>Fusarium graminearum</i>	Nuclear <i>PaAtp9-5</i> like	FUSGR-ATP9	XP_386224 ^(b) (FGSG_06048)
	Mitochondrial	FUSGR-ATP9mt	A5J039
<i>Neurospora crassa</i>	Nuclear <i>PaAtp9-5</i> like	NEUCR-ATP9	P00842
	Mitochondrial	NEUCR-ATP9mt	Q12635
<i>Sordaria macrospora</i>	Nuclear <i>PaAtp9-5</i> like	SORMA-ATP9 ^(d)	D1Z8Z1-1
	Mitochondrial	SORMA-ATP9mt	D1ZZ82
<i>Podospora anserina</i>	Nuclear <i>PaAtp9-5</i>	PODAN-ATP9-5	Q03672 (Pa_5_9140)
	Nuclear <i>PaAtp9-7</i>	PODAN-ATP9-7	B2APB0 (Pa_7_20)
<i>Chaetomium globosum</i>	Nuclear <i>PaAtp9-5</i> like	CHAGL-ATP9A ^(d)	Q2GQX4 (Chgg_09630) ^(c)
	Nuclear <i>PaAtp9-7</i> like	CHAGL-ATP9B ^(d)	Q2HBT4 (Chgg_02320) ^(c)
<i>Magnaporthe grisea</i>	Nuclear <i>PaAtp9-5</i> like	MAGGR-ATP9A	A4RDR7
	Nuclear <i>PaAtp9-7</i> like	MAGGR-ATP9B	A4QVK7
<i>Mycosphaerella graminicola</i>	Nuclear <i>PaAtp9-5</i> like	MYCGR-ATP9A	mygr_04864 ^(c)
	Nuclear <i>PaAtp9-7</i> like	MYCGR-ATP9B ^(d)	mygr_07973 ^(c)
	Mitochondrial	MYCGR-ATP9mt	A9Y5I1
<i>Pyrenophora tritici-repentis</i>	Nuclear <i>PaAtp9-7</i> like	PYRTR-ATP9	B2W3H8

			(PTRG_05028) ^(c)
<i>Stagonospora nodorum</i>	Nuclear <i>PaAtp9-7</i> like	STANO-ATP9	Q0U410
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	Mitochondrial	SACCE-ATP9mt	P61829
<i>Candida glabrata</i>	Mitochondrial	CANGL-ATP9mt	Q85Q98
<i>Ashbya gossypii</i>	Mitochondrial	ASHGO-ATP9mt	Q75G38
<i>Kluyveromyces lactis</i>	Mitochondrial	KLULA-ATP9mt	P92811
<i>Candida albicans</i>	Mitochondrial	CANAL-ATP9mt	Q9B8D5
<i>Yarrowia lipolytica</i>	Mitochondrial	YARLI-ATP9mt	Q37695
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	Mitochondrial	SCHPO-ATP9mt	P21537
<i>Pleurotus ostreatus</i>	Mitochondrial	PLEOS-ATP9mt	A7KCS5
<i>Schizophyllum commune</i>	Mitochondrial	SCHCO-ATP9mt	Q94ZJ5
<i>Cryptococcus neoformans</i>	Mitochondrial	CRYNE-ATP9mt	Q6J9U5
<i>Ustilago maydis</i>	Mitochondrial	USTMA-ATP9mt	Q0H8W9
<i>Rhizopus oryzae</i>	Mitochondrial	RHIOR-ATP9mt	Q3T4E5
<i>Allomyces macrogynus</i>	Mitochondrial	ALLMA-ATP9mt	Q37404

Species are the same as in Table 1 and are presented in the same order. ^(a)Accession numbers are for the UniProt database (www.uniprot.org) except for ^(b), NCBI database (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov>) and ^(c), PEDANT3 database (<http://pedant.gsf.de>). ^(d) In these cases, a database annotation was modified manually to rectify the length and position of introns. In the case of *Chaetomium globosum*, the pertinence of manual modifications was verified by cDNA sequencing.

Supplemental Table S2. Primers used in this study

Name	Sequence (5'→3')	Description
RP	AGCGGATAACAATTTACACAGG	Universal reverse primer
UP	CGCCAGGGTTTTCCAGTCAC	Universal primer
1	<u>ggg</u> ccgccGCGGTGTTTGTCGGAGTTGATC	<i>PaAtp9-5</i> 5'UTR
2	ATCCGTTACACAACATTTGCGG	<i>PaAtp9-5</i> 5'UTR
3	GTCGCCGAGACGGTTCGTG*	<i>PaAtp9-5</i> 3'UTR
4	GAGCCGCGCCAACCTCAGAC	<i>PaAtp9-5</i> 5'UTR
5	GAGGCGTTCATTGTGTCTGATGAGAAGGG*	7 ⁵ construct
6	CATCAGACACAATGAACGCCTCTAGCAAGC	7 ⁵ construct
7	GTGAACCGCTTAGTAGGCGAAGAGAAGC*	7 ⁵ construct
8	CTTCGCCTACTAAGCGGTTCACCACCACC	7 ⁵ construct
9	cccc <u>actagt</u> CCATGCACACCCCGCC*	<i>PaAtp9-5</i> 3'UTR
10	aacc <u>atgg</u> CAGAGGTGATGCAAAAGAC*	<i>PaAtp9-5</i> ATG region
11	gagagacc <u>gcgg</u> GAGCGAGAGTGGGGG	<i>PaAtp9-5</i> STOP region
12	<u>ggg</u> ccgccGCATCAGGGTACCGGGAC*	<i>PaAtp9-5</i> 3'UTR
13	GCGACGCGTCCGAGATGCGCCGCGTGC	5' hph cassette
14	GTC <u>acGcgt</u> AGAGGATCCTCTAGCTA*	3' hph cassette
15	GCTAGAG <u>ggcgcgCc</u> TTTTGACGAGAC*	<i>PaAtp9-7</i> ATG region
16	CTGGGGCGCgCcAGTCGGTATTTC	<i>PaAtp9-7</i> STOP region
17	CCTCCAGTGGCATTGGTTTG	<i>PaAtp9-7</i> 5'UTR
18	CACCATGGCTCTTGACCTTG*	<i>PaAtp9-7</i> 3'UTR
19	GGCTGCAGGTGTTTGTGTAAG	<i>PaAtp9-7</i> 5'UTR
20	GGAGGAGACCGTCAAGGTC*	<i>PaAtp9-7</i> 3'UTR

21	CAACCCTTGGCAGAACATATC	Hph cassette
22	CCCAGAATGCACAGGTACAC*	Hph cassette
23	GCAGCAGGATGCAGAAGAG	<i>PaAtp9-7</i> 5'UTR
24	GAACACGGGTGGAGGCCATTTTGACGAGA CGGAGAAATA*	5' construct
25	CTAACAAAATGCCTCAGACCTAACATGTC GTCTGGGGCG	5' construct
26	GAGAGCGGAAAAGTATGTGG*	<i>PaAtp9-7</i> 3'UTR
27	TATTTCTCCGTCTCGTCAAAATGGCCTCCAC CCGTGTTC	5' construct
28	CGCCCCAGACGACATGTTTAGGTCTGAGGC ATTTTGTTAG*	5' construct
29	GAACGAACACTCTCTCGGATG*	<i>PaAtp9-5</i> Intron1
30	GTCGAGGTCTCCAAGAACTTG	<i>PaAtp9-5</i> Exon 2
CHG1-5'	CATCCTCTTCCCAACAGTCAC	Chgg_09630 ATG region
CHG1-3'R	GAGGCACCGACGCCAATCC*	Chgg_09630 STOP region
CHG2-5'	CACTTTCCTCCATCAATTCC	Chgg_02320 ATG region
CHG2-3'R	CGATCAGACGAACGCGAGTC*	Chgg_02320 STOP region
<i>Real time RT-qPCR primers:</i>		
GPD	CATTGAGCCCAAGTACGCT/GAG	Exon1-2
GPD rev	CGCGCTCAGTGTAGAACTTG*	Exon2
PDF2	GCAGACAGGTTTCGAAAAG/ATTG	Exon4-5
PDF2rev	CAGATGATCAATGGTT/TCTTGC*	Exon5-6
UBC	GGCCATCCCCATCCATCAAC	5'UTR

UBC rev	GGTGATGGTCTTGCCAGTGA/GA*	Exon2-1
ATP5	ATCGGTATCGGTCTCGTCTTCG	<i>PaAtp9-5</i> exon2
ATP5rev	GTGGTGAACCGCTTAGGT/GAAC*	<i>PaAtp9-5</i> exon3-2
ATP7	GTAATGCCTTCGCCCCTGTC	<i>PaAtp9-7</i> exon2
ATP7rev	TACGAGAAGAGCTGGG/ACCTG*	<i>PaAtp9-7</i> exon3-2
ATP7b	CCGGCTCTCAGGT/CCCAG	<i>PaAtp9-7</i> exon2-3
ATP7brev	GGACACTCAGAAATACCGACTTG*	<i>PaAtp9-7</i> exon3
5C7rev	CCAGACGACATGTTTAGGT/GAAC*	5' STOP region
ATP5brev	CCCGTCTTGTTGATATGTACAG*	<i>PaAtp9-5</i> 3'UTR

Relevant restriction sites are underlined. Lower case letters indicate nucleotides which were changed in the sequence to create restriction sites. For fusion primers used to construct the 5⁷ or 7⁵ transgenes, sequences from Pa_5_9140 (*PaAtp9-5*) are in bold. For RT-qPCR primers, the slash indicates the junction between two exons. Primers with reverse orientation with respect to the coding strand are indicated with an asterisk.

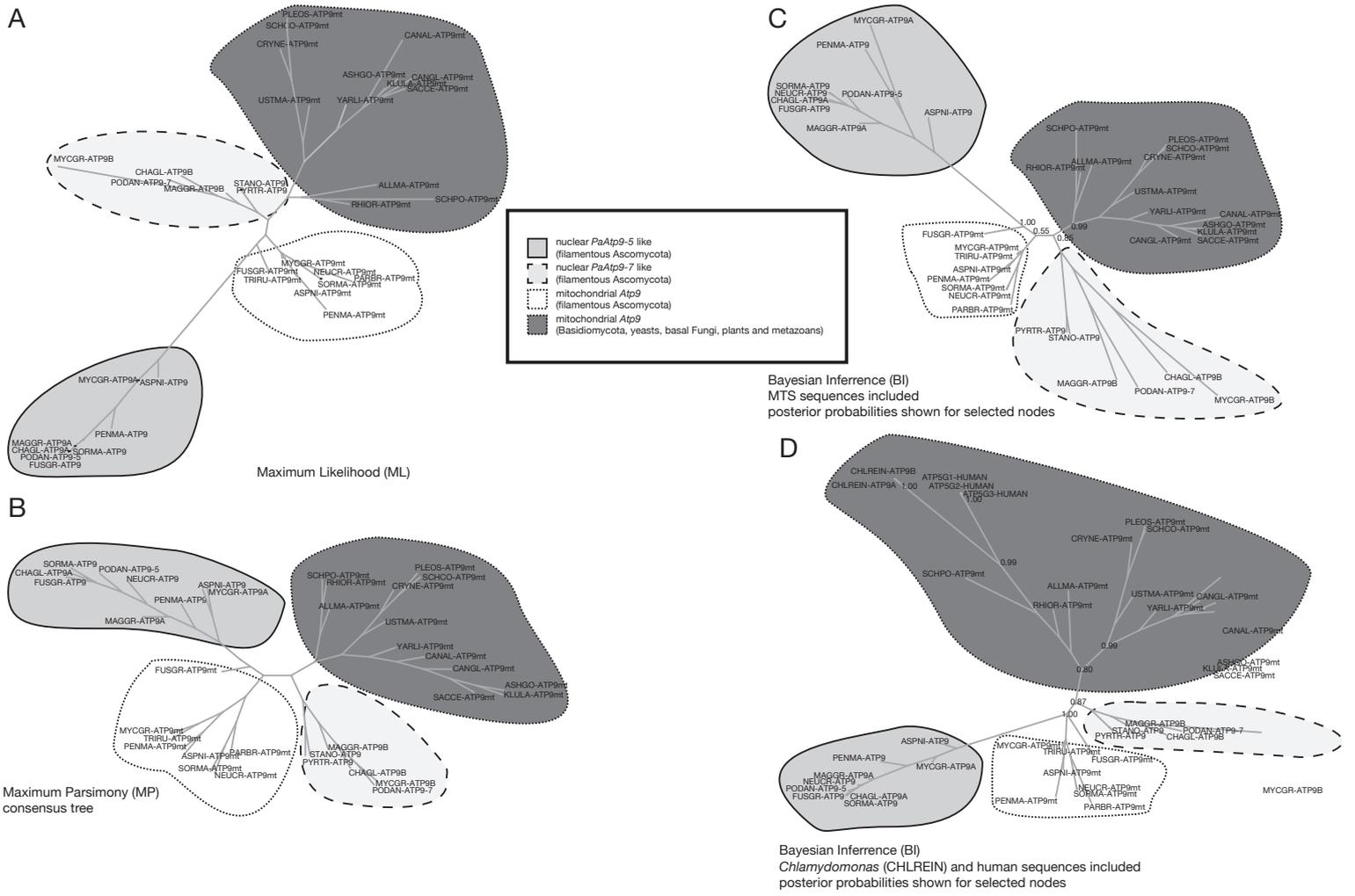


Figure S1. Additional phylogenetic trees for the Atp9 dataset. Boxed legend indicates four major groups apparent in each analysis.

Chapitre 4

Les mutations SUP améliorant l'expression allotopique du gène *ATP9* améliorent également l'expression du gène mitochondrial *COX2* depuis le noyau

Sommaire

4.1	Construction des souches $\Delta cox2 : : ARG8^m$	216
4.2	Influence des mutations SUP sur l'expression nucléaire du gène <i>COX2</i>	217
4.2.1	Phénotype de croissance	217
4.2.2	Accumulation de la sous-unité Cox2p	218

Dans le chapitre 2 page 151, j'ai décrit comment les mutations SUP optimisaient l'expression nucléaire du gène *ATP9-Hyb* et des gènes *ATP9* de *Podospora anserina*. Partant de ce constat, nous nous sommes demandé si d'autres gènes artificiellement relocalisés pouvaient bénéficier de ces optimisations. Il a été montré par Supekova *et al.* (2010) que le gène *COX2*, mitochondrial chez *Saccharomyces cerevisiae*, pouvait être relocalisé fonctionnellement au noyau après le remplacement d'un résidu tryptophane par un résidu arginine dans la première traverse transmembranaire de la protéine. Toutefois, comme nous pouvons le voir à la figure III.4.2(a) page 217, la souche de levure ainsi modifiée croît très lentement sur substrat respiratoire. Nous avons voulu savoir si les mutations SUP pouvaient avoir une influence sur l'expression allotopique du gène *COX2* et la croissance des souches ainsi modifiées.

4.1 Construction des souches $\Delta\text{cox2} :: \text{ARG8}^m$

Dans un premier temps, j'ai transféré un génome mitochondrial $\Delta\text{cox2} :: \text{ARG8}^m$ généreusement fourni par Nathalie BONNEFOY du CENTRE DE GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE de Gif-sur-Yvette, dans les différents fonds SUP. Le schéma III.4.1 résume les étapes réalisées. Tout d'abord (étape 1 du schéma), les différents fonds SUP ont été traités au bromure d'éthidium (BET). Ensuite, le génome mitochondrial $\Delta\text{cox2} :: \text{ARG8}^m$ a été transféré par cytoduction dans ces souches ρ^0 . La souche $\Delta\text{cox2} :: \text{ARG8}^m$ avec un fond génétique nucléaire sauvage de la souche MR6, fournie par Cécile SAUVANET, a été nommée CS1. Je la désignerai par $\Delta\text{cox2} :: \text{ARG8}^m$ par la suite. Les souches à fond nucléaire SUP et génome mitochondrial $\Delta\text{cox2} :: \text{ARG8}^m$ ont été nommées respectivement AMY146 (SUP1 + $\Delta\text{cox2} :: \text{ARG8}^m$), AMY147 (SUP2 + $\Delta\text{cox2} :: \text{ARG8}^m$) et AMY148 (SUP3 + $\Delta\text{cox2} :: \text{ARG8}^m$).

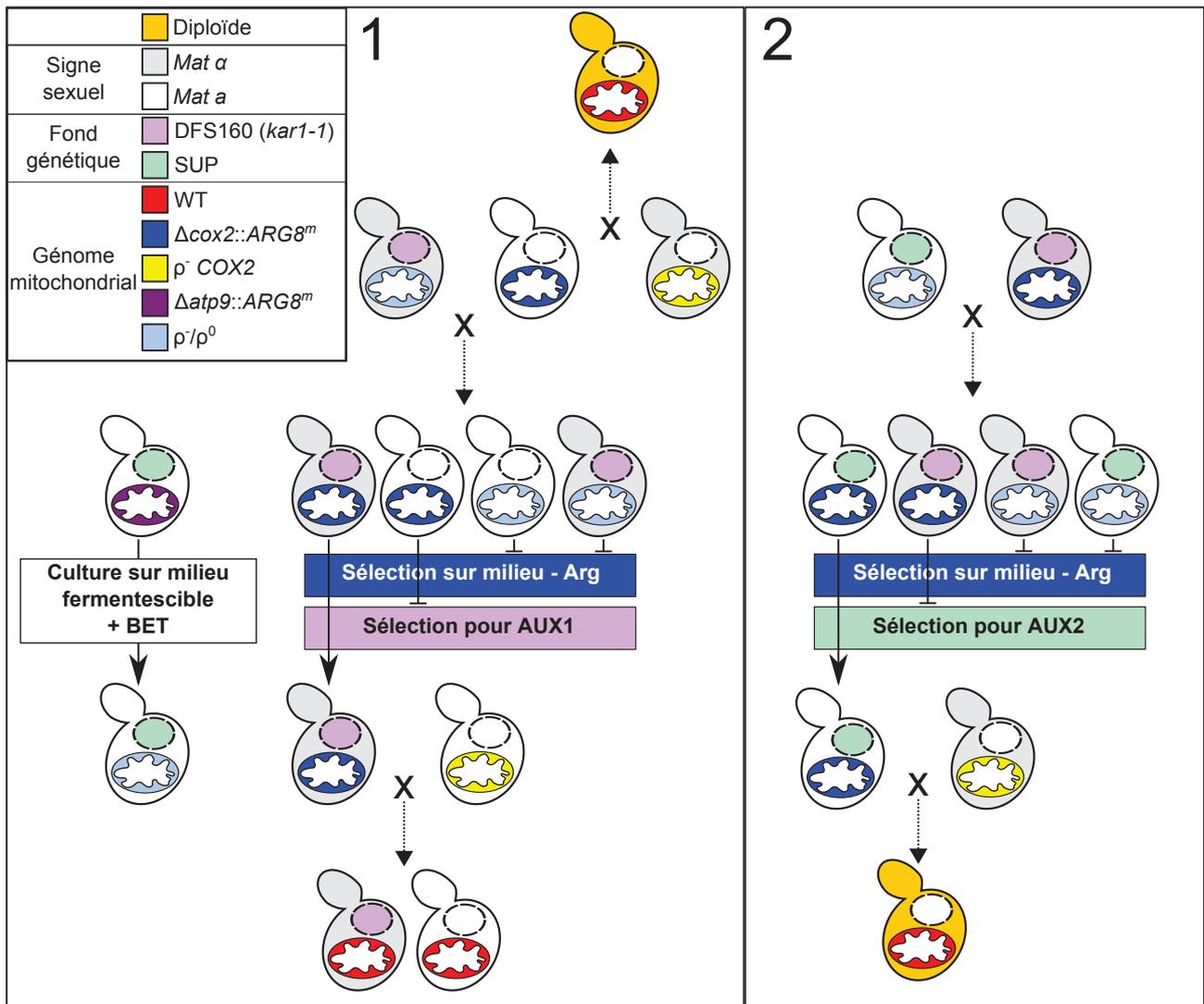


FIGURE III.4.1: Cytoduction des génomes $\Delta\text{cox2} :: \text{ARG8}^m$ dans les souches à fond nucléaire SUP

Schéma récapitulant les étapes de construction des souches à fond nucléaire SUP et génome mitochondrial $\Delta\text{cox2} :: \text{ARG8}^m$. Le code couleur est indiqué dans l'encadré. L'ensemble des croisements est réalisé sur milieu fermentescible riche YPGA. Les descendants sont ensuite sélectionnés selon les critères indiqués. Les souches obtenues sont contrôlées pour leurs auxotrophies et leur signe sexuel, puis pour leur capacité à restaurer la croissance respiratoire d'une souche ρ^- synthétique COX2. AUX1 : auxotrophies du contexte génétique nucléaire DFS160 α , AUX2 : auxotrophies du contexte génétique nucléaire MR6.

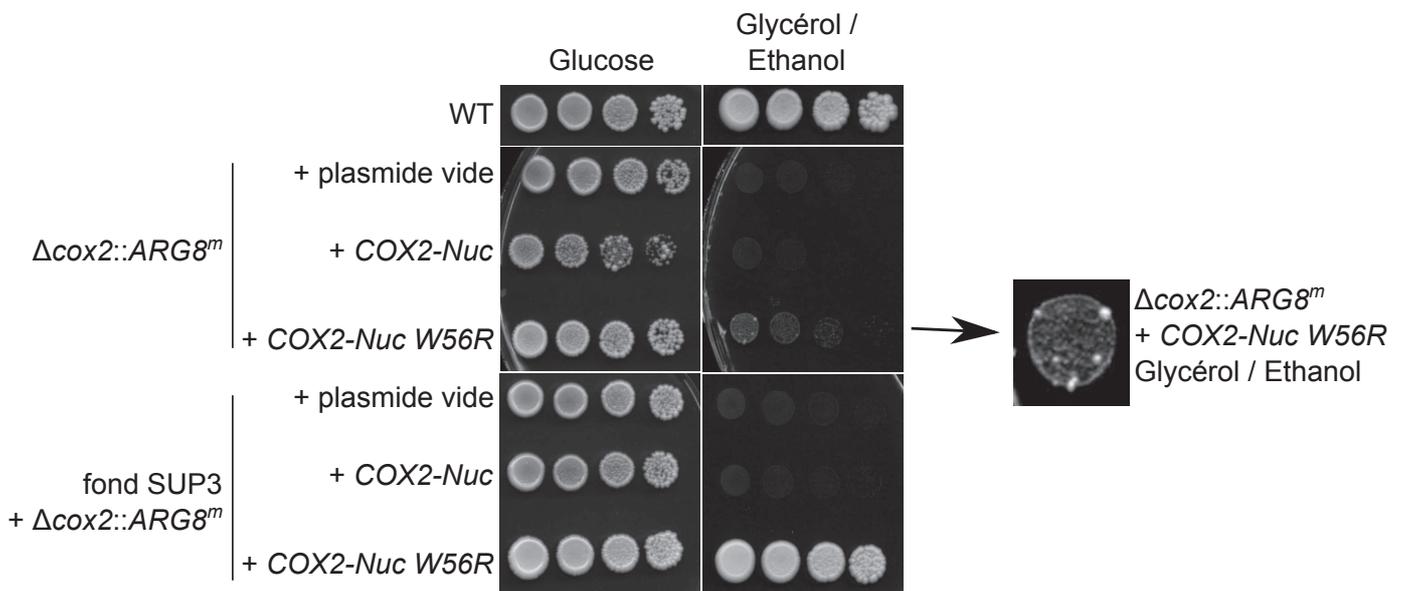
4.2 Influence des mutations SUP sur l'expression nucléaire du gène *COX2*

4.2.1 Phénotype de croissance

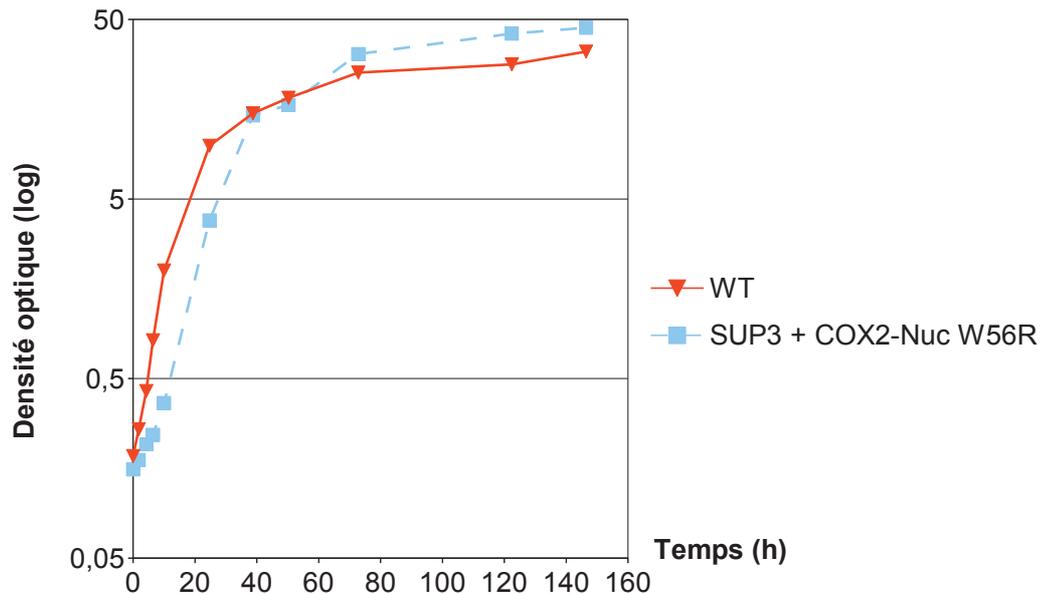
Les souches ainsi modifiées ont été ensuite transformées avec les constructions des gènes *COX2* décrites dans Supekova *et al.* (2010), et aimablement fournies par Diego GONZALEZ-HALPHEN de l'INSTITUT DE PHYSIOLOGIE CELLULAIRE de Mexico. Les gènes utilisés encodent la MTS de la protéine Oxa1p de levure fusionnée à la protéine Cox2p native de *Saccharomyces cerevisiae* (*COX2-Nuc*) ou la protéine Cox2p modifiée (*COX2-Nuc W56R*). Le vecteur utilisé est le plasmide Yep352, un vecteur multicopie (2 μ) portant le gène d'auxotrophie *URA3*. Le gène est sous contrôle du promoteur du gène *ACT1* dans ce plasmide (Supekova *et al.*, 2010). Les souches obtenues ont été nommées fond WT + $\Delta\text{cox2}::\text{ARG8}^m$ + *COX2-Nuc* (AMY211) ou *COX2-Nuc W56R* (AMY212), fond SUP1 + $\Delta\text{cox2}::\text{ARG8}^m$ + *COX2-Nuc* (AMY216) ou *COX2-Nuc W56R* (AMY217), fond SUP2 + $\Delta\text{cox2}::\text{ARG8}^m$ + *COX2-Nuc* (AMY222) ou *COX2-Nuc W56R* (AMY223), fond SUP3 + $\Delta\text{cox2}::\text{ARG8}^m$ + *COX2-Nuc* (AMY167) ou *COX2-Nuc W56R* (AMY229).

La figure III.4.2(a) présente les phénotypes de croissance de ces souches. La souche sauvage, délétée pour le gène *COX2* ($\Delta\text{cox2}::\text{ARG8}^m$) et exprimant le gène *COX2-Nuc* ne croît pas sur milieu respiratoire. La souche exprimant le gène *COX2-Nuc W56R* montre une faible croissance respiratoire. Les différents fonds génétiques SUP ne permettent pas la restauration d'un phénotype de croissance avec la construction *COX2-Nuc* encodant la version native de la protéine. Le fond génétique SUP3 permet une amélioration conséquente de la vitesse de croissance à partir du gène *COX2-Nuc W56R*.

J'ai réalisé une courbe de croissance incluant la souche sauvage WT et la souche fond SUP3 $\Delta\text{cox2}::\text{ARG8}^m$ + *COX2-Nuc W56R*. Les résultats de ces mesures sont présentés en figure III.4.2(b) page suivante. Ces courbes montrent que la souche exprimant le gène *COX2-Nuc W56R* en fond SUP3 a retrouvé une croissance similaire au type sauvage en milieu respiratoire. Les mutations SUP optimisant l'expression allotopique du gène *ATP9* sont donc actives aussi sur des versions nucléaires du gène *COX2*.



(a) Phénotypes de croissance des souches avec *COX2* relocalisé



(b) Courbe de croissance de la souche combinant *COX2* relocalisé et fond nucléaire SUP

FIGURE III.4.2: Le fond génétique SUP3 améliore la croissance respiratoire des les souches avec *COX2* relocalisé

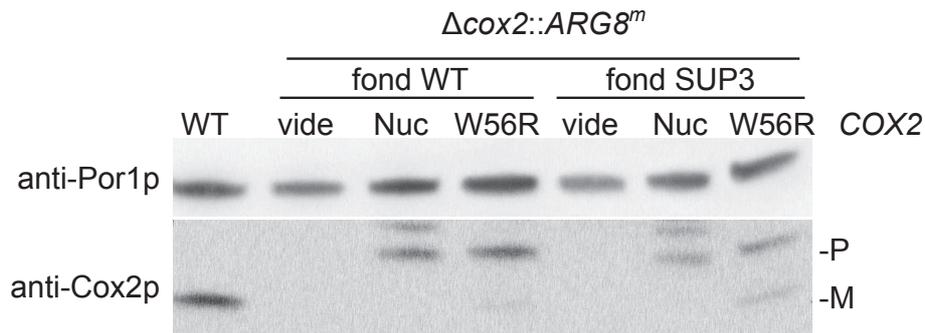
(a) Photographie d'un test en gouttes des souches WT (MR6), $\Delta\text{cox2}::\text{ARG8}^{\text{m}}$ + plasmide *Yep352* vide (AMY210) ou + *COX2-Nuc* (AMY211) ou + *COX2-Nuc W56R* (AMY212), fond SUP3 $\Delta\text{cox2}::\text{ARG8}^{\text{m}}$ + plasmide *Yep352* vide (AMY166) ou + *COX2-Nuc* (AMY167) ou + *COX2-Nuc W56R* (AMY229). Les souches ont été déposées sur milieu fermentescible riche YPGA (glucose) et sur milieu respiratoire riche YPEG (glycérol/éthanol) et incubées respectivement 3 et 6 jours à 28 °C. Comme montré dans la publication de Supekova et al. (2010), le gène *COX2-Nuc* a besoin de la mutation *W56R* pour compléter partiellement la délétion de la version mitochondriale. Des mutations améliorant la vitesse de croissance apparaissent également dans cette souche (encadré à droite). Les mutations du fond SUP3 sont actives dans ce contexte et améliorent ce phénotype de croissance.

(b) Courbe de croissance d'une souche sauvage WT et de la souche fond SUP3 $\Delta\text{cox2}::\text{ARG8}^{\text{m}}$ + *COX2-Nuc W56R* (AMY229) en milieu respiratoire riche YPEG à 28 °C. Les souches ont été pré-adaptées dans le même milieu. En phase exponentielle de croissance, 50 mL du même milieu ont été ensemencés avec une quantité précise de cellules, rapportée en unités de Densité Optique (DO). Des mesures régulières de DO sont ensuite effectuées. En abscisses est rapporté le temps en heures, en ordonnées la densité optique mesurée à λ 650 nm (échelle logarithmique). La légende de la figure est indiquée à droite. Les mutations SUP permettent à la souche exprimant le gène *COX2* à partir du noyau de retrouver une croissance similaire à celle du type sauvage. La souche à fond nucléaire sauvage n'est pas présentée ici du fait de l'apparition fréquente de mutations améliorant sa croissance (voir (a)).

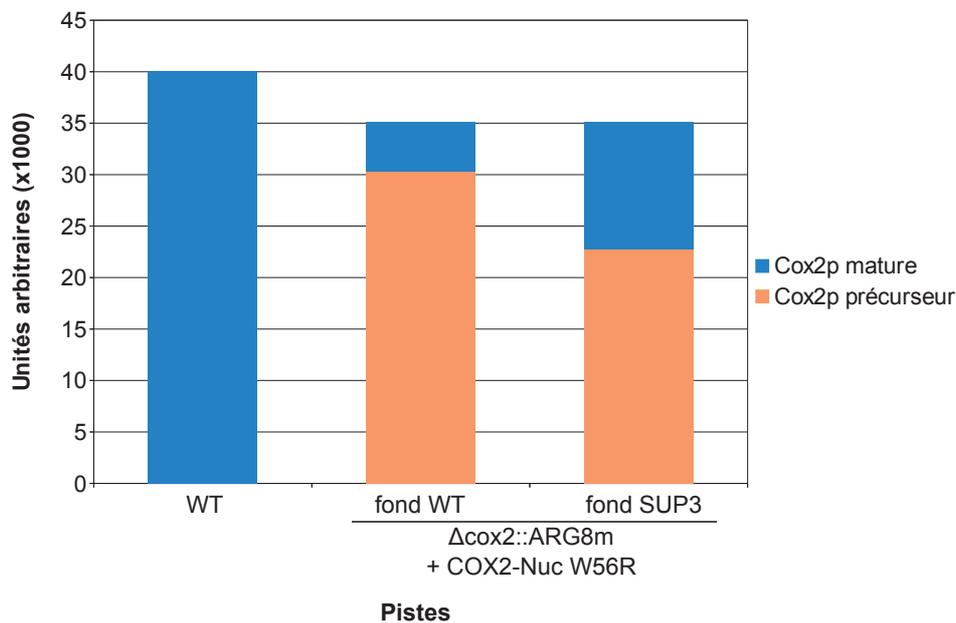
4.2.2 Accumulation de la sous-unité Cox2p

J'ai réalisé des extraits totaux de protéines sur ces différentes souches et les ai séparés sur gel dénaturant, puis les ai transférés sur membrane par Western blot. La figure III.4.3(a) page ci-contre présente les résultats de cette expérience. La protéine Cox2p-Nuc (sans la mutation *W56R*) est détectée mais la taille correspond à la forme précurseur de la protéine, quel que soit le fond génétique utilisé. La construction *COX2-Nuc W56R* est suffisante pour générer une forme maturée de la protéine. La figure III.4.3(b) présente une quantification des différents signaux de

la protéine Cox2p-Nuc W56R, rapportée au contrôle Por1p. Cette quantification indique que la quantité de protéine maturée générée est doublée entre les fonds génétiques WT et SUP3. Le fond SUP3 permet donc d'améliorer l'expression du gène *COX2-Nuc W56R*.



(a) Accumulation de la protéine Cox2p exprimée à partir du noyau



(b) Quantification des signaux de protéine Cox2p

FIGURE III.4.3: Les mutations du fond SUP3 ont un impact sur l'accumulation de la protéine Cox2p exprimée à partir du noyau

(a) Détection des protéines Cox2p (souches sauvage MR6) et Cox2p-Nuc (avec ou sans mutation W56R), exprimées dans les souches WT (MR6), $\Delta\text{cox2}::\text{ARG8}^m$ + plasmide Yep352 vide (AMY210) ou + COX2-Nuc (AMY211) ou + COX2-Nuc W56R (AMY212), fond SUP3 $\Delta\text{cox2}::\text{ARG8}^m$ + plasmide Yep352 vide (AMY166) ou + COX2-Nuc (AMY167) ou + COX2-Nuc W56R (AMY229). La protéine est indétectable car absente dans les souches avec le plasmide Yep352 vide. Les extraits protéiques totaux ont été réalisés sur des cultures de ces souches en phase exponentielle de croissance en milieu fermentescible synthétique (CSM-UR, complété en uracile et arginine pour la souche WT). La forme de la protéine précurseur (P) ou maturée (M) est indiquée. La protéine Por1p mitochondriale sert de contrôle de charge. La forme mature de la protéine Cox2p-Nuc est absente de ces souches, et le contexte SUP n'impacte pas sur ce paramètre. Elle est par contre détectée en présence de la mutation W56R, qui doit influencer sur l'import et/ou la maturation de la protéine.

(b) Quantification des signaux de protéines Cox2p et Cox2p-Nuc W56R détectés en (a). Ces valeurs ont été corrigées par rapport au contrôle de charge Por1p. La protéine Cox2p mature est représentée par la couleur bleue, et la précurseur en orange. L'axe des abscisses correspond à différentes pistes du Western blot, et l'axe des ordonnées aux valeurs de quantification en unités arbitraires. Le contexte SUP3 augmente l'accumulation de la protéine Cox2p-Nuc W56R maturée, mais sans augmenter la quantité totale (précurseur + maturée) de protéine accumulée par la cellule.

Ces données sur l'accumulation de Cox2p sont corrélées avec des mesures de consommation d'oxygène réalisées sur mitochondries isolées (table III.4.1). Il est possible de noter une augmentation équivalente de l'activité cytochrome c oxydase en fond SUP3 exprimant la construction *COX2-Nuc W56R*, comparativement au fond sauvage exprimant ce même gène.

Souches	Consommation d'oxygène (nAtO ₂ / min / mg)			
	NADH			Asc./TMPD
	Etat 3	Etat 4	CCCP	CCCP
WT	653 ± 58	N/D	1261 ± 166	1848 ± 212
fond SUP3 ρ^0 + WT ADNmt	593	258	1095	1476
fond WT $\Delta\text{cox2} :: \text{ARG8}^m$ + plasmide vide	26,5	21,8	31,7	53,3
fond WT $\Delta\text{cox2} :: \text{ARG8}^m$ + <i>COX2-Nuc W56R</i>	127	105	150,5	261,5
fond SUP3 $\Delta\text{cox2} :: \text{ARG8}^m$ + <i>COX2-Nuc W56R</i>	250	197	365	541,5

TABLE III.4.1: Les mutations SUP ont un impact sur l'activité du complexe IV dans un contexte *COX2* relocalisé

Tableau regroupant les données de caractérisation quantitative des mitochondries des souches WT (MR6), fond WT $\Delta\text{cox2} :: \text{ARG8}^m$ + plasmide *Yep352* vide (AMY210), $\Delta\text{cox2} :: \text{ARG8}^m$ + *COX2-Nuc W56R* (AMY212), fond SUP3 $\Delta\text{cox2} :: \text{ARG8}^m$ + *COX2-Nuc W56R* (AMY229). Les souches ont été cultivées en milieu respiratoire YPEG et récoltées en phase exponentielle. Les mesures de vitesse de consommation d'oxygène sont réalisées sur mitochondries fraîches. Asc. : Ascorbate. Les mutations SUP ont un impact important sur ce contexte, elles permettent de doubler l'activité de consommation d'oxygène du complexe IV.

Chapitre 5

Relocalisation des gènes *ATP6* et *COX3*

Sommaire

5.1	Les gènes <i>ATP6</i> et <i>COX3</i> nucléaires	222
5.2	Les effets des mutations SUP sur les constructions nucléaires du gène <i>ATP6</i> .	222
5.2.1	Transfert des génomes mitochondriaux $\Delta atp6$: : <i>ARG8^m</i> dans les souches à fonds SUP	222
5.2.2	Modifications du gène <i>ATP6</i>	222
5.2.3	Phénotype de croissance	223
5.3	Les effets des mutations SUP sur les constructions nucléaires du gène <i>COX3</i>	226
5.3.1	Transfert des génomes mitochondriaux $\Delta cox3$: : <i>ARG8^m</i> dans les souches à fond SUP	226
5.3.2	Modifications du gène <i>COX3</i>	226
5.3.3	Phénotype de croissance	227
5.3.4	Accumulation de la protéine Cox3p	228

Chez *Chlamydomonas reinhardtii* et autres espèces du même Genre, certains gènes, que l'on identifie comme mitochondriaux chez la plupart des eucaryotes, sont exprimés à partir du noyau. C'est le cas, par exemple, pour les gènes *ATP6* et *COX3* (Funes *et al.*, 2002; Pérez-Martínez *et al.*, 2000). Ces deux gènes encodent des protéines portant respectivement cinq et sept traverses transmembranaires. La première correspond à une sous-unité de l'ATP synthase, constituant le canal à protons F_0 avec l'oligomère de sous-unités Atp9p. La seconde est, comme pour Cox2p, une sous-unité du complexe IV de la chaîne respiratoire, la cytochrome c oxydase. Les tentatives d'expression allotopique de ces deux gènes en fond nucléaire sauvage n'ont pas fourni de résultats probants ni clairs à l'heure actuelle (Figuroa-Martínez *et al.*, 2011; Dunn et Pinkert, 2012). Les contextes SUP se sont révélés efficaces dans l'optimisation de l'expression nucléaire de deux gènes mitochondriaux différents, *ATP9* et *COX2*. Nous avons donc décidé de tester les différents fonds SUP dans des expériences de relocalisation artificielle des gènes *ATP6* et *COX3*.

5.1 Les gènes *ATP6* et *COX3* nucléaires

Le gène mitochondrial *ATP6* de levure participe, comme *ATP9*, à la formation du F_0 . Chez certains organismes comme *Chlamydomonas reinhardtii*, ce gène se situe dans le génome nucléaire (Funes *et al.*, 2002). Chez cet organisme les trois premières traverses membranaires de cette protéine sont moins hydrophobes que leurs homologues encodés au niveau mitochondrial. Une situation similaire a été décrite pour le gène *COX3*, encodant une sous-unité de la cytochrome c oxydase. Mitochondrial chez la plupart des eucaryotes connus, il est localisé dans le génome nucléaire chez *Chlamydomonas reinhardtii* et *Polytomella sp.* (Pérez-Martínez *et al.*, 2000). Ici aussi, la protéine a subi des modifications affectant son hydrophobicité après le transfert de son gène dans le noyau (Pérez-Martínez *et al.*, 2000).

Nous avons souhaité tenter une relocalisation artificielle de ces deux gènes, mitochondriaux chez *Saccharomyces cerevisiae* et savoir si les fonds génétiques SUP, sélectionnés pour l'amélioration de l'expression allotopique de la sous-unité Atp9p, pouvaient également influencer l'expression des gènes *ATP6* et *COX3* depuis le noyau.

5.2 Les effets des mutations SUP sur les constructions nucléaires du gène *ATP6*

5.2.1 Transfert des génomes mitochondriaux $\Delta atp6 :: ARG8^m$ dans les souches à fonds SUP

Les souches SUP avec un génome mitochondrial $\Delta atp6 :: ARG8^m$ ont été obtenues en suivant la méthode décrite en section 4.1 page 216. Ces souches ont été nommées AMY123 pour la souche de type DFS160 α $\Delta atp6 :: ARG8^m$, et AMY133, AMY134 et AMY135 pour respectivement les fonds SUP1, SUP2 et SUP3 $\Delta atp6 :: ARG8^m$. La souche MR10 (fond WT + $\Delta atp6 :: ARG8^m$) utilisée pour réaliser ces constructions avait déjà été construite dans notre laboratoire (Rak *et al.*, 2007).

5.2.2 Modifications du gène *ATP6*

Les séquences protéiques des constructions utilisées ont été conçues (puis fournies par la suite) par Diego GONZALEZ-HALPHEN. Elles ont été traitées avec le logiciel GENE DESIGNER de la société DNA2.0. Les schémas des constructions sont montrés en figure III.5.1 page suivante. La séquence de la protéine Atp6p de *Chlamydomonas reinhardtii* a été utilisée pour la première construction, mais la MTS a été remplacée par celle de la protéine mitochondriale Oxa1p de *Saccharomyces cerevisiae*. Je désignerai cette construction par ScOXAI^{MTS}-CrATP6. La séquence native de la protéine Atp6p mitochondriale de *Saccharomyces cerevisiae* a également été utilisée, également fusionnée à la MTS de Oxa1p. Je l'appellerai ScOXAI^{MTS}-ScATP6-Nuc. Une dernière construction a été conçue, une protéine hybride contenant la première TMH de *Chlamydomonas reinhardtii* et le reste de la protéine de *Saccharomyces cerevisiae* (ScOXAI^{MTS}-ATP6-Hyb). Ces trois constructions ont été clonées dans le vecteur pCM189.

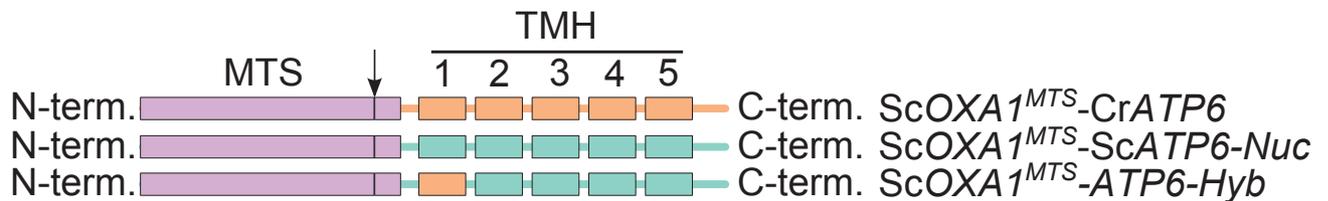


FIGURE III.5.1: Différentes constructions du gène *ATP6* ont été utilisées

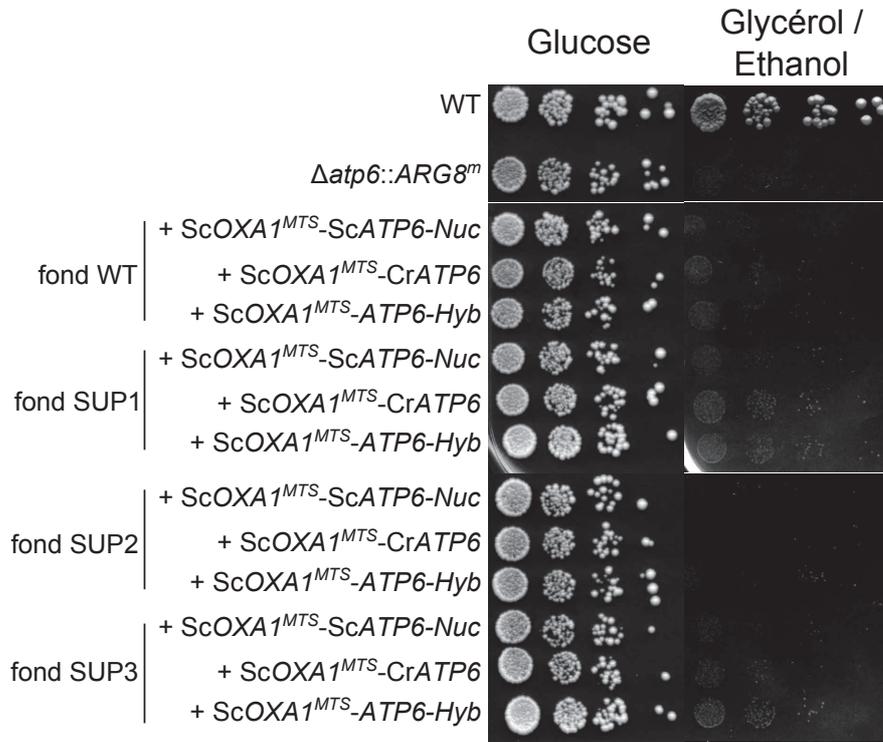
Schéma des différents gènes *ATP6* nucléaires utilisés. La préséquence d'adressage mitochondrial (MTS) utilisée est celle de la protéine *Oxa1p* de levure (en bleu). Le site de clivage est indiqué par une flèche. Les protéines *Atp6p* natives de *Saccharomyces cerevisiae* (*ScOXA1^{MTS}-ScATP6-Nuc*, en vert) et *Chlamydomonas reinhardtii* (*ScOXA1^{MTS}-CrATP6*, en orange) sont fusionnées à la MTS de la protéine *Oxa1p* de levure (la MTS de la protéine native de *Chlamydomonas reinhardtii* a été remplacée). La protéine hybride encodée par le gène *ScOXA1^{MTS}-ATP6-Hyb* correspond à la protéine encodée par *ScOXA1^{MTS}-ScATP6-Nuc* dont la première traverse a été remplacée par celle de *Chlamydomonas reinhardtii*.

5.2.3 Phénotype de croissance

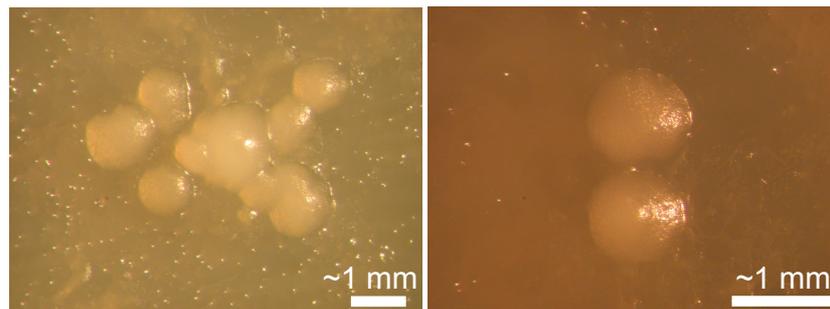
Les différentes souches $\Delta atp6 :: ARG8^m$ ont été ensuite transformées avec les gènes *ATP6* nucléaires. Les noms des souches correspondantes sont :

- fond WT + $\Delta atp6 :: ARG8^m$ +
 - *ScOXA1^{MTS}-CrATP6* = AMY241
 - *ScOXA1^{MTS}-ScATP6-Nuc* = AMY242
 - *ScOXA1^{MTS}-ATP6-Hyb* = AMY240
- fond SUP1 + $\Delta atp6 :: ARG8^m$ +
 - *ScOXA1^{MTS}-CrATP6* = AMY244
 - *ScOXA1^{MTS}-ScATP6-Nuc* = AMY245
 - *ScOXA1^{MTS}-ATP6-Hyb* = AMY243
- fond SUP2 + $\Delta atp6 :: ARG8^m$ +
 - *ScOXA1^{MTS}-CrATP6* = AMY247
 - *ScOXA1^{MTS}-ScATP6-Nuc* = AMY248
 - *ScOXA1^{MTS}-ATP6-Hyb* = AMY246
- fond SUP3 + $\Delta atp6 :: ARG8^m$ +
 - *ScOXA1^{MTS}-CrATP6* = AMY250
 - *ScOXA1^{MTS}-ScATP6-Nuc* = AMY251
 - *ScOXA1^{MTS}-ATP6-Hyb* = AMY249

Les phénotypes de croissance de ces souches sont présentés en figure III.5.2(a) page suivante. Toutes sont incapables de croître en milieu respiratoire, aussi bien celles avec un fond nucléaire sauvage que SUP. Les mutations SUP ne sont pas actives sur ces constructions, du moins sur leur fonctionnalité. Quelques clones à croissance abortive sur milieu respiratoire sont apparus (figure III.5.2(b) page suivante), indépendamment du gène *ATP6* et du fond génétique WT ou SUP utilisés. Ces clones ne dépassent pas le millimètre de diamètre, même après plusieurs semaines de culture, et n'ont pas donné naissance à des clones secondaires ayant une meilleure croissance. Ces données semblent indiquer que soit les contextes génétiques ne sont pas compatibles avec la relocalisation du gène *ATP6* chez *Saccharomyces cerevisiae*, soit les protéines *Atp6p* utilisées ne sont pas suffisamment modifiées pour être exprimées fonctionnellement depuis le noyau.



(a) Phénotype de croissance des souches



(b) Apparition de clones à croissance abortive

FIGURE III.5.2: Les constructions du gène *ATP6* ne complètent pas la délétion de la version mitochondriale

(a) Photographie d'un test en gouttes des souches WT (MR6), $\Delta atp6::ARG8^m$ (MR10), $\Delta atp6::ARG8^m$ + ScOX1^{MTS}-ScATP6-Nuc (AMY242) ou + ScOX1^{MTS}-CrATP6 (AMY241) ou + ScOX1^{MTS}-ATP6-Hyb (AMY240), fond SUP1 $\Delta atp6::ARG8^m$ + ScOX1^{MTS}-ScATP6-Nuc (AMY245) ou + ScOX1^{MTS}-CrATP6 (AMY244) ou + ScOX1^{MTS}-ATP6-Hyb (AMY243), fond SUP2 $\Delta atp6::ARG8^m$ + ScOX1^{MTS}-ScATP6-Nuc (AMY248) ou + ScOX1^{MTS}-CrATP6 (AMY247) ou + ScOX1^{MTS}-ATP6-Hyb (AMY246), fond SUP3 $\Delta atp6::ARG8^m$ + ScOX1^{MTS}-ScATP6-Nuc (AMY251) ou + ScOX1^{MTS}-CrATP6 (AMY250) ou + ScOX1^{MTS}-ATP6-Hyb (AMY249). Les souches ont été déposées sur milieu fermentescible riche YPGA (glucose) et sur milieu respiratoire riche YPEG (glycérol/éthanol) et incubées respectivement 3 et 6-25 jours à 28 °C. Les différentes constructions du gène *ATP6* utilisées et exprimées à partir du noyau ne peuvent compléter la délétion de la version mitochondriale du gène. Les différents fonds SUP n'affectent pas le phénotype obtenu.

(b) Photographies de clones abortifs obtenus dans les différents fonds génétiques utilisés. Un tapis de 10⁸ cellules (cultivées en milieu fermentescible synthétique (CSM-UR) 3 jours à 28 °C) a été déposé sur milieu respiratoire riche YPEG. Après 15 à 20 jours d'incubation à 28 °C, des clones à croissance abortive peuvent apparaître. L'apparition de ces clones n'est pas dépendante du contexte génétique nucléaire ni de la construction utilisée. Les clones montrés ici sont ceux obtenus à partir de la souche fond WT $\Delta atp6::ARG8^m$ + ScOX1^{MTS}-ScATP6-Nuc. Une échelle de taille est indiquée sur chaque photographie.

J'ai réalisé un fractionnement cellulaire sur la souche fond WT + $\Delta atp6 :: ARG8^m$ + ScOXA1^{MTS}-ScATP6-Nuc. Les protéines que j'ai ainsi extraites ont ensuite été séparées sur gel dénaturant, et analysées par Western blot. Le résultat, présenté en figure III.5.3, montre que la protéine ScOxa1p^{MTS}-ScAtp6p-Nuc est présente sous forme non maturée, et à l'état de traces exclusivement dans la fraction mitochondriale. Il y a donc bien un adressage à la mitochondrie, mais la protéine ne semble pouvoir atteindre la matrice mitochondriale. La faible quantité détectée de la protéine laisse à penser qu'elle est peut-être en grande partie dégradée.

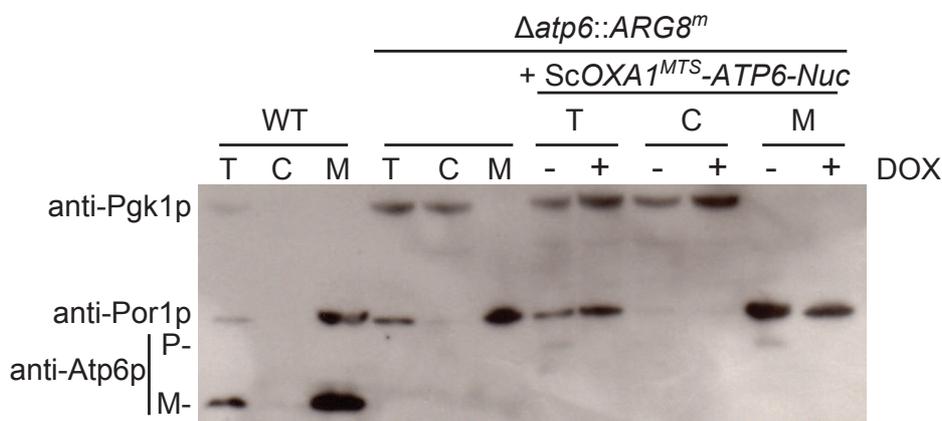


FIGURE III.5.3: Détection de protéines extraites par fractionnement cellulaire de la souche $\Delta atp6 :: arg8^m$ + ScOXA1^{MTS}-ScATP6-Nuc

Fractionnement cellulaire des souches WT (MR6), $\Delta atp6 :: ARG8^m$ (MR10), $\Delta atp6 :: ARG8^m$ + ScOXA1^{MTS}-ScATP6-Nuc (AMY242). Les mitochondries ont été préparées sur des cultures en phase exponentielle de croissance en milieu fermentescible synthétique (CSM-UR, complété en uracile pour la souche $\Delta atp6 :: ARG8^m$ et uracile + arginine pour la souche WT). Les cultures de la souche $\Delta atp6 :: ARG8^m$ + ScOXA1^{MTS}-ScATP6-Nuc ont été effectuées en présence (pistes +) ou en absence (pistes -) de doxycycline, qui éteint l'expression du gène. La protéine hybride précurseur (P) ou maturée (M) est détectable à l'aide de l'anticorps anti-Atp6p de levure. Les protéines Por1p mitochondriale et Pgk1p cytosolique servent de contrôle de fractionnement. La protéine ScOxa1p^{MTS}-ScAtp6p-Nuc est associée à la fraction mitochondriale mais n'est pas maturée, comme c'est le cas pour la protéine $\gamma Atp9p$ -Nuc.

Cette situation étant similaire à celle observée pour la protéine $\gamma Atp9p$ -Nuc (figure III.1.2 page 127, nous avons décidé de tester l'expression du gène ScOXA1^{MTS}-ScATP6-Nuc dans une souche $\Delta yme1 :: KANMX4$, dépourvue de la protéase i-AAA protéase. La souche correspondante s'appelle AMY158, j'y ferai référence comme $\Delta atp6 \Delta yme1$ + ScOXA1^{MTS}-ScATP6-Nuc. Nous avons vu précédemment que la protéine Atp9p de levure, exprimée depuis le noyau, était en grande partie dégradée par cette protéase (voir section 1.2.2 page 118). Les extraits totaux de protéines préparés à partir de la souche AMY158 ont été séparés sur gel dénaturant. Les résultats de cette expérience sont présentés en figure III.5.4 page suivante.

En l'absence du complexe i-AAA protéase, la quantité de protéine ScOxa1p^{MTS}-ScAtp6p-Nuc détectée n'augmente pas. Il est possible que d'autres protéases dégradent la protéine ScOxa1p^{MTS}-ScAtp6p-Nuc exprimée depuis le noyau avant même son adressage à la mitochondrie.

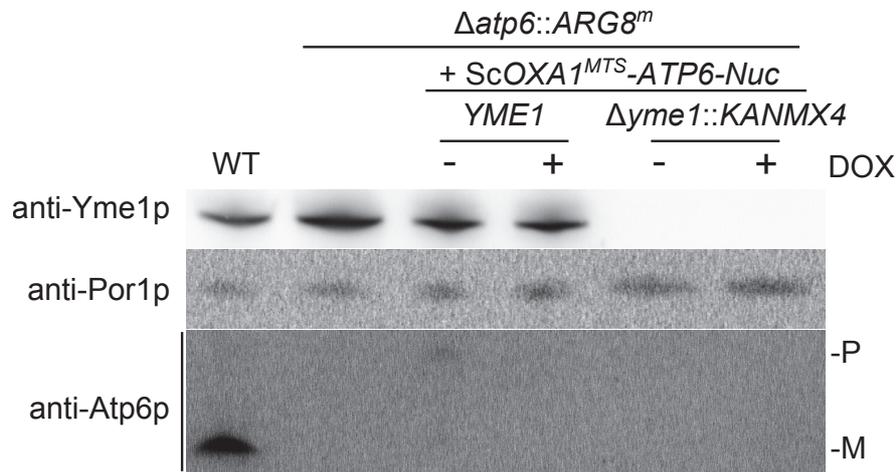


FIGURE III.5.4: Effet de la délétion du gène *YME1* sur l'accumulation de la protéine ScOXA1p^{MTS}-ScAtp6p-Nuc

Western blot réalisé sur les extraits protéiques totaux des souches WT (MR6), $\Delta atp6::ARG8^m$ (MR10), $\Delta atp6::ARG8^m + ScOXA1^{MTS}-ScATP6-Nuc$ (AMY242), $\Delta atp6 \Delta yme1 + ScOXA1^{MTS}-ScATP6-Nuc$ (AMY158). Les extraits protéiques ont été réalisés sur des souches en phase exponentielle de croissance en milieu fermentescible synthétique (CSM-UR, complété en uracile pour la souche $\Delta atp6::ARG8^m$ et uracile + arginine pour la souche WT). Certaines des cultures ont été effectuées en présence (pistes +) ou en absence (pistes -) de doxycycline, qui éteint l'expression du gène. La protéine hybride précurseur (P) ou maturée (M) est détectable à l'aide de l'anticorps anti-Atp6p de levure. La protéine Por1p mitochondriale sert de contrôle de charge. La délétion du gène *yme1*, et donc l'inactivation de la i-AAA protéase, n'affecte pas l'accumulation de la protéine ScOxa1p^{MTS}-ScAtp6p-Nuc, au contraire des résultats obtenus avec *yAtp9p-Nuc*.

5.3 Les effets des mutations SUP sur les constructions nucléaires du gène *COX3*

5.3.1 Transfert des génomes mitochondriaux $\Delta cox3::ARG8^m$ dans les souches à fond SUP

Les souches avec fond nucléaire de type sauvage ou SUP et génome mitochondrial $\Delta cox3::ARG8^m$ ont été obtenues en suivant la méthode décrite en 4.1 page 216. Ces souches ont été nommées AMY141 pour la souche de type DFS160 $\alpha \Delta cox3::ARG8^m$, et AMY152, AMY153, AMY154 et AMY155 pour respectivement les fonds WT, SUP1, SUP2 et SUP3 $\Delta cox3::ARG8^m$.

5.3.2 Modifications du gène *COX3*

Les séquences protéiques des constructions *COX3* utilisées ont été conçues (puis fournies par la suite) par Diego GONZALEZ-HALPHEN. Les gènes correspondant ont ensuite été définis avec le logiciel GENE DESIGNER de la société DNA2.0. Les schémas des constructions sont montrés en figure III.5.5 page suivante. La séquence de la protéine Cox3p de *Chlamydomonas reinhardtii* a été utilisée pour la première construction, mais la MTS a été remplacée par celle de la protéine mitochondriale Oxa1p de *Saccharomyces cerevisiae*. Je désignerai cette construction par ScOXA1^{MTS}-CrCOX3. La séquence native de la protéine Cox3p mitochondriale de *Saccharomyces cerevisiae* a également été utilisée en fusion à la MTS de Oxa1p. Je l'appellerai ScOXA1^{MTS}-ScCOX3-Nuc. Ces différentes constructions ont été clonées dans le vecteur pCM189. Les deux dernières constructions consistent en une protéine hybride contenant les traverses membranaires de *Polytomella sp.* et les boucles extra-membranaires de *Saccharomyces cerevisiae*.

Cette protéine hybride a ensuite été fusionnée à la MTS de la protéine Oxa1p de levure dans la première construction (*ScOXAI^{MTS}-COX3-Hyb*), et à la MTS de la protéine Atp9p de *Neurospora crassa* dans la seconde (*NcATP9^{MTS}-COX3-Hyb*). Ces deux constructions nous ont été fournies par Diego GONZALEZ-HALPHEN déjà clonées dans un vecteur à origine de réplication de type 2 μ (pFL61). Une construction supplémentaire, contenant la séquence protéique Cox3p de *Polytomella sp.* et dont la MTS a été remplacée par celle de Oxa1p (gène *ScOXAI^{MTS}-PsCOX3*) a également été conçue, mais je n'ai pu la cloner dans un vecteur d'expression de levure dans le temps imparti.

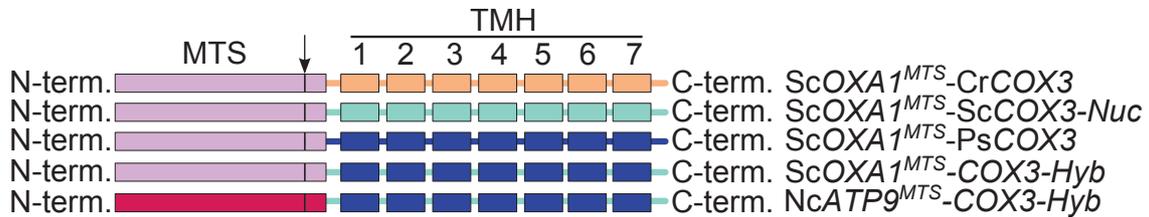


FIGURE III.5.5: Différentes constructions du gène *COX3* utilisées

*Schéma des différentes constructions du gène COX3 utilisé. Deux préséquences d'adressage mitochondrial (MTS) ont été utilisées : celle de la protéine Oxa1p de levure (en bleu clair) et celle de la protéine NcAtp9p de Neurospora crassa (en rouge). Le site de clivage est indiquée par une flèche. Les protéines Cox3p natives de Saccharomyces cerevisiae (*ScOXAI^{MTS}-ScCOX3-Nuc*, en vert), Chlamydomonas reinhardtii (*ScOXAI^{MTS}-CrCOX3*, en orange) et de Polytomella sp. (*ScOXAI^{MTS}-PsCOX3*, en bleu foncé) ont été fusionnées à la MTS de la protéine Oxa1p de levure (la MTS des protéines de Chlamydomonas reinhardtii et Polytomella sp. ont été remplacées). Deux protéines hybrides encodées par les gènes *ScOXAI^{MTS}-COX3-Hyb* et *NcATP9^{MTS}-COX3-Hyb* correspondent à la protéine encodée par *ScOXAI^{MTS}-ScCOX3-Nuc* dont l'ensemble des traverses a été remplacé par celles de Polytomella sp..*

5.3.3 Phénotype de croissance

Les différentes souches $\Delta cox3 :: ARG8^m$ ont été ensuite transformées avec différents gènes *COX3* nucléaires. Les noms des souches correspondantes sont :

- fond WT + $\Delta cox3 :: ARG8^m$ +
 - *ScOXAI^{MTS}-CrCOX3* = AMY299
 - *ScOXAI^{MTS}-ScCOX3-Nuc* = AMY300
 - *ScOXAI^{MTS}-COX3-Hyb* = AMY270
 - *NcATP9^{MTS}-COX3-Hyb* = AMY269
- fond SUP1 + $\Delta cox3 :: ARG8^m$ +
 - *ScOXAI^{MTS}-CrCOX3* = AMY301
 - *ScOXAI^{MTS}-ScCOX3-Nuc* = AMY302
 - *ScOXAI^{MTS}-COX3-Hyb* = AMY273
 - *NcATP9^{MTS}-COX3-Hyb* = AMY272
- fond SUP2 + $\Delta cox3 :: ARG8^m$ +
 - *ScOXAI^{MTS}-CrCOX3* = AMY303
 - *ScOXAI^{MTS}-ScCOX3-Nuc* = AMY304
 - *ScOXAI^{MTS}-COX3-Hyb* = AMY276
 - *NcATP9^{MTS}-COX3-Hyb* = AMY275
- fond SUP3 + $\Delta cox3 :: ARG8^m$ +
 - *ScOXAI^{MTS}-CrCOX3* = AMY305
 - *ScOXAI^{MTS}-ScCOX3-Nuc* = AMY306
 - *ScOXAI^{MTS}-COX3-Hyb* = AMY279
 - *NcATP9^{MTS}-COX3-Hyb* = AMY278

Les phénotypes de croissance sont présentés en figure III.5.6 page ci-contre. Toutes les souches exprimant les gènes *COX3* relocalisés au noyau sont incapables de croître en milieu respiratoire. Les mutations SUP ne sont pas actives sur ces constructions. Ces données semblent indiquer que soit les contextes génétiques ne sont pas compatibles avec la relocalisation du gène *COX3* chez *Saccharomyces cerevisiae*, soit que les gènes *COX3* utilisés ne sont pas suffisamment adaptés pour une expression depuis le noyau.

5.3.4 Accumulation de la protéine Cox3p

J'ai également réalisé des extraits de protéines totaux sur les souches à fond nucléaire sauvage exprimant la protéine hybride NcAtp9p^{MTS}-Cox3p-Hyb ou ScOxa1p^{MTS}-Cox3p-Hyb. Les résultats de cette expérience sont présentés en figure III.5.7 page 230. Pour la souche sauvage WT, un signal spécifique est détecté avec l'anticorps anti-Cox3p de levure. Aucun signal n'a été détecté avec les constructions *COX3* hybrides, hormis un bruit de fond dont nous ne savons pas à quoi il correspond. Il est possible que l'anticorps anti-Cox3p utilisé ne puisse reconnaître la protéine hybride, les modifications entraînant un masquage ou une disparition de l'épitope de reconnaissance. Il est également possible que les protéines Cox3p-Hyb s'agrègent dans la cellule, rendant leur identification difficile, ou bien qu'elles soient dégradées dans la cellule.

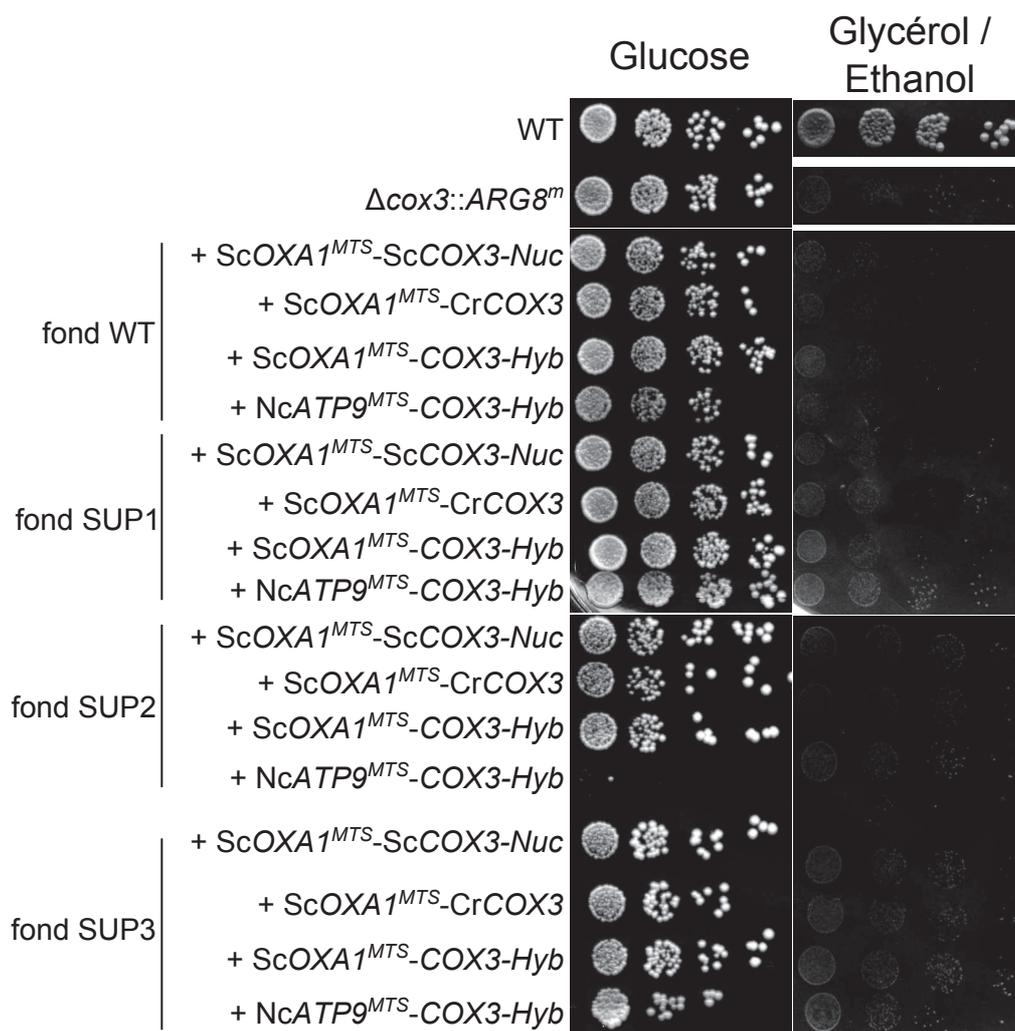


FIGURE III.5.6: Les constructions *COX3* utilisées ne complètent pas la délétion de la version mitochondriale

Photographie d'un test en gouttes des souches WT (MR6), $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$ (AMY152), $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$ + ScOXA1^{MTS}-ScCOX3-Nuc (AMY300) ou + ScOXA1^{MTS}-CrCOX3 (AMY299) ou + ScOXA1^{MTS}-COX3-Hyb (AMY270) ou + NcATP9^{MTS}-COX3-Hyb (AMY269), fond SUP1 $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$ + ScOXA1^{MTS}-ScCOX3-Nuc (AMY302) ou + ScOXA1^{MTS}-CrCOX3 (AMY301) ou + ScOXA1^{MTS}-COX3-Hyb (AMY273) ou + NcATP9^{MTS}-COX3-Hyb (AMY272), fond SUP2 $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$ + ScOXA1^{MTS}-ScCOX3-Nuc (AMY304) ou + ScOXA1^{MTS}-CrCOX3 (AMY303) ou + ScOXA1^{MTS}-COX3-Hyb (AMY276) ou + NcATP9^{MTS}-COX3-Hyb (AMY275), fond SUP3 $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$ + ScOXA1^{MTS}-ScCOX3-Nuc (AMY306) ou + ScOXA1^{MTS}-CrCOX3 (AMY305) ou + ScOXA1^{MTS}-COX3-Hyb (AMY279) ou + NcATP9^{MTS}-COX3-Hyb (AMY278). Les souches ont été déposées sur milieu fermentescible riche YPGA (glucose) et sur milieu respiratoire riche YPEG (glycérol / éthanol) et incubées respectivement 3 et 6-25 jours à 28 °C. Les différentes constructions du gène COX3 utilisées et exprimées à partir du noyau ne peuvent compléter la délétion de la version mitochondriale du gène. Les différents fonds SUP n'affectent pas le phénotype obtenu. Soit les mutations ne sont pas actives sur ces constructions, soit ces dernières ne sont pas fonctionnelles.

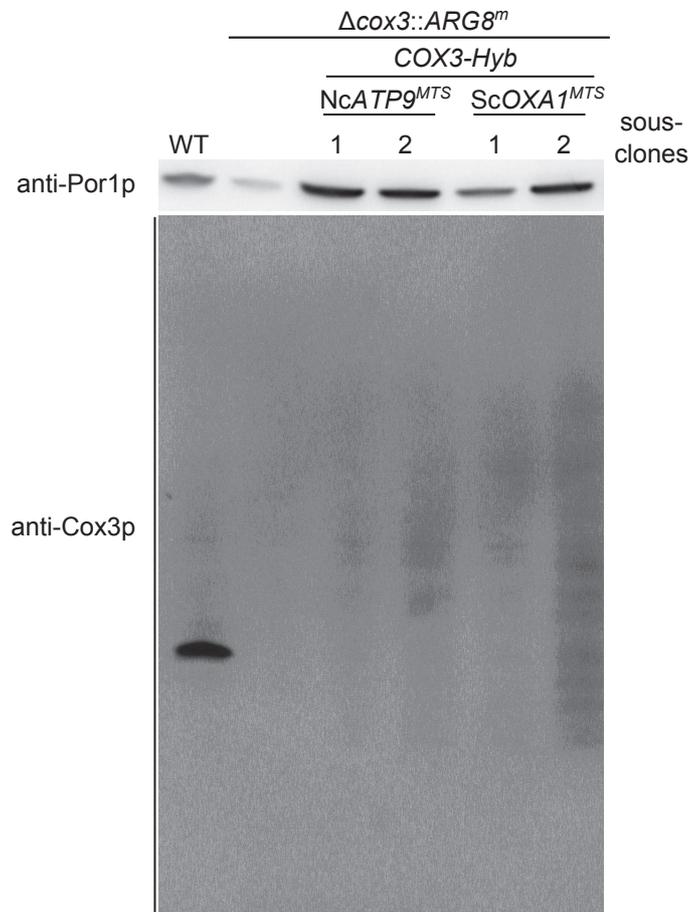


FIGURE III.5.7: La protéine Cox3p-Hyb exprimée à partir du noyau n'est pas correctement accumulée

Western blot réalisé sur les extraits protéiques totaux des souches WT (MR6), $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$ (AMY152), $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m + \text{ScOXA1}^{\text{MTS}}\text{-COX3-Hyb}$ (AMY270), $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m + \text{NcATP9}^{\text{MTS}}\text{-COX3-Hyb}$ (AMY269). Les extraits protéiques ont été réalisés sur des souches en phase exponentielle de croissance en milieu fermentescible synthétique (CSM-UR, complémenté en uracile pour la souche $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m$ et uracile + arginine pour la souche WT). 2 sous clones ont été testés pour les souches $\Delta\text{cox3}::\text{ARG8}^m + \text{COX3-Hyb}$. La protéine Por1p mitochondriale sert de contrôle de charge. L'anticorps anti-Cox3p utilisé ne permet pas de détecter nettement les protéines Cox3p-Hyb utilisées ici.

Quatrième partie

Discussion

L'évolution du génome mitochondrial : un génome procaryote devenu mitochondrial

Durant mes trois années de thèse, j'ai étudié l'évolution du génome mitochondrial au travers de la relocalisation expérimentale de ses gènes vers le génome nucléaire. Le travail réalisé a permis de montrer que différents facteurs sont nécessaires à la relocalisation du gène mitochondrial *ATP9* chez *Saccharomyces cerevisiae*, et que certaines de ces adaptations permettent aussi d'améliorer l'expression du gène *COX2* depuis le génome nucléaire. Ces résultats apportent un éclairage nouveau sur l'évolution du génome mitochondrial.

Une petite partie des nombreuses protéines impliquées dans la production énergétique cellulaire, via le processus des oxydations phosphorylantes, est encodée au sein des mitochondries (Foury *et al.*, 1998). Si l'on observe la localisation de leurs gènes dans l'ensemble des espèces eucaryotes connues, on s'aperçoit que – mis à part deux d'entre eux, les gènes encodant le cytochrome b et la sous-unité Cox1p de la cytochrome c oxydase – chacun d'eux a pu être entièrement relocalisé naturellement vers le génome nucléaire chez certaines espèces (Pérez-Martínez *et al.*, 2000; Daley *et al.*, 2002; Funes *et al.*, 2002; Dequard-Chablat *et al.*, 2011).

La question principale à laquelle s'intéresse ce travail est de savoir quelles sont les forces sous-jacentes au maintien de ces gènes dans l'organite ou à leur transfert dans le noyau. J'ai décrit dans cette thèse des expériences de relocalisation artificielle de quatre de ces gènes ayant une distribution variable au sein des eucaryotes, les gènes *ATP9* et *ATP6* (Figuroa-Martínez *et al.*, 2011), encodant des sous-unités du secteur F_0 de l'ATP synthase, et les sous-unités Cox2p (Supekova *et al.*, 2010) et Cox3p (Figuroa-Martínez *et al.*, 2011) de la cytochrome c oxydase.

Le génome procaryote à l'origine des mitochondries (Andersson *et al.*, 1998) était sans doute un génome entier permettant à l'endosymbiote initial une vie en dehors de l'hôte protoeucaryote. Après la symbiose originelle, de nombreuses modifications ont eu lieu et ont produit les génomes mitochondriaux actuels (Lang *et al.*, 1999). Cette évolution a eu pour principale conséquence la réduction de la quantité d'information génétique encodée dans ces génomes, qui contiennent à l'heure actuelle deux types de gènes : ceux impliqués dans la maintenance, l'intégrité et l'expression du génome mitochondrial, et ceux impliqués dans la production énergétique mitochondriale (Foury *et al.*, 1998). Plus de 1 000 protéines composent le protéome des mitochondries, et moins d'une vingtaine sont encodées dans leur génome. Même si l'on considère qu'une fraction des protéines encodées dans le génome nucléaire provient du génome proto-eucaryotique ancestral, ou ont été générées au cours de l'évolution des cellules eucaryotes, au moins une partie est issue de la relocalisation de matériel génétique procaryotique du symbiote originel vers le génome nucléaire hôte.

Pourquoi les gènes mitochondriaux actuels n'ont-ils pas été transférés vers le génome nucléaire ?

Plusieurs hypothèses, non exclusives, ont été avancées pour répondre à cette question. Tout d'abord, l'évolution est un phénomène continu (Palmer, 1997). Les espèces observées aujourd'hui

d'hui ne constituent qu'un "instantané", une "photographie" des diverses possibilités obtenues au cours de l'évolution de notre biosphère. Il est possible qu'un jour, des cellules eucaryotes ayant transféré l'ensemble de leurs gènes mitochondriaux vers le noyau puissent être observées. Une autre hypothèse, celle du piégeage des gènes mitochondriaux au noyau, implique que certains gènes mitochondriaux ne pourraient être relocalisés fonctionnellement, ou seulement très difficilement (de Grey, 2005). En effet, la majorité des protéines codées par des gènes mitochondriaux sont des protéines hydrophobes qu'il peut être difficile d'importer dans l'organite depuis le cytoplasme.

D'autres difficultés peuvent être évoquées. En effet, le code génétique nucléaire des eucaryotes, le code standard montré en figure IV.1.1 page ci-contre, diffère de celui des mitochondries (Sammet *et al.*, 2010). Bien que peu nombreuses, ces différences de code génétique peuvent perturber l'expression éventuelle des gènes mitochondriaux fraîchement relocalisés. Par exemple, un codon tryptophane dans les mitochondries (UGA) est traduit en codon stop dans le génome nucléaire de *Saccharomyces cerevisiae*, ce qui équivaldrait à une mutation non-sens. Ces différences de "langage" entre les deux compartiments représentent aujourd'hui la première barrière prévenant la relocalisation fonctionnelle des gènes (de Grey, 2005). Cependant, cette barrière n'est pas seule responsable de la rétention d'ADN dans les mitochondries. En effet, ces différences de codes génétiques ne sont pas présentes chez certaines espèces comme *Schizosaccharomyces pombe* (Lang *et al.*, 1985), qui possède un génome mitochondrial à contenu informatif proche de celui de *Saccharomyces cerevisiae*.

De plus, il est nécessaire pour les protéines mitochondriales synthétisées dans le cytosol d'être correctement adressées à la mitochondrie. Les gènes fraîchement relocalisés ne possédant pas de telle structure, il leur est alors nécessaire d'en acquérir une. Cette modification importante n'est pas forcément difficile à effectuer, la structure des préséquences d'adressage mitochondrial n'étant ni complexe ni structurellement précise (Habib *et al.*, 2007). De plus, de nombreux gènes nucléaires encodent des protéines mitochondriales, la copie de leur préséquence pourrait aisément contourner ce problème.

Il a été suggéré que certains gènes, plutôt que d'être piégés dans l'organite, aient pu être retenus préférentiellement dans les mitochondries. C'est l'hypothèse CORR (pour *Co-localization for Redox Regulation* ou co-localisation pour une régulation RedOx) (de Grey, 2005). Celle-ci postule que la rétention de certains gènes mitochondriaux serait utile pour la mise en place de régulations permettant une réponse plus rapide à certains stress métaboliques comme la production d'espèces réactives de l'oxygène.

Un organisme modèle bien adapté à l'étude de ces questions est la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Il s'agit en effet d'un organisme aérobic facultatif chez lequel il est possible de modifier les génomes nucléaire et mitochondrial (Bonney et Fox, 2001). Ceci permet de tester facilement la capacité d'un gène mitochondrial à être exprimé depuis le noyau. Dans un premier temps, le gène mitochondrial est inactivé par mutation, puis une version nucléaire de ce gène est testée pour sa capacité à restaurer la fonction respiratoire. Cette démarche a été utilisée avec succès dans le cas du gène *ATP8* (Nagley *et al.*, 1988; Oca-Cossio *et al.*, 2003) codant pour une protéine hydrophobe à une traverse membranaire. Une expression fonctionnelle du gène *COX2* depuis le noyau a pu être obtenue après remplacement d'un résidu tryptophane par un arginine dans la première de ses deux traverses transmembranaires (Supekova *et al.*, 2010), mais la souche de levure ainsi modifiée montre une très faible croissance sur substrats respiratoires. Les expérimentations de relocalisation artificielle de la protéine cytochrome b, une protéine très hydrophobe à huit traverses transmembranaires, ont échoué jusqu'à présent (Claros *et al.*, 1995, 1996), indiquant que le gène encodant cette protéine est

peut-être extrêmement difficile, sinon impossible, à relocaliser de la mitochondrie vers le génome nucléaire.

		2. nucleotide				
		U	C	A	G	
1. nucleotide U	UUU } F	UCU } S	UAU } Y	UGU } C	3. nucleotide U C A G	
	UUC } F	UCC } S	UAC } Y	UGC } C		
	UUA } L	UCA } S	UAA St, Q ₆	UGA St, W _{1,2,3,4,5}		
	UUG } L	UCG } S	UAG St, Q ₆	UGG W		
C	CUU } L, T ₅	CCU } P	CAU } H	CGU } R	U C A G	
	CUC } L, T ₅	CCC } P	CAC } H	CGC } R		
	CUA } L, T ₅ , S ₇	CCA } P	CAA } Q	CGA } R		
	CUG } L, T ₅ , S ₇	CCG } P	CAG } Q	CGG } R		
A	AUU } I	ACU } T	AAU } N	AGU } S	U C A G	
	AUC } I	ACC } T	AAC } N	AGC } S		
	AUA I, M _{2,3,4,5}	ACA } T	AAA K, N ₁	AGA } R, S _{1,2} , G ₃ , St ₄		
	AUG M	ACG } T	AAG K	AGG } R, S _{1,2} , G ₃ , St ₄		
G	GUU } V	GCU } A	GAU } D	GGU } G	U C A G	
	GUC } V	GCC } A	GAC } D	GGC } G		
	GUA } V	GCA } A	GAA } E	GGA } G		
	GUG } V	GCG } A	GAG } E	GGG } G		

FIGURE IV.1.1: Le code génétique mitochondrial diffère du code génétique standard (Sammet *et al.*, 2010)

Le code génétique standard et ses variantes naturelles, écrits en code ARN et utilisant les abréviations standard pour les acides aminés (St : Codon Stop). Les variations du code, la nomenclature ainsi que la numérotation sont celles utilisées par la base de données NCBI. Une description plus détaillée des différents codes, avec références, peut être retrouvée sur la page web correspondante (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Utils/wprintgc.cgi>). Le code génétique standard est en noir; les variantes suivent le code couleur suivant : (1, bleu) : code mitochondrial des échinodermes et vers plats (Asterozoa, Echinozoa, et Rhabditophora); (2, orange) : code génétique mitochondrial des invertébrés (Nematoda, Mollusca, Crustacea, Insecta); (3, magenta) : code mitochondrial des ascidies (Urochordata); (4, vert) : code génétique mitochondrial des vertébrés (Vertebrata); (5, cyan) : code génétique mitochondrial des levures (*Saccharomyces cerevisiae*, *Candida glabrata*, *Hansenula saturnus*, *Kluyveromyces thermotolerans*); (6, jaune) : code nucléaire des ciliés, dasycladacées et Hexamita (Ciliata, Dasycladaceae, Diplomonadida); (7, rouge) : code génétique nucléaire alternatif des levures (*Candida albicans*)

La relocalisation fonctionnelle du gène *ATP9* nécessite de nombreuses adaptations chez *Saccharomyces cerevisiae*

Dans ce travail, j'ai testé la capacité du gène *ATP9* à être exprimé depuis le noyau chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. La protéine codée par ce gène ne possède que deux traverses transmembranaires. Cependant cette protéine est extrêmement hydrophobe et est classifiée comme un protéolipide, car elle peut être efficacement extraite avec des solvants organiques. Bien que majoritairement mitochondrial, le gène *ATP9* est retrouvé dans le noyau de certains champignons filamenteux ascomycètes et chez la plupart des métazoaires. Nous avons montré que ce gène avait été relocalisé à plusieurs reprises dans le règne des Fungi, donnant lieu à cinq types de distributions entre génomes nucléaires et mitochondriaux chez ce groupe d'organismes (Dequard-Chablat *et al.*, 2011). Il n'y a donc pas de barrière insurmontable à la relocalisation de ce gène au noyau.

Toutefois, est-il aisé d'exprimer la sous-unité Atp9p depuis le noyau et que signifie cette forte diversité de localisations génomiques : est-elle le produit du hasard ou le reflet de forces sous-tendant l'évolution des eucaryotes ?

Dans un premier temps, nous avons réalisé la délétion du gène *ATP9* mitochondrial de levure qui, comme prévu, entraîne une incapacité de croître sur milieu respiratoire. Nous avons ensuite introduit une version modifiée du gène *ATP9* de levure. Les modifications apportées permettent de pallier les différences de code génétique, et la préséquence d'adressage choisie est fonctionnelle chez la levure. Ces modifications n'ont pas suffi, la construction utilisée n'est pas fonctionnelle. La protéine synthétisée dans le cytosol n'est pas importée dans la matrice mitochondriale, aucune forme maturée (préséquence retirée) n'est détectée. Cette protéine précurseur est dégradée dans l'espace inter-membranaire par la i-AAA protéase, dont le site catalytique est orienté vers ce sous-compartiment.

Dans une deuxième série d'expérimentations, nous avons testé des isoformes naturellement nucléaires du gène *ATP9* provenant de *Podospora anserina*. Ces gènes ont déjà subi toutes les modifications nécessaires à leur expression à partir du noyau dans cette espèce. Nous avons donc envisagé la possibilité que ces mutations permettent également une expression fonctionnelle de ces gènes chez *Saccharomyces cerevisiae*. L'introduction de ces gènes dans une souche de levure dépourvue de sa version mitochondriale du gène *ATP9* a permis de restaurer la fonction respiratoire. La croissance respiratoire résultante est moins rapide que celle du type sauvage, et l'expression de ces gènes entraîne l'apparition de phénotypes cellulaires anormaux, qui semblent provenir d'un défaut de séparation des cellules. La caractérisation biochimique de ces souches a montré un rendement en assemblage des ATP synthases diminué de 30 à 40 % par rapport au type sauvage, mais les ATP synthases hybrides ont une bonne efficacité catalytique. Une fois assemblées, les sous-unités Atp9p de *Podospora anserina* sont donc capables de remplacer efficacement la protéine de levure au sein du complexe ATP synthase.

Deux conclusions peuvent être tirées de cette expérimentation. Tout d'abord, rien n'empêche la relocalisation du gène *ATP9* dans la levure de boulanger *Saccharomyces cerevisiae*. Les modifications apportées par l'évolution aux sous-unités PaAtp9p de *Podospora anserina* sont suffisantes, même chez la levure, pour établir une relocalisation fonctionnelle. Toutefois ces modifications ne sont pas suffisantes pour avoir une expression optimale de cette protéine depuis le noyau, indiquant que d'autres adaptations sont nécessaires.

Nous avons alors tenté de trouver quelles différences dans la structure d'Atp9p permettent la complémentation de la délétion du gène *ATP9* de levure. Des analyses *in silico* et des tests de résistance aux détergents ont montré qu'une différence d'hydrophobicité résidait entre les protéines de *Podospora anserina* et celle de *Saccharomyces cerevisiae*, plus particulièrement au niveau de la première traverse transmembranaire de la protéine.

Cette hypothèse a été confirmée par des expériences utilisant un gène chimérique contenant la MTS et la première traverse transmembranaire de la protéine théoriquement la moins hydrophobe de *Podospora anserina*, PaATP9-7, suivi de la boucle et la seconde traverse membranaire de la protéine Atp9p de *Saccharomyces cerevisiae*. Cette construction a permis à la protéine d'être importée dans la matrice mitochondriale, où elle peut être maturée par la protéase MPP. La diminution de l'hydrophobicité représente donc une étape importante dans la relocalisation du gène *ATP9*, comme montré sur le schéma IV.2.2 page suivante. Sans cette modification, la protéine Atp9p ne peut parvenir à son compartiment cible, et ne peut donc former l'oligomère d'Atp9p nécessaire à la formation du secteur F_0 de l'ATP synthase.

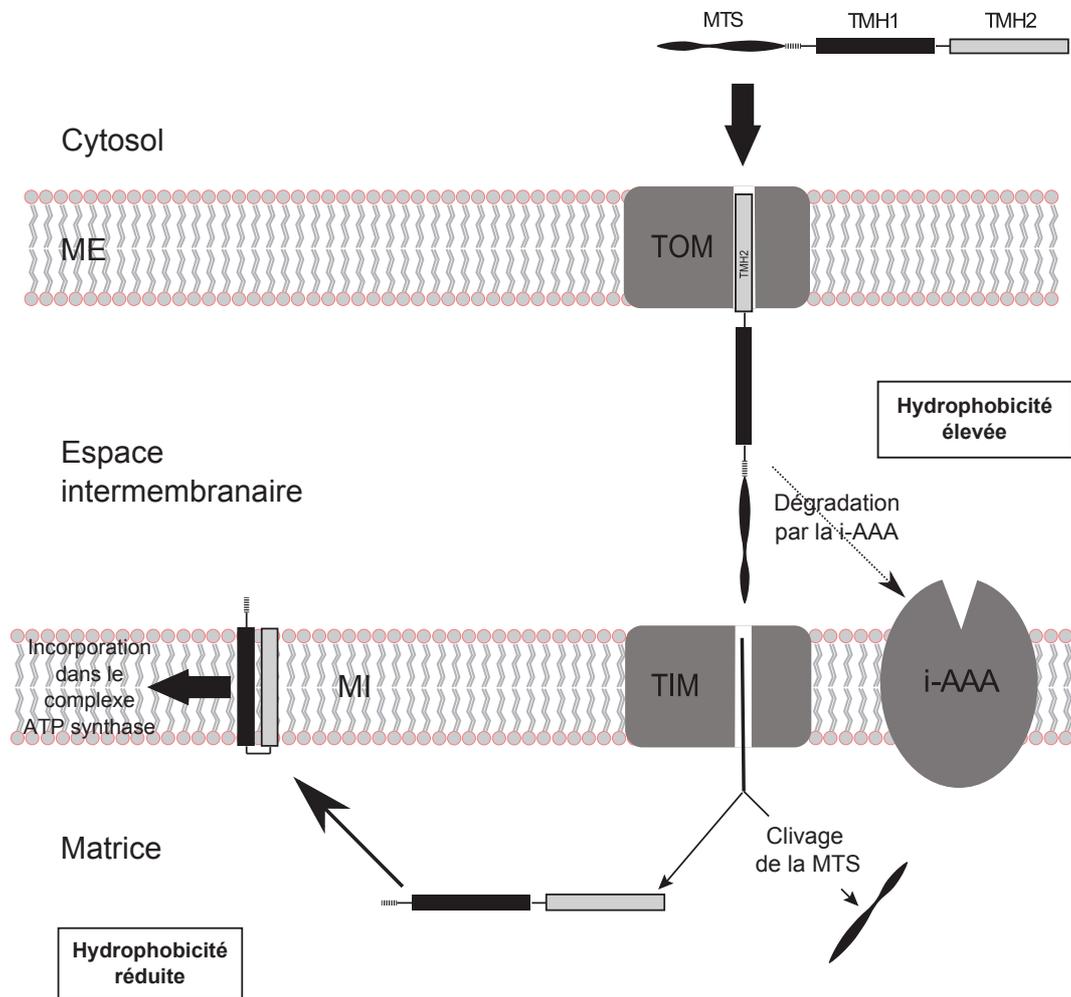


FIGURE IV.2.2: L'hydrophobicité est un facteur important dans la relocalisation du gène *ATP9* (Bietenhader *et al.*, 2012)

Représentation schématique de l'influence de la réduction de l'hydrophobicité de la sous-unité Atp9p sur son expression fonctionnelle depuis le génome nucléaire. Quand l'hydrophobicité de cette sous-unité est trop élevée, la protéine ne peut franchir la membrane interne mitochondriale (MI) et est dégradée dans l'espace intermembranaire par la i-AAA protéase. La réduction de son hydrophobicité permet à la sous-unité Atp9p de traverser la MI et d'être maturée par la MPP, d'être insérée de manière adéquate dans la MI, puis d'être éventuellement assemblée dans les complexes ATP synthases. OM : membrane mitochondriale externe ; MTS : préséquence d'adressage mitochondrial ; TMH : traverse transmembranaire ; TOM : translocase de la ME ; TIM : translocase de la MI.

Des mutations dans le génome nucléaire de *Saccharomyces cerevisiae* améliorent l'expression allotopique du gène *ATP9*

Les expériences décrites dans le chapitre précédent démontrent que la relocalisation du gène *ATP9* est possible chez *Saccharomyces cerevisiae*, mais qu'il est nécessaire de réduire l'hydrophobicité de la première traverse membranaire d'Atp9p. Cette situation rappelle celle de l'hypothèse du piégeage des gènes mitochondriaux évoquée précédemment, postulant que le produit inadapté des gènes relocalisés serait en partie la cause de leur rétention dans le génome mitochondrial. Comme démontré par l'évolution du gène *ATP9*, ce facteur n'empêche pas ce gène d'être fonctionnellement transféré au noyau. Cependant la situation obtenue expérimentalement semble être loin de l'optimum. La croissance sur milieu respiratoire des souches construites est inférieure à celle de la souche sauvage, et leur morphologie cellulaire aberrante laisse entrevoir des perturbations dans la cellule, causées par le nouveau gène nucléaire. Chez *Saccharomyces cerevisiae*, des adaptations supplémentaires sont donc nécessaires pour optimiser cette relocalisation du gène *ATP9*.

Des modifications supplémentaires sont nécessaires pour une relocalisation fonctionnelle optimale du gène *ATP9*

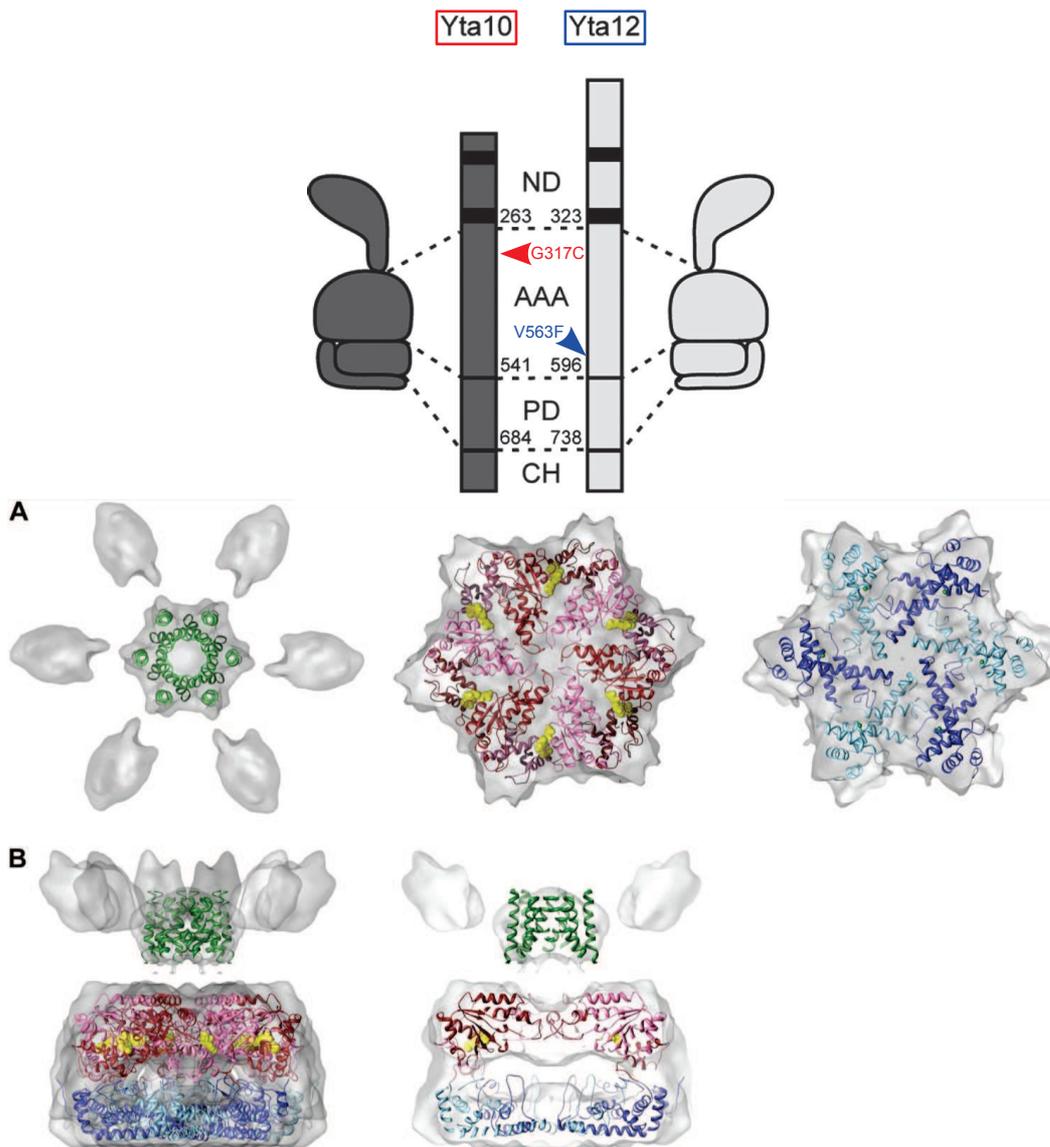
Les mutations SUP

Nous avons alors recherché de telles adaptations par sélection de mutations améliorant les propriétés de cellules de levure exprimant la sous-unité Atp9p depuis le noyau. Nous avons tout d'abord obtenu un clone ayant une croissance en milieu respiratoire améliorée puis, après plusieurs cycles de sélections en milieu respiratoire, nous avons obtenu à partir de ce clone primaire différents clones secondaires (nommés SUP) ayant une croissance respiratoire similaire à celle de la souche de levure sauvage, et présentant une morphologie cellulaire anormale. Ces mutations sont situées dans le génome nucléaire de *Saccharomyces cerevisiae*, et sont récessives. Cette situation est extrêmement intéressante, car elle pourrait amener à dégager des mécanismes impliqués dans l'adaptation de gènes mitochondriaux relocalisés dans le génome nucléaire. Nous avons séquencé entièrement quatre mutants SUP, ce qui a révélé une dizaine de gènes nucléaires susceptibles, par mutations, d'améliorer l'expression allotopique du gène *ATP9*. Des analyses ont permis de démontrer un tel effet pour plusieurs de ces mutations, comme discuté ci-après.

La m-AAA protéase

Une cible particulièrement intéressante des mutations SUP est la m-AAA protéase, complexe ancré dans la membrane mitochondriale interne. Cette protéase joue un rôle majeur dans le contrôle qualité des protéines mitochondriales (Koppen et Langer, 2007), notamment en dégradant celles qui n'ont pu atteindre leur conformation fonctionnelle ou celles ayant subi des

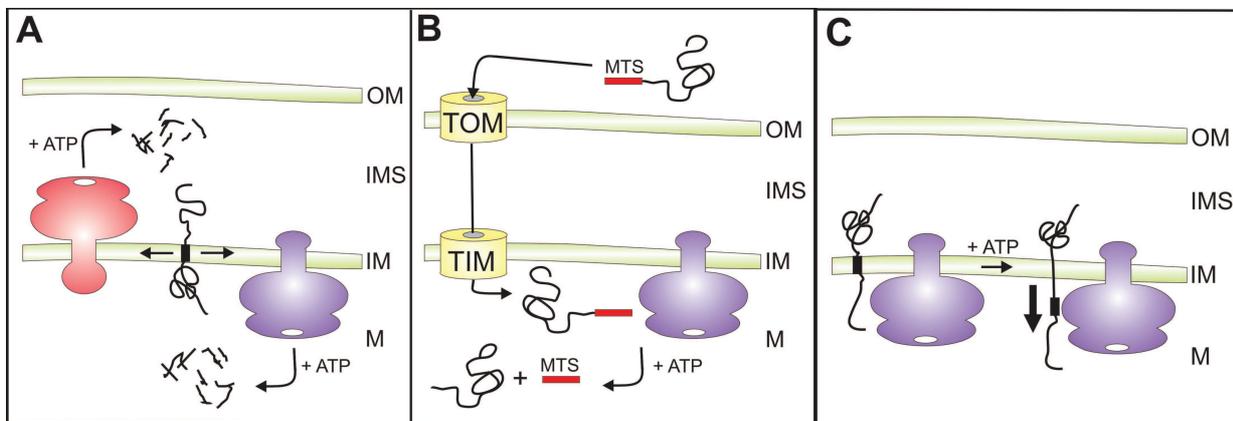
altérations, par exemple suite à un stress oxydatif. La m-AAA protéase est un complexe hétérohexamérique fait de deux sous-unités homologues encodées par les gènes *YTA10* (également appelé *AFG3*), et *YTA12* (aussi nommé *RCA1*) (Lee *et al.*, 2011). Ces deux sous-unités sont structurellement similaires, comme montré en figure IV.3.3(a) premier panneau. Elles contiennent deux domaines transmembranaires du côté N-terminal, un domaine métallopeptidase HExxH impliqué dans la dégradation protéique et un domaine ATPasique de type AAA (*ATPases Associated with various cellular Activities*) (Koppen et Langer, 2007; Lee *et al.*, 2011). Les domaines transmembranaires permettent l'ancrage du complexe dans la membrane interne mitochondriale, et les domaines AAA et protéolytique sont dirigés vers la matrice mitochondriale (figure IV.3.3(a) second panneau) (Koppen et Langer, 2007; Lee *et al.*, 2011).



(a) Structure de la m-AAA protéase de levure. (Lee *et al.*, 2011)

Premier panneau : Domaines des sous-unités *Yta10p* (gris sombre) et *Yta12p* (gris clair) de la m-AAA protéase de levure. ND, Domaine N-terminal; AAA, domaine AAA; PD, Domaine Protéase; CH, domaine Hélicale C-terminal. Les mutations SUP identifiées ont été positionnées sur ce schéma (rouge pour *Yta10p* et bleu pour *Yta12p*). Second panneau : Reconstruction Cryo-EM de la m-AAA protéase de levure. Représentation des sous-unités colorées avec surface semi-transparente. Domaines transmembranaires colorés en vert, domaines AAA rouge (*Yta10p*)/rose (*Yta12p*), domaines PD en bleu (*Yta10p*)/bleu ciel (*Yta12p*). **A**, vues haut-bas. **B**, vues de côté (gauche) et section verticale centrale (droite).

Le complexe m-AAA protéase est une métallopeptidase ATP-dépendante de la famille des AAA protéases (Koppen et Langer, 2007). Comme certaines chaperonnes, la spécificité de substrats de ce complexe est dégénérée et implique la reconnaissance de l'état de repliement de la partie soluble matricielle de protéines à domaines membranaires (figure IV.3.3(b) panneau A). Une cible de 20 acides aminés de longueur suffit pour une activation de la fonction de dégradation (Koppen et Langer, 2007). Le complexe m-AAA protéase a, indépendamment de l'activité protéolytique, la capacité de "tirer" les protéines hors de la membrane (figure IV.3.3(b) panneau C). L'activité de contrôle-qualité exercée par ce complexe est dépendante de la présence des deux sous-unités Yta10p et Yta12p. Les sites ATPasiques sont situés dans le domaine AAA de chaque sous-unités du complexe (Lee *et al.*, 2011; Koppen et Langer, 2007). L'abolition totale de l'activité du complexe, entraînée par la perte ou l'inactivation totale d'au moins l'une de ces sous-unités, provoque une diminution drastique de la capacité respiratoire, une biogénèse de l'ATP synthase et des complexes de la chaîne respiratoire très altérée (Paul et Tzagoloff, 1995). Il semblerait que le complexe m-AAA protéase soit impliqué dans certaines étapes de la biogénèse de l'ATP synthase (Francis et Thorsness, 2011), notamment lors de l'incorporation de la tige centrale dans le secteur F₁. Les mécanismes impliqués ne sont pas encore précisément connus à l'heure actuelle. L'inactivation du complexe entraîne également chez la levure l'apparition d'une plus grande proportion de ρ^- / ρ^0 dans la population (Koppen et Langer, 2007). Le complexe m-AAA protéase est également impliqué dans la maturation de certaines protéines importées dans la matrice (figure IV.3.3(b) panneau B), en particulier la sous-unité ribosomale MrpL32p (Bonn *et al.*, 2011; Koppen et Langer, 2007).



(b) Fonctions de la m-AAA protéase dans les mitochondries. (Koppen et Langer, 2007)

En rouge la i-AAA protéase, en bleu la m-AAA protéase. **A** Dégradation protéique. **B** Maturation des protéines. **C** Séparation membranaire ATP-dépendante. OM, Membrane externe ; IMS, Espace intermembranaire ; IM, Membrane interne ; M, Matrice ; TOM, Translocase de la membrane externe ; TIM, Translocase de la membrane interne ; MTS, Séquence d'adressage mitochondriale.

FIGURE IV.3.3: Le complexe m-AAA protéase : structure et fonctions

Dans chacun des clones SUP secondaires obtenus, une mutation affectant directement ou indirectement la m-AAA protéase a été identifiée : une dans chaque sous-unité de ce complexe, et une dans la sous-unité Phb1p de la prohibitine, qui module l'activité de la m-AAA protéase. La mutation située sur Yta10p est sur une position très conservée au cours de l'évolution (figure IV page suivante), celle affectant la protéine Yta12p n'est pas conservée pour le résidu mais plutôt pour la nature aliphatique de l'acide aminé (figure IV page 247). Les deux mutations des gènes *YTA10* et *YTA12* sont situées près du site de liaison à l'ATP dans le domaine AAA (voir figure IV.3.3(a) page 242), nécessaire pour l'activité protéolytique de la m-AAA protéase.

Dans le cas normal, quand Atp9p est exprimée par le génome mitochondrial et donc synthétisée dans la matrice, elle serait directement insérée dans la membrane interne mitochondriale au cours de sa synthèse, lui évitant ainsi d'être exposée au compartiment aqueux qu'est la matrice mitochondriale. Dans le cas d'un gène *ATP9* relocalisé, la protéine Atp9p sera exposée à la matrice mitochondriale après son transport au travers des membranes mitochondriales et pourrait devenir un substrat pour la m-AAA protéase dont le site catalytique est orienté vers la matrice (figure IV.3.6 page 247 cas A).

Nous avons vu qu'en dépit de l'utilisation des systèmes d'expression forte, la sous-unité Atp9p exprimée allotopiquement s'accumule faiblement dans la mitochondrie (figure IV.3.6 page 247 cas B). Une possibilité est que les mutations SUP dans la m-AAA protéase affectent partiellement son activité protéolytique, et protègent ainsi la sous-unité Atp9p d'une dégradation rapide après son entrée dans la matrice.

En accord avec cette hypothèse, nous avons trouvé que la quantité de sous-unité Atp9p exprimée depuis le noyau est considérablement accrue dans une souche où la m-AAA protéase a été entièrement éliminée, tandis que des niveaux intermédiaires sont observés dans des souches arborant les mutations SUP de la m-AAA protéase, indiquant que ces mutations diminuent bien l'activité protéolytique de ce complexe et protégeant ainsi la sous-unité d'être dégradée trop rapidement, augmentant ses chances d'incorporation dans le complexe ATP synthase.

<i>Cryptosporidium muris</i>	LK E PKRYEFLGAKIPKGALLV	344
<i>Theileria annulata</i>	LRSPKTYESYGAKIPKGVLLC	371
<i>Toxoplasma gondii</i>	LKH P QSFRRLGAKIPKGALLV	681
<i>Arabidopsis thaliana</i>	LQ N PKKYEDLGAKIPKGALLV	374
<i>Ricinus communis_1</i>	LKN P KKYEEELGAKIPKGALLV	385
<i>Homo sapiens</i>	LKN P KQYQDLGAKIPKGAILT	347
<i>Macaca mulatta</i>	LKN P KQYQDLGAKIPKGAILT	348
<i>Bos taurus</i>	LKN P KQYQDLGAKIPKGAILT	348
<i>Mus musculus_2</i>	LKN P KQYQDLGAKIPKGAILT	346
<i>Rattus norvegicus_1</i>	LKN P KQYQDLGAKIPKGAILT	346
<i>Xenopus tropicalis_2</i>	LKN P KQYQDLGAKIPKGAVLT	349
<i>Danio rerio</i>	LKN P KQYQDLGAKIPKGAILT	342
<i>Mus musculus_1</i>	LKN P KQYQDLGAKIPKGAMLT	339
<i>Rattus norvegicus_2</i>	LKN P KQYQDLGAKIPKGAMLT	339
<i>Xenopus tropicalis_1</i>	LKN P KQYQDLGAKIPRGAMLT	329
<i>Clonorchis sinensis</i>	LKN P QKYEALGAKIPRGAVLK	421
<i>Naumovozyma dairenensis</i>	LKN P NKYTVLGAKIPRGAILS	346
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	LKN P GKYTKLGAKIPRGAILS	327
<i>Zygosaccharomyces rouxii</i>	LK K PEKYTALGAKIPRGAILS	293
<i>Candida glabrata_1</i>	LKN P AKYTQLGAKIPRGAILS	317
<i>Kazachstania africana</i>	LK S PDKYTALGAKIPRGAILS	345
<i>Tetrapisispora phaffii</i>	LKN P KKYTDLGAKIPRGAILS	336
<i>Vanderwaltozyma polyspora</i>	LKN P QRYTDLGAKIPRGAILS	343
<i>Torulaspora delbrueckii</i>	LKN P DKYTALGAKIPRGAILS	307
<i>Tetrapisispora blattae</i>	LKN P HKYTELGAKIPRGAILS	352
<i>Lachancea thermotolerans</i>	LQ K PDKYKALGAKIPRGAILS	307
<i>Ashbya gossypii</i>	LK T PEKYRALGAQIPRGAILS	290
<i>Komagataella pastoris_2</i>	LKN P KKYEKLGAKIPRGAILS	313
<i>Candida albicans</i>	LQ D PHKYEKLGAKIPRGAILS	326
<i>Candida dubliniensis</i>	LQ D PHKYEKLGAKIPRGAILS	325
<i>Candida parapsilosis</i>	LQ D PKKYEKLGAKIPRGAILS	377
<i>Debaryomyces hansenii</i>	LQ D PTKYEKLGAKIPRGAILS	312
<i>Scheffersomyces stipitis_1</i>	LQ D PKKYERLGAKIPRGAILS	325
<i>Millerozyma farinosa</i>	LQ S PTKYERLGAKIPRGAILS	347
<i>Candida glabrata_2</i>	LR N PQRYEKMGAQIPRGAILS	391
<i>Scheffersomyces stipitis_2</i>	LQ N PEKYERLGAKIPRGAILS	429
<i>Komagataella pastoris_1</i>	LKN P AKYERLGAKIPRGAILS	401
<i>Yarrowia lipolytica_1</i>	LKN P QKFERLGAKIPRGAILS	365
<i>Exophiala dermatitidis</i>	LK D PSKYQRLGAKIPRGAILS	461
<i>Glarea lozoyensis</i>	LK T PEQFERLGAKIPRGAILS	934
<i>Yarrowia lipolytica_2</i>	LK D PKKYEKLGAKIPRGAILS	307
<i>Puccinia graminis</i>	LK E PEKYERLGAKIPKGAMIS	373
<i>Trypanosoma brucei_1</i>	LKN P SRYQALGAKIPKGVLLD	308
<i>Trypanosoma brucei_2</i>	LR H PERYTSLGAKVPTGALLL	349
<i>Ricinus communis_2</i>	LKN E EEFQDKGIYCPKGVLLH	350

Position 317 (levure)

FIGURE IV.3.4: Alignements de séquences de la sous-unité Yta10p

Les alignements ont été réalisés à l'aide du logiciel CLUSTALW. La coloration indique les sites d'identité de plus de 50 %. Les numéros d'accension correspondants sont : *Arabidopsis thaliana* AAF79577.1 ; *Ashbya gossypii* AAS50390.2 ; *Bos taurus* AAI05323.1 ; *Candida albicans* EAL02831.1 ; *Candida dubliniensis* CAX42693.1 ; *Candida glabrata* 1 : CAG60141.1, 2 : CAG60717.1 ; *Candida parapsilosis* CCE44089.1 ; *Clonorchis sinensis* GAA31340.2 ; *Cryptosporidium muris* EEA07942.1 ; *Danio rerio* CAQ14927.1 ; *Debaryomyces hansenii* CAG87336.2 ; *Exophiala dermatitidis* EHY57370.1 ; *Glarea lozoyensis* EHK98376.1 ; *Homo sapiens* AAH65016.1 ; *Kazachstania africana* CCF59311.1 ; *Komagataella pastoris* 1 : CCA37573.1, 2 : CCA40271.1 ; *Lachancea thermotolerans* CAR24355.1 ; *Macaca mulatta* XP_001094146.1 ; *Millerozyma farinosa* CCE79218.1 ; *Mus musculus* 1 NP_473411.2 ; *Mus musculus* 2 BAE29204.1 ; *Naumovozyma dairenensis* CCD25175.1 ; *Puccinia graminis* EFP86563.1 ; *Rattus norvegicus* 1 : NP_001128336.1, 2 : NP_001101926.2 ; *Ricinus communis* 1 : EEF31401.1, 2 :

EEF45143.1 ; *Saccharomyces cerevisiae CAA54091.1* ; *Scheffersomyces stipitis 1 : ABN64403.2, 2 : ABN64747.2* ; *Tetrapisispora blattae CCH60945.1* ; *Tetrapisispora phaffii CCE62308.1* ; *Theileria annulata CAI74556.1* ; *Torulasporea delbrueckii CCE94136.1* ; *Toxoplasma gondii EEB00408.1* ; *Trypanosoma brucei 1 : AAX79808.1, 2 : AAX80117.1* ; *Vanderwaltozyma polyspora EDO15198.1* ; *Xenopus tropicalis 1 : NP 001015906.1, 2 : NP 001072759.1* ; *Yarrowia lipolytica 1 CAG83880.1, 2 : CAG82648.1* ; *Zygosaccharomyces rouxii CAR28161.1*.

<i>Candida_albicans</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	V	C	N	E	A	A	L	I	A	A	R	599
<i>Candida_dublinsiensis</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	V	C	N	E	A	A	L	I	A	A	R	694
<i>Candida_parapsilosis</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	V	C	N	E	A	A	L	I	A	A	R	673
<i>Debaryomyces_hansenii</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	V	C	N	E	A	A	L	I	G	A	R	742
<i>Scheffersomyces_stipitis</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	V	C	N	E	A	A	L	I	G	A	R	616
<i>Millerozyma_farinosa</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	V	C	N	E	A	A	L	I	G	A	R	730
<i>Saccharomyces_cerevisiae</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	V	C	N	E	A	A	L	I	A	A	R	573
<i>Naumovozyma_dairenensis</i>	P	G	F	A	G	A	D	I	A	N	V	C	N	E	A	A	L	I	A	A	R	547
<i>Candida_glabrata_2</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	V	C	N	E	A	A	L	I	A	A	R	577
<i>Kazachstania_africana</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	V	C	N	E	A	A	L	I	A	A	R	536
<i>Tetrapisispora_blattae</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	S	N	V	C	N	E	A	A	L	I	A	A	R	577
<i>Tetrapisispora_phaffii</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	V	C	N	E	A	A	L	I	A	A	R	554
<i>Vanderwaltozyma_polyspora</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	V	C	N	E	A	A	L	I	A	A	R	607
<i>Torulasporea_delbrueckii</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	V	C	N	E	A	A	L	I	A	A	R	566
<i>Zygosaccharomyces_rouxii</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	A	C	N	E	A	A	L	I	A	A	R	579
<i>Lachancea_thermotolerans</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	S	N	V	C	N	E	A	A	L	T	A	A	R	568
<i>Ashbya_gossypii</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	V	C	N	E	A	A	L	I	A	A	R	559
<i>Komagataella_pastoris_1</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	C	C	N	E	A	A	L	I	A	A	R	589
<i>Yarrowia_lipolytica_3</i>	P	G	F	S	G	A	N	V	A	N	V	C	N	E	A	A	L	I	A	A	R	493
<i>Candida_glabrata_1</i>	P	G	F	T	G	A	D	I	A	N	A	C	N	E	A	A	L	I	A	A	R	511
<i>Yarrowia_lipolytica_1</i>	P	G	F	A	G	A	D	I	A	N	C	C	N	E	A	A	L	I	A	A	R	555
<i>Puccinia_graminis_1</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	V	C	N	E	A	A	L	I	A	A	R	594
<i>Cryptosporidium_muris</i>	S	G	F	T	G	S	E	I	A	N	I	C	N	E	A	A	I	F	A	A	R	533
<i>Theileria_annulata</i>	P	N	F	V	G	A	E	I	A	N	V	C	N	E	A	A	I	Q	A	A	R	579
<i>Clonorchis_sinensis</i>	P	S	M	S	G	A	D	I	A	R	L	C	N	E	A	A	L	V	A	A	R	491
<i>Toxoplasma_gondii</i>	P	G	F	V	G	A	D	I	A	N	L	C	N	E	A	A	I	Q	A	A	R	866
<i>Komagataella_pastoris_2</i>	P	G	F	S	G	A	E	L	M	N	V	V	N	Q	A	A	V	Y	A	S	Q	438
<i>Yarrowia_lipolytica_2</i>	S	G	F	S	G	A	E	L	M	N	L	V	N	Q	A	A	I	Q	A	S	K	445
<i>Puccinia_graminis_2</i>	P	G	F	S	G	A	D	L	Q	N	L	V	N	Q	A	A	V	K	A	S	R	578
<i>Ricinus_communis</i>	P	G	F	N	G	A	D	L	A	N	L	V	N	I	A	A	I	K	A	A	V	593
<i>Trypanosoma_brucei</i>	T	G	F	T	G	A	E	L	S	N	L	V	N	I	A	A	I	R	A	A	T	405
<i>Mus_musculus</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	I	C	N	E	A	A	L	H	A	A	R	534
<i>Rattus_norvegicus</i>	P	G	F	S	517
<i>Bos_taurus</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	I	C	N	E	A	A	L	H	A	A	R	534
<i>Macaca_mulatta</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	I	C	N	E	A	A	L	H	A	A	R	1260
<i>Homo_sapiens</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	I	C	N	E	A	A	L	H	A	A	R	534
<i>Danio_rerio</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	I	C	N	E	A	A	L	H	A	A	R	525
<i>Xenopus_tropicalis</i>	P	G	F	S	G	A	D	I	A	N	I	C	N	E	A	A	L	H	A	A	R	507

↑
Position 563 (levure)

- X acidic (-)
- X aliphatic
- X aliphatic (small)
- X amide
- X aromatic
- X basic (+)
- X hydroxyl
- X imino
- X sulfur

FIGURE IV.3.5: Alignements de séquences de la sous-unité Yta12p

Les alignements ont été réalisés à l'aide du logiciel CLUSTALW. La coloration correspond à la nature des différents acides aminés (légende en dessous). Les numéros d'accès correspondants sont : *Ashbya gossypii* AAS50730.2 ; *Bos taurus* NP 001095492.1 ; *Candida albicans* EAL00623.1 ; *Candida dubliniensis* CAX43343.1 ; *Candida glabrata* 1 : CAG60141.1, 2 : CAG60717.1 ; *Candida parapsilosis* CCE43670.1 ; *Clonorchis sinensis* GAA57526.1 ; *Cryptosporidium muris* XP 002142291.1 ; *Danio rerio* XP 001923118.1 ; *Debaryomyces hansenii* CAG88198.2 ; *Homo sapiens* NP 003110.1 ; *Kazachstania africana* CCF55512.1 ; *Komagataella pastoris* 1 : XP 002490791.1, 2 : XP 002494338.1 ; *Lachancea thermotolerans* CAR22519.1 ; *Macaca mulatta* XP 002802648.1 ; *Millerozyma farinosa* CCE87110.1 ; *Mus musculus* AAN03852.1 ; *Naumovozyma dairenensis* CCD26395.1 ; *Puccinia graminis* 1 : XP 003330982.1, 2 : XP 003323106.2 ; *Rattus norvegicus* AAP35059.1 ; *Ricinus communis* XP 002513581.1 ; *Saccharomyces cerevisiae* NP 013807.1 ; *Scheffersomyces stipitis* XP 001382776.2 ; *Theileria annulata* XP 952288.1 ; *Tetrapisispora blattae* 1 : CCH62779.1, 2 : CCE64154.1 ; *Torulasporea delbrueckii* CCE89580.1 ; *Toxoplasma gondii* XP 002367548.1 ; *Trypanosoma brucei* XP 822996.1 ; *Vanderwaltozyma polyspora* EDO15511.1 ; *Xenopus tropicalis* XP 002933705.1 ; *Yarrowia lipolytica* 1 : XP 499951.1, 2 : XP 500384.1, 3 : XP 500430.1 ; *Zygosaccharomyces rouxii* CAR29208.1.

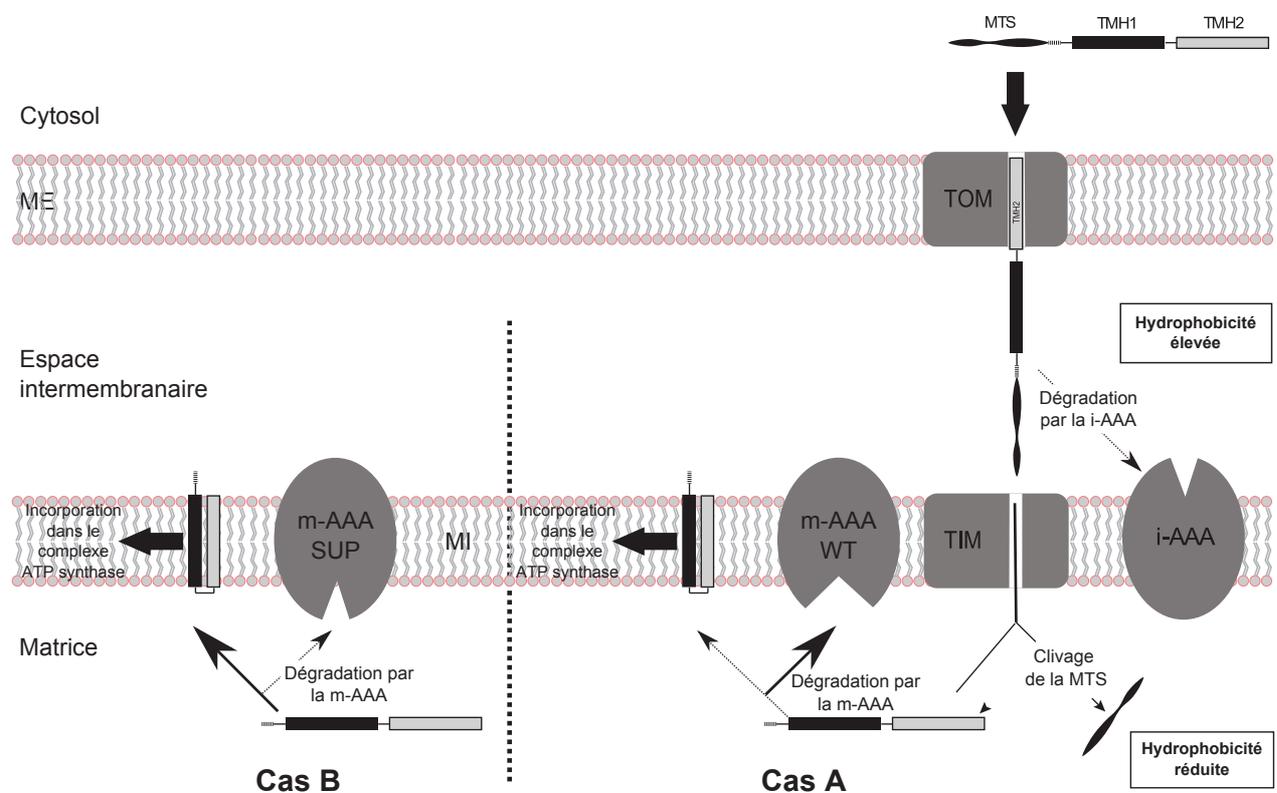


FIGURE IV.3.6: La m-AAA protéase est impliquée dans la dégradation de la sous-unité Atp9p importée depuis le cytosol

Représentation schématique de l'influence de la réduction de l'hydrophobicité de la sous-unité Atp9p sur son expression fonctionnelle depuis le génome nucléaire montrée en IV.2.2 page 239 complétée avec l'impact de la m-AAA protéase sur cette incorporation. La m-AAA protéase sauvage dégrade une grande partie des protéines Atp9p matures importées depuis le cytosol (cas A). Les mutations SUP identifiées permettent une réduction de l'activité de dégradation du complexe, et plus de sous-unités Atp9p pourront alors être incorporées dans les complexes ATP synthases (cas B). MI : membrane mitochondriale interne ; OM : membrane mitochondriale externe ; MTS : préséquence d'adressage mitochondrial ; TMH : traverse transmembranaire ; TOM : translocase de la ME ; TIM : translocase de la MI.

La glutamyl-tRNA synthétase

Une des mutations trouvées dans un clone SUP affecte le gène *GUS1*. Celui-ci encode une glutamyl-tRNA synthétase (figure IV.3.7). En phase de fermentation celle-ci est principalement localisée dans le cytosol où elle est liée à une protéine d'ancrage nommée Arc1p. Une seconde amino-acyl tRNA synthétase est liée par cette ancre, une méthionyl-tRNA synthétase. Hubert BECKER a montré (Frechin *et al.*, 2009) que lorsque les cellules de levure effectuent la transition diauxique, l'expression de Arc1p est réprimée, ce qui va "libérer" les deux aminoacyl-tRNA synthétases. Une fois indépendante, la MetRS va être dirigée vers le noyau de la cellule, où elle va accroître l'expression de gènes impliqués dans la respiration cellulaire via des interactions avec une sous-unité régulatrice de l'ARN polymérase II (Hubert BECKER, communication personnelle).

En parallèle, la GluRS va être transloquée dans la matrice mitochondriale. Une fois transloquée dans la mitochondrie, la GluRS va pouvoir participer à la synthèse du Glutaminyl-ARN_t^{Gln} (Frechin *et al.*, 2009) par la voie de transamidation. Cette réaction est essentielle pour l'expression des gènes mitochondriaux. Ainsi, ce système permet la coordination de l'expression de gènes nucléaires et mitochondriaux impliqués dans la respiration cellulaire.

La mutation identifiée dans le gène *GUS1* de levure est située sur un site peu conservé au cours de l'évolution (figure IV page 250). Elle est localisée dans un coeur hydrophobe stabilisant le repliement du domaine de liaison à l'ARN_t (figure IV.3.9 page 250). Il est possible que la mutation affecte la liaison avec cet ARN_t, par exemple en favorisant l'aminoacylation par le rapprochement du nucléotide cible et du Glu-AMP, et donc affecterait le taux d'aminoacylation de cet ARN. La synthèse des protéines serait impactée, plus particulièrement des protéines mitochondriales qui dépendent de cette synthétase pour deux de leurs ARN de transfert.

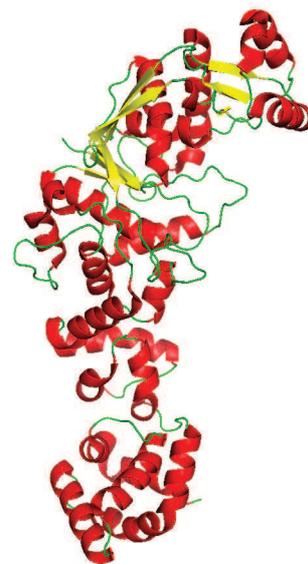


FIGURE IV.3.7:
Structure
tridimensionnelle de la
GluRS (Sekine *et al.*,
2006)

Diagramme en ruban de la structure tridimensionnelle de la glutamyl-tRNA synthétase de Thermus thermophilus, complexée avec un L-glutamate (PDB ID : 2CUZ). Les hélices α sont en rouge, les feuillets β en jaune et les boucles en vert.

<i>Naumovozya_dairenensis</i>	K	N	G	T	E	E	G	L	K	N	C	V	R	A	K	I	D	Y	K	A	L	353
<i>Torulaspora_delbrueckii</i>	K	N	G	T	E	E	G	L	K	N	C	V	R	A	K	I	D	Y	Q	A	A	351
<i>Saccharomyces_cerevisiae</i>	K	N	G	T	E	E	G	L	K	N	C	V	R	A	K	I	D	Y	K	A	L	352
<i>Candida_glabrata</i>	K	N	G	T	E	E	G	L	K	N	C	V	R	A	K	I	D	Y	A	A	L	351
<i>Kazachstania_africana</i>	K	N	G	T	E	E	G	L	K	N	C	V	R	A	K	I	D	Y	A	A	L	350
<i>Tetrapisispora_phaffii</i>	Q	N	G	T	E	E	G	L	Q	N	C	V	R	A	K	I	D	Y	E	A	L	351
<i>Vanderwaltozyma_polyspora</i>	K	N	G	T	E	E	G	L	K	N	C	V	R	A	K	I	D	Y	E	A	L	351
<i>Zygosaccharomyces_rouxii_2</i>	K	N	G	T	E	F	G	Q	K	N	C	V	R	A	K	I	D	Y	K	A	A	351
<i>Lachancea_thermotolerans</i>	K	N	G	T	E	E	G	L	K	N	C	V	R	A	K	I	D	Y	K	A	L	350
<i>Tetrapisispora_blattae</i>	T	N	G	T	E	E	G	L	K	N	C	V	R	A	K	I	D	Y	K	A	L	352
<i>Ashbya_gossypii</i>	K	N	G	T	E	E	G	L	K	N	C	V	R	A	K	I	D	Y	A	A	L	351
<i>Candida_albicans_1</i>	K	N	G	T	E	E	G	L	K	N	C	L	R	A	K	I	D	Y	K	A	P	366
<i>Candida_dublinsiensis_1</i>	K	N	G	T	E	E	G	L	K	N	C	L	R	A	K	I	D	Y	K	A	P	366
<i>Candida_parapsilosis</i>	K	N	G	T	E	E	G	L	K	N	C	L	R	A	K	I	D	Y	K	A	L	366
<i>Debaryomyces_hansenii_1</i>	K	N	G	T	E	G	G	L	K	N	C	L	R	A	K	I	D	Y	T	A	L	364
<i>Scheffersomyces_stipitidis</i>	K	N	G	T	E	E	G	L	K	N	C	L	R	A	K	I	D	Y	T	A	P	362
<i>Komagataella_pastoris_1</i>	K	N	G	T	E	I	G	L	K	N	C	L	R	A	K	I	D	Y	E	N	P	361
<i>Yarrowia_lipolytica_2</i>	A	K	G	T	E	E	G	L	K	N	C	I	R	A	K	I	S	V	D	A	G	341
<i>Glarea_lozoyensis_1</i>	K	A	G	T	E	K	G	V	K	N	C	L	R	A	K	L	S	V	D	N	P	273
<i>Puccinia_graminis</i>	K	L	G	T	P	E	G	L	R	W	C	L	R	A	K	I	R	Y	D	D	L	379
<i>Exophiala_dermatitidis</i>	K	K	G	T	D	E	G	R	R	W	C	I	R	A	K	I	S	Y	A	N	D	180
<i>Arabidopsis_thaliana_2</i>	A	.	G	S	E	R	G	L	Q	C	C	V	R	G	K	F	N	M	Q	D	P	363
<i>Ricinus_communis</i>	V	.	G	S	E	R	G	L	Q	C	C	L	R	G	K	L	D	M	Q	D	P	367
<i>Cryptosporidium_muris_1</i>	S	.	G	S	E	D	G	L	K	C	C	I	R	A	K	I	D	M	S	C	K	188
<i>Toxoplasma_gondii</i>	K	.	G	S	A	E	G	Q	K	C	C	V	R	A	K	I	D	M	Q	S	K	392
<i>Theileria_annulata</i>	K	.	G	S	E	V	G	V	K	N	C	L	R	A	K	M	D	M	T	S	K	364
<i>Homo_sapiens</i>	K	K	G	S	Q	F	G	Q	S	C	C	L	R	A	K	I	D	M	S	S	N	347
<i>Macaca_mulatta</i>	K	K	G	S	Q	F	G	Q	S	C	C	L	R	A	K	I	D	M	S	S	N	347
<i>Bos_taurus_2</i>	K	K	G	S	Q	F	G	Q	S	C	C	L	R	A	K	I	D	M	S	S	N	347
<i>Mus_musculus</i>	K	K	G	S	Q	F	G	Q	S	C	C	L	R	A	K	I	D	M	S	S	N	347
<i>Rattus_norvegicus</i>	K	R	G	S	Q	F	G	Q	S	C	C	L	R	A	K	I	D	M	S	S	N	353
<i>Xenopus_tropicalis_1</i>	K	K	G	T	E	Y	G	Q	T	C	C	L	R	A	K	I	D	M	N	S	N	389
<i>Xenopus_tropicalis_2</i>	K	K	G	T	E	Y	G	Q	T	C	C	L	R	A	K	I	D	M	N	S	N	389
<i>Danio_erio</i>	K	K	G	T	E	F	G	Q	T	C	C	M	R	A	K	I	D	M	N	S	N	346
<i>Clonorchis_sinensis</i>	K	K	G	T	E	F	G	V	Q	C	C	V	R	A	K	I	D	M	N	S	N	169
<i>Trypanosoma_brucei</i>	K	E	G	S	A	E	G	Q	E	T	C	L	R	A	K	I	S	V	D	N	E	203
<i>Arabidopsis_thaliana_1</i>	R	R	G	I	I	E	E	G	K	A	T	L	R	M	K	Q	D	M	Q	S	D	420
<i>Arabidopsis_thaliana_3</i>	R	R	G	I	I	E	E	G	K	A	T	L	R	M	K	Q	D	M	Q	S	D	425
<i>Bos_taurus_1</i>	R	K	G	K	F	A	E	G	E	A	T	L	R	M	K	L	V	M	E	D	.	410
<i>Candida_albicans_2</i>	K	N	G	K	Y	N	V	G	E	A	T	L	R	M	K	Q	D	L	N	S	P	410
<i>Candida_dublinsiensis_2</i>	K	N	G	K	Y	N	V	G	E	A	T	L	R	M	K	Q	D	L	N	S	P	410
<i>Debaryomyces_hansenii_2</i>	K	N	G	E	Y	K	S	G	E	A	T	L	R	M	K	Q	D	L	E	S	P	402
<i>Komagataella_pastoris_2</i>	R	D	G	K	Y	Q	S	G	E	A	T	L	R	M	K	Q	D	L	E	S	P	409
<i>Zygosaccharomyces_rouxii_1</i>	K	D	G	H	Y	Q	P	G	E	A	T	L	R	M	K	Q	D	L	S	S	P	409
<i>Yarrowia_lipolytica_1</i>	R	D	G	H	Y	K	P	G	E	A	V	L	R	M	K	Q	D	L	N	N	P	405
<i>Cryptosporidium_muris_2</i>	K	N	G	K	F	E	E	G	E	C	V	L	R	A	K	I	D	M	N	H	G	198

↑
Position 343 (levure)

- X acidic (-)
- X aliphatic
- X aliphatic (small)
- X amide
- X aromatic
- X basic (+)
- X hydroxyl
- X imino
- X sulfur

FIGURE IV.3.8: La mutation SUP est située sur un site peu conservé de la protéine Gus1p

Les alignements ont été réalisés à l'aide du logiciel CLUSTALW. La coloration correspond à la nature des différents acides aminés (légende en dessous). Les numéros d'accèsion correspondants sont : Arabidopsis thaliana 1 : NP 173906.2, 2 : NP 850874.1, 3 : NP 001185094.1 ; Ashbya gossypii NP 985811.2 ; Bos taurus 1 : NP 001029640.1, 2 : NP 001230249.1 ; Candida albicans 1 : XP 720349.1, 2 : XP 720356.1 ; Candida dubliniensis 1 : XP 002421224.1, 2 : XP 002421231.1 ; Candida glabrata XP 445260.1 ; Candida parapsilosis CCE41122.1 ; Clonorchis sinensis GAA31783.2 ; Cryptosporidium muris 1 : XP 002139813.1, 2 : XP 002142164.1 ; Danio rerio NP 001191177.1 ; Debaryomyces hansenii 1 : XP 461343.1, 2 : XP 461335.2 ; Exophiala dermatitidis EHY54959.1 ; Glarea lozoyensis 1 : EHK97348.1, 2 : EHK99240.1 ; Homo sapiens NP 004437.2 ; Kazachstania africana 1 : CCF60353.1, 2 : CCF60818.1 ; Komagataella pastoris 1 : XP 002490737.1, 2 XP 002492504.1 ; Lachancea thermotolerans XP 002555069.1 ; Macaca mulatta XP 002808297.1 ; Mus musculus NP 084011.1 ; Naumovozyma dairenensis XP 003672136.1 ; Puccinia graminis XP 003335888.2 ; Rattus norvegicus NP 001019409.1 ; Ricinus communis XP 002512595.1 ; Scheffersomyces stipitis XP 001384967.1 ; Tetrapisispora blattae CCH61082.1 ; Tetrapisispora phaffii XP 003684110.1 ; Theileria annulata XP 953722.1 ; Torulaspora delbrueckii XP 003681432.1 ; Toxoplasma gondii XP 002365487.1 ; Vanderwaltozyma polyspora XP 001643704.1 ; Xenopus tropicalis 1 : XP 002936063.1, 2 : XP 002936064.1 ; Yarrowia lipolytica 1 : XP 501409.1, 2 : XP 504508.1 ; Zygosaccharomyces rouxii 1 : XP 002495955.1, 2 : XP 002499344.1.

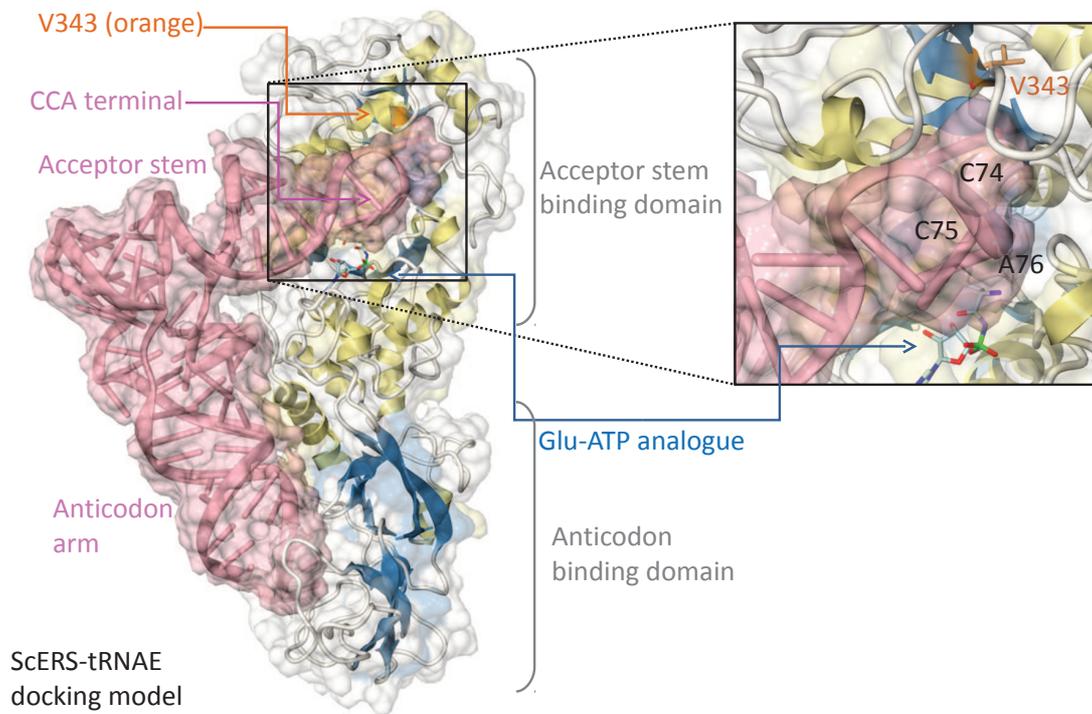


FIGURE IV.3.9: Positionnement de la mutation SUP de la GluRS (H. BECKER)

Diagramme tridimensionnel modélisant la protéine *Gus1p* liée à son ARN_t^{Glu} cible. Sont indiqués sur ce diagramme les différents sites du complexe : Acceptor stem : bras accepteur ; Anticodon arm : bras anticodon ; binding domain : domaine de liaison. L'encadré correspond à un agrandissement de la zone de liaison de la GluRS au bras accepteur de l' ARN_t^{Glu} . Dans cette zone est située le résidu 343 Valine (représenté en orange) de la protéine *Gus1p*, site de la mutation SUP V343I. Source : Hubert BECKER.

Des expériences ont montré que la mutation SUP du gène *GUS1* n'affecte pas la liaison de la GluRS à la protéine Arc1p, au contraire elle semblerait même la renforcer (H. BECKER, communication personnelle). Lorsque la GluRS se lie à Arc1p, son activité d'aminacylation est accrue (Graindorge *et al.*, 2005). De manière intéressante, cette stimulation n'est plus observée avec la mutation *gus1-Sup* (H. BECKER, communication personnelle). Celle-ci aurait donc un impact fonctionnel qui pourrait se traduire par un ralentissement des synthèses protéiques dans le cytosol. Des expérimentations supplémentaires sont nécessaires pour connaître les mécanismes exacts impliquant cette mutation et l'optimisation de la croissance des cellules avec *ATP9* relocalisé. Nous pouvons cependant avancer un possible scénario.

Notre hypothèse est que, du fait d'une biogénèse non optimale du F_0 avec un gène *ATP9* relocalisé, il y aurait une trop grande accumulation de secteurs F_1 libres qui ont la capacité d'hydrolyser inutilement de l'ATP. En ralentissant la synthèse des sous-unités du F_1 , toutes traduites dans le cytoplasme, la mutation SUP du gène *GUS1* permettrait de réduire l'excès de F_1 libre. De fait, il y a un meilleur équilibre entre secteurs F_1 et F_0 dans les différents clones SUP secondaires.

Le gène *ENT5*

Une autre mutation SUP, a priori très intéressante, affecte un gène impliqué dans le trafic membranaire intracellulaire, le gène *ENT5*. La protéine encodée par ce gène est impliquée dans le trafic golgi-endosomes comme adaptateur de la clathrine (Duncan et Payne, 2003; Fang *et al.*, 2010). Elle facilite le recrutement des vésicules qui vont prendre en charge des protéines membranaires et les diriger vers la vacuole pour y être dégradées.

La mutation SUP du gène *ent5* affecte un motif DLIDLDD, essentiel pour l'interaction avec la clathrine (Fang *et al.*, 2010; Dell'Angelica, 2001). Des expériences réalisées par Sylvie FRIANT, du laboratoire de GÉNÉTIQUE MOLÉCULAIRE GÉNOMIQUE MICROBIOLOGIE de Strasbourg, montrent que les interactions entre Ent5p mutée et la clathrine sont affaiblies (figure IV.3.11 page 253).

Nous avons, sur la base de ces résultats, dégagé un scénario possible de l'effet de la mutation dans un contexte avec *ATP9* relocalisé chez la levure. En tant que protéine membranaire, la sous-unité Atp9p exprimée depuis le noyau devrait être synthétisée dans le réticulum endoplasmique, puis être dirigée vers la mitochondrie. Cependant, malgré l'utilisation de système d'expression forte, l'accumulation en sous-unité Atp9p dans les mitochondries est relativement faible. Une possibilité est qu'une fraction importante des sous-unités synthétisées n'atteignent pas le compartiment mitochondrial et aboutissent dans la vacuole pour y être dégradées. Les systèmes de dégradation cellulaire, comme les hydrolases vacuolaires, détourneraient alors une partie des Atp9p vers la vacuole. La modification de l'activité de Ent5p permettrait de diminuer la quantité d'Atp9p dirigée vers la vacuole, il y en aurait donc plus dirigées vers les mitochondries. Cette hypothèse sera testée plus tard, en collaboration avec S.FRIANT, par exemple en inactivant les hydrolases vacuolaires de la levure dans la souche exprimant un *ATP9* à partir du noyau. De plus, d'autres voies de dégradation (la protéasome, l'autophagie, par exemple) pourront être testées dans le même but. Ces expériences seront également intéressantes pour les protéines Atp6p et Cox3p, qui, comme je l'ai montré dans cette thèse, ne s'accumulent pas dans les cellules de levure les exprimant à partir du noyau, tant dans la mitochondrie que dans d'autres compartiments cellulaires. Il sera possible de combiner ces constructions avec les souches affectées dans les voies de dégradation, permettant ainsi de vérifier les effets de ces voies sur les produits de des gènes *ATP6* et *COX3* relocalisés.

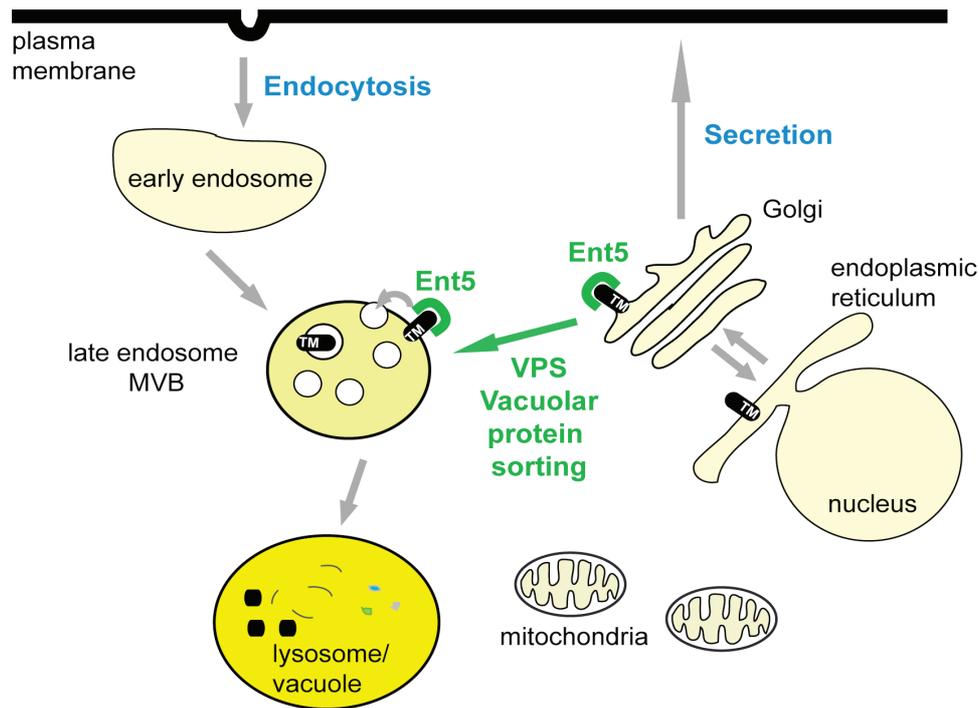


FIGURE IV.3.10: Fonction de la protéine Ent5p (S.FRIANT)

Schéma simplifié représentant la fonction de la protéine Ent5p dans la cellule. Au niveau des endosomes tardifs, Les chargements destinés à être dirigés vers la vacuole sont inclus dans des vésicules contenues dans les MultiVesicular Bodies (MVB, pour corps multivésiculaires). Pour assurer une redirection correcte de ces chargements, des protéines à domaine ENTH (Epsin N-Terminal Homology pour homologie à l'epsine en N-terminal) sont, entre autres, utilisées, comme la protéine Ent5p (Eugster et al., 2004) qui est un adaptateur de la clathrine (Duncan et Payne, 2003; Fang et al., 2010). Source : Sylvie FRIANT.

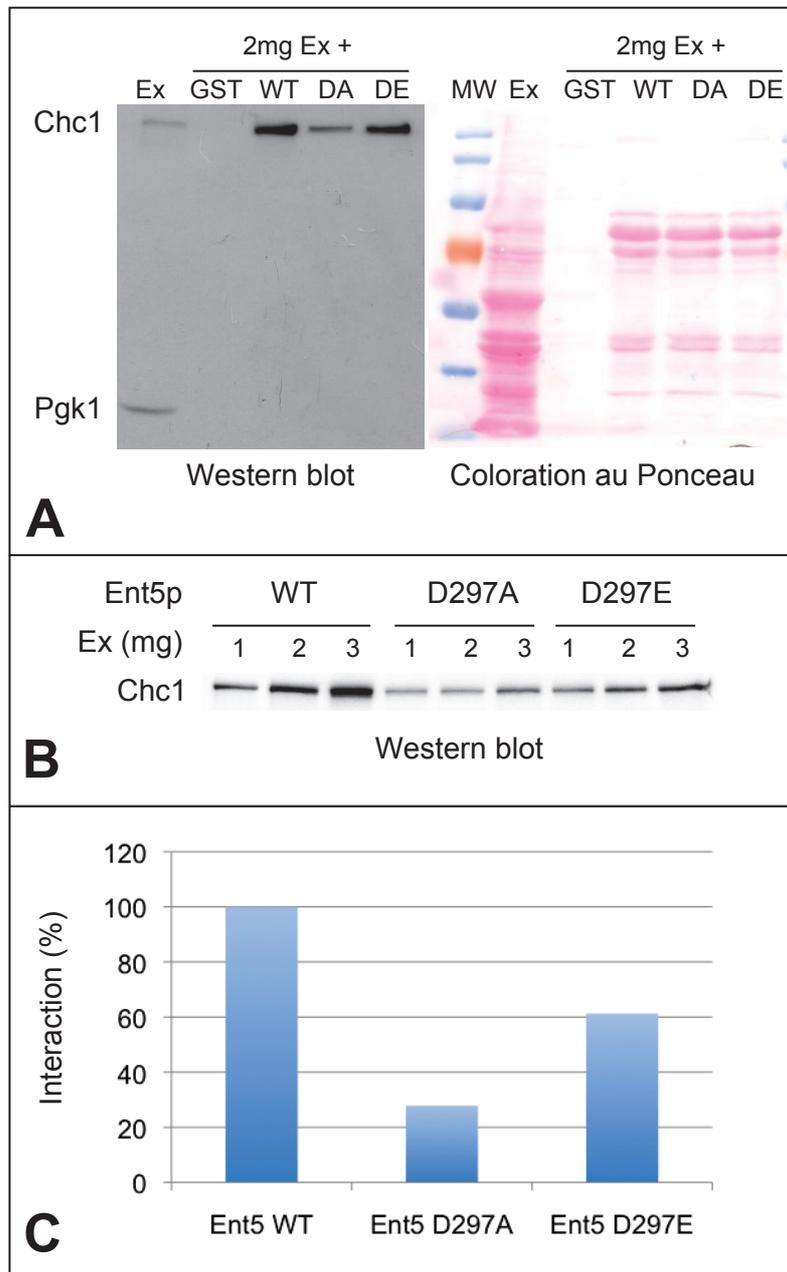


FIGURE IV.3.11: La mutation SUP de la Ent5p affecte son affinité pour la clathrine

(A) Expérience de capture de la clathrine à l'aide d'une protéine de fusion GST-Ent5p (GST : glutathione S-transférase). Un extrait protéique de levure est réalisé (Ex) et une capture de la clathrine est réalisée sur 2 mg de cet extrait. La capture est réalisée ici à l'aide de trois protéines GST-Ent5p différentes, une portant une Ent5p sauvage (WT), une Ent5p portant la mutation D297A qui va drastiquement diminuer son affinité pour la clathrine, et une Ent5p portant la mutation SUP D297E. Les extraits protéiques obtenus sont ensuite séparés sur gel SDS-PAGE et analysés par Western blot (la piste Ex correspond à 50 µg d'extraits non traités). Chc1 : clathrin-heavy chain ou chaîne lourde de la clathrine ; MW : marqueur de taille protéique.

(B) Expérience similaire à celle décrite en (A), mais réalisée avec différentes quantités d'extraits protéiques de levure.

(C) Graphique de quantification de l'affinité observée en (A) et (B) de la protéine Ent5p (mutée ou non) pour la clathrine. La mutation D297A impacte de manière importante cette affinité, comme attendu. La mutation SUP D297E affecte également l'affinité de Ent5p pour la clathrine, mais de manière moins importante que la mutation D297A.

La relocalisation du gène *ATP9* est-elle bénéfique pour la cellule ?

L'étude que j'ai présentée dans ce rapport montre que la relocalisation du gène *ATP9* est possible chez la levure. La protéine encodée, suffisamment modifiée, peut être synthétisée depuis le cytosol. De plus, même si la relocalisation du gène pose un problème, la levure peut adapter ses systèmes cellulaires pour compenser ce manque, et ainsi avoir une croissance de type sauvage. Cependant, l'ensemble des modifications à effectuer semble complexe et difficile à réaliser. La relocalisation de ce gène risque donc d'être contre-sélectionnée, sauf si ce transfert apporte un bénéfice à la cellule.

Chez *Podospora anserina* et *Mus musculus*, l'expression des isoformes nucléaires du gène *ATP9* est régulée

Nous avons testé cette hypothèse d'un avantage évolutif chez le champignon filamenteux *Podospora anserina* (Dequard-Chablat *et al.*, 2011). Nous avons montré que, chez cet organisme, la sous-unité Atp9p est encodée par deux gènes nucléaires différents, Pa*ATP9-5* et Pa*ATP9-7*. L'étude de leur expression a révélé que ces gènes font l'objet de régulations transcriptionnelles gène-spécifiques au cours du cycle de vie du champignon. Ces observations indiquent que les gènes *ATP9* sont utilisés dans cet organisme pour moduler la production d'ATP synthases en fonction de ses besoins. Au cours de la germination des spores, lorsque de grandes quantités d'ATP synthases doivent être produites, le gène Pa*ATP9-5* est très fortement exprimé. Dans la phase de reproduction sexuée, lorsque les conditions du milieu moins favorables amènent à une carence nutritive, la croissance végétative s'arrête et le champignon se met à fabriquer des spores (Espagne *et al.*, 2008). Il n'est ici plus nécessaire de produire de grandes quantités d'ATP synthases, et la sous-unité Atp9p est exprimée à des niveaux beaucoup plus bas (des milliers de fois moins) essentiellement à partir du gène Pa*ATP9-7*.

Une régulation similaire a été observée chez les mammifères (Houstek *et al.*, 1995; Anderson *et al.*, 1997; Blanchet *et al.*, 2011) où le gène *ATP9* a également été relocalisé dans le génome nucléaire au cours de l'évolution. Chez les mammifères, il existe trois isoformes nucléaires du gène *ATP9* (P1 à P3). L'expression de l'isoforme P1 est réprimée dans le tissu brun adipeux lors d'une baisse de la température ambiante. Cette diminution de l'expression de l'isoforme majoritaire dans la cellule entraîne une diminution globale de la quantité d'ATP synthases. En parallèle, la production d'une protéine découplante, Ucp1p, est accrue, permettant le passage de protons de l'espace inter-membranaire vers la matrice sans passer par l'ATP synthase. Cette fuite est exothermique permettant à l'organisme de s'adapter à une baisse de température ambiante. La modulation de la quantité d'ATP synthases participerait donc à l'adaptation des cellules au froid. L'expression des gènes *ATP9* chez cet organisme est donc dépendante du mode de vie de cette espèce homéotherme. De même, l'expression de la sous-unité Atp9p est augmentée dans les tissus à forte demande énergétique comme, par exemple, les muscles (Blanchet *et al.*, 2011).

L'étude phylogénétique réalisée par Dequard-Chablat *et al.* (2011) montre que les *ATP9* nucléaires des mammifères et des champignons ont été relocalisés de manière indépendante, et que cette relocalisation a été exploitée pour permettre à l'organisme de répondre à des changements dans son environnement (disponibilité en nutriments, modifications de la température). Il semble plus facile pour la cellule de répondre à de tels changements en modulant l'activité de gènes nucléaires que des gènes mitochondriaux dont aucune régulation transcriptionnelle gène-spécifique n'a été décrite. Il y a donc une convergence évolutive entre ces deux groupes d'organismes, sur un gène en particulier. Le gène *ATP9* est devenu la cible de régulations dépendantes du mode de vie de l'organisme considéré. Pourtant, il existe de nombreuses sous-unités de l'ATP synthase, dont les gènes sont plus aisément relocalisables au noyau, qui auraient pu devenir de telles cibles. Pourquoi le gène *ATP9*, un gène potentiellement difficile à relocaliser, a-t-il été utilisé pour ce type de régulation particulière ?

Une explication possible peut être avancée à la lumière de nos connaissances sur la biogénèse de l'ATP synthase. Des études chez la levure ont montré que cette biogénèse, que j'ai décrite en partie I section 3.2 page 33, est un processus très complexe où les différentes sous-unités sont assemblées dans un certain ordre et avec l'aide de facteurs d'assemblage ayant des actions très spécifiques. Ce processus n'a pas pour seul but de faciliter l'assemblage ou d'améliorer le rendement en complexes ATP synthases, mais également d'éviter l'accumulation d'intermédiaires d'assemblages, potentiellement délétères pour la cellule. Par exemple, il a été montré que de petits déficits en sous-unités de la tige centrale, à peine quelques pourcents dans le cas de la sous-unité γ (Contamine et Picard, 2000), entraînent un découplage total de la respiration – phénotype létal pour la cellule – et ce à cause de fuites de protons au travers du secteur F_0 . Ces observations suggèrent que l'expression du secteur F_0 doit être fortement contrôlée afin d'éviter son assemblage, même en faible quantité, sans être associé au secteur F_1 . Divers mécanismes ont été décrits dans la littérature permettant de contrôler l'expression du secteur F_0 (Lefebvre-Legendre *et al.*, 2001; Rak et Tzagoloff, 2009).

Des études en cours dans notre laboratoire indiquent que le système serait notamment sécurisé chez la levure par un mécanisme où la sous-unité Atp9p joue un rôle clé. Il a été trouvé qu'en l'absence de la protéine Fmc1p, les sous-unités α et β du secteur F_1 s'agrègent dans la matrice mitochondriale en corps d'inclusions (Lefebvre-Legendre *et al.*, 2001, 2005). À l'état stationnaire, les niveaux d'accumulation de la protéine Atp9p dans le mutant *fmc1* sont extrêmement faibles, à priori à cause d'une répression de la synthèse de cette sous-unité (comme montré par des expérimentations de radiomarquage des protéines néosynthétisées dans la mitochondrie). L'autre composante du canal à protons de l'ATP synthase, la sous-unité Atp6p, n'est pas affectée au niveau de sa synthèse, mais son accumulation est aussi compromise du fait de sa dégradation par des protéases. Ces observations suggèrent que les sous-unités α et β du secteur F_1 de l'ATP synthase permettraient une activation de l'expression de la sous-unité Atp9p de manière à coupler l'assemblage du F_0 à celui du F_1 . Tant que le F_1 n'est pas formé, le secteur F_0 , et plus particulièrement le canal à protons, ne peut s'assembler en F_0 libre, ce qui empêchera la fuite de protons délétère pour la cellule.

Il apparaîtrait donc que, quelle que soit la localisation génomique nucléaire ou mitochondriale du gène *ATP9*, l'expression de la protéine qu'il encode serait contrôlée au niveau de sa synthèse plutôt qu'au niveau post-traductionnel. Une possibilité serait que ce type de contrôle est indispensable du fait de l'hydrophobicité extrême de cette protéine (qualifiée de protéolipide, c'est à dire extractible par des solvants organiques) et des contraintes en termes d'assemblage du complexe ATP synthase, à savoir la nécessité d'éviter l'accumulation même en quantités d'intermédiaires d'assemblages potentiellement très délétères. Ceci permettrait d'expliquer pourquoi la sous-unité Atp9p, et non une autre sous-unité de l'ATP synthase, aurait été utilisée au cours de

l'évolution pour moduler la production d'ATP synthase chez les champignons filamenteux et les mammifères, malgré les difficultés à relocaliser son gène au noyau.

Une nouvelle hypothèse sur l'évolution du génome mitochondrial

Comme expliqué précédemment, différentes hypothèses ont été avancées pour expliquer la rétention d'ADN dans les mitochondries – le transfert de gènes mitochondriaux est toujours en cours, certains gènes sont retenus car leur expression depuis le noyau serait problématique, et un maintien préférentiel de certains gènes permettrait d'optimiser le fonctionnement des mitochondries. L'étude que nous avons menée au cours de ma thèse montre que, dans le cas du gène *ATP9*, sa relocalisation au noyau est un processus très complexe requérant de nombreuses adaptations. Cette relocalisation doit donc présenter quelque avantage pour être conservée au cours de l'évolution, par exemple une régulation plus spécialisée de la production d'ATP synthase observée chez certains organismes complexes. Dans le cas contraire, le gène *ATP9* resterait dans la mitochondrie, comme chez les eucaryotes tels que la levure, où il n'existe pas de régulation spécifique de la production de ce complexe en dehors de la répression générale des fonctions mitochondriales induite par le glucose (Ackerman et Tzagoloff, 2005).

Ainsi, nous souhaiterions introduire une hypothèse nouvelle selon laquelle **les variations de contenu en gènes dans les mitochondries ne sont pas uniquement influencées par des contraintes au niveau de la structure de leurs produits protéiques (hydrophobicité) mais aussi par le mode de vie de l'organisme.**

Vers des mécanismes généraux améliorant l'expression des gènes mitochondriaux depuis le noyau ?

Comme indiqué précédemment, une étude récente a montré que le gène mitochondrial de levure encodant la sous-unité Cox2p de la cytochrome c oxydase pouvait être exprimé fonctionnellement depuis le noyau, après le remplacement d'un résidu tryptophane par l'arginine au niveau de la première traverse membranaire de cette protéine (Supekova *et al.*, 2010). Toutefois la souche de levure ainsi modifiée a une croissance très lente sur milieu non fermentescible. Nous nous sommes dès lors demandé si les mutations SUP, sélectionnées pour leur capacité à améliorer l'expression allotopique d'*ATP9*, pouvaient également améliorer l'expression de Cox2p depuis le noyau. Effectivement, en présence de ces mutations, les levures exprimant l'allèle muté *COX2* depuis le noyau ont une croissance respiratoire proche de la souche sauvage de levure. Ceci est une observation très intéressante, indiquant la possibilité de mettre en place des mécanismes généraux permettant d'améliorer l'expression allotopique des gènes mitochondriaux.

L'étude décrite dans ce manuscrit laisse ainsi entrevoir la possibilité de pouvoir créer artificiellement des cellules eucaryotes entièrement dépourvues d'ADN mitochondrial, mais toujours capables de réaliser les réactions d'oxydations phosphorylantes. Cette étude peut également avoir un impact dans le domaine médical, ouvrant la possibilité de mise en place de thérapies géniques pour des maladies mitochondriales humaines associées à des altérations de l'ADN mitochondrial (Rak *et al.*, 2007).

Bibliographie

- ABRAHAMAS, J. P., LESLIE, A. G., LUTTER, R. et WALKER, J. E. (1994). *Structure at 2.8 Å resolution of F1-ATPase from bovine heart mitochondria*. *Nature*, 370(6491):621–8.
- ACKERMAN, S. H. et TZAGOLOFF, A. (2005). *Function, structure, and biogenesis of mitochondrial ATP synthase*. *Prog Nucleic Acid Res Mol Biol*, 80:95–133.
- ALBERTYN, J., HOHMANN, S., THEVELEIN, J. M. et PRIOR, B. A. (1994). *GPD1, which encodes glycerol-3-phosphate dehydrogenase, is essential for growth under osmotic stress in Saccharomyces cerevisiae, and its expression is regulated by the high-osmolarity glycerol response pathway*. *Mol Cell Biol*, 14(6):4135–44.
- ALLEN, J. F. (1993). *Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes*. *J Theor Biol*, 165(4):609–31.
- ALLEN, J. F. et RAVEN, J. A. (1996). *Free-radical-induced mutation vs redox regulation : costs and benefits of genes in organelles*. *J Mol Evol*, 42(5):482–92.
- ALLEN, R. D. (1995). *Membrane tubulation and proton pumps*. *Protoplasma*, 189(1):1–8.
- ANDERSSON, S. G. (1998). *Bioenergetics of the obligate intracellular parasite Rickettsia prowazekii*. *Biochim Biophys Acta*, 1365(1-2):105–11.
- ANDERSSON, S. G. et KURLAND, C. G. (1999). *Origins of mitochondria and hydrogenosomes*. *Curr Opin Microbiol*, 2(5):535–41.
- ANDERSSON, S. G., ZOMORODIPOUR, A., ANDERSSON, J. O., SICHERITZ-PONTÉN, T., ALS-MARK, U. C., PODOWSKI, R. M., NÄSLUND, A. K., ERIKSSON, A. S., WINKLER, H. H. et KURLAND, C. G. (1998). *The genome sequence of Rickettsia prowazekii and the origin of mitochondria*. *Nature*, 396(6707):133–40.
- ANDERSSON, U., HOUSTEK, J. et CANNON, B. (1997). *ATP synthase subunit c expression : physiological regulation of the P1 and P2 genes*. *Biochem J*, 323 (Pt 2):379–85.
- ANGEVINE, C. M., HEROLD, K. A. G., VINCENT, O. D. et FILLINGAME, R. H. (2007). *Aqueous access pathways in ATP synthase subunit a. Reactivity of cysteine substituted into transmembrane helices 1, 3, and 5*. *J Biol Chem*, 282(12):9001–7.
- ARLT, H., TAUER, R., FELDMANN, H., NEUPERT, W. et LANGER, T. (1996). *The YTA10-12 complex, an AAA protease with chaperone-like activity in the inner membrane of mitochondria*. *Cell*, 85(6):875–85.
- ARTAL-SANZ, M. et TAVERNARAKIS, N. (2009). *Prohibitin and mitochondrial biology*. *Trends Endocrinol Metab*, 20(8):394–401.
- BANROQUES, J., DELAHODDE, A. et JACQ, C. (1986). *A mitochondrial RNA maturase gene transferred to the yeast nucleus can control mitochondrial mRNA splicing*. *Cell*, 46(6):837–44.

- BANROQUES, J., PEREA, J. et JACQ, C. (1987). *Efficient splicing of two yeast mitochondrial introns controlled by a nuclear-encoded maturase*. EMBO J, 6(4):1085–91.
- BARACCA, A., SGARBI, G., SOLAINI, G. et LENAZ, G. (2003). *Rhodamine 123 as a probe of mitochondrial membrane potential : evaluation of proton flux through F₀ during ATP synthesis*. Biochim Biophys Acta, 1606(1-3):137–46.
- BECKER, T., BÖTTINGER, L. et PFANNER, N. (2012). *Mitochondrial protein import : from transport pathways to an integrated network*. Trends Biochem Sci, 37(3):85–91.
- BECKER, T., GEBERT, M., PFANNER, N. et van der LAAN, M. (2009). *Biogenesis of mitochondrial membrane proteins*. Curr Opin Cell Biol, 21(4):484–93.
- BERGER, K. H. et YAFFE, M. P. (2000). *Mitochondrial DNA inheritance in Saccharomyces cerevisiae*. Trends Microbiol, 8(11):508–13.
- BIETENHADER, M., MARTOS, A., TETAUD, E., AIYAR, R. S., SELLEM, C. H., KUCHARCZYK, R., CLAUDER-MÜNSTER, S., GIRAUD, M.-F., GODARD, F., SALIN, B., SAGOT, I., GAGNEUR, J., DÉQUARD-CHABLAT, M., CONTAMINE, V., DENMAT, S. H.-L., SAINARD-CHANET, A., STEINMETZ, L. M. et di RAGO, J.-P. (2012). *Experimental relocation of the mitochondrial ATP9 gene to the nucleus reveals forces underlying mitochondrial genome evolution*. PLoS Genet, 8(8):e1002876.
- BIRKY, C. W. J. (1995). *Uniparental inheritance of mitochondrial and chloroplast genes : mechanisms and evolution*. Proc Natl Acad Sci U S A, 92(25):11331–8.
- BITTNER-EDDY, P., MONROY, A. F. et BRAMBL, R. (1994). *Expression of mitochondrial genes in the germinating conidia of Neurospora crassa*. J Mol Biol, 235(3):881–97.
- BLANCHARD, J. L. et LYNCH, M. (2000). *Organellar genes : why do they end up in the nucleus ?* Trends Genet, 16(7):315–20.
- BLANCHARD, J. L. et SCHMIDT, G. W. (1996). *Mitochondrial DNA migration events in yeast and humans : integration by a common end-joining mechanism and alternative perspectives on nucleotide substitution patterns*. Mol Biol Evol, 13(3):537–48.
- BLANCHET, E., ANNICOTTE, J.-S., LAGARRIGUE, S., AGUILAR, V., CLAPÉ, C., CHAVEY, C., FRITZ, V., CASAS, F., APPARAILLY, F., AUWERX, J. et FAJAS, L. (2011). *E2F transcription factor-1 regulates oxidative metabolism*. Nat Cell Biol, 13(9):1146–52.
- BLOMAIN, E. S. et MCMAHON, S. B. (2012). *Dynamic regulation of mitochondrial transcription as a mechanism of cellular adaptation*. Biochim Biophys Acta, 1819(9-10):1075–9.
- BOGENHAGEN, D. F. (2012). *Mitochondrial DNA nucleoid structure*. Biochim Biophys Acta, 1819(9-10):914–20.
- BOKORI-BROWN, M. et HOLT, I. J. (2006). *Expression of algal nuclear ATP synthase subunit 6 in human cells results in protein targeting to mitochondria but no assembly into ATP synthase*. Rejuvenation Res, 9(4):455–69.
- BONN, F., TATSUTA, T., PETRUNGARO, C., RIEMER, J. et LANGER, T. (2011). *Presequence-dependent folding ensures MrpL32 processing by the m-AAA protease in mitochondria*. EMBO J, 30(13):2545–56.
- BONNEFOY, N., BSAT, N. et FOX, T. D. (2001). *Mitochondrial translation of Saccharomyces cerevisiae COX2 mRNA is controlled by the nucleotide sequence specifying the pre-Cox2p leader peptide*. Mol Cell Biol, 21(7):2359–72.

- BONNEFOY, N., FIUMERA, H. L., DUJARDIN, G. et FOX, T. D. (2009). *Roles of Oxa1-related inner-membrane translocases in assembly of respiratory chain complexes*. *Biochim Biophys Acta*, 1793(1):60–70.
- BONNEFOY, N. et FOX, T. D. (2001). *Genetic transformation of Saccharomyces cerevisiae mitochondria*. *Methods Cell Biol*, 65:381–96.
- BONNET, C., KALTIMBACHER, V., ELLOUZE, S., AUGUSTIN, S., BÉNIT, P., FORSTER, V., RUSTIN, P., SAHEL, J.-A. et CORRAL-DEBRINSKI, M. (2007). *Allotopic mRNA localization to the mitochondrial surface rescues respiratory chain defects in fibroblasts harboring mitochondrial DNA mutations affecting complex I or v subunits*. *Rejuvenation Res*, 10(2):127–44.
- BOUSQUET-ANTONELLI, C., HENRY, Y., G'ELUGNE, J. P., CAIZERGUES-FERRER, M. et KISS, T. (1997). *A small nucleolar RNP protein is required for pseudouridylation of eukaryotic ribosomal RNAs*. *EMBO J*, 16(15):4770–6.
- BRAIG, K., MENZ, R. I., MONTGOMERY, M. G., LESLIE, A. G. et WALKER, J. E. (2000). *Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase inhibited by Mg(2+) ADP and aluminium fluoride*. *Structure*, 8(6):567–73.
- BUSI, M. V., GÓMEZ-CASATI, D. F., PERALES, M., ARAYA, A. et ZABALETA, E. (2006). *Nuclear-encoded mitochondrial complex I gene expression is restored to normal levels by inhibition of unedited ATP9 transgene expression in Arabidopsis thaliana*. *Plant Physiol Biochem*, 44(1):1–6.
- CALLEN, J.-C. (2003). *Biologie Cellulaire : des molécules aux organismes*. Sciences sup.
- CHINNERY, P. F., THORBURN, D. R., SAMUELS, D. C., WHITE, S. L., DAHL, H. M., TURNBULL, D. M., LIGHTOWLERS, R. N. et HOWELL, N. (2000). *The inheritance of mitochondrial DNA heteroplasmy : random drift, selection or both ?* *Trends Genet*, 16(11):500–5.
- CLAROS, M. G., PEREA, J. et JACQ, C. (1996). *Allotopic expression of yeast mitochondrial maturase to study mitochondrial import of hydrophobic proteins*. *Methods Enzymol*, 264:389–403.
- CLAROS, M. G., PEREA, J., SHU, Y., SAMATEY, F. A., POPOT, J. L. et JACQ, C. (1995). *Limitations to in vivo import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b*. *Eur J Biochem*, 228(3):762–71.
- CONDE, J. et FINK, G. R. (1976). *A mutant of Saccharomyces cerevisiae defective for nuclear fusion*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 73(10):3651–5.
- CONTAMINE, V. et PICARD, M. (2000). *Maintenance and integrity of the mitochondrial genome : a plethora of nuclear genes in the budding yeast*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 64(2):281–315.
- COTTIER, F., RAYMOND, M., KURZAI, O., BOLSTAD, M., LEEWATTANAPASUK, W., JIMÉNEZ-LÓPEZ, C., LORENZ, M. C., SANGLARD, D., VÁCHOVÁ, L., PAVELKA, N., PALKOVÁ, Z. et MÜHLSCHLEGEL, F. A. (2012). *The bZIP transcription factor Rca1p is a central regulator of a novel CO₂ sensing pathway in yeast*. *PLoS Pathog*, 8(1):e1002485.
- CRUZ-TORRES, V., VÁZQUEZ-ACEVEDO, M., GARCÍA-VILLEGAS, R., PÉREZ-MARTÍNEZ, X., MENDOZA-HERNÁNDEZ, G. et GONZÁLEZ-HALPHEN, D. (2012). *The cytosol-synthesized subunit II (Cox2) precursor with the point mutation W56R is correctly processed in yeast mitochondria to rescue cytochrome oxidase*. *Biochim Biophys Acta*.

- CUMMINGS, D. J., MCNALLY, K. L., DOMENICO, J. M. et MATSUURA, E. T. (1990). *The complete DNA sequence of the mitochondrial genome of Podospora anserina*. *Curr Genet*, 17(5):375–402.
- DALEY, D. O., CLIFTON, R. et WHELAN, J. (2002). *Intracellular gene transfer : reduced hydrophobicity facilitates gene transfer for subunit 2 of cytochrome c oxidase*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(16):10510–5.
- DARWIN, C. (1859). *On the Origin of the Species by Means of Natural Selection : Or, The Preservation of Favoured Races in the Struggle for Life*. John Murray.
- DAUTANT, A., VELOURS, J. et GIRAUD, M. (2010). *Crystal structure of the Mg·ADP-inhibited state of the yeast F1c10-ATP synthase*. *J Biol Chem*, 285(38):29502–10.
- DAVIDOV, Y. et JURKEVITCH, E. (2009). *Predation between prokaryotes and the origin of eukaryotes*. *Bioessays*, 31(7):748–57.
- DE GRASSI, A., LANAVE, C. et SACCONI, C. (2006). *Evolution of ATP synthase subunit c and cytochrome c gene families in selected Metazoan classes*. *Gene*, 371(2):224–33.
- de GREY, A. D. N. J. (2005). *Forces maintaining organellar genomes : is any as strong as genetic code disparity or hydrophobicity ?* *Bioessays*, 27(4):436–46.
- DELL' ANGELICA, E. C. (2001). *Clathrin-binding proteins : got a motif ? Join the network !* *Trends Cell Biol*, 11(8):315–8.
- DEQUARD-CHABLAT, M., SELLEM, C. H., GOLIK, P., BIDARD, F., MARTOS, A., BIETENHADER, M., di RAGO, J., SAINSAARD-CHANET, A., HERMANN-LE DENMAT, S. et CONTAMINE, V. (2011). *Two nuclear life cycle-regulated genes encode interchangeable subunits c of mitochondrial ATP synthase in Podospora anserina*. *Mol Biol Evol*, 28(7):2063–75.
- DEVENISH, R. J., PRESCOTT, M. et RODGERS, A. J. W. (2008). *The structure and function of mitochondrial F1F0-ATP synthases*. *Int Rev Cell Mol Biol*, 267:1–58.
- DHAR, M. K., SEHGAL, S. et KAUL, S. (2012). *Structure, replication efficiency and fragility of yeast ARS elements*. *Res Microbiol*, 163(4):243–53.
- DUNCAN, M. C. et PAYNE, G. S. (2003). *ENTH/ANTH domains expand to the Golgi*. *Trends Cell Biol*, 13(5):211–5.
- DUNN, D. A. et PINKERT, C. A. (2012). *Nuclear expression of a mitochondrial DNA gene : mitochondrial targeting of allotopically expressed mutant ATP6 in transgenic mice*. *J Biomed Biotechnol*, 2012:541245.
- DYALL, S. D., BROWN, M. T. et JOHNSON, P. J. (2004). *Ancient invasions : from endosymbionts to organelles*. *Science*, 304(5668):253–7.
- DYALL, S. D. et JOHNSON, P. J. (2000). *Origins of hydrogenosomes and mitochondria : evolution and organelle biogenesis*. *Curr Opin Microbiol*, 3(4):404–11.
- EGNER, A., JAKOBS, S. et HELL, S. W. (2002). *Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99(6):3370–5.

- ESPAGNE, E., LESPINET, O., MALAGNAC, F., DA SILVA, C., JAILLON, O., PORCEL, B. M., COULOUX, A., AURY, J.-M., SÉGURENS, B., POULAIN, J., ANTHOUARD, V., GROSSETETE, S., KHALILI, H., COPPIN, E., DÉQUARD-CHABLAT, M., PICARD, M., CONTAMINE, V., ARNAISE, S., BOURDAIS, A., BERTEAUX-LECELLIER, V., GAUTHERET, D., de VRIES, R. P., BATTAGLIA, E., COUTINHO, P. M., DANCHIN, E. G., HENRISSAT, B., KHOURY, R. E., SAINSAARD-CHANET, A., BOIVIN, A., PINAN-LUCARRÉ, B., SELLEM, C. H., DEBUCHY, R., WINCKER, P., WEISSENBAACH, J. et SILAR, P. (2008). *The genome sequence of the model ascomycete fungus Podospora anserina*. *Genome Biol*, 9(5):R77.
- EUGSTER, A., PÉCHEUR, E.-I., MICHEL, F., WINSOR, B., LETOURNEUR, F. et FRIANT, S. (2004). *Ent5p is required with Ent3p and Vps27p for ubiquitin-dependent protein sorting into the multivesicular body*. *Mol Biol Cell*, 15(7):3031–41.
- FANG, P., LI, X., WANG, J., NIU, L. et TENG, M. (2010). *Structural basis for the specificity of the GAE domain of γ GGA2 for its accessory proteins Ent3 and Ent5*. *Biochemistry*, 49(36):7949–55.
- FARQUHAR, J., ZERKLE, A. L. et BEKKER, A. (2011). *Geological constraints on the origin of oxygenic photosynthesis*. *Photosynth Res*, 107(1):11–36.
- FARRELL, L. B., GEARING, D. P. et NAGLEY, P. (1988). *Reprogrammed expression of subunit 9 of the mitochondrial ATPase complex of Saccharomyces cerevisiae. Expression in vitro from a chemically synthesized gene and import into isolated mitochondria*. *Eur J Biochem*, 173(1):131–7.
- FIGUEROA-MARTÍNEZ, F., VÁZQUEZ-ACEVEDO, M., CORTÉS-HERNÁNDEZ, P., GARCÍA-TREJO, J. J., DAVIDSON, E., KING, M. P. et GONZÁLEZ-HALPHEN, D. (2011). *What limits the allotopic expression of nucleus-encoded mitochondrial genes ? The case of the chimeric Cox3 and Atp6 genes*. *Mitochondrion*, 11(1):147–54.
- FILLINGAME, R. H., ANGEVINE, C. M. et DMITRIEV, O. Y. (2003). *Mechanics of coupling proton movements to c-ring rotation in ATP synthase*. *FEBS Lett*, 555(1):29–34.
- FOURY, F., ROGANTI, T., LECRENIER, N. et PURNELLE, B. (1998). *The complete sequence of the mitochondrial genome of Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 440(3):325–31.
- FOURY, F. et TZAGLOFF, A. (1976). *Assembly of the mitochondrial membrane system. XIX. Genetic characterization of mit- mutants with deficiencies in cytochrome oxidase and coenzyme qh2-cytochrome c reductase*. *Mol Gen Genet*, 149(1):43–50.
- FRANCIS, B. R. et THORSNESS, P. E. (2011). *Hsp90 and mitochondrial proteases Yme1 and Yta10/12 participate in ATP synthase assembly in Saccharomyces cerevisiae*. *Mitochondrion*, 11(4):587–600.
- FRECHIN, M., SENGER, B., BRAYÉ, M., KERN, D., MARTIN, R. P. et BECKER, H. D. (2009). *Yeast mitochondrial Gln-tRNA(Gln) is generated by a GatFAB-mediated transamidation pathway involving Arc1p-controlled subcellular sorting of cytosolic GluRS*. *Genes Dev*, 23(9):1119–30.
- FRITZ, S., RAPAPORT, D., KLANNER, E., NEUPERT, W. et WESTERMANN, B. (2001). *Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion*. *J Cell Biol*, 152(4):683–92.
- FUNES, S., DAVIDSON, E., CLAROS, M. G., van LIS, R., PÉREZ-MARTÍNEZ, X., VÁZQUEZ-ACEVEDO, M., KING, M. P. et GONZÁLEZ-HALPHEN, D. (2002). *The typically mitochondrial*

- DNA-encoded ATP6 subunit of the F1F0-ATPase is encoded by a nuclear gene in *Chlamydomonas reinhardtii*. *J Biol Chem*, 277(8):6051–8.
- GALLUZZI, L., KEPP, O., TROJEL-HANSEN, C. et KROEMER, G. (2012). *Mitochondrial control of cellular life, stress, and death*. *Circ Res*, 111(9):1198–207.
- GAO, Y. Q., YANG, W. et KARPLUS, M. (2005). *A structure-based model for the synthesis and hydrolysis of ATP by F1-ATPase*. *Cell*, 123(2):195–205.
- GARGAUD, M., MARTIN, H., LÓPEZ-GARCÍA, P., MONTMERLE, T. et PASCAL, R. (2009). *Le soleil, la Terre, la vie : la quête des origines*. Pour la science. Belin.
- GENTZSCH, M. et TANNER, W. (1996). *The PMT gene family : protein O-glycosylation in Saccharomyces cerevisiae is vital*. *EMBO J*, 15(21):5752–9.
- GIETZ, R. D. et WOODS, R. A. (2002). *Transformation of yeast by lithium acetate/single-stranded carrier DNA/polyethylene glycol method*. *Methods Enzymol*, 350:87–96.
- GLASS, J. I., ASSAD-GARCIA, N., ALPEROVICH, N., YOOSEPH, S., LEWIS, M. R., MARUF, M., HUTCHISON, C. A. r., SMITH, H. O. et VENTER, J. C. (2006). *Essential genes of a minimal bacterium*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 103(2):425–30.
- GRAINDORGE, J.-S., SENGER, B., TRITCH, D., SIMOS, G. et FASIOLO, F. (2005). *Role of Arc1p in the modulation of yeast glutamyl-tRNA synthetase activity*. *Biochemistry*, 44(4):1344–52.
- GRAY, M. W. (1998). *Rickettsia, typhus and the mitochondrial connection*. *Nature*, 396(6707):109–10.
- GRAY, M. W., BURGER, G. et LANG, B. F. (1999). *Mitochondrial evolution*. *Science*, 283(5407):1476–81.
- GUÉRIN, B. (2004). *Bionénergétique*. Collection Grenoble sciences.
- GUÉRIN, B., LABBE, P. et SOMLO, M. (1979). *Preparation of yeast mitochondria (Saccharomyces cerevisiae) with good P/O and respiratory control ratios*. *Methods Enzymol*, 55:149–59.
- HABIB, S. J., NEUPERT, W. et RAPAPORT, D. (2007). *Analysis and prediction of mitochondrial targeting signals*. *Methods Cell Biol*, 80:761–81.
- HACKSTADT, T. (1996). *The biology of rickettsiae*. *Infect Agents Dis*, 5(3):127–43.
- HACKSTEIN, J. H. P., TJADEN, J. et HUYNEN, M. (2006). *Mitochondria, hydrogenosomes and mitosomes : products of evolutionary tinkering !* *Curr Genet*, 50(4):225–45.
- HERNOULD, M., MOURAS, A., LITVAK, S. et ARAYA, A. (1992). *RNA editing of the mitochondrial atp9 transcript from tobacco*. *Nucleic Acids Res*, 20(7):1809.
- HERNOULD, M., SUHARSONO, S., LITVAK, S., ARAYA, A. et MOURAS, A. (1993). *Male-sterility induction in transgenic tobacco plants with an unedited atp9 mitochondrial gene from wheat*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90(6):2370–4.
- HERRMANN, J. M., WOELLHAF, M. W. et BONNEFOY, N. (2012). *Control of protein synthesis in yeast mitochondria : The concept of translational activators*. *Biochim Biophys Acta*.

- HIBBETT, D. S., BINDER, M., BISCHOFF, J. F., BLACKWELL, M., CANNON, P. F., ERIKSSON, O. E., HUHDORF, S., JAMES, T., KIRK, P. M., LÜCKING, R., THORSTEN LUMBSCH, H., LUTZONI, F., MATHENY, P. B., McLAUGHLIN, D. J., POWELL, M. J., REDHEAD, S., SCHOCH, C. L., SPATAFORA, J. W., STALPERS, J. A., VILGALYS, R., AIME, M. C., APTROOT, A., BAUER, R., BEGEROW, D., BENNY, G. L., CASTLEBURY, L. A., CROUS, P. W., DAI, Y.-C., GAMS, W., GEISER, D. M., GRIFFITH, G. W., GUEIDAN, C., HAWKSWORTH, D. L., HESTMARK, G., HOSAKA, K., HUMBER, R. A., HYDE, K. D., IRNSIDE, J. E., KÖLJALG, U., KURTZMAN, C. P., LARSSON, K.-H., LICHTWARDT, R., LONGCORE, J., MIADLIKOWSKA, J., MILLER, A., MONCALVO, J.-M., MOZLEY-STANDRIDGE, S., OBERWINKLER, F., PARMASO, E., REEB, V., ROGERS, J. D., ROUX, C., RYVARDEN, L., SAMPAIO, J. P., SCHÜSSLER, A., SUGIYAMA, J., THORN, R. G., TIBELL, L., UNTEREINER, W. A., WALKER, C., WANG, Z., WEIR, A., WEISS, M., WHITE, M. M., WINKA, K., YAO, Y.-J. et ZHANG, N. (2007). *A higher-level phylogenetic classification of the Fungi*. *Mycol Res*, 111(Pt 5):509–47.
- HINNEBUSCH, A. G. (2011). *Molecular mechanism of scanning and start codon selection in eukaryotes*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 75(3):434–67, first page of table of contents.
- HO, H.-L., SHIAU, Y.-S. et CHEN, M.-Y. (2005). *Saccharomyces cerevisiae TSC11/AVO3 participates in regulating cell integrity and functionally interacts with components of the Tor2 complex*. *Curr Genet*, 47(5):273–88.
- HOUSTEK, J., ANDERSSON, U., TVRDIK, P., NEDERGAARD, J. et CANNON, B. (1995). *The expression of subunit c correlates with and thus may limit the biosynthesis of the mitochondrial F₀F₁-ATPase in brown adipose tissue*. *J Biol Chem*, 270(13):7689–94.
- HUANG, L.-S., SHEN, J. T., WANG, A. C. et BERRY, E. A. (2006). *Crystallographic studies of the binding of ligands to the dicarboxylate site of Complex II, and the identity of the ligand in the "oxaloacetate-inhibited" state*. *Biochim Biophys Acta*, 1757(9-10):1073–83.
- IBBA, M. et SOLL, D. (2000). *Aminoacyl-tRNA synthesis*. *Annu Rev Biochem*, 69:617–50.
- JAMES, T. Y., KAUFF, F., SCHOCH, C. L., MATHENY, P. B., HOFSTETTER, V., COX, C. J., CELIO, G., GUEIDAN, C., FRAKER, E., MIADLIKOWSKA, J., LUMBSCH, H. T., RAUHUT, A., REEB, V., ARNOLD, A. E., AMTOFT, A., STAJICH, J. E., HOSAKA, K., SUNG, G.-H., JOHNSON, D., O’ROURKE, B., CROCKETT, M., BINDER, M., CURTIS, J. M., SLOT, J. C., WANG, Z., WILSON, A. W., SCHÜSSLER, A., LONGCORE, J. E., O’DONNELL, K., MOZLEY-STANDRIDGE, S., PORTER, D., LETCHER, P. M., POWELL, M. J., TAYLOR, J. W., WHITE, M. M., GRIFFITH, G. W., DAVIES, D. R., HUMBER, R. A., MORTON, J. B., SUGIYAMA, J., ROSSMAN, A. Y., ROGERS, J. D., PFISTER, D. H., HEWITT, D., HANSEN, K., HAMBLETON, S., SHOEMAKER, R. A., KOHLMAYER, J., VOLKMAN-KOHLMEYER, B., SPOTTS, R. A., SERDANI, M., CROUS, P. W., HUGHES, K. W., MATSUURA, K., LANGER, E., LANGER, G., UNTEREINER, W. A., LÜCKING, R., BÜDEL, B., GEISER, D. M., APTROOT, A., DIEDERICH, P., SCHMITT, I., SCHULTZ, M., YAHR, R., HIBBETT, D. S., LUTZONI, F., McLAUGHLIN, D. J., SPATAFORA, J. W. et VILGALYS, R. (2006). *Reconstructing the early evolution of Fungi using a six-gene phylogeny*. *Nature*, 443(7113):818–22.
- JUNGE, W., LILL, H. et ENGELBRECHT, S. (1997). *ATP synthase : an electrochemical transducer with rotatory mechanics*. *Trends Biochem Sci*, 22(11):420–3.
- KAGAWA, R., MONTGOMERY, M. G., BRAIG, K., LESLIE, A. G. W. et WALKER, J. E. (2004). *The structure of bovine F₁-ATPase inhibited by ADP and beryllium fluoride*. *EMBO J*, 23(14):2734–44.

- KALTIMBACHER, V., BONNET, C., LECOEVRE, G., FORSTER, V., SAHEL, J.-A. et CORRAL-DEBRINSKI, M. (2006). *mRNA localization to the mitochondrial surface allows the efficient translocation inside the organelle of a nuclear recoded ATP6 protein*. RNA, 12(7):1408–17.
- KANEDA, H., HAYASHI, J., TAKAHAMA, S., TAYA, C., LINDAHL, K. F. et YONEKAWA, H. (1995). *Elimination of paternal mitochondrial DNA in intraspecific crosses during early mouse embryogenesis*. Proc Natl Acad Sci U S A, 92(10):4542–6.
- KARBSTEIN, K. (2011). *Inside the 40S ribosome assembly machinery*. Curr Opin Chem Biol, 15(5):657–63.
- KOLTER, T. (2007). *The fatty acid factory of yeasts*. Angew Chem Int Ed Engl, 46(36):6772–5.
- KOPPEN, M. et LANGER, T. (2007). *Protein degradation within mitochondria : versatile activities of AAA proteases and other peptidases*. Crit Rev Biochem Mol Biol, 42(3):221–42.
- KUBO, T. et NEWTON, K. J. (2008). *Angiosperm mitochondrial genomes and mutations*. Mitochondrion, 8(1):5–14.
- KUCHARCZYK, R., ZICK, M., BIETENHADER, M., RAK, M., COUPLAN, E., BLONDEL, M., CAUBET, S.-D. et di RAGO, J.-P. (2009). *Mitochondrial ATP synthase disorders : molecular mechanisms and the quest for curative therapeutic approaches*. Biochim Biophys Acta, 1793(1):186–99.
- KYTE, J. et DOOLITTLE, R. F. (1982). *A simple method for displaying the hydropathic character of a protein*. J Mol Biol, 157(1):105–32.
- LANE, N., ALLEN, J. F. et MARTIN, W. (2010). *How did LUCA make a living ? Chemiosmosis in the origin of life*. Bioessays, 32(4):271–80.
- LANG, B. F., AHNE, F. et BONEN, L. (1985). *The mitochondrial genome of the fission yeast Schizosaccharomyces pombe. The cytochrome b gene has an intron closely related to the first two introns in the Saccharomyces cerevisiae cox1 gene*. J Mol Biol, 184(3):353–66.
- LANG, B. F., GRAY, M. W. et BURGER, G. (1999). *Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes*. Annu Rev Genet, 33:351–97.
- LANGE, C. et HUNTE, C. (2002). *Crystal structure of the yeast cytochrome bc1 complex with its bound substrate cytochrome c*. Proc Natl Acad Sci U S A, 99(5):2800–5.
- LAW, R. H., DEVENISH, R. J. et NAGLEY, P. (1990). *Assembly of imported subunit 8 into the ATP synthase complex of isolated yeast mitochondria*. Eur J Biochem, 188(2):421–9.
- LAW, R. H., FARRELL, L. B., NERO, D., DEVENISH, R. J. et NAGLEY, P. (1988). *Studies on the import into mitochondria of yeast ATP synthase subunits 8 and 9 encoded by artificial nuclear genes*. FEBS Lett, 236(2):501–5.
- LEE, S., AUGUSTIN, S., TATSUTA, T., GERDES, F., LANGER, T. et TSAI, F. T. F. (2011). *Electron cryomicroscopy structure of a membrane-anchored mitochondrial AAA protease*. J Biol Chem, 286(6):4404–11.
- LEFEBVRE-LEGENDRE, L., SALIN, B., SCHAËFFER, J., BRÈTHES, D., DAUTANT, A., ACKERMAN, S. H. et di RAGO, J.-P. (2005). *Failure to assemble the alpha 3 beta 3 subcomplex of the ATP synthase leads to accumulation of the alpha and beta subunits within inclusion bodies and the loss of mitochondrial cristae in Saccharomyces cerevisiae*. J Biol Chem, 280(18):18386–92.

- LEFEBVRE-LEGENDRE, L., VAILLIER, J., BENABDELHAK, H., VELOURS, J., SLONIMSKI, P. P. et di RAGO, J. P. (2001). *Identification of a nuclear gene (FMC1) required for the assembly/stability of yeast mitochondrial F(1)-ATPase in heat stress conditions*. J Biol Chem, 276(9):6789–96.
- LEFRANÇOIS, P., EUSKIRCHEN, G. M., AUERBACH, R. K., ROZOWSKY, J., GIBSON, T., YELLMAN, C. M., GERSTEIN, M. et SNYDER, M. (2009). *Efficient yeast ChIP-Seq using multiplex short-read DNA sequencing*. BMC Genomics, 10:37.
- LILL, R. et MÜHLENHOFF, U. (2005). *Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes*. Trends Biochem Sci, 30(3):133–41.
- LOWRY, O. H., ROSEBROUGH, N. J., FARR, A. L. et RANDALL, R. J. (1951). *Protein measurement with the Folin phenol reagent*. J Biol Chem, 193(1):265–75.
- MAGASANIK, B. et KAISER, C. A. (2002). *Nitrogen regulation in Saccharomyces cerevisiae*. Gene, 290(1-2):1–18.
- MANDAVILLI, B. S., SANTOS, J. H. et VAN HOUTEN, B. (2002). *Mitochondrial DNA repair and aging*. Mutat Res, 509(1-2):127–51.
- MANFREDI, G., FU, J., OJAIMI, J., SADLOCK, J. E., KWONG, J. Q., GUY, J. et SCHON, E. A. (2002). *Rescue of a deficiency in ATP synthesis by transfer of MTATP6, a mitochondrial DNA-encoded gene, to the nucleus*. Nat Genet, 30(4):394–9.
- MARGULIS, L. (1975). *Symbiotic theory of the origin of eukaryotic organelles ; criteria for proof*. Symp Soc Exp Biol, (29):21–38.
- MCLAUGHLIN, D. J., HIBBETT, D. S., LUTZONI, F., SPATAFORA, J. W. et VILGALYS, R. (2009). *The search for the fungal tree of life*. Trends Microbiol, 17(11):488–97.
- MENZ, R. I., WALKER, J. E. et LESLIE, A. G. (2001). *Structure of bovine mitochondrial F(1)-ATPase with nucleotide bound to all three catalytic sites : implications for the mechanism of rotary catalysis*. Cell, 106(3):331–41.
- MITCHELL, P. (1961). *Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism*. Nature, 191:144–8.
- MORAN, N. A. (1996). *Accelerated evolution and Muller's ratchet in endosymbiotic bacteria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 93(7):2873–8.
- MORSE, R. H. (2000). *RAP, RAP, open up ! New wrinkles for RAP1 in yeast*. Trends Genet, 16(2):51–3.
- MOUNOLOU, J.-C. et LACROUTE, F. (2005). *Mitochondrial DNA : an advance in eukaryotic cell biology in the 1960s*. Biol Cell, 97(9):743–8.
- MULLER, H. J. (1964). *The relation of recombination to mutational advance*. Mutat Res, 106:2–9.
- MURPHY, M. P. (2009). *How mitochondria produce reactive oxygen species*. Biochem J, 417(1):1–13.
- NAGLEY, P., FARRELL, L. B., GEARING, D. P., NERO, D., MELTZER, S. et DEVENISH, R. J. (1988). *Assembly of functional proton-translocating ATPase complex in yeast mitochondria with cytoplasmically synthesized subunit 8, a polypeptide normally encoded within the organelle*. Proc Natl Acad Sci U S A, 85(7):2091–5.

- NIU, W., LI, Z., ZHAN, W., IYER, V. R. et MARCOTTE, E. M. (2008). *Mechanisms of cell cycle control revealed by a systematic and quantitative overexpression screen in S. cerevisiae*. PLoS Genet, 4(7):e1000120.
- NURY, H., DAHOUT-GONZALEZ, C., TRÉZÉGUET, V., LAUQUIN, G., BRANDOLIN, G. et PEBAY-PEYROULA, E. (2005). *Structural basis for lipid-mediated interactions between mitochondrial ADP/ATP carrier monomers*. FEBS Lett, 579(27):6031–6.
- OCA-COSSIO, J., KENYON, L., HAO, H. et MORAES, C. T. (2003). *Limitations of allotropic expression of mitochondrial genes in mammalian cells*. Genetics, 165(2):707–20.
- OHAMA, T., INAGAKI, Y., BESSHO, Y. et OSAWA, S. (2008). *Evolving genetic code*. Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci, 84(2):58–74.
- OJAIMI, J., PAN, J., SANTRA, S., SNELL, W. J. et SCHON, E. A. (2002). *An algal nucleus-encoded subunit of mitochondrial ATP synthase rescues a defect in the analogous human mitochondrial-encoded subunit*. Mol Biol Cell, 13(11):3836–44.
- OTT, M. et HERRMANN, J. M. (2010). *Co-translational membrane insertion of mitochondrially encoded proteins*. Biochim Biophys Acta, 1803(6):767–75.
- PALMER, J. D. (1997). *Organelle genomes : going, going, gone !* Science, 275(5301):790–1.
- PARTIKIAN, A., OLVECZKY, B., SWAMINATHAN, R., LI, Y. et VERKMAN, A. S. (1998). *Rapid diffusion of green fluorescent protein in the mitochondrial matrix*. J Cell Biol, 140(4):821–9.
- PAUL, M. F. et TZAGOLOFF, A. (1995). *Mutations in RCA1 and AFG3 inhibit F1-ATPase assembly in Saccharomyces cerevisiae*. FEBS Lett, 373(1):66–70.
- PAUMARD, P., VAILLIER, J., COULARY, B., SCHAEFFER, J., SOUBANNIER, V., MUELLER, D. M., BRÈTHES, D., di RAGO, J.-P. et VELOURS, J. (2002). *The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology*. EMBO J, 21(3):221–30.
- PÉREZ-MARTÍNEZ, X., VAZQUEZ-ACEVEDO, M., TOLKUNOVA, E., FUNES, S., CLAROS, M. G., DAVIDSON, E., KING, M. P. et GONZÁLEZ-HALPHEN, D. (2000). *Unusual location of a mitochondrial gene. Subunit III of cytochrome C oxidase is encoded in the nucleus of Chlamydomonas algae*. J Biol Chem, 275(39):30144–52.
- RACE, H. L., HERRMANN, R. G. et MARTIN, W. (1999). *Why have organelles retained genomes ?* Trends Genet, 15(9):364–70.
- RAK, M., TETAUD, E., GODARD, F., SAGOT, I., SALIN, B., DUVEZIN-CAUBET, S., SLONIMSKI, P. P., RYTKA, J. et 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(15):10853–64.
- RAK, M. et 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(44):18509–14.
- RAK, M., ZENG, X., BRIÈRE, J.-J. et TZAGOLOFF, A. (2009). *Assembly of F0 in Saccharomyces cerevisiae*. Biochim Biophys Acta, 1793(1):108–16.
- ROSSMANN, M. P., LUO, W., TSAPONINA, O., CHABES, A. et STILLMAN, B. (2011). *A common telomeric gene silencing assay is affected by nucleotide metabolism*. Mol Cell, 42(1):127–36.

- ROUCOU, X., ARTIKA, I. M., DEVENISH, R. J. et NAGLEY, P. (1999). *Bioenergetic and structural consequences of allotopic expression of subunit 8 of yeast mitochondrial ATP synthase. The hydrophobic character of residues 23 and 24 is essential for maximal activity and structural stability of the enzyme complex.* Eur J Biochem, 261(2):444–51.
- SAMMET, S. G., BASTOLLA, U. et PORTO, M. (2010). *Comparison of translation loads for standard and alternative genetic codes.* BMC Evol Biol, 10:178.
- SANCHIRICO, M., TZELLAS, A., FOX, T. D., CONRAD-WEBB, H., PERIMAN, P. S. et MASON, T. L. (1995). *Relocation of the unusual VARI gene from the mitochondrion to the nucleus.* Biochem Cell Biol, 73(11-12):987–95.
- SANGER, F., NICKLEN, S. et COULSON, A. R. (1977). *DNA sequencing with chain-terminating inhibitors.* Proc Natl Acad Sci U S A, 74(12):5463–7.
- SCHÄGGER, H. et 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(2):368–79.
- SCHÄGGER, H. et von JAGOW, G. (1991). *Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form.* Anal Biochem, 199(2):223–31.
- SCHOPF, J. W. (2011). *The paleobiological record of photosynthesis.* Photosynth Res, 107(1):87–101.
- SEKINE, S.-i., SHICHIRI, M., BERNIER, S., CHÊNEVERT, R., LAPOINTE, J. et YOKOYAMA, S. (2006). *Structural bases of transfer RNA-dependent amino acid recognition and activation by glutamyl-tRNA synthetase.* Structure, 14(12):1791–9.
- SENIOR, A. E., NADANACIVA, S. et WEBER, J. (2002). *The molecular mechanism of ATP synthesis by F1FO-ATP synthase.* Biochim Biophys Acta, 1553(3):188–211.
- SICHERITZ-PONTÉN, T., KURLAND, C. G. et ANDERSSON, S. G. (1998). *A phylogenetic analysis of the cytochrome b and cytochrome c oxidase I genes supports an origin of mitochondria from within the Rickettsiaceae.* Biochim Biophys Acta, 1365(3):545–51.
- SIERRA, M. F. et TZAGOLOFF, A. (1973). *Assembly of the mitochondrial system. Purification of a mitochondrial product of the ATPase.* Proc Natl Acad Sci U S A, 70(11):3155–9.
- SINCLAIR, J. H. et STEVENS, B. J. (1966). *Circular DNA filaments from mouse mitochondria.* Proc Natl Acad Sci U S A, 56(2):508–14.
- SOGIN, M. L. (1997). *Organelle origins : energy-producing symbionts in early eukaryotes ?* Curr Biol, 7(5):R315–7.
- SOTO, I. C., FONTANESI, F., VALLEDOR, M., HORN, D., SINGH, R. et BARRIENTOS, A. (2009). *Synthesis of cytochrome c oxidase subunit 1 is translationally downregulated in the absence of functional F1FO-ATP synthase.* Biochim Biophys Acta, 1793(11):1776–86.
- STEELE, D. F., BUTLER, C. A. et FOX, T. D. (1996). *Expression of a recoded nuclear gene inserted into yeast mitochondrial DNA is limited by mRNA-specific translational activation.* Proc Natl Acad Sci U S A, 93(11):5253–7.
- STOCK, D., GIBBONS, C., ARECHAGA, I., LESLIE, A. G. et WALKER, J. E. (2000). *The rotary mechanism of ATP synthase.* Curr Opin Struct Biol, 10(6):672–9.

- SUPEKOVA, L., SUPEK, F., GREER, J. E. et SCHULTZ, P. G. (2010). *A single mutation in the first transmembrane domain of yeast COX2 enables its allotopic expression*. Proc Natl Acad Sci U S A, 107(11):5047–52.
- TAYLOR, A. B., SMITH, B. S., KITADA, S., KOJIMA, K., MIYAURA, H., OTWINOWSKI, Z., ITO, A. et DEISENHOFER, J. (2001). *Crystal structures of mitochondrial processing peptidase reveal the mode for specific cleavage of import signal sequences*. Structure, 9(7):615–25.
- THORSNESS, P. E. et FOX, T. D. (1990). *Escape of DNA from mitochondria to the nucleus in Saccharomyces cerevisiae*. Nature, 346(6282):376–9.
- THORSNESS, P. E. et FOX, T. D. (1993). *Nuclear mutations in Saccharomyces cerevisiae that affect the escape of DNA from mitochondria to the nucleus*. Genetics, 134(1):21–8.
- THORSNESS, P. E. et WEBER, E. R. (1996). *Escape and migration of nucleic acids between chloroplasts, mitochondria, and the nucleus*. Int Rev Cytol, 165:207–34.
- van der GIEZEN, M. (2009). *Hydrogenosomes and mitosomes : conservation and evolution of functions*. J Eukaryot Microbiol, 56(3):221–31.
- VANROLLEGHEM, P. A., de JONG-GUBBELS, P., van GULIK, W. M., PRONK, J. T., van DIJKEN, J. P. et HEIJNEN, S. (1996). *Validation of a metabolic network for Saccharomyces cerevisiae using mixed substrate studies*. Biotechnol Prog, 12(4):434–48.
- VELOURS, J. et ARSELIN, G. (2000). *The Saccharomyces cerevisiae ATP synthase*. J Bioenerg Biomembr, 32(4):383–90.
- VIEBROCK, A., PERZ, A. et SEBALD, W. (1982). *The imported preprotein of the proteolipid subunit of the mitochondrial ATP synthase from Neurospora crassa. Molecular cloning and sequencing of the mRNA*. EMBO J, 1(5):565–71.
- VILLALOBOS, A., NESS, J. E., GUSTAFSSON, C., MINSHULL, J. et GOVINDARAJAN, S. (2006). *Gene Designer : a synthetic biology tool for constructing artificial DNA segments*. BMC Bioinformatics, 7:285.
- WALLACE, D. C. (2005). *Mitochondria and cancer : Warburg addressed*. Cold Spring Harb Symp Quant Biol, 70:363–74.
- WATT, I. N., MONTGOMERY, M. G., RUNSWICK, M. J., LESLIE, A. G. W. et WALKER, J. E. (2010). *Bioenergetic cost of making an adenosine triphosphate molecule in animal mitochondria*. Proc Natl Acad Sci U S A, 107(39):16823–7.
- WEI, Y.-H. et LEE, H.-C. (2002). *Oxidative stress, mitochondrial DNA mutation, and impairment of antioxidant enzymes in aging*. Exp Biol Med (Maywood), 227(9):671–82.
- WERY, M., RUIDANT, S., SCHILLEWAERT, S., LEPORÉ, N. et LAFONTAINE, D. L. J. (2009). *The nuclear poly(A) polymerase and Exosome cofactor Trf5 is recruited cotranscriptionally to nucleolar surveillance*. RNA, 15(3):406–19.
- WESTERMANN, B. (2010). *Mitochondrial dynamics in model organisms : what yeasts, worms and flies have taught us about fusion and fission of mitochondria*. Semin Cell Dev Biol, 21(6):542–9.
- WILLIAMSON, D. (2002). *The curious history of yeast mitochondrial DNA*. Nat Rev Genet, 3(6):475–81.

- WILSON, R. J. et WILLIAMSON, D. H. (1997). *Extrachromosomal DNA in the Apicomplexa*. *Microbiol Mol Biol Rev*, 61(1):1–16.
- WITTIG, I. et SCHÄGGER, H. (2009). *Supramolecular organization of ATP synthase and respiratory chain in mitochondrial membranes*. *Biochim Biophys Acta*, 1787(6):672–80.
- WOLF, K., DUJON, B. et SLONIMSKI, P. P. (1973). *Mitochondrial genetics. V. Multifactorial mitochondrial crosses involving a mutation conferring paromomycin-resistance in Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Gen Genet*, 125(1):53–90.
- YOSHIKAWA, S., SHINZAWA-ITOH, K. et TSUKIHARA, T. (1998). *Crystal structure of bovine heart cytochrome c oxidase at 2.8 Å resolution*. *J Bioenerg Biomembr*, 30(1):7–14.
- ZABALETA, E., MOURAS, A., HERNOULD, M., SUHARSONO et ARAYA, A. (1996). *Transgenic male-sterile plant induced by an unedited atp9 gene is restored to fertility by inhibiting its expression with antisense RNA*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 93(20):11259–63.
- ZENG, X., BARROS, M. H., SHULMAN, T. et TZAGOLOFF, A. (2008). *ATP25, a new nuclear gene of Saccharomyces cerevisiae required for expression and assembly of the Atp9p subunit of mitochondrial ATPase*. *Mol Biol Cell*, 19(4):1366–77.
- ZENG, X., HOURSET, A. et TZAGOLOFF, A. (2007). *The Saccharomyces cerevisiae ATP22 gene codes for the mitochondrial ATPase subunit 6-specific translation factor*. *Genetics*, 175(1):55–63.

Index

Complexe protéique

AAA protéases

- i-AAA protéase, 118, 120, 225, 226, 237, 239, 243
- m-AAA protéase, 18, 48, 161–163, 171, 175, 176, 241–244, 247, 260

- ATP synthase, 6, 16, 21, 24, 25, 27–38, 43–45, 47, 48, 102, 103, 105, 106, 116, 119, 120, 166, 167, 170, 181, 185, 221, 233, 237–239, 243, 244, 247, 255–257, 260

- Secteur F₁, 28–34, 43, 105, 106, 164, 170, 243, 251, 256

- Secteur F_o, 28, 30, 31, 33, 43, 106, 116, 153, 164, 170, 221, 222, 233, 238, 251, 256

- Cytochrome bc₁, 24, 37, 38, 44

- Cytochrome c oxydase, 21, 24, 37, 38, 44, 102, 105, 109, 220–222, 233, 257

- Prohibitine, voir Phb1p

Délétion

- $\Delta arg8$: : *HIS3*, 53, 54, 56, 57, 156

- $\Delta arg8$: : *URA3*, 53

- $\Delta atp6$: : *ARG8^m*, 53, 58, 59, 62, 63, 222–226

- $\Delta 5$, 183, 184

- $\Delta 7$, 183, 184

- $\Delta atp9$: : *ARG8^m*, 53–62, 65, 116–120, 152–155, 160, 162–167, 169, 170, 172, 174, 176

- $\Delta cox2$: : *ARG8^m*, 53, 58–61, 216–220

- $\Delta cox3$: : *ARG8^m*, 53, 58, 59, 63–66, 226, 227, 229, 230

- $\Delta gus1$: : *KANMX4*, 54, 64, 65, 96, 177, 178

- $\Delta yme1$: : *KANMX4*, 54, 58, 59, 96, 118, 225, 226

- $\Delta yta10$: : *KANMX4*, 53, 57–62, 96, 171–176

- $\Delta yta12$: : *KANMX4*, 177

Génome mitochondrial

- ρ^+ , 43, 53–66, 174, 175

- ρ^- , 43, 73, 216

- ρ^- / ρ^0 , 43, 44, 57, 61, 71–73, 116, 243

- ρ^0 , 43, 53, 57, 72, 73, 155, 156, 167, 170, 216, 220

- ρ , 53, 58

- Petite synthétique, voir ρ^-

Gène

- AAP1, voir ATP8

- ACT1

- ACT1*, 217

- ADE2

- ade2-101*, 53

- ade2-1*, 53, 54, 56, 57

- ADH1

- ADH1*, 171, 177

- AEP1

- AEP1*, 34

- AEP2

- AEP2*, 34

- AEP3

- AEP3*, 34

- AFG3, voir YTA10

- ARG8

- ARG8^m*, 53–66, 71–73, 116–120, 152–155, 160, 162–167, 169, 170, 172, 174, 176, 216–220, 222–227, 229, 230

- arg8*, 53, 54, 56, 57, 156

- ARG8*, 116

- ARS413

- ARS413 IV 32977C>T*, 56

- ARS413*, 161

- ATP10

- ATP10*, 34

- ATP11

- ATP11*, 34

- ATP12

- ATP12*, 34

- ATP14

- ATP14*, 28

- ATP15

ATP15, 28
 ATP16
 ATP16, 28
 ATP17
 ATP17, 28
 ATP18
 ATP18, 28
 ATP19
 ATP19, 28
 ATP1
 ATP1, 28
 ATP20
 ATP20, 28
 ATP21
 ATP21, 28
 ATP22
 ATP22, 34
 ATP23
 ATP23, 34
 ATP25
 ATP25, 34
 ATP2
 ATP2, 28
 ATP3
 ATP3, 28
 ATP4
 ATP4, 28
 ATP5G
 ATP5G1, 45
 ATP5
 ATP5, 28
 ATP6
 ATP6^M, 28
 ScOXAI^{MTS}-ATP6-Hyb, 62, 63, 77, 78, 81, 222–224
 ScOXAI^{MTS}-ScATP6-Nuc, 59, 62, 63, 77, 78, 80, 222–226
 atp6, 53, 58, 59, 62, 63, 222–226
 ATP6, 42, 45, 53, 77, 119, 221–224, 233, 251
 ScOXAI^{MTS}-CrATP6, 62, 63, 77, 78, 80, 222–224
 ATP7
 ATP7, 28
 ATP8
 ATP8^M, 28
 ATP8, 44, 117, 234
 ATP9
 ATP9^M, 28
 PaATP9-5 (like), 182, 183
 PaATP9-5, 54, 55, 57, 59, 60, 77–79, 118–120, 163–170, 172, 174, 183, 184, 255
 PaATP9-7 (like), 182, 183
 PaATP9-7, 54–56, 78, 79, 118–120, 163–165, 183, 184, 238, 255
 ATP9-Hyb, 54–57, 60–62, 77, 79, 120, 152–155, 162–165, 168, 172, 174–176, 215
 SUP3ATP9-Hyb, 55, 78, 165, 167, 169, 170
 yATP9-Nuc, 54–56, 58, 77, 79, 117–119, 152, 153, 163, 165
 5⁵, 183
 5⁷, 184
 7⁵, 184
 ATP9mt, 182, 183
 atp9, 53–62, 65, 116–120, 152–155, 160, 162–167, 169, 170, 172, 174, 176
 ATP9, 38, 39, 45–48, 53, 77, 115–119, 151, 152, 163, 164, 166, 168, 170–172, 177, 178, 181–185, 215, 217, 221, 222, 233, 237, 238, 241, 244, 251, 255–257, 260
 PaATP9, 184
 BI4
 BI4, 43
 CAN1
 CAN1 V 32675 A>G, 54, 56, 57
 can1-I, 156, 160
 CAN1, 158–160
 COB
 COB, 37, 43, 44
 COX1
 COX1, 13, 37, 43
 COX2
 COX2 XVII 73448 T>C + 7451 T>C + 74225 T>A + 74327 T>C + 74414 A>G, 54, 56, 57
 COX2-Nuc W56R, 61, 77, 80, 217–220
 COX2-Nuc, 59–61, 77, 80, 217–219
 cox2, 53, 58–61, 216–220
 COX2, 38, 42, 44, 77, 158–160, 215–218, 221, 233, 234, 257
 COX3
 COX3-Hyb, 230
 NcATP9^{MTS}-COX3-Hyb, 63, 64, 78, 83, 227, 229, 230
 ScOXAI^{MTS}-COX3-Hyb, 63, 64, 78, 83, 227, 229, 230

ScOXAI^{MTS}-ScCOX3-Nuc, 65, 66, 77, 78, 81, 226, 227, 229
cox3, 53, 58, 59, 63–66, 226, 227, 229, 230
COX3, 38, 119, 221, 222, 226–229, 251
ScOXAI^{MTS}-CrCOX3, 65, 66, 77, 78, 82, 226, 227, 229
ScOXAI^{MTS}-PsCOX3, 77, 82, 227
COX4
COX4, 46
COX8
COX8, 45
CST6
cst6-G276C, 54, 56, 57
CST6, 158, 159, 161, 162
ENT5
ent5-D297E, 57
ent5-Sup, 179
ent5, 251
ENT5, 159, 161, 162, 178, 251
FAS1
fas1-R174S, 56
FAS1, 158, 161, 162
FMC1
fmc1, 256
FMC1, 34
GAR1
gar1-G185C, 54
GAR1, 158, 161, 162
GLN3
GLN3 V 23262T>C, 57
GLN3, 159, 161
GPD1
gpd1-T88N, 54, 56, 57
GPD1, 158, 159, 161, 162
GUS1
gus1-Sup, 64, 65, 77, 90, 91, 177, 178, 251
gus1-V343I, 56
GUS1-Wt, 64, 65, 77, 88, 89, 177, 178
gus1, 54, 64, 65, 96, 177, 178
GUS1, 54, 96, 158, 161, 162, 177, 178, 248, 251
HIS3
his3Δ1, 53, 54
his3-11,15, 53, 54, 56, 57
HIS3, 53, 54, 56, 57, 156
HIS4
his4, 53
INH1
INH1, 28
KANMX4
KANMX4, 53, 54, 57–62, 64, 65, 72, 96, 118, 171–173, 175–178, 225
KAR1
kar1-1, 53, 72
LEU2
leu2Δ0, 53, 54
leu2-3,112, 53, 54, 56, 57
LEU2, 77, 78, 177
LYS2
lys2Δ0, 54
LYS2, 54
MAT
MATα, 53, 54, 70
MATa, 53, 54, 56, 57, 70
MET15
met15Δ0, 53, 54
MET6
met6, 53
NAM1
NAM1, 34
NCA2
NCA2, 34
NCA3
NCA3, 34
OLI1, voir ATP9
OLI2, voir ATP6
OXA1
OXA1, 34
PDF2
PaPDF2, 184
PHB1
phb1-T143S, 56
PHB1, 159, 161, 162
PMT7
pmt7-V61L, 56
PMT7, 158, 161, 162
PRT1
prt1-E725A, 57
PRT1, 159, 161
RAP1
rap1-M763V, 56
RAP1, 159, 161
RCA1, voir YTA12
SAS10
SAS10, 158, 159, 161, 162
SAS1
sas1-F97L, 54, 56, 57
SOD2
SOD2, 45

- STF1
STF1, 28
- STF2
STF2, 28
- STF3
STF3, 28
- TIM11
TIM11, 28
- TRF5
TRF5 XIV 66555T>C, 57
TRF5, 159, 161
- TRP1
trp1-1, 53, 54, 56, 57
TRP1, 77, 78, 171
- TRP2
trp2, 53
- TSC11
TSC11 V 346422A>G, 56
TSC11, 159, 161, 162
- URA3
ura3Δ0, 53, 54
ura3-1, 53, 54, 56, 57
ura3-52, 53
URA3, 53, 71, 77, 78, 158–160, 217
- VAR1
VARI, 36, 44
- YLL066W-B
YLL066W-B, 161
- YLL66W-B
yll66w-b-F46S, 56
- YME1
yme1, 54, 58, 59, 96, 118, 225, 226
YME1, 96, 118
- YTA10
yta10-G317C, 57
yta10-Sup, 60, 62, 78, 85, 96, 171–176
YTA10-Wt, 60, 61, 77, 84, 171–176
yta10, 53, 57–62, 96, 171–176
YTA10, 96, 159, 161, 162, 171–175, 242, 244
- YTA12
yta12-Sup, 78, 87, 96, 172, 177
yta12-V563F, 56
YTA12-Wt, 77, 86, 177
yta12, 177
YTA12, 96, 158, 161, 162, 171, 177, 242, 244
- Organismes**
Homo sapiens, 45, 48
 LUCA, 4–8
- Organisme**
 α -protéobactérie, 10, 12, 13
Arabidopsis thaliana, 46
Bos taurus, 25, 32
Candida albicans, 235
Candida glabrata, 235
Chlamydomonas reinhardtii, 45, 47, 119, 221–223, 226, 227
Escherichia coli, 25, 28, 32, 98
Grypania spiralis, 11
Hansenula saturnus, 235
 Homme, voir *Homo sapiens*
Homo sapiens, 28, 36
Kluyveromyces thermotolerans, 235
 Levure, voir *Saccharomyces cerevisiae*
Neurospora crassa, 38, 39, 43, 44, 46, 47, 117, 183, 227
Nicotiana tabacum, 46
Podospora anserina, 36, 38, 47, 48, 70, 76, 97, 99, 117–120, 152, 162–166, 174, 181–185, 215, 237, 238, 255, 260
Polytomella sp., 222, 226, 227
Rickettsia prowazekii, 10, 13
Saccharomyces cerevisiae, 17, 18, 23–25, 28, 29, 31–34, 36–39, 42–44, 46–48, 70–72, 79, 94, 97, 98, 102, 106, 112, 115–120, 151, 152, 156, 163, 166, 168, 177, 181, 215, 217, 222, 223, 225–228, 233–235, 237, 238, 241–243, 248, 251, 253, 255–257, 260
Schizosaccharomyces pombe, 43
Schizosaccharomyces pombe, 234
Thermophilus aquaticus, 95
Thermus thermophilus, 248
- Protéine**
 Acétylornithine aminotransférase, voir Arg8p
 4
 4 (*ATP4*), 28, 29, 31
ATP6
ScOxa1p^{MTS}-ScAtp6p-Nuc, 226
ARC1
Arc1p, 178, 248, 251
ARG8
Arg8p, 71, 116
ATP10
Atp10p, 33
ATP11
Atp11p, 33
ATP12

Atp12p, 33, 34
 ATP15
 ϵ (*ATP15*), 28–30
 ATP16
 δ (*ATP16*), 28–30, 43
 ATP1
 α (*ATP1*), 18, 28–30, 33, 34, 43, 256
 ATP23
 Atp23p, 33
 ATP25
 Atp25p, 33
 ATP2
 β (*ATP2*), 28–30, 33, 34, 43, 256
 ATP3
 γ (*ATP3*), 28–31, 43, 109, 256
 ATP4
 Atp4p, 31
 ATP5
 OSCP (*ATP5*), 28, 29, 31
 ATP6
 Atp6p, 28, 29, 31–34, 36, 38, 43, 45,
 109, 116, 222, 223, 251, 256
 ScOxa1p^{MTS}-ScAtp6p-Nuc, 225
 ATP8
 Atp8p, 28, 29, 31, 33, 34, 36, 38, 43,
 44, 116
 ATP9
 Atp9p, 28, 29, 32–34, 36, 38, 43, 44,
 46–48, 109, 115–117, 119, 120, 151–
 154, 163, 164, 166, 170, 173, 175,
 177–179, 182, 221, 222, 225, 227,
 237–239, 241, 244, 247, 251, 255,
 256, 260
 Atp9p-Hyb, 120, 153, 154, 172, 173,
 175, 176
 NcAtp9p, 227
 PaAtp9p, 120, 238
 PaAtp9p-5, 120, 166, 182
 PaAtp9p-7, 117, 120, 152, 182
 yAtp9p-Nuc, 117, 118, 120, 152, 225,
 226
 BI4
 Bi4p, 43, 44
 COB
 Cytochrome b (*COB*), 13, 36, 38, 44,
 233, 234
 COX18
 Cox18p, 21
 COX1
 Cox1p, 36, 38, 233
 COX2
 Cox2p, 21, 36, 109, 217, 219–221, 233,
 257
 Cox2p-Nuc, 218, 219
 Cox2p-Nuc W56R, 218, 219
 COX3
 Cox3p, 36, 109, 226–228, 233, 251
 Cox3p-Hyb, 228
 NcAtp9p^{MTS}-Cox3p-Hyb, 228
 ScOxa1p^{MTS}-Cox3p-Hyb, 228
 D
 d (*ATP7*), 28, 29, 31
 ENT5
 Ent5p, 179, 251–253
 E
 e (*ATP21*), 28, 29, 31, 33
 FMC1
 Fmc1p, 33, 256
 F
 f (*ATP17*), 28, 29, 31, 33
 GUS1
 GluRS, voir Gus1p
 Gus1p, 250
 G
 g (*ATP20*), 28, 29, 31, 33
 HSP70
 Hsp70p, 21
 H
 h (*ATP14*), 28, 29, 31
 INH1
 Inh1p, 28, 30
 I
 i (*ATP18*), 28, 29, 31, 33
 K
 k (*ATP19*), 28, 29, 31, 33
 MBA1
 Mba1p, 21
 MDM38
 Mdm38p, 21
 MIA40
 Mia40p, 21
 MRPL32
 MrpL32p, 243
 OXA1
 Oxa1p, 21, 44, 217, 222, 223, 226, 227
 PGK1
 Pgk1p, 109, 117
 PHB1
 Phb1p, 171, 244
 PHB2
 Phb2p, 171
 PMT1

Pmt1p, 162
PNT1
Pnt1p, 21
POR1
Por1p, 109, 153, 173, 219, 225, 226
STF1
Stf1p, 28, 30
STF2
Stf2p, 28
STF3
Stf3p, 28
TOM20
Tom20p, 19
TOM40
Tom40p, 19
TOM70
Tom70p, 19
UCP1
Ucp1p, 255
URA3
Orotidine monophosphate décarboxylase, voir Ura3p
VAR1
Var1p, 44
YME1
Yme1p, 109, 118
YTA10
Yta10p, 109, 171, 242–244
YTA12
Yta12p, 242–244

Liste des symboles

3D	trois dimensions	EDTA	<i>Ethylene Diamine Tetraacetic Acid</i> , acide éthylène diamine tétraacétique
5-FOA	<i>5-FluoroOrotic Acid</i> , acide 5-fluoroorotique	EGTA	<i>Ethylene Glycol Tetraacetic Acid</i> , éthylène glycol acide tétraacétique
°C	degrés celcius	EIM	Espace InterMembranaire mitochondrial
AAA	<i>ATPase Associated with various cellular Activities</i> , ATPase associée à des activités cellulaires variées	GFP	<i>Green Fluorescent Protein</i> , protéine fluorescente verte
ADN	Acide DésoxyriboNucléique	GOE	<i>Great Oxidation Event</i> , grand évènement d'oxydation
ADN _g	ADN génomique	GTP	Guanosine TriPhosphate
ADN _{mt}	ADN mitochondrial	HEPES	acide 4-(2-HydroxyÉthyl)-1-Pipérazine Éthane Sulfonique
ARN	Acide RiboNucléique	IM	<i>Inner Membrane</i> , membrane interne
ARN _m	ARN messenger	IMS	<i>InterMembrane Space</i> , espace intermembranaire
ARN _r	ARN ribosomique	KCN	cyanure de potassium
ARN _s	ARN <i>short</i> : petits ARN	LUCA	<i>Last Universal Common Ancestor</i> , dernier ancêtre commun universel (cénancêtre)
ARN _t	ARN de transfert	m/v	masse par volume
ATP	Adénosine TriPhosphate	ME	Membrane Externe
BET	Bromure d'Éthidium	MI	Membrane Interne
BN	<i>Blue Native gel</i> , gel natif en coloration bleue	MOPS	acide 3-(N-Morpholino) Propane-Sulfonique
CCCP	Carbonyl Cyanide m-ChloroPhényl hydrazone	MTS	<i>Mitochondrial Targetting Sequence</i> , préséquence d'adressage mitochondrial
CSM	<i>Complete Synthetic Medium</i> , mélange d'acides aminés	NAD ⁺ / NADH	Nicotinamine Adénine Dinucléotide / hydrogénée
Da	Dalton, unité de poids moléculaire (1/12 de la masse du ¹² C)	OM	<i>Outer Membrane</i> , membrane externe
ddNTP	didésoxyNucléotide TriPhosphate	OXPHOS	Oxidations Phosphorylantes
dNTP	désoxyNucléotide TriPhosphate	P _i	Phosphate inorganique
DO	Densité Optique		
ECL	<i>Electrogenerated ChemiLuminescence</i> , chemiluminescence électrogénérée		

PAGE	<i>PolyAcrylamide Gel Electrophoresis</i> , électrophorèse en gel de polyacrylamide	sp.	<i>species</i>
pb	paire de bases, unité de longueur des ADN	T _m	Température de fusion
PCR	<i>Polymerase Chain Reaction</i> , réaction en chaîne de la polymérase	TCA	<i>TriChloroacetic Acid</i> , acide trichloroacétique
PEG	PolyÉthylène Glycol	TE	Tris-EDTA
PMSF	PhénylMéthaneSulfonylFluoride	TMH	<i>Trans-Membrane Helix</i> , hélice trans-membranaire
qsp	quantité suffisante pour	TMPD	N,N,N',N'-TétraMéthyl-p-PhénylèneDiamine
RedOx	Réductions / Oxidations	UTR	<i>UnTranslated Region</i> , région non traduite
ROS	<i>Reactive Oxygen Species</i> , espèces réactives de l'oxygène	v / v	volume par volume
SDS	Sodium DodécylSulfate	WT	<i>Wild Type</i> , type sauvage

Résumé

Malgré la relocalisation au noyau d'une majorité des gènes du procaryote ancestral à l'origine des mitochondries, une poignée de gènes réside encore dans l'organite après près de deux milliards d'années d'évolution. Les raisons du maintien d'un génome mitochondrial sont mal comprises. Je me suis intéressé à cette problématique via des expériences de relocalisation artificielle de gènes mitochondriaux chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Nous avons réussi, pour la première, à exprimer de manière fonctionnelle depuis le noyau le gène *ATP9* qui encode une petite protéine hydrophobe essentielle au canal à protons de l'ATP synthase. Majoritairement mitochondrial chez les eucaryotes, comme *S.cerevisiae*, ce gène est retrouvé dans le génome nucléaire de la majorité des métazoaires, des algues vertes chlorophycées et des champignons filamenteux ascomycètes tel que *Podospora anserina*. Nos résultats montrent que l'hydrophobicité de la sous-unité Atp9p doit être diminuée pour qu'elle puisse être importée dans la mitochondrie depuis le cytosol. Nous avons également identifié un certain nombre d'autres adaptations pour optimiser l'expression du gène *ATP9* relocalisé. Elles sont relativement nombreuses, comme par exemple une diminution de l'activité protéolytique de certains systèmes (m-AAA protéase) impliqués dans le contrôle de qualité des protéines mitochondriales. Il apparaît donc que si le transfert du gène *ATP9* est en principe possible chez la levure, il s'agit d'un processus très complexe. Une telle évolution n'a donc que peu de chances de se produire et d'être maintenue par la sélection naturelle, à moins que le transfert du gène *ATP9* au noyau ne confère quelque avantage à l'organisme. Nous avons confirmé cette hypothèse par une étude menée chez *P.anserina* où nous avons montré que la relocalisation au noyau du gène *ATP9*, qui s'est produite naturellement au cours de l'évolution, a permis la mise en place de régulations spécifiques permettant d'ajuster les besoins en ATP synthase au cours du cycle de vie de ce champignon. Les résultats de cette étude nous amènent à introduire une nouvelle hypothèse selon laquelle les variations de contenu en gènes des génomes mitochondriaux ne sont pas influencées uniquement par des contraintes au niveau de la structure de leur produits, mais aussi par le mode de vie de l'organisme.

Abstract

Despite the nuclear relocation of most genes of the ancestral procaryotic genome which gave birth to mitochondria, a small set of genes still remains into the organite after 2 billions years of evolution. The reasons for this maintenance of mitochondrial genome are currently not clear. I studied these questions by experimenting artificial relocations of mitochondrial genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. We managed, for the first, to functionally express the *ATP9* gene from the nucleus, which encodes a small hydrophobic essential subunit of the proton chanel of the ATP synthase. Mostly mitochondrial within eukaryotes like *S.cerevisiae*, this gene can be found in the nuclear genome in most metazoans, chlorophyceans green algae and ascomycota filamentous fungi like *Podospora anserina*. Our results show that the hydrophobicity of the Atp9p subunit has to be decreased to be imported into the mitochondria from the cytosol. We also identified some adaptations optimizing the expression of the relocated *ATP9* gene, for example mutations decreasing the proteolytic activity of some systems (like the m-AAA protease) involved in the quality control of mitochondrial proteins. It seems that if the *ATP9* gene relocation is possible within the yeast, yet it is a complex and difficult process. Such an evolution has only few chances to occur and to be maintained by natural selection, unless it could confer some advantage to the organism. We have confirmed this hypothesis in a study made on *P.anserina*, in which we showed that the natural *ATP9* relocation to the nucleus that appeared during its evolution allowed the setting up of specific regulations modulating the ATP synthase needs during the life-cycle of this fungus. The results presented here lead us to introduce a new hypothesis postulating that the variations of the set of genes contained in the mitochondrial genome are influenced not only by the constraints generated by their products structure, but also by the lifestyle of the organism.