UNIVERSITÉ PARIS SUD

École doctorale Gènes, Génomes, Cellules

Thèse de Doctorat présentée par

Rémy SAUNIER

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris Sud

Discipline : **Biologie**

Étude des rôles et des partenaires du domaine C-terminal de Rpn11, une sous-unité du protéasome 26S, dans la dynamique mitochondriale chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Soutenue publiquement le 18 décembre 2012 devant un jury composé de :

Pr Cécile FAIRHEAD	Professeur des Universités	Président du jury
Dr Anne PEYROCHE	Directeur de recherche	Rapporteur
Dr Naïma BELGAREH-TOUZÉ	Chargée de recherche - HDR	Rapporteur
Dr Anne-Laure BULTEAU	Chargée de recherche	Examinateur
Dr Agnès DELAHODDE	Directeur de recherche	Directeur de Thèse

UNIVERSITÉ PARIS SUD

École doctorale Gènes, Génomes, Cellules

Thèse de Doctorat présentée par

Rémy SAUNIER

Pour obtenir le grade de

Docteur de l'Université Paris Sud

Discipline : **Biologie**

Étude des rôles et des partenaires du domaine C-terminal de Rpn11, une sous-unité du protéasome 26S, dans la dynamique mitochondriale chez *Saccharomyces cerevisiae*.

Soutenue publiquement le 18 décembre 2012 devant un jury composé de :

Pr Cécile FAIRHEAD	Professeur des Universités	Président du jury
Dr Anne PEYROCHE	Directeur de recherche	Rapporteur
Dr Naïma BELGAREH-TOUZÉ	Chargée de recherche - HDR	Rapporteur
Dr Anne-Laure BULTEAU	Chargée de recherche	Examinateur
Dr Agnès DELAHODDE	Directeur de recherche	Directeur de Thèse

À mes parents.

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier Agnès Delahodde pour m'avoir fait confiance et m'avoir permis d'effectuer ce travail de thèse au sein de son équipe. Tu t'es toujours montrée très disponible et même si cela n'a pas été facile tous les jours, j'espère avoir répondu au mieux à tes demandes de manips qui changent en moins de temps qu'une souche de levure met pour arriver en phase exponentielle. En espérant que le sujet ne stagne pas trop après mon départ et que tu retrouves très vite UNE thésarde.

Je tiens à remercier Madame le Professeur des Universités Cécile Fairhead pour avoir accepté la présidence de ce jury de thèse.

J'adresse aussi mes remerciements à Mesdames Anne Peyroche, Naïma Belgareh-Touzé et Anne-Laure Bulteau pour avoir accepté de juger mon travail de thèse.

Merci aux membres de l'équipe FDM : Emmanuel Dassa pour son aide sur la fin de ma thèse même si les manips n'ont pas fonctionné comme nous l'espérions ; Michela Esposito pour son aide constante au cours de ma thèse ; Laras Ajeng Pitayu pour son immense gentillesse (c'est juste incroyable) et Raynald Cossard pour sa reprise de la gestion K'fet et des commandes. Merci à Damien Pichard, avec qui je me souviendrai de cette nuit de galère passée à l'institut…

Je tiens aussi à remercier Murielle Dutertre pour son aide « technique et logistique » en cas de problème sur à peu près tout.

Je souhaite remercier Madame Sylvie Hermann-Le Denmat pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse.

Et je remercie particulièrement Madame Anne Peyroche pour avoir accepté de faire partie de mon comité de thèse ainsi que pour m'avoir accueilli dans son laboratoire et m'avoir dépanné pour des réactifs lorsque j'en ai eu besoin. Merci à Madame Marie-Bénédicte Barrault pour son aide et ses astuces afin de résoudre mes problèmes techniques.

Merci à toutes les personnes du RDC Ouest de l'IGM pour animer tous les jours cette partie du bâtiment qui serait bien morne autrement mais qui doit être actuellement l'endroit le plus agréable de l'IGM.

Je remercie aussi les personnes trop nombreuses pour être citées qui ont, au cours de ma thèse, apporté leur aide de diverses façons.

Merci à Simon, Émilie, Marlène, petite et grande Julie, Floriane, Priscilla, Aurélien, Axel, Florian, Hacène, Michael et Stéphane pour les moments de détente qui ont eu lieu au cours de ces trois années. Ainsi qu'un remerciement spécial à Pierre-Étienne pour avoir accepté, et Benjamin pour avoir tenté, de relire ma thèse et d'éliminer les fautes que je n'aurais pas vues.

Enfin, merci au lecteur qui justifie la rédaction de ce document.

Résumé

Les mitochondries sont des organites semi-autonomes, capables d'autoréplication, qui varient en nombre, en taille et en forme dans le cytoplasme de presque toutes les cellules eucaryotes. Elles sont notamment connues pour être les fournisseurs d'énergie de la cellule. Afin de mener à bien ce rôle, les mitochondries sont capables de fusionner et de se diviser, ce qui permet un contrôle de la forme du réseau mitochondrial. Le contrôle de ces évènements et la forme du réseau qui en résulte sont connus sous le nom de dynamique mitochondriale. Cette dynamique répond à de nombreux stimuli cellulaires et est très régulée. Récemment, il a été montré que le système ubiquitine-protéasome régule la fusion des mitochondries et qu'une des sous-unités du protéasome contrôlait la fission des mitochondries.

Le système ubiquitine-protéasome est un mécanisme qui repose sur plusieurs acteurs : les enzymes qui vont reconnaître les protéines cibles de ce système, une protéine appelée ubiquitine qui sert pour le marquage des protéines cibles et un complexe multi-protéique appelé protéasome effecteur de la dégradation des protéines cibles. Connu uniquement à l'origine pour son rôle dans la dégradation des protéines cibles, il est apparu dans les dernières années que le rôle de ce système ou de ses composants en dehors de ce système était bien plus vaste.

Les études effectuées au laboratoire avaient déjà montré que Rpn11, une sous-unité du protéasome, régulait la fission des mitochondries indépendamment de l'activité protéolytique du protéasome. Le travail présenté ici porte sur le mécanisme d'action du domaine C-terminal de Rpn11 sur divers processus cellulaires tels que l'assemblage du protéasome, la régulation de la fission des mitochondries et des peroxysomes, la longévité cellulaire ou la formation de « Proteasome Storage Granule ». Ce manuscrit présente aussi le travail effectué pour trouver les partenaires qui permettent la régulation de la fission des mitochondries avec le domaine C-terminal de Rpn11 ainsi que l'étude de la localisation *in vivo* de Rpn11.

Mots-clés : mitochondrie, protéasome, Rpn11, organites, longévité.

Laboratoire d'accueil : UMR 8621 – Institut de Génétique et Microbiologie
Équipe « Fonctions et dysfonctions des mitochondries »
Université Paris Sud – Bâtiment 400 - 91400 ORSAY

Abstract

Mitochondria are semi-autonomous organelles, which size, shape and number vary in a wide range in almost every eukaryotic cell. They are famous to be the energy producer of the cells. For this purpose, mitochondria are able to fuse and divide. These events of fusion and fission are also known as the mitochondrial dynamic. This phenomenon is highly controlled and answers to many stimuli. Lately, it has been shown that the ubiquitin proteasome system controls the fusion of mitochondria and that a proteasome subunit controls the mitochondrial fission.

The ubiquitin proteasome system is a mechanism that relies on many actors: enzymes recognizing the targets of this system, a protein called ubiquitin and a complex called proteasome in charge of the degradation of the targets. Primarily known for the protein degradation, many investigations suggest that this system has other roles.

Our previous studies had already shown that the proteasome subunit named Rpn11 controls the fission of mitochondria independently of the proteolytic activities of the proteasome system. The work shown in this manuscript is focused on the mechanism of action of the C-terminus domain of Rpn11 on various cellular processes, including proteasome assembly, control of mitochondrial and peroxisomal fission, yeast lifespan and also the "Proteasome Storage Granule" formation. The *in vivo* localisation of Rpn11 and the elucidation of its partners on the mitochondrial fission regulation were also investigated.

Keywords: mitochondria, proteasome, Rpn11, organelles, lifespan.

Laboratory: UMR 8621 – Institut de Génétique et Microbiologie
Équipe « Fonctions et dysfonctions des mitochondries »
Université Paris Sud – Bâtiment 400 - 91400 ORSAY

Table des matières

AVANT-PROPOS 1

INTRODUCTION 3

I. LE PROTEASOME. 3
A. La particule 20S. 4
1. Structure et fonctions. *4*
2. Diversité des protéasomes 20S. *6*
B. Les particules régulatrices. 8
1. La particule PA700 ou 19S. *9*
a. La base. 9
b. Le lid. 10
2. Les autres particules régulatrices. *13*
C. L'assemblage du protéasome 26S chez les eucaryotes. 14
D. La localisation du protéasome 26S chez les eucaryotes. 16
E. Les différents rôles du protéasome. 17
1. Le système ubiquitine-protéasome. *17*
2. La dégradation 20S ou 26S dépendante et ubiquitine-indépendante. *21*
3. Endoplasmic Reticulum Associated Degradation. *21*
4. Mitochondria Associated protein Degradation. *22*
5. Les rôles cellulaires des sous-unités du protéasome. *24*
II. LA MITOCHONDRIE. 25
A. Origine évolutive. 25
B. Rôles des mitochondries. 26
1. La production d'ATP. *26*
2. Les autres fonctions mitochondriales. *28*
C. L'organisation de la mitochondrie. 30
1. Le génome mitochondrial. *30*
2. La structure mitochondriale. *32*
3. La morphologie mitochondriale. *33*
a. Une morphologie qui s'adapte à l'environnement. 34
b. La fusion mitochondriale. 39
i. Fzo1 39
ii. Mgm1 40
iii. Ugo1 40
iv. Les autres protéines. 41
• Mdm30 41
• Pcp1 42
• Ups1 42
v. Un modèle du processus de fusion. 42
c. La fission mitochondriale. 45
i. Fis1 46
ii. Dnm1 46
iii. Mdv1 46
iv. Caf4 47
v. Les autres protéines. 47
• Num1 48
• Mdm33 48
• Mdm36 49
• Le cas MIEF1 49
vi. Un modèle du processus de fission. 50
vii. Un nouvel acteur de taille : le réticulum endoplasmique. 51
d. La tubulation mitochondriale. 52
i. Les protéines du complexe ERMES. 54
• Mmm1 54
• Mdm10 55

• Mdm12 ... 55
• Mdm34 ... 55
• Gem1 ... 56
ii. Les autres protéines impliquées dans la tubulation. ... 56
• Mdm31 et Mdm32 ... 56
iii. Les rôles du complexe ERMES. ... 57
iv. Les structures mitochondries-RE chez l'homme. ... 60
e. La régulation des machineries de fusion et de fission. ... 61
f. La dynamique mitochondriale et les maladies mitochondriales humaines. ... 64
III. LES PEROXYSOMES. ... 65
A. Structure et fonction. ... 65
B. Biogénèse des peroxysomes. ... 67
1. La formation de novo. ... 67
2. La formation par fission. ... 68
IV. LE SYSTEME UBIQUITINE-PROTEASOME ET LA BIOGENESE DES ORGANITES. ... 69
A. Le système ubiquitine-protéasome et les peroxysomes. ... 69
B. Le système ubiquitine-protéasome et la vacuole. ... 70
C. Le système ubiquitine-protéasome et la mitochondrie. ... 71
IV. RPN11 ... 72
A. La protéine, son rôle. ... 72
B. Le mutant *rpn11-m1*, son origine et ses phénotypes. ... 73
C. Les révertants. ... 75
D. Objectifs de la thèse. ... 76

TRAVAUX ... 78

I. L'ORIGINE DES DEFAUTS MITOCHONDRIAUX CHEZ *RPN11-M1*. ... 78
A. La mutation *rpn11-m1* affecte la fission des mitochondries et des peroxysomes. ... 78
B. Les défauts mitochondriaux et peroxysomaux observés chez *rpn11-m1* sont liés à une activation de l'appareil de fission. ... 79
C. Les protéines Fis1 et Dnm1 ne semblent pas être modifiées ou stabilisées chez *rpn11-m1*. ... 80
D. Article : « A nonproteolytic proteasome activity controls organelle fission in yeast ». ... 81
E. Résultats complémentaires. ... 93
1. Deux des partenaires de Rpn11 ne montrent pas de localisation mitochondriale. ... 93
2. La délétion d'une sous-unité de l'appareil de fission a un impact inhabituel sur la morphologie mitochondriale observée dans la souche rpn11-m1 ... 94
3. Rpn11 ne semble pas interagir avec l'appareil de fission. ... 95
a. Pas d'interaction mise en évidence par pulldown. ... 95
b. L'appareil de fission n'est pas requis pour la localisation de Rpn11 et Rpn11-m1 à la mitochondrie. ... 97
4. Implication du complexe ERMES et du système ERAD dans la localisation mitochondriale de Rpn11. ... 98
a. Analyse de l'implication du complexe ERMES dans la localisation mitochondriale de Rpn11. ... 99
b. Un nouvel acteur potentiel : le système ERAD. ... 100
F. Conclusions. ... 101
II. RECHERCHE D'INTERACTANTS DES DOMAINES C-TERMINAUX DE RPN11 ET RPN11-M1. ... 103
A. Les interactants obtenus. ... 105
B. Confirmation des interactions. ... 108
C. Conclusions. ... 113
III. ÉTUDE DU DOMAINE C-TERMINAL DE RPN11. ... 114
A. Détermination d'un domaine C-terminal minimum. ... 114
1. Capacité de complémentation des peptides. ... 114
2. Expression des peptides. ... 115
B. L'accessibilité du domaine C-terminal est importante. ... 117
C. La localisation du domaine C-terminal est importante. ... 120
1. Localisation par microscopie. ... 120
2. La localisation au sein de la cellule est importante. ... 121
D. L'intégrité du domaine C-terminal est importante. ... 123

1. Les phénotypes étudiés avec les différentes souches. ... *123*
2. Effet de la surexpression des divers domaines C-terminaux sur la morphologie des mitochondries. ... *125*
3. Effet de la surexpression des divers domaines C-terminaux sur le nombre de peroxysomes. ... *127*
4. Effet de la surexpression des divers domaines C-terminaux sur le défaut d'assemblage du protéasome. ... *128*
5. La complémentation du défaut de croissance par la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 est spécifique pour la mutation rpn11-m1. ... *131*
E. Conclusions. ... 132
IV. ÉTUDE DE LA LOCALISATION MITOCHONDRIALE DE RPN11. ... 133
A. La détection de Rpn11 et Rpn11-m1 peut être effectuée par un anticorps dirigé contre POH1. ... 133
B. Examen de la localisation subcellulaire des différentes formes. ... 134
C. Étude de la localisation au sein de la mitochondrie. ... 136
D. La localisation mitochondriale est différente entre la souche sauvage et les souches mutantes. ... 137
E. La surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 n'empêche pas le clivage des épitopes HA de Rpn11-m1-HA et ne perturbe pas sa localisation mitochondriale. ... 138
F. La surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 n'empêche pas la localisation membranaire de Rpn11-m1-HA. ... 139
G. Récapitulatif et conclusions. ... 140
V. RPN11 ET LA LONGEVITE CHRONOLOGIQUE. ... 142
A. La souche *rpn11-m1* présente un défaut de « chronological lifespan ». ... 143
B. La surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 peut complémenter le défaut de « chronological lifespan » de *rpn11-m1*. ... 143
C. Les souches sont capables d'entrer en quiescence. ... 145
D. La formation des PSG est absente chez *rpn11-m1*. ... 146
1. La souche rpn11-m1 est incapable de former les PSG. ... *146*
2. La surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 est capable de complémenter le défaut de formation des PSG de la souche rpn11-m1. ... *148*
3. Le domaine C-terminal Rpn11 de 45 acides aminés est incorporé aux PSG. ... *150*
E. Récapitulatif et conclusions. ... 151

DISCUSSION ... 152

I. LOCALISATION MITOCHONDRIALE DE RPN11. ... 153
II. FONCTION DE RPN11 A LA MITOCHONDRIE. ... 154
III. LES PARTENAIRES DE RPN11. ... 156
IV. EFFET PLEIOTROPE DES DIFFERENTES MUTATIONS. ... 160
A. Complémentation du défaut de croissance. ... 161
B. Complémentation du défaut de morphologie mitochondriale. ... 163
V. RPN11 ET LA « CHRONOLOGICAL LIFESPAN ». ... 165
VI. CONCLUSIONS. ... 166

MATERIELS ET METHODES ... 170

I. TECHNIQUES DE MICROBIOLOGIE. ... 170
A. Souches de levure. ... 170
B. Souches bactériennes. ... 172
C. Milieux de culture. ... 172
II. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE. ... 173
A. Préparation d'ADN plasmidique à partir d'une culture de bactéries. ... 173
B. Transformation des cellules bactériennes compétentes par choc thermique. ... 173
C. Transformation des cellules de levure par de l'ADN plasmidique. ... 173
III. TECHNIQUES DE BIOCHIMIE. ... 174
A. Extraits protéiques de levure dénaturés. ... 174
B. Extraits protéiques de levure non dénaturés. ... 175
C. Analyse des protéines par électrophorèse sur gel d'acrylamide non dénaturant. ... 175

D. Analyse des protéines par électrophorèse sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE)..... 175
E. Coloration au bleu de Coomassie..... 176
F. Immunodétection ou « western blot ». 176
G. Préparation des mitochondries..... 176
H. Purification des mitochondries sur gradient de sucrose..... 177
I. Immunoprécipitation. 177
J. GST-pulldown..... 178

BIBLIOGRAPHIE..... 179

ANNEXES 191

ANNEXE I : LISTE DES INTERACTANTS AVEC LES DOMAINES C-TERMINAUX DE RPN11 ET RPN11-M1 RETROUVES LORS DU CRIBLE DOUBLE HYBRIDE EFFECTUE AU LABORATOIRE. 191

Index des figures

INTRODUCTION

Figure 1 : Représentation du protéasome 20S chez trois organismes. 4
Figure 2 : Les différents types de protéasome 20S « standards » et l'analogue bactérien. 5
Figure 3 : Le pore du protéasome 20S est obstrué par les parties N-terminales des sous-unités α2, α3 et α4. 6
Figure 4 : Structure du protéasome 20S. 7
Figure 5 : Représentation schématique de la diversité des protéasomes 20S. 8
Figure 6 : Représentation schématique du protéasome 26S. 9
Figure 7 : Photographies de protéasomes purifiés de cellules sauvage et Δ*rpn10*. 10
Figure 8 : Une vision totalement nouvelle du protéasome 26S. 11
Figure 9 : Reconstruction 3D du protéasome 26S de la levure *S. cerevisiae*. 12
Figure 10 : Illustration de deux autres activateurs du protéasome 20S. 13
Figure 11 : Assemblage du protéasome 26S. 15
Figure 12 : Les différentes possibilités d'ubiquitination. 18
Figure 13 : Complexité de la cascade enzymatique de l'ubiquitination. 19
Figure 14 : Abondance relative des liaisons de l'ubiquitine chez *S. cerevisiae*. 20
Figure 15 : Le système ERAD. 22
Figure 16 : Le système MAD. 24
Figure 17 : Les différents rôles des composants du protéasome. 25
Figure 18 : Vision classique du système OXPHOS des mammifères. 27
Figure 19 : Les super-complexes chez les mammifères. 28
Figure 20 : Aperçu des fonctions effectuées au sein de la mitochondrie. 29
Figure 21 : Schéma des cascades d'évènements mitochondriaux durant l'apoptose. 30
Figure 22 : Cartographie linéarisée du génome mitochondrial de *S. cerevisiae*. 31
Figure 23 : Modèle pour le remodelage du nucléoïde suivant les conditions chez la levure. 32
Figure 24 : Tomographie d'une mitochondrie 33
Figure 25 : Evènements de fusion et de fission au sein du réseau mitochondrial. 35
Figure 26 : Mélange des milieux mitochondriaux après une fusion cellulaire. 36
Figure 27 : Adaptation du réseau mitochondrial en fonction de la demande énergétique. 37
Figure 28 : Morphologies mitochondriales de mutants chez *S. cerevisiae*. 39
Figure 29 : Les acteurs de la fusion mitochondriale 41
Figure 30 : Représentation du test de fusion *in vitro* 43
Figure 31 : Modèle du mécanisme moléculaire de fusion mitochondriale 45
Figure 32 : Les acteurs de la fission mitochondriale. 47
Figure 33 : Modèle du rôle de Num1 dans la ségrégation et la fission mitochondriale. 48

Figure 34 : Modèle du mécanisme moléculaire de fission mitochondriale. 51
Figure 35 : Les sites de contact mitochondries-RE marquent les sites de fission mitochondriaux. 53
Figure 36 : Le complexe ERMES. 57
Figure 37 : Relations entre les composants impliqués dans la dynamique mitochondriale. 61
Figure 38 : Interdépendance des organites dans le métabolisme lipidique. 66
Figure 39 : La formation des peroxysomes. 68
Figure 40 : Import des protéines matricielles du peroxysome chez *S. cerevisiae*. 70
Figure 41 : Cartographie d'un cross-link du 19S de *S. cerevisiae.* 73
Figure 42 : La mutation *rpn11-m1*. 74
Figure 43 : Les révertants intragéniques obtenus. 76

TRAVAUX

Figure 44 : La mutation *rpn11-m1* affecte deux organites. 79
Figure 45 : La redirection de Fis1 aux peroxysomes en présence de *rpn11-m1* augmente le nombre de peroxysomes en glucose. 80
Figure 46 : Le temps de demi-vie de Dnm1, Fis1 et Fzo1 est inchangé dans les deux contextes. 81
Figure 47 : Localisation subcellulaire de Rpn5-GFP et Rpn8-GFP. 93
Figure 48 : Rpn11 est impliquée dans la tubulation. 94
Figure 49 : Pulldowns avec les sous-unités de l'appareil de fission. 96
Figure 50 : Vérification de la présence des protéines chimères appât. 97
Figure 51 : Pulldown de HA-Fis1. 97
Figure 52 : Localisation subcellulaire de Rpn11 dans des souches *Δfis1* 98
Figure 53 : Localisation de Rpn11-HA dans des souches *ΔERMES.* 99
Figure 54 : Localisation de Rpn11-m1-HA dans des souches *ΔERMES* 100
Figure 55 : Localisation de Rpn11-HA et Rpn11-m1-HA dans des souches *Δvms1.* 101
Figure 56 : Exemple de résultat pour la confirmation des interactions. 105
Figure 57 : Seul le mutant *rpn11-m1* semble incapable d'interagir avec Nup42. 108
Figure 58 : Confirmation d'interaction pour Duf1 et Phb2. 110
Figure 59 : Confirmation d'interaction pour Mpa43 et Bem2. 111
Figure 60 : Confirmation d'interaction avec Nup42. 112
Figure 61 : Cartographie des domaines C-terminaux de Rpn11 de différentes tailles. 114
Figure 62 : Capacité de complémentation des peptides. 115
Figure 63 : Analyse des domaines C-terminaux par western blot. 116
Figure 64 : Analyse du domaine C-terminal de 45 acides aminés par western blot. 117
Figure 65 : Soupçon du clivage du domaine C-terminal de Rpn11 de 100 acides aminés 118
Figure 66 : Localisation de la « mCherry- domaine C-terminal-GFP » par microscopie. 119
Figure 67 : L'accessibilité du domaine C-terminal est importante. 120
Figure 68 : Localisation du domaine C-terminal par microscopie. 121

Figure 70 : La localisation du domaine C-terminal est importante pour la complémentation. 122
Figure 71 : La souche *RevA5* ne conserve pas les plasmides 2µ sans pression de sélection. 124
Figure 72 : Morphologie mitochondriale dans les contextes W303 et BY4741 125
Figure 73 : Morphologie mitochondriale lors de la surexpression des domaines C-terminaux. 126
Figure 74 : L'assemblage du protéasome est normal dans la souche *RevA5* 128
Figure 75 : Assemblage du protéasome dans les diverses souches. 129
Figure 76 : La surexpression des domaines C-terminaux ne provoque pas de défaut d'assemblage du protéasome dans la souche sauvage. 129
Figure 77 : La surexpression du domaine C-terminal sauvage complémente le défaut d'assemblage du protéasome de la souche mutante. 130
Figure 78 : La surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 ne permet pas la complémentation du défaut de croissance à haute température d'autres souches avec des défauts d'assemblage du protéasome. 131
Figure 79 : Les épitopes HA sont clivés dans la souche *rpn11-m1-HA*. 134
Figure 80 : La localisation subcellulaire de la protéine Rpn11-m1 est différente de celle de Rpn11-m1-HA. 134
Figure 81 : Les protéines Rpn11 et Rpn11-m1 sont bien localisées à la mitochondrie 135
Figure 82 : Les protéines Rpn11 et Rpn11-m1 pourraient être situées dans l'espace intermembranaire mitochondrial. 137
Figure 83 : La localisation membranaire diffère entre une protéine Rpn11 et les versions mutées. 138
Figure 84 : La surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 n'entraîne pas une relocalisation de *rpn11-m1*-HA dans le cytoplasme. 139
Figure 85 : La surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 ne permet pas une complémentation du défaut de localisation de Rpn11-m1-HA. 140
Figure 86 : Illustration de la « replicative et chronological lifespan ». 142
Figure 87 : Seule la souche *rpn11-m1-HA* montre une « chronological lifespan » réduite 143
Figure 88 : La surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 complémente le défaut de « chronological lifespan » de la souche *rpn11-m1*. 144
Figure 89 : Les souches sont capables d'entrer en quiescence. 146
Figure 90 : Localisation des PSG. 146
Figure 91 : Une souche *rpn11-m1/PRE6-GFP* est incapable de former des PSG 147
Figure 92 : La formation des PSG est défectueuse dans la souche *rpn11-m1* 148
Figure 93 : La surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 permet la formation de PSG dans une souche *rpn11-m1*. 149
Figure 94 : La formation des PSG permise par la surexpression du domaine C-terminal sauvage dans une souche *rpn11-m1* pourrait être retardée. 150

DISCUSSION

Figure 95 : Le domaine C-terminal peut être intégré aux PSG. 151
Figure 96 : Une souche Δ*caf4/rpn11-m1* présente un phénotype très particulier..... 155
Figure 97 : Les divers processus cellulaires où Rpn11 pourrait être impliquée. 158
Figure 98 : Les différents mutants de Rpn11 qui présentent un défaut mitochondrial..... 161
Figure 99 : Rpn11 agirait comme un inhibiteur de fission. 165
Figure 100 : Le système ubiquitine/protéasome/Rpn11 en « super régulateur » ?..... 168

Index des tables

INTRODUCTION

Table 1 : Les sous-unités des protéasomes 20S et 19S. 16
Table 2 : Protéines impliquées dans la fission mitochondriale. 62
Table 3 : Protéines impliquées dans la fusion mitochondriale. 63

TRAVAUX

Table 4 : Interactants obtenus avec le crible double hybride. 106
Table 5 : Les premiers interactants que nous avons souhaité confirmer. 109
Table 6 : Les divers phénotypes déjà étudiés. 123
Table 7 : L'augmentation du nombre de peroxysomes en oléate chez *rpn11-m1* est complémentée par la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11. 127
Table 8 : Le défaut d'assemblage du protéasome chez *rpn11-m1* peut être complémenté par la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11. 131

DISCUSSION

Table 9 : L'intégrité du domaine C-terminal est importante pour la cellule. 153

Abréviations

ADN : Acide DésoxyriboNucléique

ATP : Adénosine triphosphate

BLAST : Basic Local Alignment Search Tool

Da : Dalton

DMSO : Diméthylsulfoxyde

DTT : Dithiotréithol

ECL : Enhanced chimioluminescence

EDTA : Acide éthylène diamine tétraacétique

GFP : Green Fluorescent Protein

HA : hémagglutinine

HRP : Horse radish peroxidase

IPTG : isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside

kDa : kilo Dalton

MDa : méga Dalton

Nedd8 : Neural precursor cell Expressed, Developmentally Down regulated 8

nm : nanomètre

PAGE : PolyAcrylamide Gel Electrophoresis

PCR :Polymerase Chain Reaction

Pi : phosphate inorganique

PEG : Polyéthylène glycol

p/v : rapport poids/volume

PMSF : Phénylméthylsulfonyle fluoride

SDS : Sodium Dodécyl Sulfate

SUMO : Small Ubiquitin-like Modifier

Tris : Tris(hydroxylméthyl) aminométhane

UV : Ultra-violet

v/v : rapport volume/volume

YPD : Yeast Peptone Dextrose

YPG : Yeast Peptone Glycerol

Avant-propos

Les mitochondries sont des organites semi-autonomes, capables d'autoréplication, qui varient en nombre, en taille et en forme dans le cytoplasme de presque toutes les cellules eucaryotes. Elles sont notamment connues pour être les fournisseurs d'énergie de la cellule. Afin de mener à bien ce rôle, les mitochondries sont capables de fusionner et de se diviser, ce qui permet un contrôle de la forme du réseau mitochondrial. Le contrôle de ces évènements et la forme du réseau qui en résulte sont connus sous le nom de dynamique mitochondriale. Cette dynamique répond à de nombreux stimuli cellulaires et est très régulée. Les acteurs de cette dynamique ont été très bien décrits au cours des dernières années, aussi bien chez l'homme que chez la levure. Seulement, comme tous les autres mécanismes qu'elle possède, la cellule contrôle très finement leurs activités et les moyens par lesquels est mis en œuvre ce contrôle sont très peu connus. Récemment, il a été montré que le système ubiquitine-protéasome régule la fusion des mitochondries et qu'une des sous-unités du protéasome contrôlait la fission des mitochondries.

Le système ubiquitine-protéasome est un mécanisme qui repose sur plusieurs acteurs : les enzymes qui vont reconnaître les protéines cibles de ce système, une protéine appelée ubiquitine qui sert pour le marquage des protéines cibles et un complexe multi-protéique appelé protéasome effecteur de la dégradation des protéines cibles. Connu uniquement à l'origine pour son rôle dans la dégradation des protéines cibles, il est apparu dans les dernières années que le rôle de ce système ou de ses composants en dehors de ce système était bien plus vaste. Ainsi, il est maintenant admis que l'ubiquitination des protéines est une modification post-traductionnelle au moins aussi courante que la phosphorylation. Cette ubiquitination contrôle donc la dégradation des protéines par le système ubiquitine-protéasome mais a aussi des rôles cellulaires très variés dans la signalisation cellulaire, le trafic cellulaire des protéines ou la réparation de l'ADN endommagé. Le protéasome ou ses composants sont quant à eux impliqués dans des processus cellulaires variés comme l'épissage et l'export des ARNm, la transcription ou bien la maturation de protéines.

Étant donné les rôles divers et variés attribués à ces acteurs, il n'est pas vraiment étonnant qu'ils soient à l'origine du contrôle de la morphologie du réseau mitochondrial. Cette fonction, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, s'effectue par l'ubiquitination d'une protéine de la machinerie de fusion mitochondriale qui sera dégradée par le protéasome. Cette étape est essentielle pour la fusion mitochondriale puisque sans elle, la fusion ne peut avoir lieu.

À mon arrivée au laboratoire, Agnès et Line avaient déjà commencé à étudier un thème nouveau concernant la dynamique mitochondriale. Alors que la fonction du système ubiquitine-protéasome dans la fusion mitochondriale était encore inconnue, le laboratoire possédait un mutant d'une des sous-unités du protéasome qui présentait une fragmentation du réseau mitochondrial. Elles avaient pu montrer que cette fragmentation était due à une dérégulation de l'activité de fission des mitochondries indépendante de l'activité protéolytique du protéasome. Seulement, le mécanisme par lequel cette sous-unité parvenait à réguler le mécanisme de fission n'était pas connu.

Lors de mon travail de thèse, je me suis donc attaché à trouver le mécanisme par lequel agit cette sous-unité pour réguler la fission des mitochondries. Agnès et Line ayant aussi pu montrer que l'intégrité du domaine C-terminal de cette sous-unité était nécessaire pour effectuer cette régulation de façon indépendante du protéasome, je me suis aussi intéressé au comportement de ce domaine au sein de la cellule en m'appuyant notamment sur l'étude comparée de divers mutants de ce domaine.

Avant de présenter ce qui était déjà connu sur le mutant lors de mon arrivée au laboratoire, je m'attacherai à décrire la structure, le rôle et l'origine du protéasome et des mitochondries. Je détaillerai ensuite le lien qui existe entre le protéasome et le contrôle de la dynamique de divers organites. Une dérégulation de la dynamique mitochondriale provoquant des pathologies chez l'homme, je décrirai autant que possible les connaissances actuelles sur les homologues connus des acteurs de cette dynamique entre l'homme et la levure.

Introduction

Introduction

I. Le protéasome.

Le protéasome est la principale protéase responsable de la dégradation des protéines anormales ou à temps de demi-vie courte dans la cellule jouant de ce fait un rôle prépondérant dans le contrôle qualité des protéines cellulaires. Chez les eucaryotes, la dégradation de ces protéines par le protéasome se fait en aval d'une signalisation de dégradation par la liaison des protéines cibles avec une petite protéine conservée au cours de l'évolution : l'ubiquitine. Le protéasome est retrouvé parmi un vaste nombre d'organismes : les eucaryotes, les archées et certaines bactéries de l'ordre des actinomycètes. Chez les bactéries, le protéasome n'est pas indispensable pour la survie cellulaire au contraire des eucaryotes, c'est la redondance des systèmes protéolytiques des procaryotes qui permettrait de compenser cette perte (De Mot *et al.*, 1999). Le point commun de ces organismes est de posséder au minimum le « fondement » du protéasome, à savoir le cœur catalytique (CP) contenant l'activité protéasique. Autour de ce cœur catalytique viennent s'ajouter une ou deux particules régulatrices (RP ou PA700) chez les eucaryotes permettant d'activer le protéasome pour la voie de dégradation modulée par l'ubiquitine (Coux *et al.*, 1996). Le protéasome et ses sous-particules sont couramment appelées par leur coefficient de sédimentation de Svedberg. Ainsi le cœur catalytique est aussi nommé protéasome 20S tandis que la particule régulatrice est appelée protéasome 19S. L'association RP1CP ou RP2CP (soit le protéasome 20S associé respectivement à une ou deux particules régulatrices 19S) est appelée protéasome 26S dans la littérature, quand bien même la forme RP2CP a un coefficient d'environ 30S (Yoshimura *et al.*, 1993). Le protéasome, sous sa forme RP2CP, est une structure imposante qui fait 2,59 MDa et est constituée d'au minimum 66 sous-unités (33 sous-unités différentes présentes en deux exemplaires). À ce jour, il n'est toujours pas connu s'il y a des différences fonctionnelles entre le protéasome 26S (RP1CP) et le protéasome 30S (RP2CP) même si la version 30S est plus abondante chez la levure (Saeki and Tanaka, 2012). L'identification récente de nombreuses chaperonnes spécifiques pour l'assemblage du protéasome montre que l'assemblage de cette machinerie est un processus extrêmement régulé qui se fait en plusieurs étapes. Une liste de toutes les protéines faisant partie intégrante du protéasome 26S chez la levure et les mammifères est donnée dans la table 1, page 16.

A. La particule 20S.

1. Structure et fonctions.

La particule 20S a une masse moléculaire d'environ 730 kDa dont la structure a été déterminée par diffraction aux rayons X après cristallisation montre une forme cylindrique chez deux eucaryotes ainsi que chez une archée (Groll *et al.*, 1997; Lowe *et al.*, 1995 ; Unno *et al.*, 2002), (Fig.1).

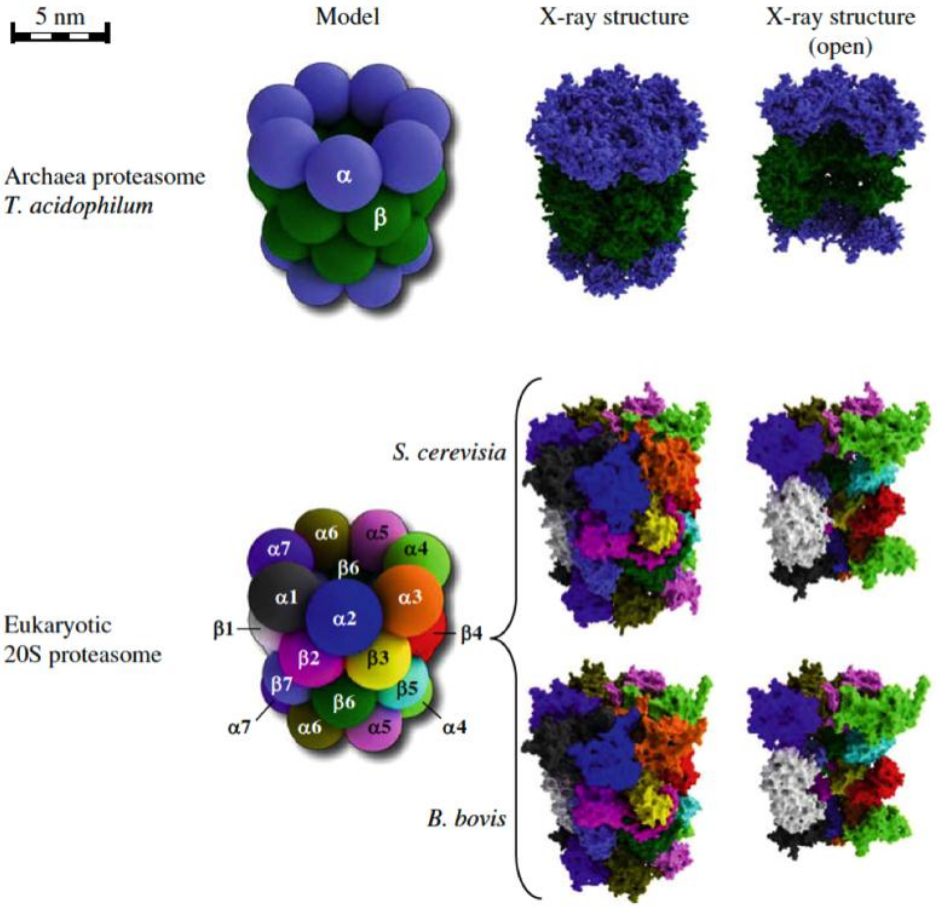

Figure 1 : Représentation du protéasome 20S chez trois organismes.

La topologie de ces protéasomes 20S a été obtenue après cristallisation et diffraction aux rayons X. Les différentes sous-unités sont représentées par une couleur unique (Jung *et al.*, 2009).

Le protéasome 20S consiste en l'assemblage de deux anneaux constitués de 7 sous-unités chacun. Deux types de sous-unités constituent ces anneaux : les sous-unités β et α. La structure du CP consiste en l'assemblage « en miroir » des anneaux de la même façon chez tous les organismes possédant un protéasome : αββα. La structure et la fonction de ces sous-unités sont très conservées parmi les eucaryotes sauf pour les formes spécialisées qui sont associées aux protéasomes impliqués dans la réponse immunitaire acquise des vertébrés où certaines sous-unités de l'anneau β sont remplacées par d'autres formes de ces mêmes sous-unités (ce point est abordé plus loin dans cette thèse). Étant donné la grande

conservation de ces sous-unités parmi les eucaryotes, toutes les sous-unités dérivent probablement d'un ancêtre commun (Coux *et al.*, 1994), les structures quaternaires des protéasome 20S « standards » sont très ressemblantes entre la levure *Saccharomyces cerevisiae* et le mammifère *Babesia bovis* (Groll *et al.*, 1997; Unno *et al.*, 2002), (Fig. 1).

Le nombre de sous–unités différentes diffère grandement suivant les domaines du vivant : à l'exception des bactéries du genre *Rhodococcus* qui possèdent deux types de sous-unités β et α (Tamura *et al.*, 1995), les procaryotes ne possèdent qu'un seul type de sous-unités β et α (Maupin-Furlow *et al.*, 2006). Au contraire des procaryotes, les eucaryotes possèdent des anneaux β et α bien plus complexes car ils sont constitués de sept sous-unités β et sept sous-unités α différentes pour les protéasomes 20S « standards » (Fig. 2).

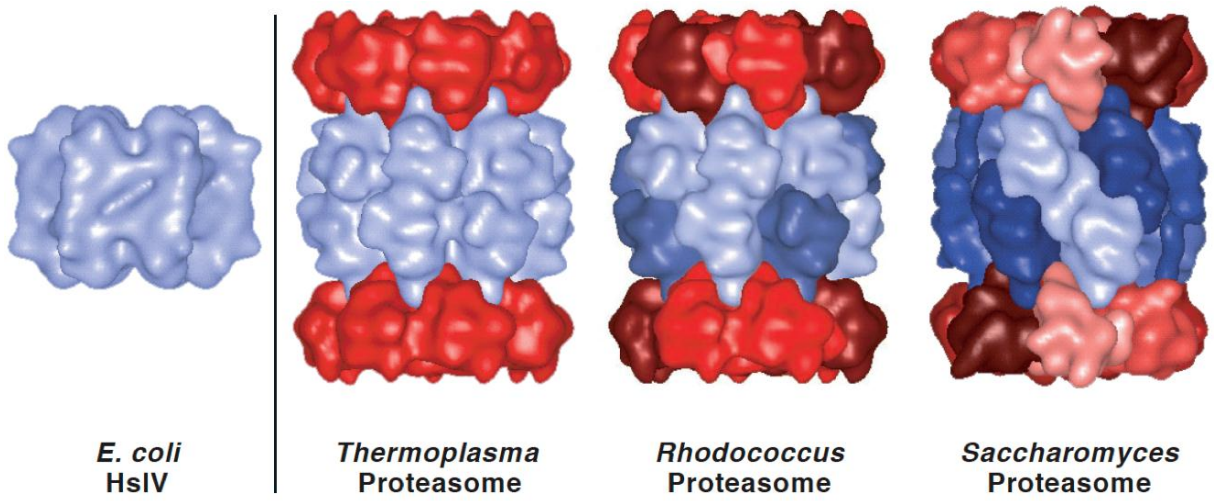

Figure 2 : Les différents types de protéasome 20S « standards » et l'analogue bactérien.

Les différentes couleurs des sous-unités représentent les différentes sous-unités présentes dans ces organismes. La couleur bleue est utilisée pour les sous-unités β et la couleur rouge pour les sous–unités α. Le complexe HsIV d'*Escherichia coli* représente l'analogue du protéasome 20S chez les procaryotes qui en sont dépourvus. Figure adaptée de (Voges *et al.*, 1999).

La structure du protéasome 20S de la levure *S. cerevisiae* obtenue par cristallisation indique que le pore formé par les anneaux des sous-unités α est très étroit (de l'ordre de 13Å de diamètre). Lorsque le protéasome 20S est « libre », ce pore est obstrué principalement par les résidus situés dans les parties N-terminales des sous-unités α2, α3 et α4 (Groll *et al.*, 1997), (Fig. 3).

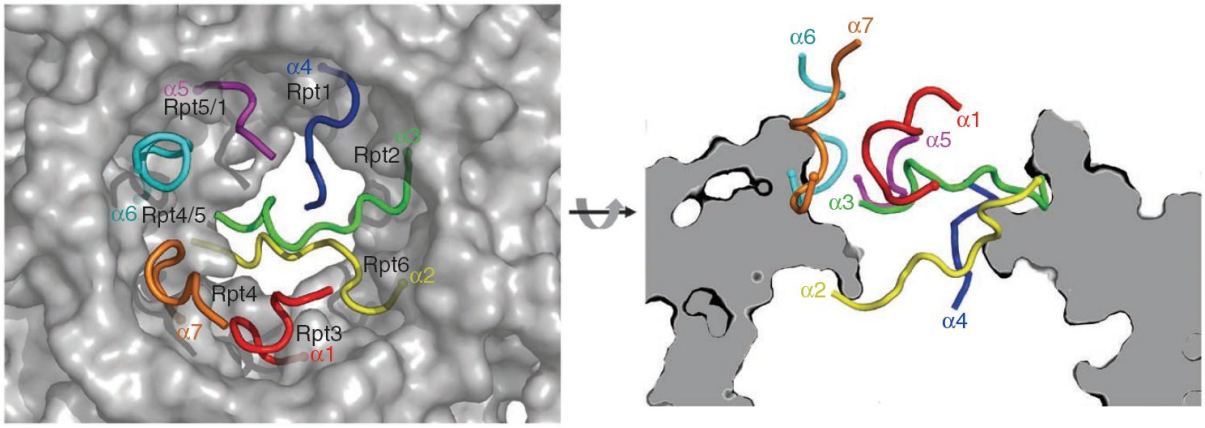

Figure 3 : Le pore du protéasome 20S est obstrué par les parties N-terminales des sous-unités α2, α3 et α4.

Représentation du pore du protéasome 20S dans sa version non activée par des particules régulatrices. En couleur sont représentées les extrémités N-terminales des sous unités α1, α2, α3, α4, α5, α6 et α7. À gauche les particules de la base avec lesquelles les N-terminaux des différentes sous-unités ont été proposées pour l'interaction et le guidage pour l'assemblage de la base sont indiquées ; à droite, les noms des sous-unités indiquent l'extrémité du N-terminal (Tian *et al.*, 2011).

L'activité protéolytique est portée uniquement par la forme 20S tandis que seule la forme 26S est capable de dégrader des protéines ubiquitinées de façon ATP et ubiquitine-dépendante (Hough *et al.*, 1987; Waxman *et al.*, 1987). L'activité protéolytique du protéasome 20S est entièrement portée par trois sous-unités de l'anneau β : les sous-unités β1, β2 et β5. Ces trois sous-unités ont une activité protéolytique différente, conférant au protéasome 20S la capacité de cliver après tous les types d'acides aminés (acides, basiques ou neutres) : β1 (Pre3 chez *S. cerevisiae*) possède une activité « caspase-like » (acides aminés acides), β2 (Pup1 chez *S. cerevisiae*) montre une activité « trypsin-like » (acides aminés basiques) et β5 (Pre2 chez *S. cerevisiae*) une activité « chymotrypsin-like » (acides aminés neutres) (Fig. 4, (Saeki and Tanaka, 2012)). Les oligopeptides issus de la dégradation du protéasome montrent une taille variant entre 2 et 35 acides aminés dont la taille moyenne est de 8-12 acides aminés avec trois tailles d'oligopeptides majoritaires de 2-3, 9-10 et 20-30 acides aminés (Kohler *et al.*, 2001; Luciani *et al.*, 2005).

2. Diversité des protéasomes 20S.

Étant donné le rôle fondamental du protéasome au sein de la cellule, la structure globale et les sous-unités du protéasome ont été bien conservées au cours de l'évolution. Cependant, chez les eucaryotes supérieurs, les sous-unités α et β se sont diversifiées à un tel niveau que certaines formes du protéasome 20S sont devenues tissu-spécifique et/ou condition-spécifique (Fig. 5).

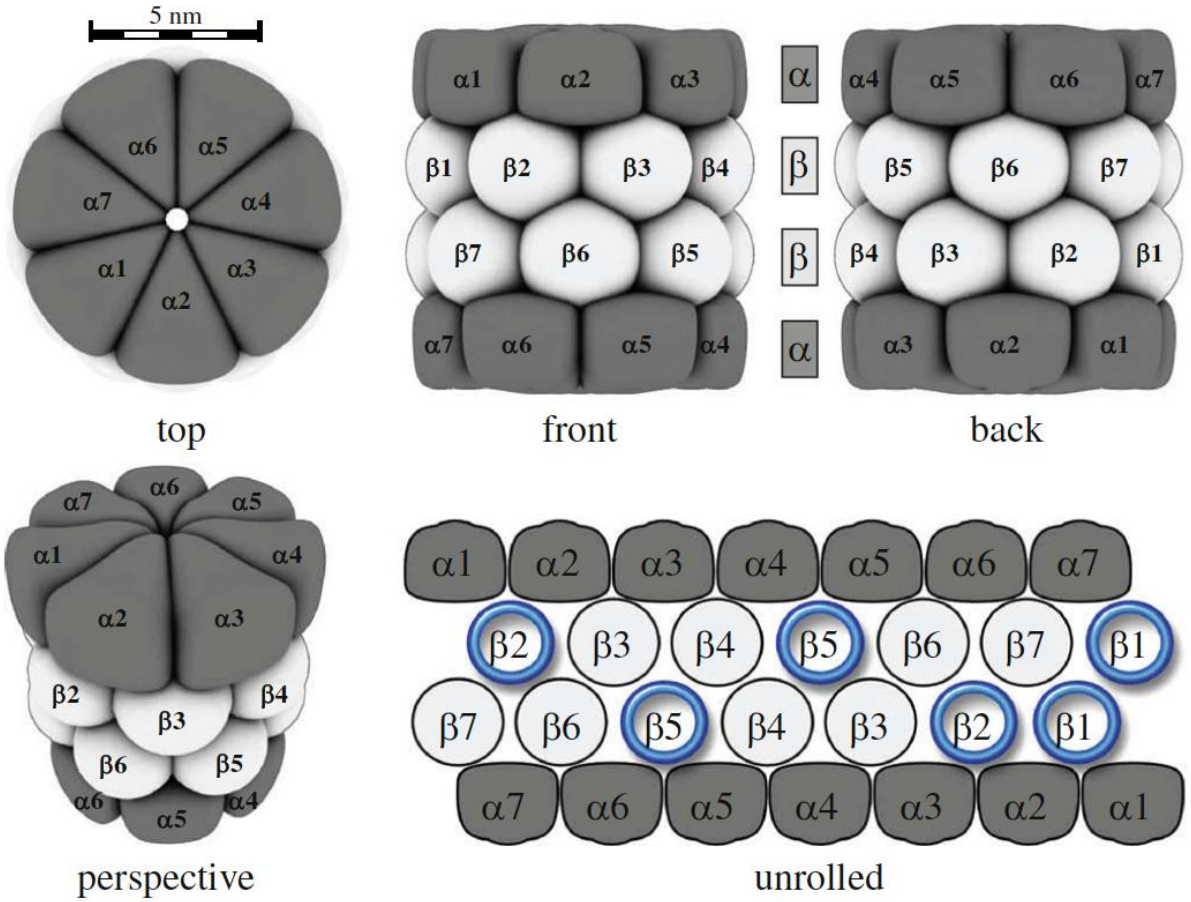

Figure 4 : Structure du protéasome 20S.

La ligne du haut montre un modèle simplifié de l'arrangement des sous-unités du CP. La ligne du bas montre une image des anneaux « déroulés », les sous-unités β portant une activité catalytique sont représentées par un cercle bleu. (Jung *et al.*, 2009)

La première forme particulière à avoir été mise en évidence fut celle de l'immunoprotéasome. Chez les vertébrés, dans certains tissus ou après une infection, les protéasomes 20S « standards » sont remplacés par des protéasomes 20S dont les sous-unités β qui portent une activité catalytique ont été remplacées par d'autres sous-unités β (Groettrup *et al.*, 2010). Ces nouvelles sous-unités sont nommées β1i, β2i et β5i en fonction de la sous-unité qu'elles remplacent et avec lesquelles elles sont phylogénétiquement liées. Le remplacement de ces sous-unités a pour effet de produire des immunoprotéasomes dont l'activité « trypsin-like » et « chymotrypsin-like » sont augmentées aux dépends de l'activité « caspase-like » qui est réduite. Les peptides ainsi générés sont plus aisément utilisables par le complexe majeur d'histocompatibilité (CMH) de classe I qui utilise préférentiellement comme ancre des peptides dont les domaines C-terminaux sont basiques ou hydrophobes (Tanaka, 2009). Après une infection, les immunoprotéasomes remplacent totalement les protéasomes pour des raisons encore inconnues à ce jour.

La seconde forme particulière mise en évidence fut celle du thymoprotéasome. Cette forme de protéasome est uniquement retrouvée dans les cellules corticales du thymus et est très proche de la précédente car elle est exactement identique à l'immunoprotéasome mais substitue à la sous-unité β5i une sous-unité β5t. Dans le thymoprotéasome, seule l'activité « chymotrypsin-like » est réduite, produisant un répertoire d'antigènes disponibles pour le CMH de classe I qui permettrait la sélection positive des lymphocytes T reconnaissant le soi (Tanaka, 2009).

La dernière forme n'a été mise en évidence que dans les testicules de drosophiles. Cette forme de protéasome, au contraire des deux autres, conserve les mêmes sous-unités β mais remplace la sous-unité α4 par une autre sous-unité α nommée α8 (Tanaka, 2009). Cette forme pourrait exister chez l'homme mais peu de choses sont connues à ce jour sur cette forme particulière de protéasome.

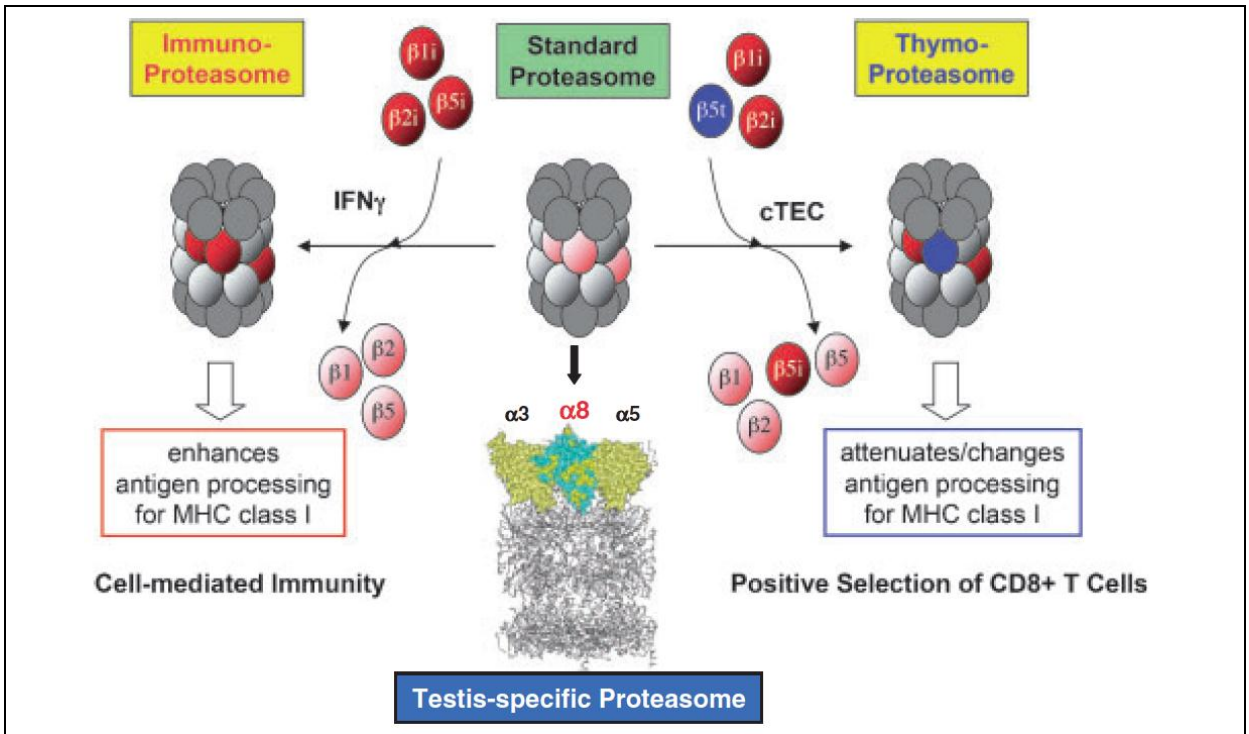

Figure 5 : Représentation schématique de la diversité des protéasomes 20S.

Les sous-unités β1i, β2i et β5i sont intégrées dans le CP et remplacent les sous-unités β1, β2 et β5 en réponse à un signal donné par les interférons γ (IFNγ). Les sous-unités β1i, β2i et β5t sont intégrées dans le CP dans les cellules de l'épithélium du cortex thymique (cTEC). (Tanaka, 2009)

B. Les particules régulatrices.

Toutes les études sur l'activité de dégradation du protéasome 20S qui montrent une dégradation spontanée des protéines oxydées ou naturellement mal repliées ont été effectuées *in vitro*. À ce jour, en se basant sur les expériences *in vitro*, il est admis que dans des conditions *in vivo* le protéasome 20S ne possède pas les mêmes substrats que le protéasome

20S avec lequel une ou deux particules régulatrices sont associées. L'attachement de ces particules régulatrices permet de spécialiser encore un peu plus le protéasome.

1. La particule PA700 ou 19S.

La particule PA 700 (pour « **P**roteasome **A**ctivator 700 kDa »), aussi nommée particule 19S, est présente uniquement chez les eucaryotes. L'association de deux particules 19S avec le protéasome 20S va former le protéasome 26S (ou RP2CP, Fig. 6). Le protéasome 26S fait partie intégrante du système ubiquitine-protéasome (ce point sera abordé plus loin dans la thèse). Une majorité des particules 19S est retrouvée avec le protéasome 20S (Geng and Tansey, 2012). La particule 19S est composée de dix-neuf sous-unités différentes, ces sous-unités sont regroupées dans deux sous-complexes : la base et la coiffe (ou lid en anglais, (Glickman *et al.*, 1998b)). C'est la seule particule régulatrice du protéasome à posséder une activité ATPase. Cette activité est située au niveau de la base.

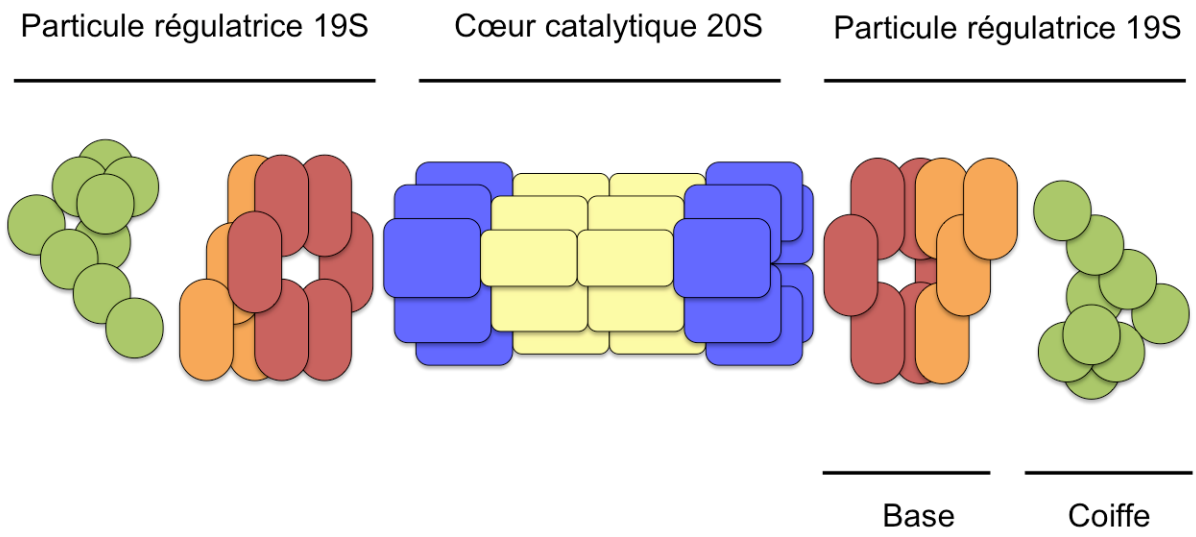

Figure 6 : Représentation schématique du protéasome 26S.

a. La base.

La base est composée de 10 sous-unités. Six de ces sous-unités sont des ATPases qui vont former un anneau et se lier directement sur les sous-unités α du protéasome 20S. Ces sous-unités font partie de la famille des AAA-ATPases et ont donc été nommées en conséquence Rpt1 à Rpt6 (pour « **R**egulatory **P**article **T**riple-A protein », elles sont représentées en rouge sur la figure 6). Ces sous-unités sont homologues, elles présentent 40% d'identité de séquence entre elles, et sont très conservées entre la levure et l'homme : elles montrent une identité de séquence comprise entre 66 et 76% (Glickman *et al.*, 1998b). Les archées et les bactéries possèdent des homologues de fonction de cet anneau : respectivement PAN et ARC/Mpa. Les quatre autres sous-unités de la base n'ont pas d'activité ATPase et ont

aussi été nommées en conséquence Rpn1, Rpn2, Rpn10 et Rpn13 (pour « **R**egulatory **P**article **N**on-ATPase », en orange sur la figure 6).

La base est impliquée dans les fonctions de capture des protéines, de reconnaissance des protéines ubiquitinées (Rpn10, Rpt5, Rpn13) (Deveraux *et al.*, 1994; Elsasser *et al.*, 2002; Husnjak *et al.*, 2008; Lam *et al.*, 2002), de dépliement des protéines pour leur transfert dans la cavité du CP (Rpt1-6) (Erales *et al.*, 2012; Rubin *et al.*, 1998) et d'ouverture du pore du protéasome 20S. Il est intéressant de noter que la délétion de Rpn10 entraîne un assemblage de protéasome dont le lid est entièrement manquant chez *S. cerevisiae* (Fig. 7).

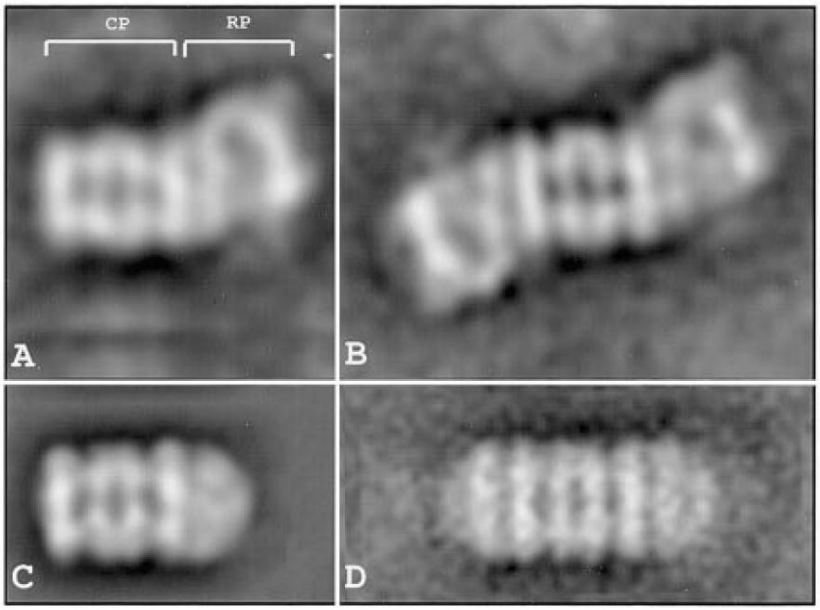

Figure 7 : Photographies de protéasomes purifiés de cellules sauvage et Δ*rpn10*.
Image moyenne obtenue par microscopie électronique. **A.** RP1CP sauvage, **B.** RP2CP sauvage, **C.** RP1CP Δ*rpn10*, **D.** RP2CP Δ*rpn10*. (Glickman *et al.*, 1998a)

b. Le lid.

Le lid est constitué d'au moins 13 sous-unités Rpn (Rpn1-3, Rpn5-13 et Rpn15). Au contraire des sous-unités ATPase de la base qui possèdent une grande identité entre la levure et l'homme, les sous-unités non-ATPase de la base et du lid possèdent une très faible identité comprise entre 22 et 47% avec une exception notable pour Rpn11 qui a 65% d'identité avec son homologue humain (Glickman *et al.*, 1998b). Six des sous-unités possèdent un domaine PCI (« **P**roteasome, **C**op9, **I**nitiation factor 3 ») dont le rôle est peu connu mais qui servirait vraisemblablement aux interactions entre protéines. La principale fonction du lid semble être la déubiquitination des substrats capturés par la base. Pour cela, le lid possède une sous-unité, Rpn11, qui porte un motif JAMM (« **Ja**b1/**M**PN domain–associated **M**etalloisopeptidase ») : $EX_nHXHX_{10}D$ (Verma *et al.*, 2002; Yao and Cohen, 2002). Grâce à ce motif, Rpn11 est capable de cliver de façon proximale les molécules d'ubiquitine pour les recycler (Verma *et*

al., 2002). Le motif JAMM de Rpn11 est contenu dans un domaine MPN (**M**pr1, **P**ad1, **N**-terminal ; (Glickman *et al.*, 1998a)), ce domaine est aussi retrouvé dans une autre sous-unité du lid mais sans le motif JAMM : Rpn8. Aucune autre sous-unité « résidente » du lid ne possède d'activité enzymatique connue. Jusque récemment, un assemblage du protéasome 26S ressemblant à celui représenté en figure 6, où le lid surmontait la base qui surmontait elle-même le protéasome 20S était le modèle admis. Au début de l'année 2012, grâce à une technique d'expression de protéines recombinantes de *S. cerevisiae* dans le système hétérologue d'*E. coli* puis analyse par microscopie électronique, une équipe a publié l'architecture de la particule régulatrice 19S de la levure *S. cerevisiae* et le résultat a changé de beaucoup la vision du lid et de la base (Fig. 8, (Lander *et al.*, 2012)).

Ainsi le lid ne surplombe pas toute la structure mais se retrouve « mis de côté » et certaines des sous-unités du lid entrent en contact avec le protéasome 20S tandis que la base, en contact avec le protéasome 20S, possède certaines sous-unités qui surplombent le protéasome 26S.

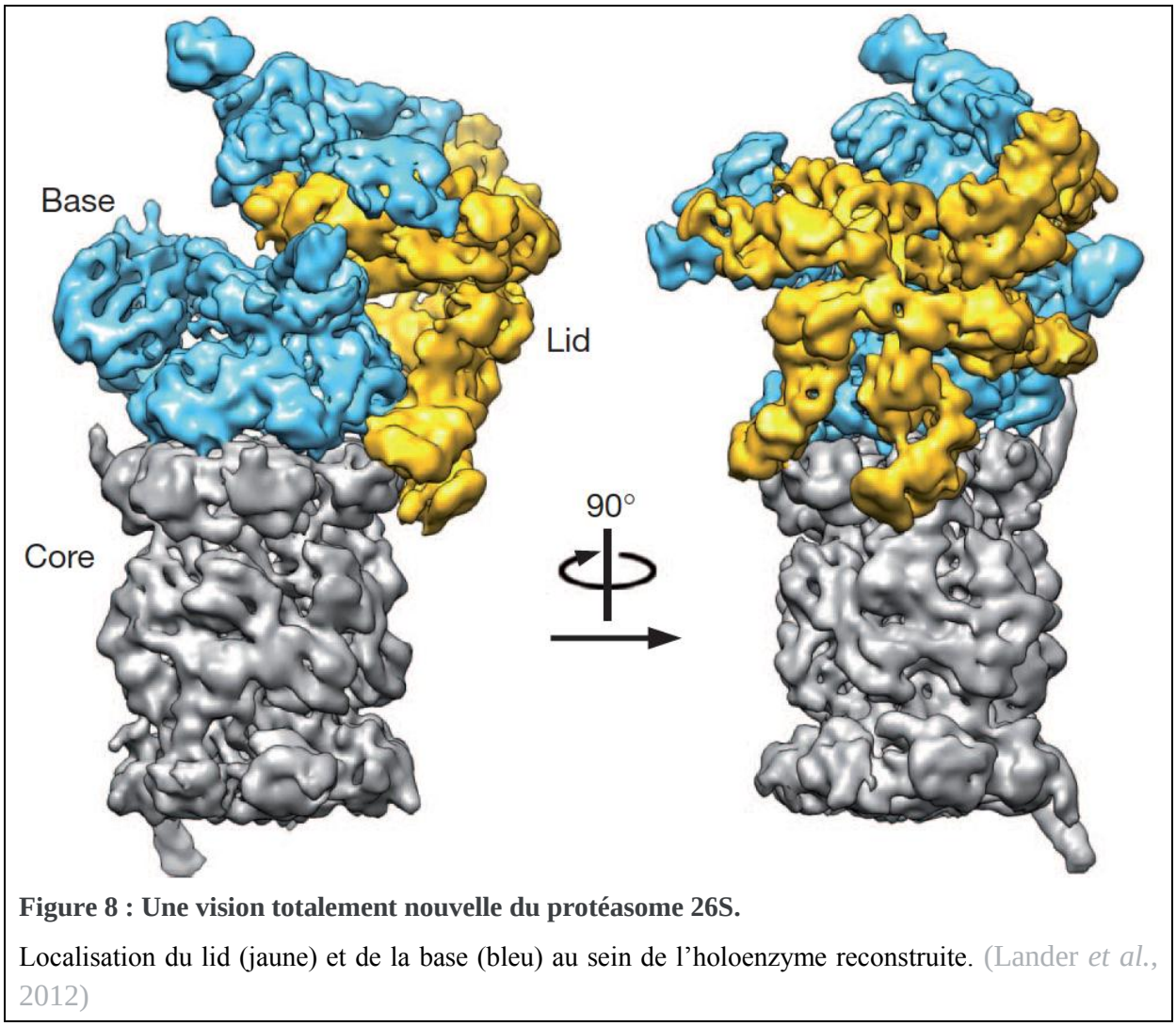

Figure 8 : Une vision totalement nouvelle du protéasome 26S.

Localisation du lid (jaune) et de la base (bleu) au sein de l'holoenzyme reconstruite. (Lander *et al.*, 2012)

Cette équipe a aussi pu positionner très précisément les sous-unités au sein du lid. Rpn5 et Rpn6 sont en contact avec le protéasome 20S tandis que les récepteurs de l'ubiquitine (Rpt5, Rpn13 et Rpn10) se retrouvent proches de la déubiquitinase (Rpn11), elle-même située à proximité du pore formé par les sous-unités ATPase de la base (Fig. 9) et dont le motif JAMM se retrouve juste à l'entrée du pore.

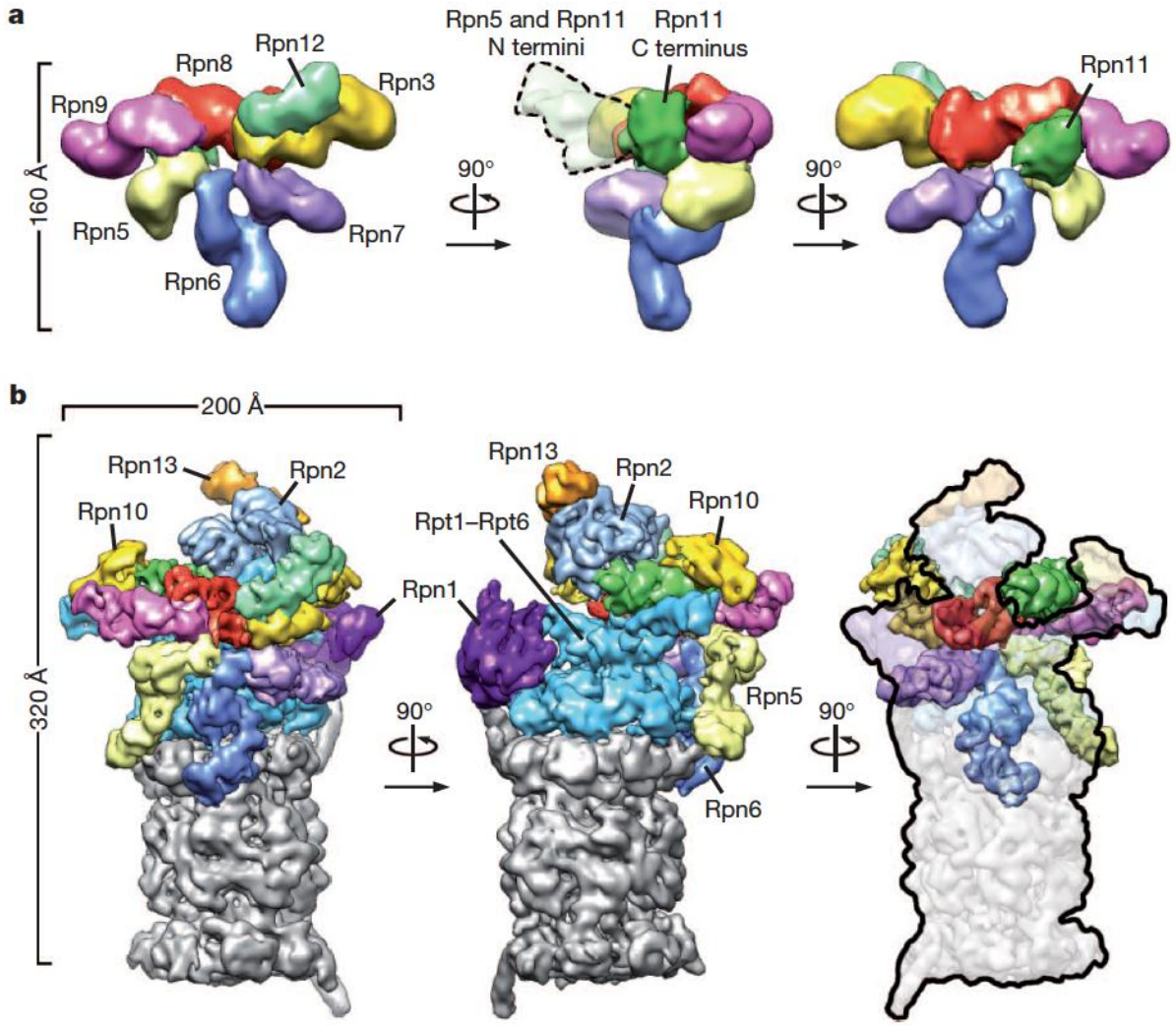

Figure 9 : Reconstruction 3D du protéasome 26S de la levure *S. cerevisiae*.

Reconstruction du lid isolé à une résolution de 15Å, chaque sous-unité à une couleur distincte.
A. Vue de l'extérieur (gauche), côté (milieu), et intérieur (côté face à la base, droite). La ligne en pointillé (milieu) indique une zone extrêmement variable des domaines N-terminaux de Rpn5 et Rpn11.
B. Reconstruction de l'holoenzyme montrée selon les même vues et avec les mêmes couleurs que dans la partie A. (Lander *et al.*, 2012)

Il a aussi été montré qu'il y avait, chez la levure, autant de sous-unités du protéasome 19S que de sous-unités du protéasome 20S. Étant donné que les sous-unités sont présentes en deux exemplaires dans le protéasome 20S et en un seul exemplaire dans la particule 19S, cette stœchiométrie montre que la levure formerait préférentiellement du protéasome 26S (Russell *et al.*, 1999b). Cela est différent chez le bœuf où on trouve environ trois à quatre fois plus de

sous-unités du protéasome 20S que de sous-unités du protéasome 19S et peut s'expliquer par la présence de particules régulatrices qui n'existent pas chez la levure.

2. Les autres particules régulatrices.

Il existe deux autres particules régulatrices, la particule 11S et Blm10 (Fig. 10), mais qui n'ont pas d'homologues chez les archées et les bactéries. La particule régulatrice 11S est aussi nommée PA26 ou PA28/REG. Cette particule est formée d'homo-oligomères. La forme nommée PA26, retrouvée chez *Trypanosoma brucei*, est un homologue fonctionnel de la forme PA28. Concernant la forme PA28, il existe trois isoformes nommées α,β,γ. La forme γ semble être la plus ancienne car elle est retrouvée chez la plupart des métazoaires et quelques unicellulaires. Aucun homologue n'est retrouvé dans la levure. La fonction précise de cette particule régulatrice est inconnue mais les formes PA28γ et PA26 seraient impliquées dans la dégradation de peptides tandis que les formes PA28α,β seraient impliquées dans la production de ligands pour le CMH de classe I.

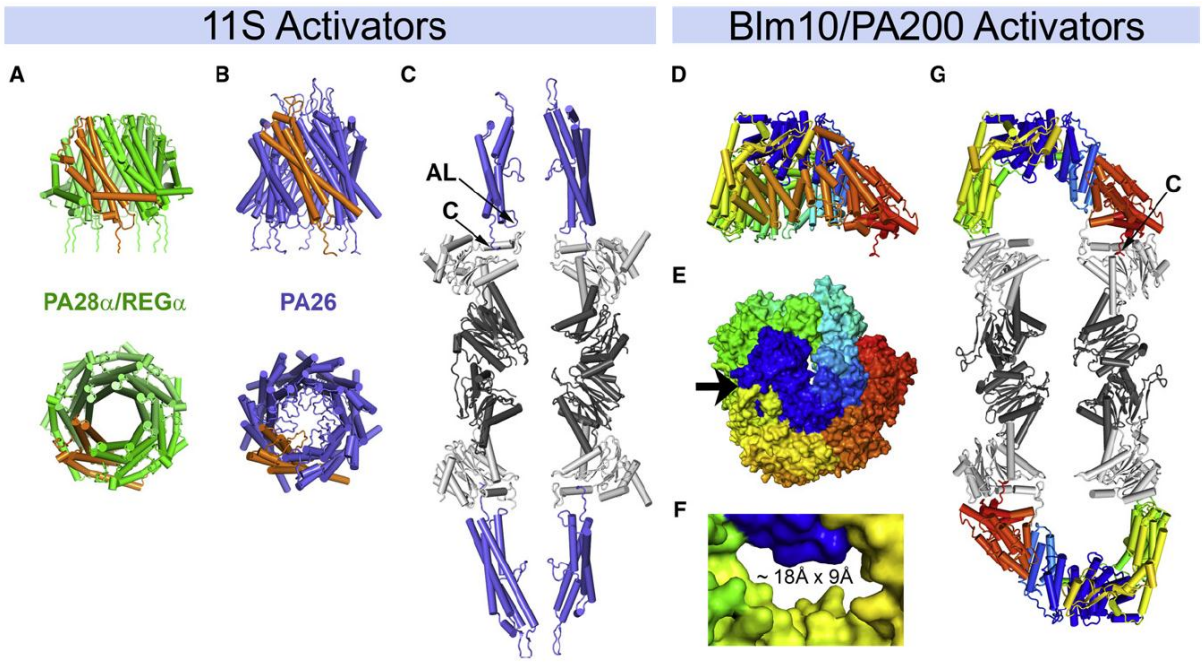

Figure 10 : Illustration de deux autres activateurs du protéasome 20S.

A. Vue de côté et de dessus du PA28α. Une seule sous-unité est colorée en orange.
B. Vue de côté et de dessus du PA26. Une seule sous-unité est colorée en orange.
C. Vue en coupe du complexe PA26-20S. La boucle activatrice (AL) et le domaine C-terminal (C) du PA26 sont indiqués.
D. Vue de côté de Blm10. Coloration en arc-en-ciel, bleu à rouge du N au domaine C-terminal.
E. Vue de dessus de Blm10, la flèche indique l'entrée du pore indiqué en F.
F. Gros plan du pore de Blm10.
G. Vue en coupe du complexe Blm10-20S. Le domaine C-terminal (C) de Blm10 est indiqué. (Stadtmueller and Hill, 2011)

L'autre particule est nommée PA200/Blm10 (humain/levure). Il s'agit en réalité d'une seule protéine de 245 kDa dont la fonction exacte est inconnue mais qui stimulerait l'hydrolyse des peptides sans activer celle des protéines. Cette protéine forme un dôme au-dessus du protéasome 20S qui enferme un large volume en laissant un pore minime pour le passage des peptides. La façon dont se lie Blm10 avec le protéasome révèle un parallèle étonnant avec la façon dont se lie PA26 et qui pourrait expliquer comment les particules régulatrices font pour ouvrir le pore du protéasome 20S (Stadtmueller and Hill, 2011).

C. L'assemblage du protéasome 26S chez les eucaryotes.

Comme on peut s'y attendre pour un complexe impliquant soixante-six sous-unités, l'assemblage n'est pas une chose aisée. Au vu de l'importance du protéasome dans la vie cellulaire, son assemblage doit être rapide et correct. Afin de faciliter l'assemblage, le protéasome ne s'assemble pas dans sa version définitive avec les soixante-six sous-unités mais passe par des « étapes » où cinq à six sous-unités s'assemblent en modules qui vont s'assembler en « sous-complexe » pour ensuite former les différentes particules qui formeront au final le protéasome 26S (le schéma d'assemblage est le même pour les autres formes de protéasome, Fig. 11). Plusieurs protéines chaperonnes sont impliquées dans ce processus : Poc 1-4 (PAC 1-4 chez l'homme, Fig. 11) qui servent à la formation de l'anneau de sous-unités α (Le Tallec *et al.*, 2007) et Ump1 qui sert à la maturation du protéasome 20S en aidant l'assemblage de l'anneau β et qui sera dégradée par le protéasome à la fin de cette maturation (Fig. 11, (Ramos *et al.*, 1998)). Concernant l'assemblage de la particule 19S, il existe aussi des chaperonnes telles que Hsm3, Nas2, Nas6 et Rpn14 (Fig. 11, (Funakoshi *et al.*, 2009; Le Tallec *et al.*, 2009; Nakamura *et al.*, 2007; Roelofs *et al.*, 2009; Saeki *et al.*, 2009b)).

Brièvement, les sous-unités du protéasome 20S sont pré-assemblées avec leurs chaperonnes puis maturées. La protéine Blm10 peut agir comme une chaperonne en s'associant avec le CP puis se retire pour permettre à la base de s'associer. Concernant la particule régulatrice 19S, l'assemblage est bien moins connu. La base est assemblée grâce à des chaperonnes et le CP pourrait servir de plate-forme d'assemblage. De façon indépendante, le lid est associé en deux modules (Rpn3, 7, 15 et Rpn5, 6, 8, 9, 11) qui vont être connectés par Rpn12. La base et le lid sont ensuite liés ensemble par Rpn10 ; cela va stabiliser l'association base-CP et former le protéasome 26S. (Fig. 11, (Saeki and Tanaka, 2012)). La localisation cellulaire de ces intermédiaires d'assemblage est mal connue.

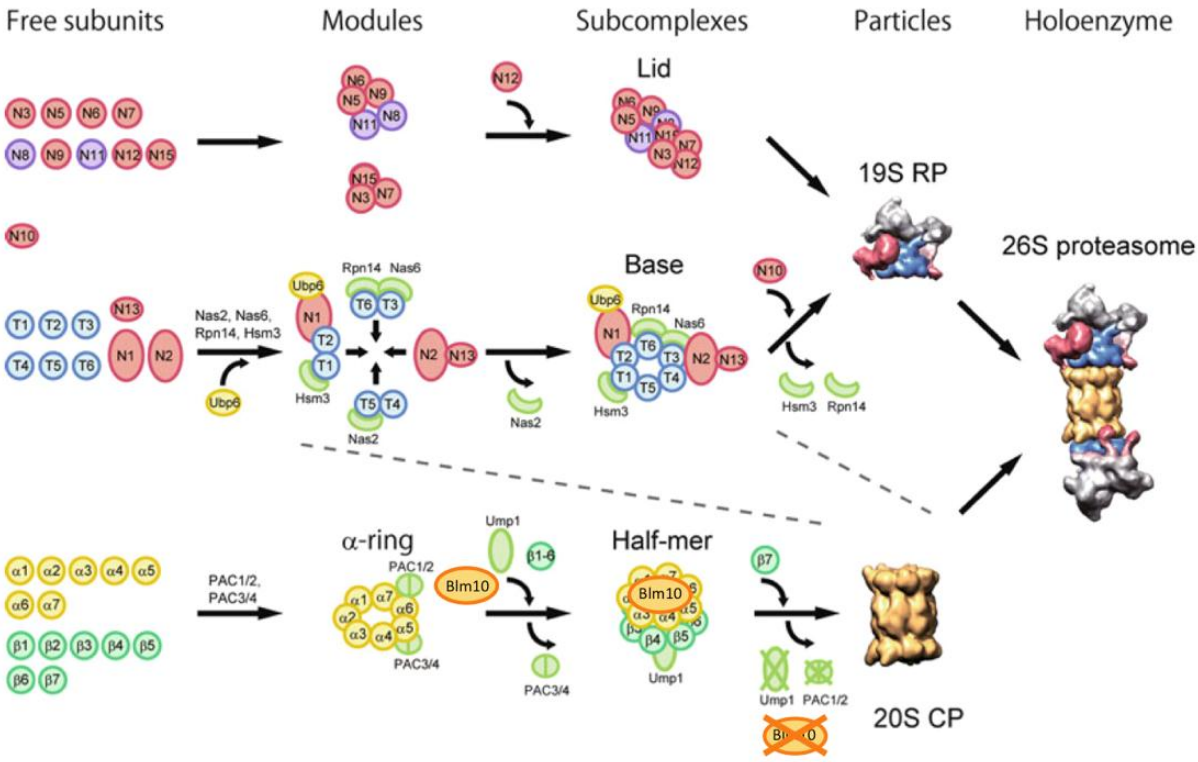

Figure 11 : Assemblage du protéasome 26S.

N : Rpn, T : Rpt. Adapté de (Saeki and Tanaka, 2012)

La table 1 page suivante recense toutes les sous-unités actuellement considérées comme faisant partie intégrante des protéasomes 20S et 19S ou permettant son assemblage chez les mammifères et la levure.

Subunit	*S. cerevisiae*	Mammals		
ATPases				
Rpt1/S7	Rpt1/Cim5/Yta3	PSMC2/Mss1	Base	19S
Rpt2/S4	Rpt2/Yhs4/Yta5	PSMC1		
Rpt3/S6b	Rpt3/Ynt1/Yta2	PSMC4/Mip224/Tbp7		
Rpt4/S10b	Rpt4/Crl13/Pcs1/Sug2	PSMC6/Sug2/p42		
Rpt5/S6a	Rpt5/Yta1	PSMC3/Tbp1		
Rpt6/S8	Rpt6/Cim3/Crl3/Sug1/TbpY/Tby1	PSMC5/p45/Sug1/Trip1		
non-ATPases				
Rpn1/S2	Rpn1/Hrd2/Nas1/Rpd1	PSMD2/p97/Trap2	Lid	
Rpn2/S1	Rpn2/Sen3	PSMD1/p112		
Rpn3/S3	Rpn3/Sun2	PSMD3/p58		
Rpn4	Rpn4/Son1/Ufd5	–		
Rpn5/p55	Rpn5/Nas5	PSMD12/p55		
Rpn6/S9	Rpn6/Nas4	PSMD11/p44.5		
Rpn7/S10	Rpn7	PSMD6/p42a		
Rpn8/S12	Rpn8	PSMD7/p40/Mov34		
Rpn9/S11	Rpn9/Nas7	PSMD13/p40.5		
Rpn10/S5a	Rpn10/Sun1/Mcb1	PSMD4/ S5a/Mcb1		
S5b	Hsm3	PSMD5/KIAA0072		
Rpn11/S13	Rpn11/Mpr1	PSMD14/Pad1/Poh1		
Rpn12/S14	Rpn12/Nin1	PSMD8/p31		
Rpn13	Rpn13/Daq1	–		
p28	Nas6	PSMD10/p28/Gankyrin		
p27	Nas2	PSMD9/p27		
Rpn15/Sem1	Rpn15/Sem1/Dsh1	SHFM1/DSS1/SHFDG1		
Rpn14	Rpn14	PAAF1		

Subunit	*T. acido-philum*	*S. cerevisiae*	Mammals	
			Constitutive 20S	Immunoproteasome
α1	α	Scl1/Prc2/Prs2/C7	PSMA6/Pros27/Iota	PSMA6/PROS27/Iota
α2	α	Pre8/Prs4/Y7	PSMA2/C3/Lmpc3	PSMA2/C3/Lmpc3
α3	α	Pre9/Prs5/Y13	PSMA4/C9	PSMA4/C9
α4	α	Pre6	PSMA7/C7/XAPC7	PSMA7/C7/XAPC7
α5	α	Pup2/Doa5	PSMA5/Zeta	PSMA5/Zeta
α6	α	Pre5	PSMA1/C2/Pros30	PSMA1/C2/Pros30
α7	α	Pre10/Prc1/Prs1/C1	PSMA3/C8	PSMA3/C8
β1	β	Pre3	PSMB6/Y/delta/LMPY/LMP19	**PSMB9/β1i/LMP2/Ring12**
β2	β	Pup1	PSMB7/Z/Mmc14	**PSMB10/β2i/LMP10/MECL1**
β3	β	Pup3	PSMB3/C10	PSMB3/C10
β4	β	Pre1/C11	PSMB2/C7	PSMB2/C7
β5	β	Pre2/Doa3/ Prg1	PSMB5/X/MB1	**PSMB8/β5i/Ring10/Y2/C13/LMP7**
β6	β	Pre7/Prs3/ Pts1/C5	PSMB1/C5	PSMB1/C5
β7	β	Pre4	PSMB4/N3/beta/LMP3	PSMB4/N3/beta/LMP3
		Poc 1-4	PAC 1-4	PAC 1-4
		Ump1	UMP1	UMP1

Table 1 : Les sous-unités des protéasomes 20S et 19S.

Les différentes sous-unités recensées dans cette table sont celles qui sont aujourd'hui admises comme faisant partie du protéasome ou permettant son assemblage. Les différents noms utilisés pour la levure et les mammifères sont listés. En gras dans la partie immunoprotéasome sont listées les sous-unités induites par les interférons. Adapté de (Sorokin *et al.*, 2009).

D. La localisation du protéasome 26S chez les eucaryotes.

La distribution du protéasome est cytosolique et nucléaire chez les eucaryotes mais elle varie suivant les organismes. Ainsi chez les mammifères, le protéasome est retrouvé dans le cytosol puis migre vers le noyau lors des mitoses. Au contraire, chez la levure, le protéasome est localisé à 80% dans le noyau (Russell *et al.*, 1999b). Pour les auteurs, cela peut s'expliquer par le fait que la membrane nucléaire ne se rompt pas lors des mitoses chez la

levure et le protéasome est donc « piégé » dans le noyau au contraire des cellules de mammifère où il peut être relâché entre chaque mitose grâce à la disparition de l'enveloppe nucléaire. La localisation nucléaire s'explique par le fait que les karyophérines αβ importent les précurseurs des sous-unités du protéasome 20S par l'interaction avec leur domaine NLS (« **N**uclear **L**ocalization **S**ignal », (Lehmann *et al.*, 2002)) mais aussi par le fait qu'il y a neuf sous-unités de la base et du lid qui possèdent des NLS putatifs. Le NLS situé dans la sous-unité Rpn2, partiellement redondant avec celui de la sous-unité Rpt2, est important pour la localisation et la fonction du protéasome (Wendler *et al.*, 2004).

E. Les différents rôles du protéasome.

La substitution de sous-unités du protéasome 20S ou la connexion du protéasome 20S à des particules régulatrices différentes du 19S permet de faire varier les rôles de ce dernier au sein de la cellule ou de l'organisme. De la même façon, le protéasome 26S est associé à divers rôles notamment grâce à son assemblage dynamique permettant de séparer les modules 20S et 19S. Le protéasome 26S est impliqué dans la dégradation des protéines mal repliées ou la régulation de la demi-vie de certaines protéines mais possède d'autres rôles comme la maturation de protéines. Le protéasome 20S peut dégrader les protéines oxydées et la particule 19S est impliquée dans les processus de réparation de l'ADN (NER ; Fig. 17, page 25 ; (Gillette *et al.*, 2001; Hoppe *et al.*, 2000; Jung *et al.*, 2009; Russell *et al.*, 1999a)).

1. Le système ubiquitine-protéasome.

Le premier rôle du protéasome 26S est lié à son implication dans ce qui est appelé le système ubiquitine-protéasome. Ce système est surtout basé sur l'ubiquitine, une protéine de soixante-seize acides aminés et d'environ 8,5 kDa (Herrmann *et al.*, 2007), très conservée entre l'homme et la levure (96% d'identité). L'ubiquitination est un processus qui ressemble à celui de la phosphorylation bien qu'étant plus complexe (Fig. 12D) : l'ubiquitine est attachée par un de ses 7 résidus lysine à un résidu lysine de la protéine cible de façon post traductionnelle et covalente mais si la protéine cible ne contient pas de résidu lysine, cette liaison peut-être effectuée sur la partie N-terminale de la protéine (Ciechanover and Ben-Saadon, 2004). Chaque protéine d'ubiquitine peut aussi être reliée à une autre ubiquitine par la liaison d'une des deux glycines en domaine C-terminal d'une ubiquitine et une lysine d'une autre ubiquitine (Fig. 12A-C et Fig. 14, page 20).

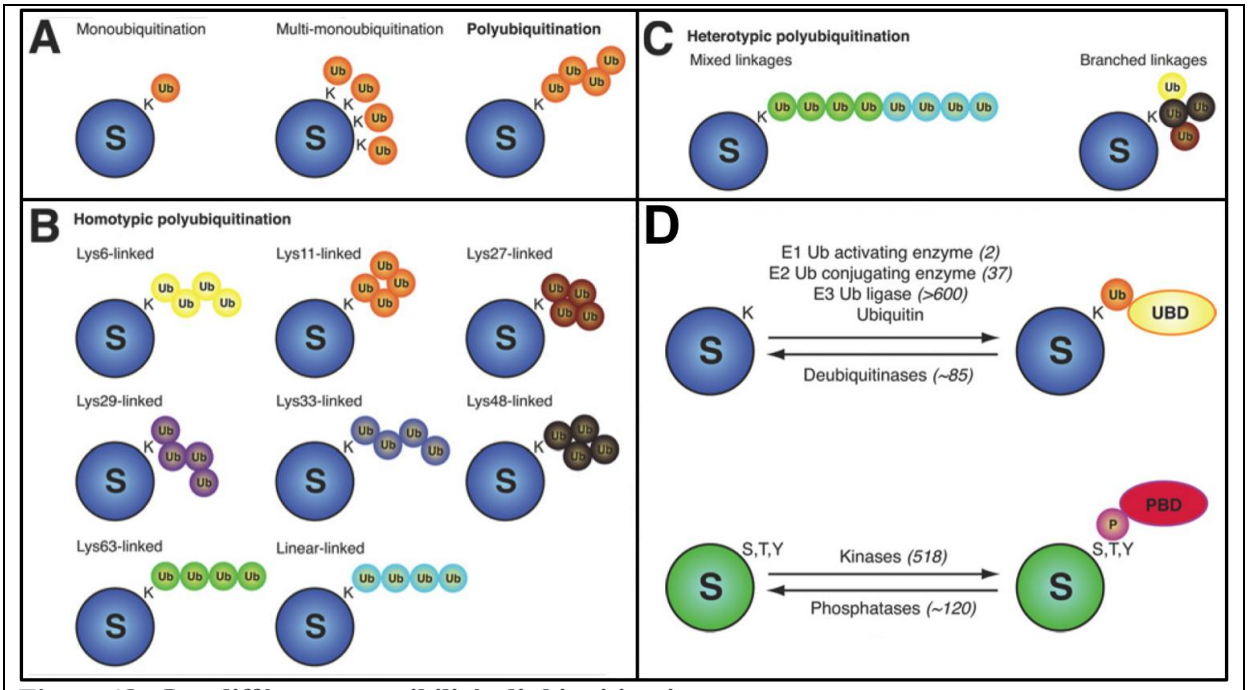

Figure 12 : Les différentes possibilités d'ubiquitination.

A. Les trois schémas d'ubiquitination. S : substrat, Ub : ubiquitine.
B. Les formes de polyubiquitinations homotypiques. Les chaines K63 ou K48 ont plusieurs conformations possibles. De multiples ubiquitination homotypiques sont possibles sur une même protéine.
C. Exemples de formes de polyubiquitinations hétérotypiques.
D. Les processus d'ubiquitination et de phosphorylation sont très ressemblants. Ces deux processus sont réversibles grâce à l'action d'enzymes spécifiques. Le nombre de protéines impliquées dans chaque étape chez l'homme est indiqué entre parenthèse. K : lysine, UBD : « ubiquitin binding domain », P : phosphorylation, PBD : « phosphate binding domain », S/T/Y : Serine/Thréonine/Tyrosine. Adapté de (Komander, 2009).

Le processus d'ubiquitination est le suivant : l'ubiquitine doit d'abord être activée par une enzyme E1 activatrice qui carboxyle le domaine C-terminal de l'ubiquitine grâce à l'hydrolyse d'ATP. L'ubiquitine ainsi activée va être liée à l'enzyme E1 par une liaison thioester. Ensuite, l'ubiquitine va être transférée de l'enzyme E1 à une enzyme E2 de conjugaison (une quarantaine d'enzymes E2 sont présentes chez les eucaryotes supérieurs). Après ce transfert, l'enzyme E2 va être liée à une enzyme E3 ligase (couramment appelée ubiquitine-ligase, il en existe plusieurs centaines chez les eucaryotes supérieurs) et le complexe E3-E2-ubiquitine activée va reconnaître la protéine cible (grâce à l'E3) et lie l'ubiquitine à la protéine cible via une des lysines de l'ubiquitine (Fig. 13, (Herrmann *et al.*, 2007)). Une éventuelle enzyme additionnelle (nommée « E4 ubiquitin-chain elongation factor ») peut être nécessaire pour la formation des chaines d'ubiquitine après la liaison de la première ubiquitine sur la protéine à détruire (Koegl *et al.*, 1999).

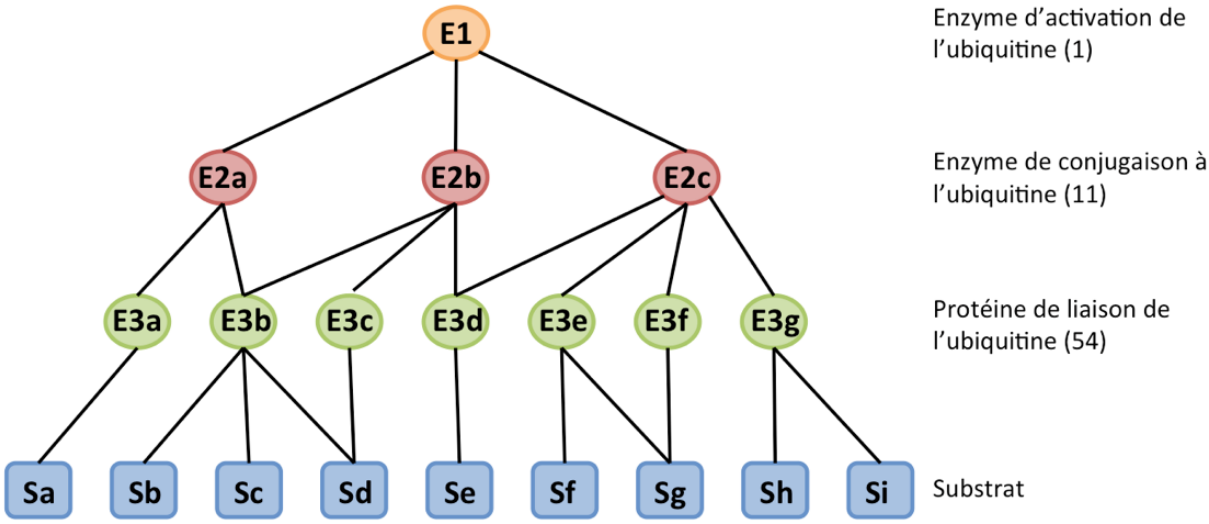

Figure 13 : Complexité de la cascade enzymatique de l'ubiquitination.

Le processus d'ubiquitination est rendu complexe par la présence d'un nombre important d'enzymes intervenant dans la cascade de ce système. Cette complexité permet une grande spécificité car chaque enzyme ne reconnaît que quelques substrats. Le nombre d'enzyme de chaque type chez *S. cerevisiae* est indiqué entre parenthèse.

Trouvée à l'origine comme un signal de dégradation des protéines, l'ubiquitination apparaît de nos jours comme ayant bien plus de fonctions grâce aux différentes liaisons possibles (Fig. 14). Dans ce système, deux chaines sont plus ou moins reconnues comme un signal de dégradation par le protéasome :

- celle qui compte au moins quatre ubiquitines reliées entre elles par la lysine 48 (K48), des facteurs se chargeant alors d'adresser la protéine marquée au protéasome pour dégradation même si parfois ce marquage a d'autres fonctions (Pickart and Fushman, 2004),
- celle qui ne compte qu'une ou plusieurs ubiquitines reliées entre elles par la lysine 63 (K63), qui destinera la protéine cible ainsi marquée à un rôle dans des processus cellulaires très variés tels que la réparation de l'ADN, la synthèse de protéines ribosomales, la transduction de signal ou les voies d'endocytose mais qui pourrait aussi être une cible pour la dégradation par le protéasome (Hicke, 2001; Hoppe *et al.*, 2000; Pickart and Fushman, 2004; Saeki *et al.*, 2009a; Weissman, 2001).

Cette ubiquitination peut être ôtée par des protéines appelées déubiquitinases. Le protéasome possède une de ces enzymes qui est intégrée directement dans le lid, Rpn11, et qui permet de coupler le recyclage des ubiquitines à la dégradation de la protéine ciblée en supprimant la chaine d'ubiquitine qui empêcherait le passage de la protéine dans le protéasome 20S (Verma *et al.*, 2002). Cependant, au moins trois autres déubiquitinases ont été retrouvées associées au protéasome. Chez les mammifères, le génome pourrait coder pour une centaine de

déubiquitinases. Il a été estimé que 90% de la protéolyse dans les cellules en croissance passe par le système ubiquitine-protéasome (Rock *et al.*, 1994). Pour ajouter un peu de complexité à ce système, l'ubiquitine est seulement l'une des 17 protéines UBL (**UB**iquitine-**L**ike) qui existent chez les mammifères. Les plus connues et les plus étudiées de ces UBL sont les protéines SUMO (Smt3 chez la levure), NEDD8 (Rub1 chez la levure) et UFM1 (n'existe pas chez la levure). La structure tertiaire de ces protéines est presque identique à celle de l'ubiquitine. La conjugaison de ces protéines passe aussi par une cascade d'activation de ces UBLs et est aussi réversible par des enzymes capables de cliver les liaisons à la manière des déubiquitinases. Ces UBLs sont aussi impliquées dans des processus cellulaires très variés, par exemple, la SUMOylation est impliquée dans la transcription ou le cycle cellulaire (Wilkinson and Henley, 2010).

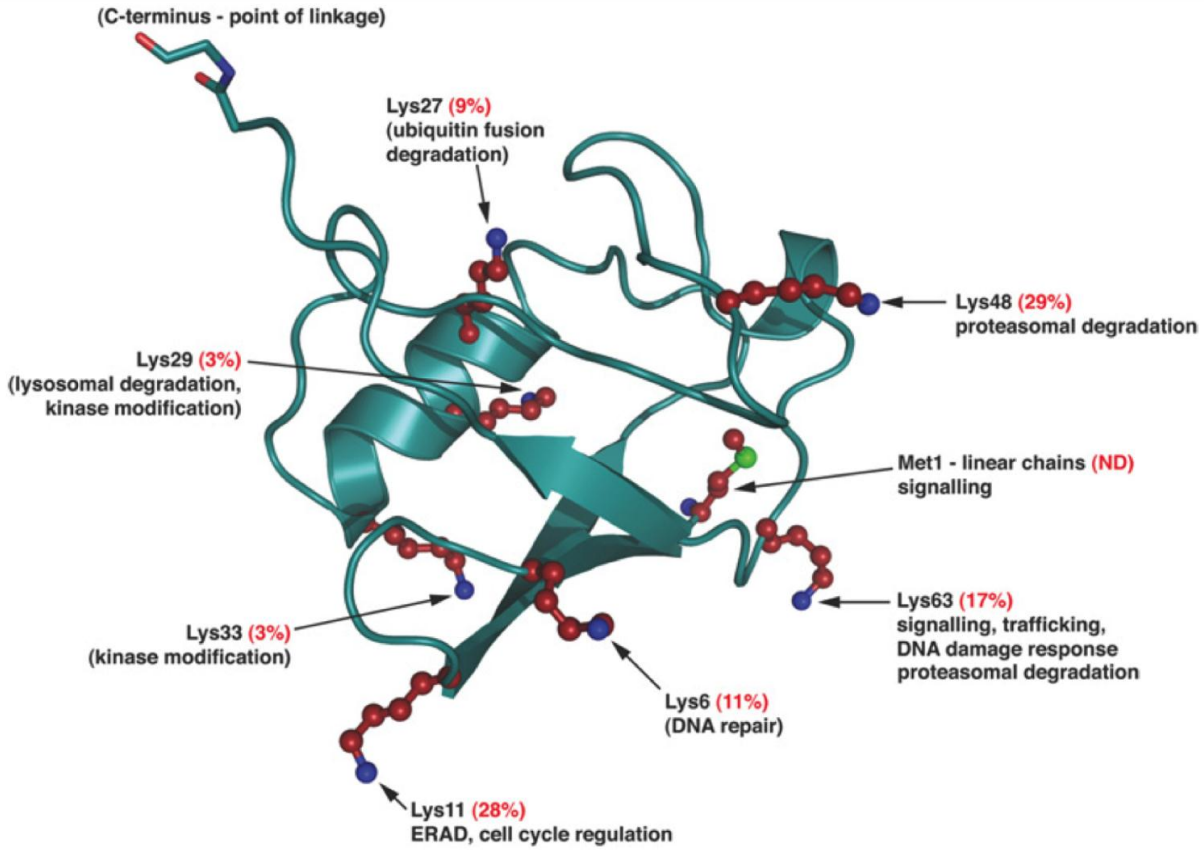

Figure 14 : Abondance relative des liaisons de l'ubiquitine chez *S. cerevisiae*.

Toutes les lysines sont utilisables pour l'ubiquitination mais elles ne sont pas toutes utilisées à la même fréquence. Chaque lysine est utilisée pour quelques fonctions cellulaires. La méthionine peut aussi être utilisée. Le pourcentage entre parenthèse indique l'abondance relative des liaisons. Celle de la méthionine n'a pu être déterminée à cause du type d'expérience utilisée (tag histidine). Le ratio d'utilisation des lysines pour les diverses liaisons possibles obtenu dans cette étude dépend probablement des organismes. Les rôles liés aux lysines qui sont indiqués entre parenthèse sont des rôles putatifs. Adapté de (Komander, 2009).

2. La dégradation 20S ou 26S dépendante et ubiquitine-indépendante.

Dans la plupart des exemples de dégradation de protéines non liées à l'ubiquitine effectuées par le protéasome, la seule différence réside dans le fait qu'une autre protéine joue le rôle de l'ubiquitine ou que le signal de dégradation est situé dans la protéine. Des protéines telles que DHFR (Amici *et al.*, 2004), Rpn4 (Ju and Xie, 2004), c-Jun (Jariel-Encontre *et al.*, 1995) sont des protéines qui peuvent être dégradées par le protéasome sans ubiquitination. Les protéines qui présentent des mauvais repliements ou des dommages très importants telles qu'une oxydation peuvent présenter des domaines hydrophobes augmentés en taille qui vont être un signal pour la dégradation ubiquitine-indépendante par le protéasome 20S (Davies, 2001). Dans ce type de dégradation, la présence de la particule 19S n'est pas requise puisque, *in vitro*, la dégradation de protéines oxydées ou mal repliées ne se fait pas avec le protéasome 26S même en présence d'ATP et d'ubiquitine (Grune *et al.*, 1997).

3. Endoplasmic Reticulum Associated Degradation.

La majorité des protéines qui vont être secrétées ou insérées dans une membrane passent par le réticulum endoplasmique (RE). Elles entrent dans le RE sous forme non repliée puis acquièrent les éventuelles modifications post-traductionnelles qu'elles doivent subir et leur forme repliée. Parfois, des protéines n'auront pas une bonne conformation et vont être dégradées par le système ERAD (« **E**ndoplasmic **R**eticulum **A**ssociated **D**egradation »). Le mécanisme au cœur de ce système est encore le système ubiquitine-protéasome mais sous une forme un peu modifiée car les protéines doivent être extraites de force du RE pour être dirigées vers le protéasome. Un grand nombre d'acteurs impliqués dans ce système sont connus et le système est très conservé entre la levure et l'homme. Brièvement, ce processus commence par la reconnaissance de la protéine à dégrader soit à cause de surfaces hydrophobes trop importantes ; des cystéines qui n'ont pas formé les ponts disulfure ou une mauvaise N-glycosylation. Les facteurs qui ont reconnus ces défauts vont adresser la protéine cible vers une E3 ubiquitine-ligase. Plusieurs E3 sont impliquées dans ce système et chaque E3 peut reconnaître plusieurs protéines substrats. La reconnaissance de ces protéines par une E3 peut être modifiée grâce à des protéines adaptatrices (Smith *et al.*, 2011). L'ubiquitination par l'E3 se produit dans le cytosol et un complexe constitué d'un homo-hexamère d'une AAA-ATPase nommée Cdc48 (ou p97 chez l'homme) est recruté (Fig. 15). C'est ce complexe qui va être le moteur pour faire sortir la protéine du RE ; il est capable de recruter des N-glycanases pour supprimer les N-glycosylations éventuelles. Des déubiquitinases vont retirer les ubiquitines pour permettre à Cdc48 de déplier la protéine puis celle-ci serait de nouveau ubiquitinée afin de faciliter son transfert vers le protéasome où elle sera dégradée en peptide (Fig. 15). Deux zones d'ombres subsistent dans ce modèle : le début de la

translocation de la protéine entre le RE et le cytosol ainsi que le passage entre Cdc48 et le protéasome.

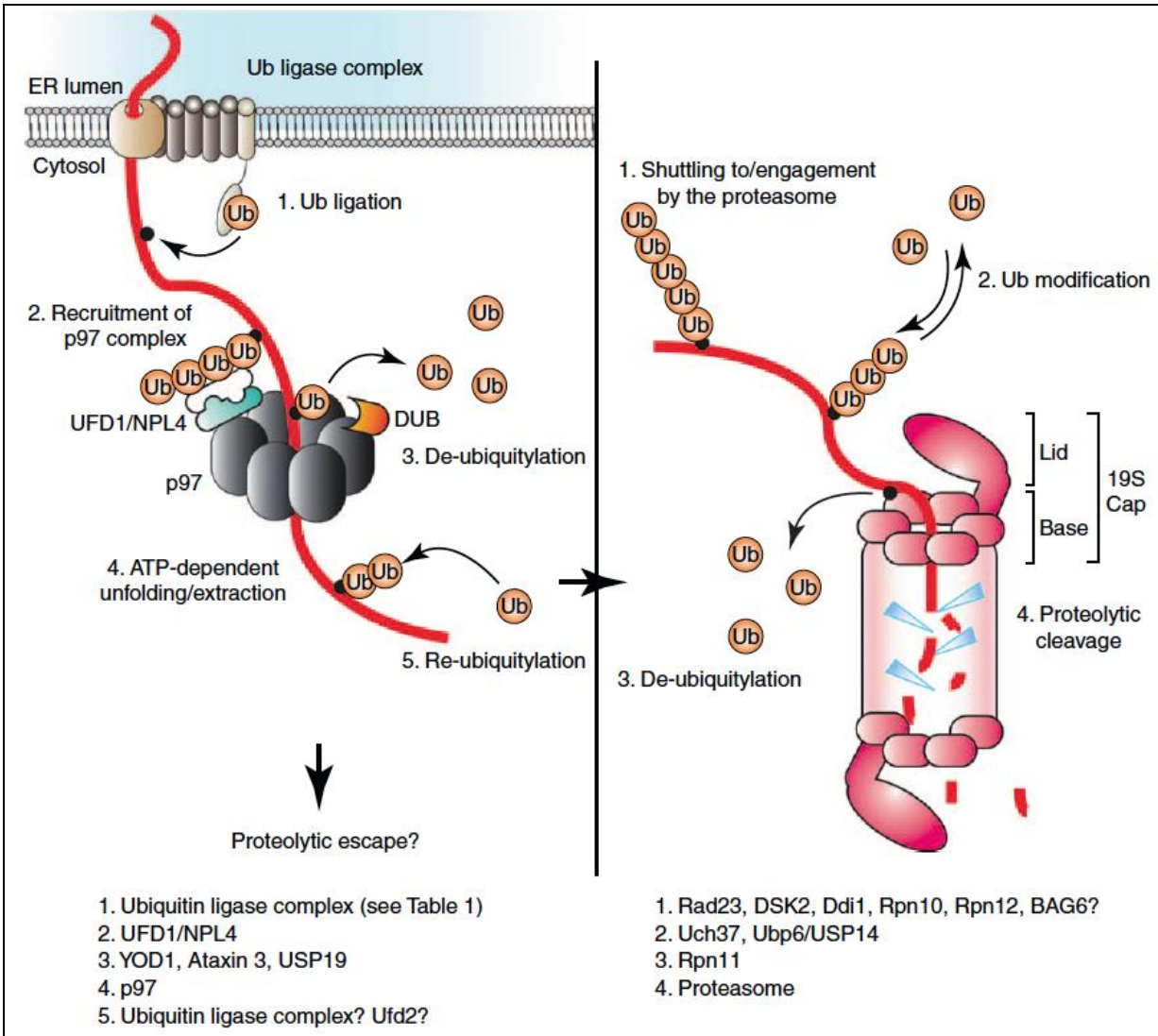

Figure 15 : Le système ERAD.

Gauche : un modèle pour la translocation de la protéine par Cdc48 (p97 sur l'image) *via* l'intermédiaire de Ufd1/Npl4. Droite : suite du devenir de la protéine avec la prise en charge par le protéasome 26S. (Claessen *et al.*, 2012).

4. Mitochondria Associated protein Degradation.

La majorité de l'ATP produit par les cellules eucaryotes l'est dans les mitochondries. Cela se fait par un système appelé phosphorylation oxydative qui utilise un gradient de protons comme force motrice pour la production de l'ATP par la F_1F_0 ATP-synthase. Ce gradient entraine donc un très fort gradient d'électrons et certains de ces électrons « s'échappent » des complexes impliqués dans la phosphorylation oxydative pour réagir avec l'oxygène présent dans la mitochondrie. Cela va avoir pour effet direct de produire des « **R**eactive **O**xygen **S**pecies » (ROS) très délétères pour la mitochondrie et la cellule. Des enzymes telles que les « **S**uper**O**xide **D**ismutase » Sod1 (cytosolique) et Sod2

(mitochondriale) sont capables de traiter ces ROS pour faire passer l'oxygène dans un état moins réactif. Les mitochondries possèdent des complexes protéasiques situés dans la membrane interne pour dégrader les protéines mitochondriales qui ne sont plus fonctionnelles. De façon intéressante, l'une de ces protéases (Yme1) fait partie d'un complexe i-AAA plutôt ressemblant aux anneaux formés par Cdc48 et dont la perte de fonction peut être compensée par la mutation d'une sous-unité de la base du protéasome nommée Ynt1 (ou Rpt3, (Campbell *et al.*, 1994)). Les complexes i-AAA possèdent leur site actif du côté intermembranaire au contraire des complexes m-AAA qui possèdent leur site actif du côté de la matrice.

Parfois les mitochondries ont subi trop de dommages liés aux ROS et doivent être isolées puis éliminées. Un contrôle qualité des protéines de la membrane externe de la mitochondrie peut être mis en place et intervenir en amont de cette élimination des mitochondries. Cela se produit grâce à une protéine, Vms1, qui va relocaliser l'un des complexes majeurs du système ERAD à la mitochondrie (Heo *et al.*, 2010). Pour cela, Vms1 va remplacer une des protéines qui interagit avec Cdc48 et entrainer la localisation de ce complexe aux mitochondries (Fig. 16). Ce système, renommé « **M**itochondria **A**ssociated protein **D**egradation », va permettre l'élimination des protéines de la membrane externe de la mitochondrie lors de divers stress cellulaires en utilisant le protéasome 26S de la même façon que dans le système ERAD décrit ci-avant. Les auteurs ont aussi montré que dans une souche Δ*vms1*, les cellules sont beaucoup plus dépendantes des protéases mitochondriales Yme1 et Oma1 et augmentent la mitophagie (phénomène de digestion des mitochondries défectueuses dans des compartiments cellulaires spécialisés). Quelques questions subsistent à propos de ce système MAD, notamment si le système dégrade les protéines mal repliées comme pour ERAD ou celles qui ont subi un stress oxydatif (voire les deux) ; comment ce système est recruté à la mitochondrie et surtout par quel signal.

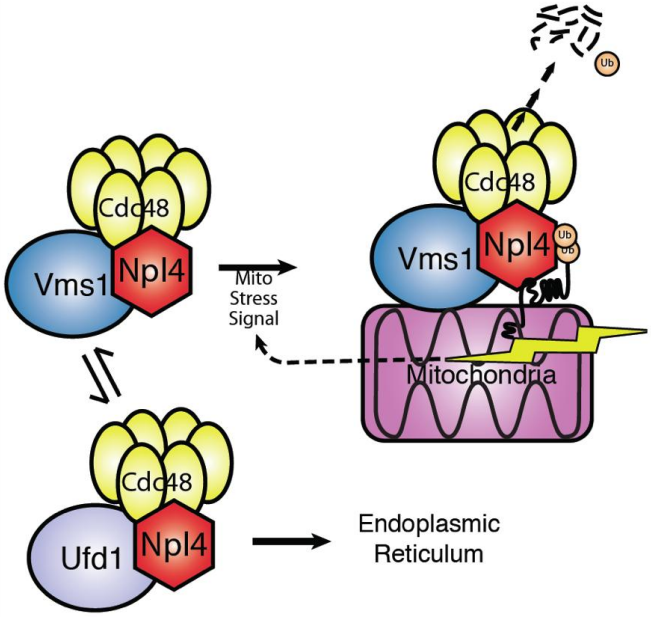

Figure 16 : Le système MAD.

Le remplacement de la protéine Ufd1 par Vms1 permet de localiser le complexe Cdc48/Npl4 à la mitochondrie. (Heo *et al.*, 2010)

5. Les rôles cellulaires des sous-unités du protéasome.

Le protéasome est impliqué dans beaucoup de rôles au sein de la cellule mais la plupart sont liés à son activité de protéase. Pourtant, avec son assemblage modulaire et dynamique, des sous-unités ou des sous-complexes du protéasome peuvent avoir un autre rôle cellulaire. La dynamique et la modularité du protéasome 26S renferment ainsi un grand nombre de fonctions très utiles pour la cellule (Fig. 17). De façon non-exhaustive, on peut citer des fonctions liées au rôle protéolytique (1-2) ou non protéolytique (3-6) :

1) Le protéasome 20S est impliqué dans la dégradation des protéines oxydées (Jung *et al.*, 2009).
2) Le protéasome 26S permet la maturation de protéines, il clive par exemple un facteur de transcription présent à la membrane du RE sous forme de précurseur et qui sera envoyé au noyau après clivage (Hoppe *et al.*, 2000).
3) Les sous-unités de la base ainsi que Rpn1/2, regroupées dans un complexe nommé « **A**AA **P**roteins **I**ndependent of the 20**S** proteasome » (APIS), qui jouent un rôle dans la transcription en interagissant physiquement avec divers facteurs de transcription ainsi qu'avec l'ARN polymérase II (Gonzalez *et al.*, 2002; Sun *et al.*, 2002).
4) Le protéasome 19S est impliqué dans la réparation de l'ADN en régulant le « **N**ucleotide **E**xcision **R**epair » (NER, (Gillette *et al.*, 2001; Russell *et al.*, 1999a)).
5) La sous-unité Rpn7 est importante pour le maintien des « DNA damage foci » qui n'ont pas été réparés et pourrait induire la sénescence des cellules ayant subi un stress

génotoxique irréparable tandis que la sous-unité Rpn11 promeut la réparation de ces « DNA damage foci » (Butler *et al.*, 2012; Tsolou *et al.*, 2012).

6) Sem1 (aussi appelée Rpn15) est une sous-unité du lid qui peut s'associer à d'autres complexes, Thp1/Sac3 pour l'export des ARNm ou Thp3/Csn12 pour l'épissage des ARNm (Wilmes *et al.*, 2008).

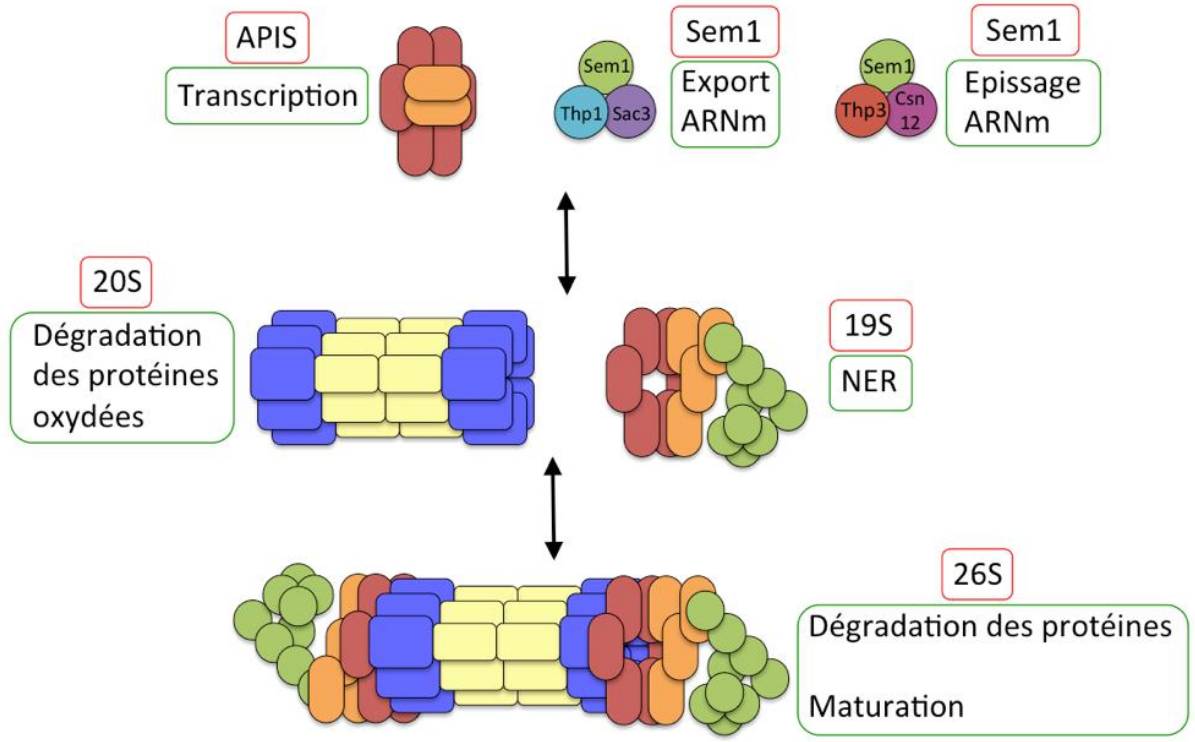

Figure 17 : Les différents rôles des composants du protéasome.

II. La mitochondrie.

A. Origine évolutive.

Très rapidement après leur découverte dans les cellules eucaryotes il y a un peu plus de 120 ans, les mitochondries ont été rattachées de façon plus ou moins affirmée aux bactéries. Dès 1890, Richard Altmann faisait référence aux mitochondries dans un livre sous le nom de bioblaste et avait proposé que ces granules fussent des unités vivantes élémentaires et autonomes, qui forment des colonies ressemblantes aux colonies bactériennes dans le cytoplasme de la cellule hôte. C'est peut-être un coup de chance mais la performance est suffisamment impressionnante, au regard actuel des connaissances, pour être soulignée.

Deux hypothèses avaient été émises pour expliquer l'origine des mitochondries : la formation d'un compartiment spécialisé chez l'ancêtre commun des eucaryotes ; la relation symbiotique entre deux procaryotes primitifs ou entre un proto-eucaryote et un procaryote

primitif capable d'effectuer la phosphorylation oxydative. Cette origine évolutive fut longtemps discutée mais la découverte du génome mitochondrial et la généralisation du fait que toutes les mitochondries possèdent un génome a permis de réfuter définitivement la première hypothèse en 1992 (Gray, 1992). Une autre assertion qui fut démentie est que tous les eucaryotes possèdent une mitochondrie. Il existe notamment deux classes de micro-organismes qui ne possèdent pas de mitochondrie : les *Microsporidia* et les *Parabasalia*. Une théorie qui prévalait jusqu'alors était que si des eucaryotes ne présentaient pas de mitochondries, c'est parce qu'ils devaient être les ancêtres de tous les eucaryotes. Cette théorie aussi fut invalidée car des études attentives de leur génome ont mis en évidence qu'ils ont possédé des mitochondries et que certains possèdent toujours un organite qui peut partiellement remplacer la mitochondrie et dont l'origine évolutive ressemble à celle des mitochondries : l'hydrogénosome. De façon générale, ces deux classes de micro-organismes regroupent des parasites et la perte de la mitochondrie est permise par le fait qu'ils vont pouvoir utiliser les mitochondries de la cellule hôte. Concernant les mitochondries, des études ont montré qu'elles auraient pour origine une α-protéobactérie, telle que les *Rickettsia*, internalisée chez un proto-eucaryote ou un procaryote primitif (Lane, 2006; Scheffler, 2008).

B. Rôles des mitochondries.

Les mitochondries ont acquis un rôle vital pour les eucaryotes. Elles ont pour fonction principale de fournir l'énergie nécessaire pour la vie cellulaire sous forme d'ATP, cette fonction est devenue tellement importante, car réellement très efficace, que très peu d'eucaryotes peuvent se dispenser de cette fonction mitochondriale. En plus de cette fonction, les mitochondries servent pour le stockage du calcium, l'homéostasie du fer, la synthèse de stéroïdes et sont en première ligne pour l'apoptose (ou mort cellulaire programmée).

1. La production d'ATP.

Dès 1912, l'idée que les mitochondries soient le lieu de la respiration cellulaire ayant pour but de produire l'énergie de la cellule fut émise. Cette idée ne fut confirmée que bien plus tard, en 1949 (Kennedy and Lehninger, 1949). Cette production d'ATP s'effectue au niveau de la membrane interne de la mitochondrie grâce à cinq complexes multi-protéiques (Fig. 18). Le premier complexe, nommé complexe I et qui est remplacé par deux protéines (Ndi1 et Nde1) chez *S. cerevisiae*, capte les protons à partir du glucose grâce au NAD+. Les électrons ainsi produits vont être transférés jusqu'au complexe IV qui va utiliser le dioxygène pour former de l'eau. Le gradient de protons va être utilisé par le complexe V pour créer de l'ATP à partir de l'ADP préexistant. Une molécule de glucose fournira 30 molécules d'ATP. Environ 3% des électrons produits par cette chaine sont « relâchés » involontairement et vont

produire les ROS. À la vue de toutes les fonctions de la mitochondrie, la production des ROS lors de la phosphorylation oxydative qui sont bénéfiques à faible concentration mais délétères à haute concentration semble un moindre mal pour la cellule.

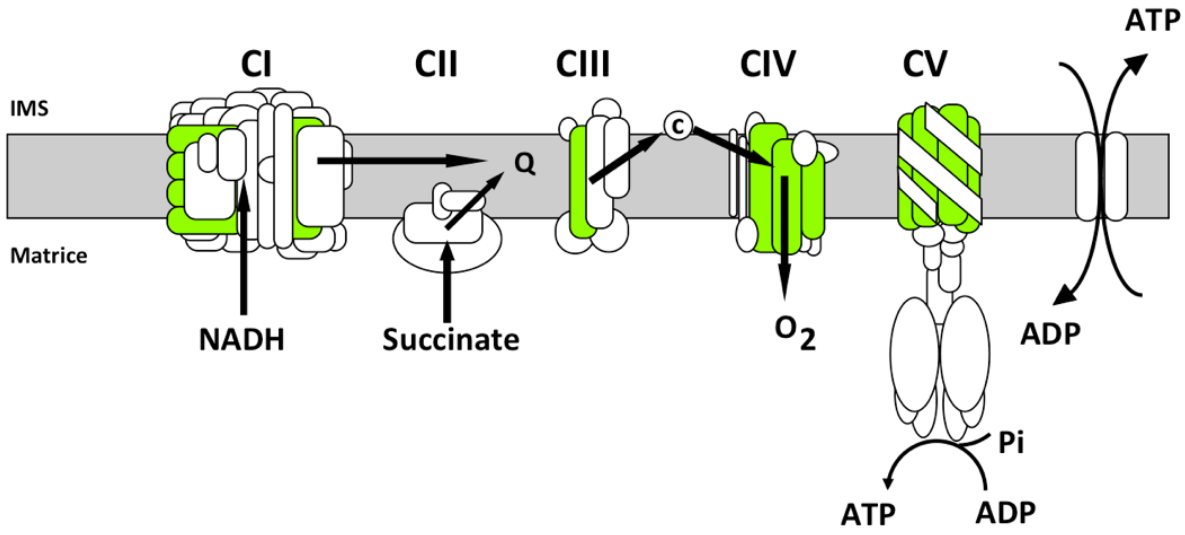

Figure 18 : Vision classique du système OXPHOS des mammifères.

La chaine respiratoire des mammifères est composée de cinq complexes multi-protéiques situés dans la membrane interne. Sur cette figure, les sous-unités codées par l'ADN nucléaire sont en blanc tandis que les sous-unités codées par l'ADN mitochondrial sont en vert. La chaine respiratoire de *S. cerevisiae* est très proche de celle représentée ici, seul le complexe I est absent, remplacé par deux protéines : Ndi1 et Nde1. Modifié à partir d'une image de P. Rustin fournie par E.P. Dassa.

La vision de la chaine respiratoire présentée dans la figure 18 est la vision classique avec un agencement linéaire des complexes. La réalité est plus complexe car ces complexes forment des super-complexes. Le premier super-complexe formé par les complexes I, III et IV est nommé respirasome. Le second super-complexe formé du complexe V et de deux transporteurs permettant l'import de phosphate inorganique dans la matrice et l'export d'ATP dans l'espace inter-membranaire couplé à l'import d'ADP dans la matrice est nommé ATPasome (Fig. 19).

Concernant cette chaine d'électrons, et pour donner une idée du travail effectué par la mitochondrie ainsi que son importance pour les cellules eucaryotes, voici plusieurs faits intéressants (Lane, 2006) :

- Gramme pour gramme, même en ne faisant aucun effort, un homme de 70 kg qui ingère 3000 calories de nourriture par jour produit 10 000 fois plus d'énergie que le soleil (toutefois, certaines bactéries du genre *Azotobacter* peuvent en produire 50 millions de fois plus).
- Par jour, ce même homme produira l'équivalent de sa masse en ATP.

- Cet homme possèderait environ 10 millions de milliards de mitochondries, ce qui représenterait 10% de sa masse totale.
- Le gradient de protons créé au niveau de la membrane interne génère une charge électrique de 150 millivolts sur une épaisseur de membrane de 5 nanomètres. Ramené à une échelle humaine de l'ordre du mètre, la charge est d'environ 30 millions de volts soit un voltage similaire à un éclair.

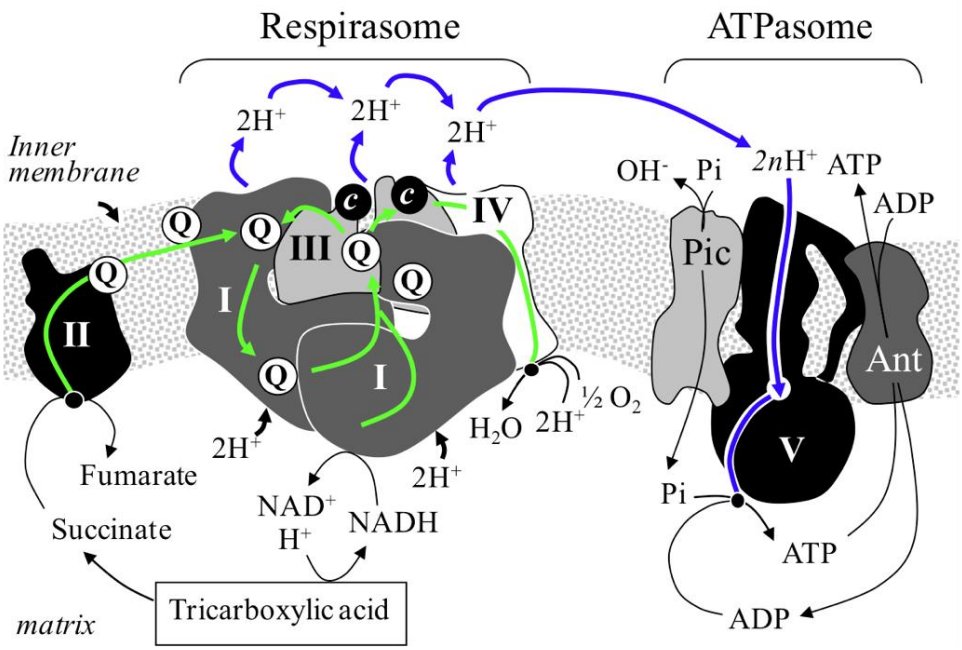

Figure 19 : Les super-complexes chez les mammifères.

En vert, chemin parcouru par les électrons. En bleu, chemin parcouru par les protons. Q : coenzyme Q, c : cytochrome c, ANT : « adenine nucleotide translocator », Pic : Pi channel. Modifié à partir d'une image de P. Rustin fournie par E.P. Dassa.

2. Les autres fonctions mitochondriales.

En plus de la respiration cellulaire, les mitochondries participent à de nombreuses voies cellulaires au sein de la cellule avec notamment : le métabolisme des acides gras, le cycle de l'urée, la biosynthèse des hèmes, la biosynthèse/métabolisme des cardiolipines et lipides, la biosynthèse du coenzyme Q, la biosynthèse des centres fer-soufre, la biosynthèse des glucides, la biosynthèse des acides aminés, le stockage du calcium (Fig. 20). Le livre d'Immo E. Scheffler donne une bonne vision de ces fonctions (Scheffler, 2008). Une fonction particulière et vitale est dédiée dans certains cas aux mitochondries : la thermogénèse. Cette fonction s'effectue dans le tissu adipeux brun chez le nouveau-né mais est constante chez les rongeurs et les animaux qui hibernent (Sell *et al.*, 2004).

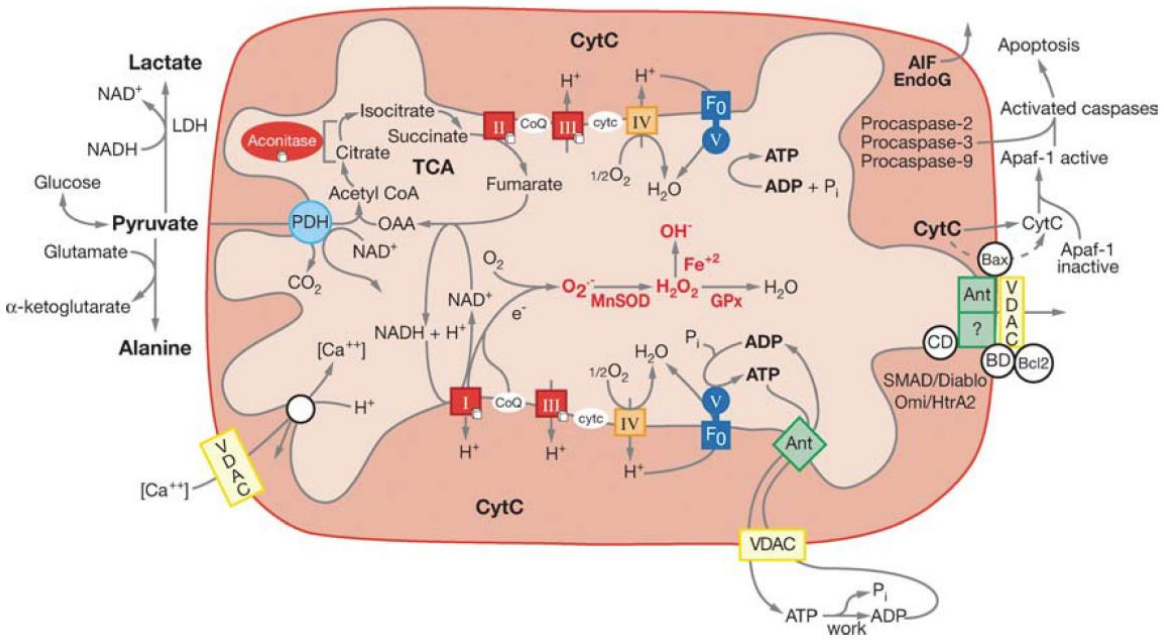

Figure 20 : Aperçu des fonctions effectuées au sein de la mitochondrie.

Ne sont représentées sur cette image que les fonctions de synthèse d'ATP, de stockage du calcium ainsi que la voie mitochondriale de l'apoptose. PDH : pyruvate déshydrogénase, TCA : cycle des acides tricarboxyliques, VDAC : « voltage-dependent anion channel ». (Wallace, 2005)

Il existe divers moyens pour les cellules des métazoaires d'exécuter l'apoptose. L'un de ces moyens est mitochondrie-dépendante. Lors d'un stimulus pro-apoptotique, beaucoup de protéines mitochondriales sont impliquées et notamment des protéines de l'appareil de fission mitochondrial (Eisenberg *et al.*, 2007; Fannjiang *et al.*, 2004). Avec un stimulus par acide acétique, H_2O_2, α-facteur, amiodarone ou des facteurs pro-apoptotiques humains exprimés chez *S. cerevisiae* ; le RE va relâcher une partie du calcium qu'il contient et la mitochondrie va le récupérer très rapidement. Ceci va avoir pour effet après une cascade d'évènements au sein de la mitochondrie de dépolariser la mitochondrie et relâcher le cytochrome c et d'autres protéines pro-apoptotiques dans le cytoplasme (Fig. 21) qui vont interagir notamment avec des protéines du RE. Le RE répondra à ce signal en relâchant encore plus de calcium, verrouillant ainsi la destinée de la cellule (Grimm, 2012).

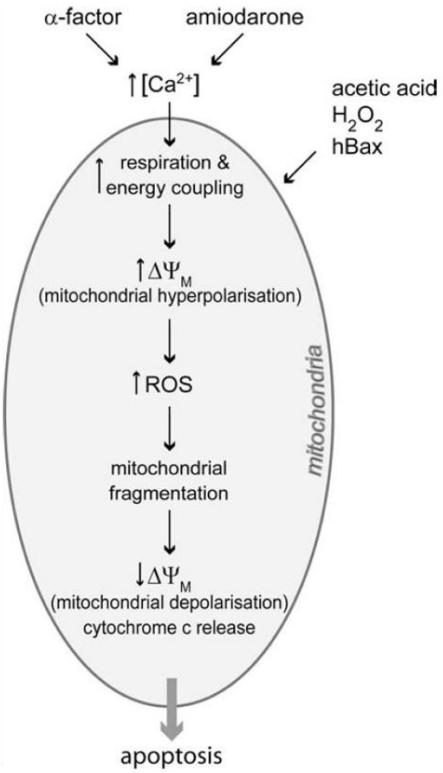

Figure 21 : Schéma des cascades d'évènements mitochondriaux durant l'apoptose.

Cette cascade a été déterminée par les stimuli de l'amiodarone ou de l'α-facteur. Les autres stimuli induisent des changements similaires avec un résultat identique mais la cascade précise n'est pas connue. ROS : « reactive oxygen species », $\Delta\Psi_M$: potentiel de membrane mitochondriale. (Eisenberg *et al.*, 2007)

C. L'organisation de la mitochondrie.

La mitochondrie ne peut pas être créée *de novo* au contraire d'autres organites présents dans la cellule. Au cours de l'évolution, la plupart des gènes mitochondriaux ont été transférés dans le génome nucléaire. Aujourd'hui la plupart des protéines mitochondriales (environ 99,8% pour l'homme et la levure) sont produites par la transcription des gènes situés dans le noyau et les protéines doivent être importées dans la mitochondrie.

1. Le génome mitochondrial.

Le premier génome mitochondrial séquencé fut celui de l'homme en 1981. Il fait 16,5 kb et se présente sous forme circulaire. De façon générale, les métazoaires présentent des génomes mitochondriaux circulaires de 16,5 kb ± 1 kb à quelques exceptions près concernant la forme ou la taille. Les mêmes gènes sont retrouvés parmi le génome mitochondrial des métazoaires mais leur position est parfois différente. L'ADN mitochondrial humain code pour 2 ARNr, 22 ARNt et 13 sous-unités du complexe I, III, IV, V (Fig. 18). Le génome mitochondrial de *S. cerevisiae* fait environ 85 kb et code pour à peu près les mêmes gènes que le génome mitochondrial humain (3 ARNr, 24 ARNt, 4 sous-unités des complexes III et V, ARN ribonucléase P ; Fig. 22). L'absence du complexe I observée chez *S. cerevisiae* n'est pas

valable pour toutes les levures. La présence d'introns optionnels chez la levure fait varier le génome mitochondrial entre 68 et 85 kb entre les diverses souches de *S. cerevisiae* (Fig. 22, (Scheffler, 2008)). Ce génome code pour des protéines indispensables à la fonction respiratoire de la mitochondrie. La levure *S. cerevisiae* fait partie du petit nombre d'organismes capables, dans des milieux leur permettant de se passer de la fonction respiratoire mitochondriale, de survivre en l'absence de ce génome.

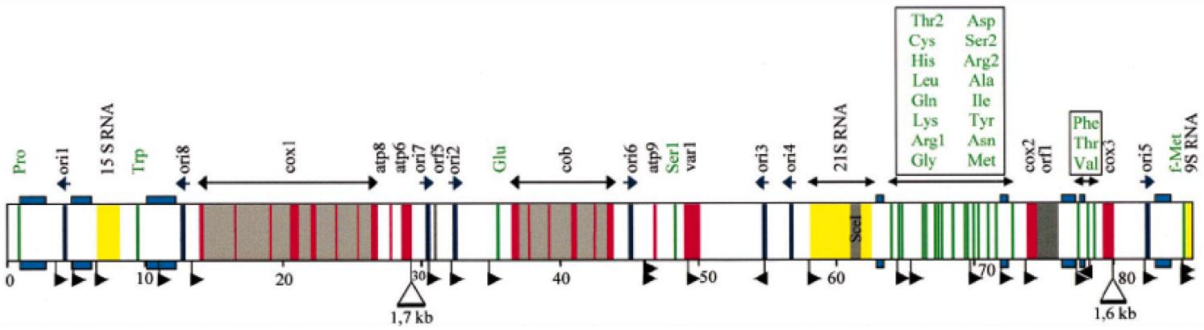

Figure 22 : Cartographie linéarisée du génome mitochondrial de *S. cerevisiae*.

Génome mitochondrial de la souche FY1679. Rouge : exons ; gris, introns ; vert : ARNt ; jaune : ARNr ; bleu foncé : origines de réplication. Les deux délétions de la souche sont indiquées par des triangles (1,7 kb et 1,6 kb). Les « drapeaux » indiquent les initiations de transcriptions et leur sens. Adapté de (Foury *et al.*, 1998).

Chez toutes les cellules eucaryotes, le génome mitochondrial est retrouvé sous forme de nucléoïde. Un nucléoïde est une structure située dans la matrice mitochondriale où des protéines vont interagir avec l'ADN mitochondrial pour l'empaqueter. Cette structure permet de relier l'ADN mitochondrial à la membrane interne et joue donc un rôle dans la transmission de cet ADN entre mitochondries. Chez *S. cerevisiae*, il existe environ 50 nucléoïdes par cellule contenant un ou deux génomes en conditions aérobie (respectivement moins de 10 et environ 20 en condition anaérobie). C'est un peu différent chez l'homme où on retrouve jusqu'à 800 nucléoïdes qui peuvent contenir jusqu'à 10 génomes. Chez *S. cerevisiae*, il a été caractérisé que l'accessibilité du génome est différente suivant les conditions de culture car les protéines constituant les nucléoïdes diffèrent mais l'organisation des nucléoïdes reste globalement inconnue (Fig. 23, (Chen and Butow, 2005)).

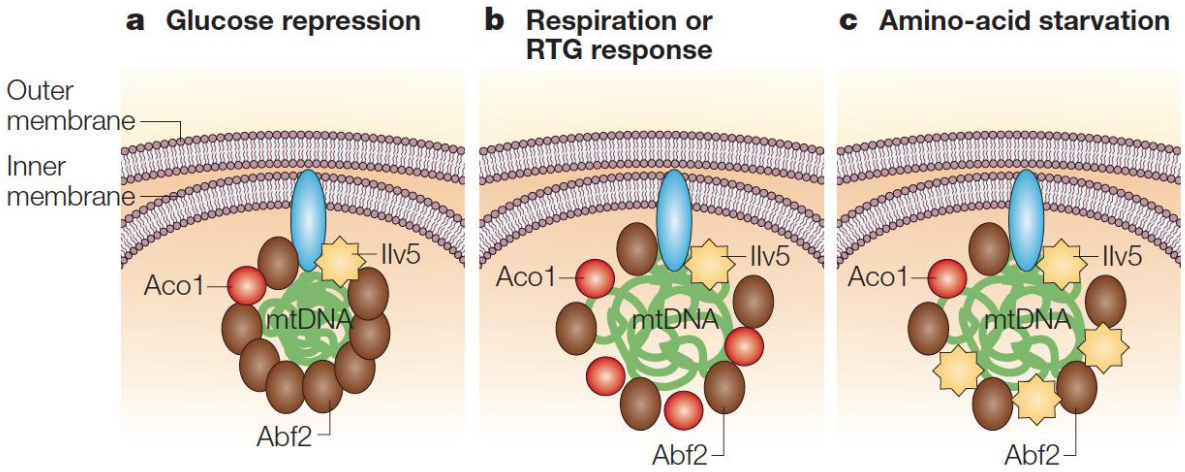

Figure 23 : Modèle pour le remodelage du nucléoïde suivant les conditions chez la levure.

A. Dans des conditions de répression glucose, l'ADN mitochondrial est empaqueté fermement par Abf2, ce qui limite l'accessibilité au génome.
B. Dans des conditions respiratoires ou en cas de dysfonctions mitochondriales activant la réponse rétrograde (RTG), Aco1 remplace une partie des protéines Abf2, permettant une plus grande accessibilité au génome.
C. En cas de manque d'acides aminés, un système similaire au point B. est mis en place mais c'est la protéine Ilv5 qui remplace Abf2. (Chen and Butow, 2005)

2. La structure mitochondriale.

Issue d'une endosymbiose, la mitochondrie a conservé la trace principale de cet évènement : cet organite possède deux membranes et la membrane externe est un vestige de l'endocytose subie par l' α-protéobactérie (Lane, 2006; Scheffler, 2008). Posséder un organite à double membrane dédié à la production d'énergie est une des raisons pour laquelle les eucaryotes ont pu avoir des formes si différentes et une taille bien plus importante en moyenne que les procaryotes malgré une variabilité génétique bien moindre (Lane, 2006). Au cours de l'évolution, une structure particulière développée par la mitochondrie a permis d'augmenter la surface dédiée à la respiration sans pour autant augmenter selon le même rapport sa surface externe : ce sont les crêtes de la membrane interne (Fig. 24). Ces deux membranes présentent aussi une grande différence dans leur composition.

La membrane externe est perméable aux petites molécules de moins de 5 kDa grâce aux porines. Pour importer les protéines et les molécules plus imposantes, la mitochondrie à recours au complexe TOM (**T**ranslocase of the **O**uter **M**embrane). La perméabilité de la membrane externe rend comparable les milieux cytoplasmiques et inter-membranaires à la différence près des protéines « filtrées » par le complexe TOM. De par sa situation à l'interface de la matrice mitochondriale et du cytosol, le milieu inter-membranaire remplit de nombreuses fonctions dont le repliement et la dégradation de protéines ou la détoxification des ROS (Herrmann and Riemer, 2010).

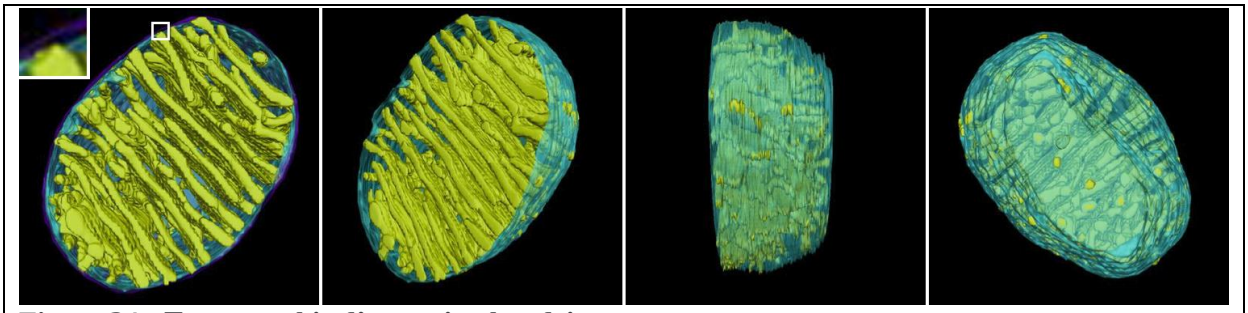

Figure 24 : Tomographie d'une mitochondrie.

Reconstruction en 3D d'une mitochondrie à partir d'une série de tomographies d'un pas de 0.5 µm. Sont représentées la membrane externe (bleu-violet, gauche et encadré seulement), la limite interne (bleu clair) et les crêtes mitochondriales (jaune). Les crêtes mitochondriales et la limite interne sont issues de la même membrane : la membrane interne (Perkins *et al.*, 1997), adapté de http://www.sci.sdsu.edu/TFrey/MitoMovies/CrisMitoMovie.htm.

Il faut noter que, bien que communicants, la constitution de l'espace inter-membranaire et de l'espace inter-crête est différente et que ces deux espaces peuvent être considérés comme distincts. Il a été notamment proposé que la concentration de cytochrome c serait enrichie dans l'espace inter-crête (Frezza *et al.*, 2006) ; ce qui est concordant avec le fait que les protéines de la membrane interne impliquées dans la respiration se retrouvent majoritairement dans les crêtes (Wurm and Jakobs, 2006). La composition de la membrane interne est particulière car elle contient une majorité de cardiolipine, de phosphatidylcoline et est très riche en protéines. Afin de permettre le passage des protéines qui doivent aller dans la matrice, on trouve un complexe similaire au complexe TOM de la membrane externe : le complexe TIM (**T**ranslocase of the **I**nner **M**embrane). Quant à la matrice, elle contient entre autre les nucléoïdes et les protéines nécessaires pour la réplication et la transcription de l'ADN mitochondrial mais aussi de nombreuses enzymes, ions et cofacteurs nécessaires pour la respiration cellulaire.

3. La morphologie mitochondriale.

Longtemps présentés comme statiques, les organites se sont révélés être très dynamiques, ayant une morphologie permettant de répondre aux besoins de la cellule à un instant donné. Les premières études montraient que le nombre de mitochondries variait grandement entre les types de cellules : de quelques-unes dans les spermatozoïdes à un millier dans les hépatocytes et plus de cent mille dans les ovocytes (Scheffler, 2008). Mais les techniques d'imageries s'améliorant, les mitochondries sont passées du statut d'organite ponctué et isolé à organite tubulaire et interconnecté (Hoffmann and Avers, 1973). Le réseau mitochondrial a pu être observé plus finement et des équipes ont montré que la forme de ce réseau était dépendant des conditions de culture (Visser *et al.*, 1995) et que le réseau était dynamique, des évènements de fission ou de fusion entre deux mitochondries ayant lieu

constamment à raison d'environ un évènement toutes les deux minutes (Nunnari *et al.*, 1997). Bien que la levure *Schizosaccharomyces pombe* soit plus proche des cellules mammifères sur certains aspects mitochondriaux (un génome d'environ 19 kb, ségrégation de la mitochondrie par les microtubules, respiration-dépendante (Chiron *et al.*, 2007)), c'est la levure *S. cerevisiae* qui reste la plus utilisée pour l'étude de la mitochondrie, car elle est capable de survivre sans génome mitochondrial en utilisant la fermentation pour produire de l'énergie. Cette levure permet de produire des mitochondries en grande quantité et en très peu de temps, grâce à son cycle cellulaire assez rapide et une purification des mitochondries plutôt facile. La recherche intensive dont cet organisme est l'objet a permis de développer de nombreuses techniques pour l'étude de la dynamique mitochondriale *in vivo* (Nunnari *et al.*, 1997) et *in vitro* (Ingerman *et al.*, 2007). De plus, le fait que *S. cerevisiae* soit respiration-facultative et que de nombreuses protéines contrôlant une partie de la morphologie mitochondriale de *S. cerevisiae* aient des homologues chez les métazoaires en font un objet d'étude de la dynamique mitochondriale et un modèle d'autant plus confortable.

a. Une morphologie qui s'adapte à l'environnement.

La morphologie mitochondriale est très dynamique et beaucoup de paramètres entrent en jeu pour la déterminer à un instant donné. Ainsi, la levure *S. cerevisiae* est capable d'utiliser deux métabolismes distincts pour produire de l'ATP : la fermentation et la respiration. Bien qu'elle puisse utiliser ces deux métabolismes et que la respiration soit bien plus efficace dans la production d'ATP en présence de glucose, la levure préfère utiliser la fermentation. Ce phénomène est dû à la répression glucose : les gènes codant pour des protéines de la chaîne respiratoire ne sont pas transcrit en présence de glucose (Schuller, 2003). Cette répression présente probablement une adaptation évolutive très intéressante de la levure : bien que moins efficace pour la production d'ATP par rapport à la respiration, la production est surtout beaucoup plus rapide que la respiration (Lane, 2006). Dans un milieu contenant du glucose, la levure peut utiliser la fermentation pour obtenir une croissance rapide permettant d'occuper tout le milieu avant d'autres compétiteurs. La fermentation présente comme défaut la production de déchets comme l'éthanol, mais cet éthanol peut être utilisé dans la respiration. Ainsi, lorsque la levure a utilisé tout le glucose présent dans le milieu, la répression glucose est levée et la levure commence à respirer ; permettant encore son développement. Ceci est sûrement un des moyens utilisé par la levure pour pouvoir supporter la compétition avec les bactéries qui se divisent bien plus rapidement que les eucaryotes et sont donc plus à même d'occuper un milieu rapidement en épuisant les ressources disponibles pour les autres organismes.

Pour répondre aux besoins différents de ces voies métaboliques, le réseau mitochondrial s'adapte : lorsque la fermentation prévaut, les mitochondries forment un réseau assez peu réticulé. Dans un environnement non-fermentescible (comme le glycérol), la mitochondrie présentera un aspect très connecté dès le début de la croissance. Ceci a pour effet d'augmenter la surface dédiée à la respiration mais aussi de diluer les dommages intrinsèques liés à la respiration comme les ROS. Ces changements de morphologie sont contrôlés par les évènements de fission et de fusion des mitochondries (Fig. 25).

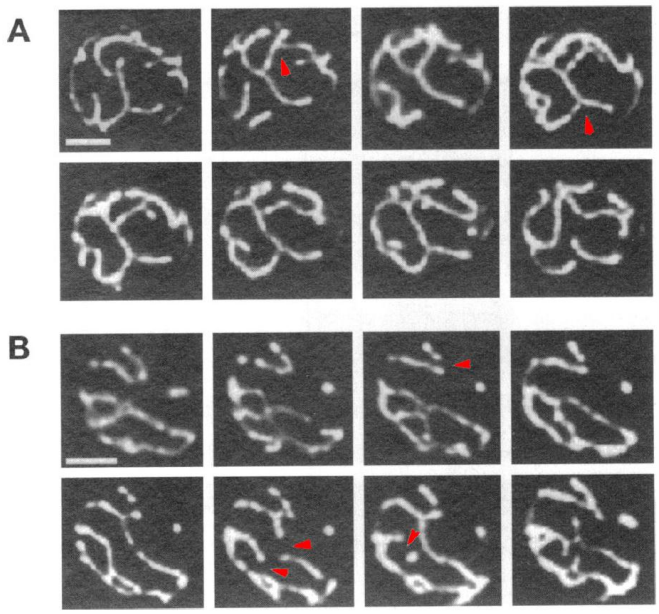

Figure 25 : Evènements de fusion et de fission au sein du réseau mitochondrial.

Le temps qui sépare la prise de chaque image de gauche à droite est de 3 minutes. Les flèches rouges indiquent des évènements de fusion (A) ou de fission (B). Barre = 1µm. Adapté de (Nunnari *et al.*, 1997).

Les adaptations métaboliques ne sont pas les seuls évènements de la vie cellulaire à pouvoir modifier la morphologie des mitochondries : le cycle cellulaire modifie aussi cette morphologie. En effet, pour que chaque cellule ou qu'une spore possède des mitochondries à la suite d'une mitose ou d'une méiose, le réseau mitochondrial va être fragmenté afin de pouvoir permettre le passage des mitochondries dans le cou du bourgeon ou pour être ségrégée avec chaque noyau haploïde lors des méioses. Au contraire, lors de la rencontre de deux cellules de signe sexuel opposé, un des premiers évènements (avant même la caryogamie) est la fusion des deux réseaux mitochondriaux dans le zygote. Cette fusion s'accompagne d'un échange très rapide du contenu des mitochondries des deux cellules (Fig. 26).

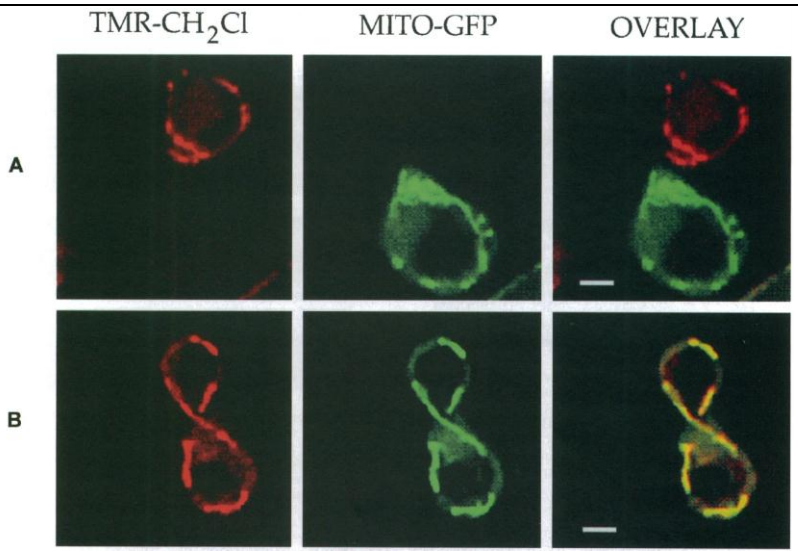

Figure 26 : Mélange des milieux mitochondriaux après une fusion cellulaire.

A. État des cellules avant la formation du zygote. Une des cellules possède des mitochondries marquées par du TMR-CH2Cl (un marqueur mitochondrial), l'autre possède des mitochondries marquées au moyen de la GFP fusionnée avec une pré-séquence mitochondriale.
B. État des cellules après la formation du zygote : on peut observer avec la superposition des images à droite que les contenus mitochondriaux ont été mélangés. Barre = 1µm. Adapté de (Nunnari *et al.*, 1997).

Une faculté apportée par cette dynamique mitochondriale concerne la destinée des mitochondries. Lors d'une forte demande énergétique sur milieu non fermentescible, les mitochondries vont produire un large réseau réticulé afin de diminuer les dommages liés à la fuite des électrons de la chaine respiratoire mais aussi pour transmettre le potentiel de membrane et dissiper l'énergie tout en unifiant le comportement de la matrice (Fig. 27). Au contraire, en cas de faible demande énergétique, la fission va permettre d'isoler une mitochondrie défectueuse car la fission est souvent faite de façon « inéquitable » : une grosse mitochondrie et une petite mitochondrie avec un potentiel de membrane moindre et des protéines nécessaires à la fusion moins nombreuses (Twig *et al.*, 2008).

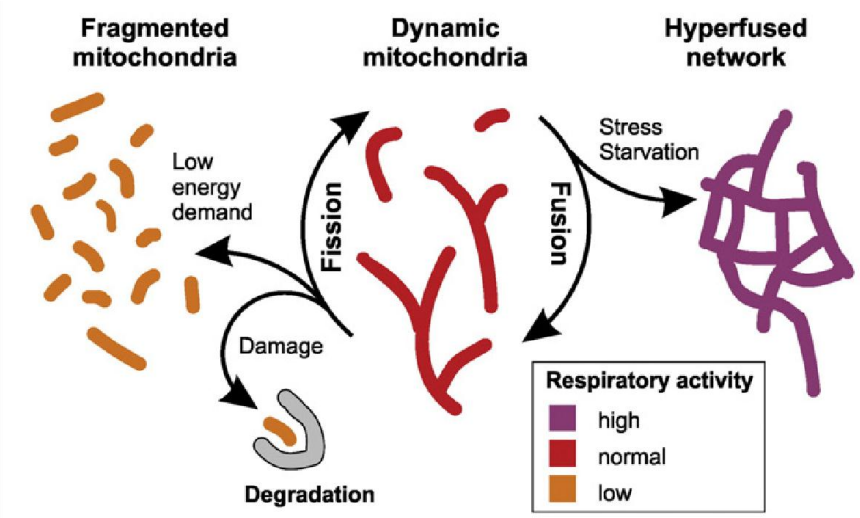

Figure 27 : Adaptation du réseau mitochondrial en fonction de la demande énergétique.

Le réseau mitochondrial peut s'adapter en fonction de l'activité énergétique de la cellule. Si la respiration est peu demandée (gauche), les mitochondries auront tendance à se fragmenter et cela va permettre de retirer les mitochondries défectueuses. En cas de forte demande respiratoire (droite), les mitochondries vont former un réseau très réticulé permettant de coupler les efforts et de diminuer les effets néfastes comme la concentration de ROS. Dans un état intermédiaire (centre) les mitochondries pourront former un réseau de volume similaire mais de réticulation moindre. Adapté de (Westermann, 2012).

Pour pouvoir étudier en profondeur les évènements de fission et de fusion, il faut connaître les protéines impliquées dans ces évènements. La connaissance de la génétique de *S. cerevisiae* a permis de développer des cribles parfaitement adaptés pour ce genre de recherche. Très rapidement, les premières protéines furent trouvées et nommées en fonction des phénotypes de leur mutant : MDM (**M**itochondrial **D**istribution and **M**orphology), MMM (**M**itochondrial **M**orphology **M**aintenance) et MGM (**M**itochondrial **G**enome **M**aintenance). En 2002, une équipe publie une liste de 131 gènes non essentiels obtenus après deux cribles et impliqués dans la morphologie mitochondriale (Dimmer *et al.*, 2002). Les gènes sont classés en trois catégories :

I. Gènes permettant l'établissement d'une morphologie de type sauvage, certains de ces gènes produisent des protéines appartenant aux machineries moléculaires qui contrôlent cette morphologie. Un peu moins de la moitié des mutants de cette classe présentent des défauts respiratoires.
II. Gènes importants mais non essentiels au sein d'une souche pour l'établissement d'une morphologie de type sauvage (les mitochondries sont souvent agrégées ou fragmentées mais parfois elles peuvent présenter un réseau normal dans certaines cellules). Les mutants de cette classe sont tous capables de respirer.

III. Gènes importants mais non essentiels au sein d'une souche pour l'établissement d'une morphologie de type sauvage. Les mutants de cette classe sont tous incapables de respirer.

En 2005, la même équipe a criblé les gènes essentiels de levure pour obtenir ceux qui sont aussi impliqués dans la morphologie mitochondriale (Altmann and Westermann, 2005). Cette équipe a utilisé une banque de souches qui place sous le promoteur répressible Tet les gènes et qui couvre les ⅔ des gènes essentiels de la levure. Après répression de l'expression de ces gènes, ils ont obtenu 119 gènes nécessaires pour la morphologie mitochondriale. Parmi les gènes retrouvés, certains font partie du système ubiquitine-protéasome. Par contre, il est important de noter qu'aucun contrôle systématique de l'extinction du gène et de l'absence de la protéine n'a été effectué.

Avec les deux cribles menés par cette équipe, environ 93% des gènes de la levure ont été testés et approximativement 4% semblent être impliqués de manière directe ou indirecte dans le processus de morphologie et de distribution de la mitochondrie. La levure *S. cerevisiae* et les eucaryotes supérieurs possèdent en commun beaucoup des protéines impliquées dans la morphologie mitochondriale. Chez la levure *S. cerevisiae*, trois machineries contrôlant la morphologie mitochondriale ont été clairement caractérisées : la machinerie de fusion, la machinerie de fission et la machinerie de tubulation. Chez les eucaryotes supérieurs seulement deux machineries ont été clairement définies : la machinerie de fusion et la machinerie de fission. La fusion et la fission des mitochondries sont des évènements régulés car un évènement de fusion déclenche un évènement de fission, évitant de se retrouver avec un réseau trop fusionné. Par contre un évènement de fission n'a aucun effet sur le temps moyen de la prochaine fusion (Twig *et al.*, 2008). Le réseau tubulaire observé dans les cellules est une conséquence de l'équilibre entre les évènements de fission et de fusion des mitochondries. Ce phénomène est très clairement mis en évidence lors de l'observation de mutants des différentes machineries. Lorsque l'on touche à la fusion, les mitochondries ne peuvent effectuer que de la fission et il en résulte que le réseau est fragmenté (Fig. 28, 2e image). De plus, la perte de la capacité de fusion de ces mutants entraine rapidement une perte de leur génome mitochondrial. Si c'est la fission qui est touchée, les mitochondries vont former un filet car elles ne seront plus capables de se séparer (Fig. 28, 3e image). Concernant un défaut de la tubulation chez la levure, les mitochondries ne seront tout simplement plus capables de former un réseau et chaque cellule ne possèdera qu'une seule grosse mitochondrie (Fig. 28, 4e image).

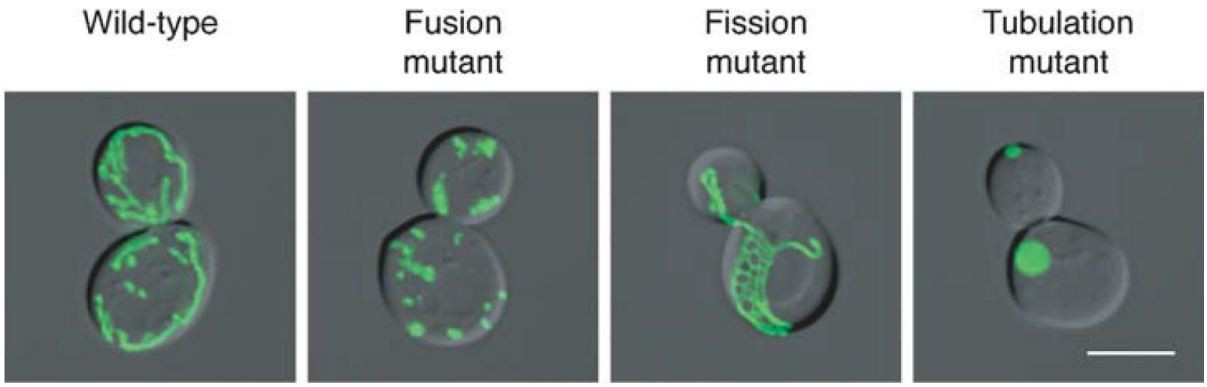

Figure 28 : Morphologies mitochondriales de mutants chez *S. cerevisiae*.

Exemples de morphologies mitochondriales observables dans une souche sauvage (1ère image), une souche affectée dans l'appareil de fusion (*Δfzo1*, 2e image), de fission (*Δdnm1*, 3e image) et de tubulation (*Δmmm1*, 4e image). Les mitochondries sont visualisées grâce à de la GFP ayant une pré-séquence mitochondriale. Barre = 5µm. (Okamoto and Shaw, 2005)

La plupart des acteurs impliqués dans la fusion et la fission ont été caractérisés chez *S. cerevisiae* et chez l'homme. Dans les parties qui vont suivre, je m'attacherai à décrire les machineries et les mécanismes chez la levure tout en pointant les différences qui peuvent exister dans les machineries des eucaryotes supérieurs (pour une revue plus complète concernant ces différences : (Zhao *et al.*, 2012)).

b. La fusion mitochondriale.

La fusion mitochondriale s'effectue lorsque deux extrémités de mitochondries se rencontrent. Cette fusion aboutira au mélange du contenu des deux mitochondries mais cela se fait après un processus plutôt compliqué qui consiste en la fusion de quatre membranes. La machinerie de fusion doit donc être capable de faire fusionner les membranes externes et internes de la mitochondrie. Cette machinerie de fusion a été très bien caractérisée chez la levure et elle nécessite trois composants principaux.

i. Fzo1

La protéine Fzo1 de la levure a été identifiée comme une protéine homologue de la protéine Fzo de la drosophile (Hales and Fuller, 1997; Hermann *et al.*, 1998; Rapaport *et al.*, 1998). Cette protéine est conservée entre la levure et l'homme qui possède deux protéines homologues (Mfn1/2, (Eura *et al.*, 2003)). Mfn1/2 sont des orthologues de la protéine Fzo de la drosophile (Hales and Fuller, 1997). Mfn1/2 sont capables de former des homo- ou des hétéro-dimères par l'interaction de leur domaine C-terminal (Chen *et al.*, 2003; Koshiba *et al.*, 2004). Les fonctions de Mfn1/2 sont partiellement redondantes et la présence d'une seule de ces protéines est suffisante pour induire la fusion. Ces protéines ont la même topologie chez tous les organismes : ce sont des protéines GTPase avec deux régions transmembranaires en C-terminal qui placent les régions N- et C-terminales face au cytosol. Le domaine GTPase est

situé dans la région N-terminale de la protéine. Cette protéine possède en plus deux (Mfn1/2) ou trois (Fzo1) domaines « coiled-coil » : deux domaines entourent le domaine GTPase chez Fzo1 (celui situé en N-terminal manque chez Mfn1/2) et un domaine est situé en C-terminal (Fig. 29).

ii. Mgm1

Cette protéine a été trouvée comme nécessaire pour la maintenance du génome mitochondrial dans un crible mené chez *S. cerevisiae* (Jones and Fangman, 1992). Il existe un homologue de cette protéine chez l'homme, OPA1. Mgm1 est une GTPase localisée dans la membrane interne mitochondriale. Elle possède une pré-séquence mitochondriale en N-terminal suivi de deux domaines transmembranaires, du domaine GTPase, d'un domaine médian, utile pour l'auto-assemblage, et enfin d'un domaine GED, qui aurait une propension à adopter une forme en « coiled-coil », activateur du domaine GTPase en C-terminal (Fig. 29). La protéine Mgm1 est présente sous deux isoformes : une forme longue (l-Mgm1) et une forme courte (s-Mgm1). Grâce à l'action d'une protéase de la membrane interne, Pcp1, qui va cliver le domaine transmembranaire de Mgm1 ; la forme courte n'est plus rattachée à la membrane interne, au contraire de la forme longue, (Herlan *et al.*, 2003; McQuibban *et al.*, 2003). Les deux formes de Mgm1 sont nécessaires pour une fusion efficace des mitochondries mais ne sont pas essentielles pour cette fusion puisque la présence d'une seule des deux formes permet une fusion des mitochondries de manière assez peu efficace (Herlan *et al.*, 2003; McQuibban *et al.*, 2003; Sesaki *et al.*, 2003). Mgm1 est associée aux deux protéines de la machinerie de fusion situées dans la membrane externe, Fzo1 et Ugo1, et joue donc un rôle dans la coordination de la fusion des membranes externe et interne pendant la fusion mitochondriale (Wong *et al.*, 2003). Concernant OPA1, elle a été découverte chez l'homme par une mutation qui provoque une atrophie optique dominante ; cette protéine a au minimum huit variations de transcrits produits par épissage alternatif (Alexander *et al.*, 2000; Delettre *et al.*, 2001). OPA1 requiert la présence de Mfn1 pour réguler la fusion mitochondriale mais pas celle de Mfn2 (Cipolat *et al.*, 2004).

iii. Ugo1

Il n'existe pas d'homologue de cette protéine chez les mammifères. Elle a été isolée dans un crible de mutants qui perdent leur ADN mitochondrial (Sesaki and Jensen, 2001). Ugo1 est ancrée dans la membrane externe par trois segments transmembranaires avec le N-terminal face au cytosol tandis que le domaine C-terminal fait face à l'espace inter-membranaire (Fig. 29, (Hoppins *et al.*, 2009)). Le domaine cytoplasmique interagit avec Fzo1 tandis que le domaine inter-membranaire interagit avec Mgm1. De plus, Ugo1 est

requise pour l'interaction entre Fzo1 et Mgm1 (Sesaki and Jensen, 2004). Ugo1 est aussi considérée comme la protéine qui coordonne les fusions des membranes interne et externe : sa présence est requise pour la fusion de la membrane externe et celle de la membrane interne (Hoppins *et al.*, 2009). Ugo1 est aussi nécessaire pour que Fzo1 forme des homo-dimères (Anton *et al.*, 2011).

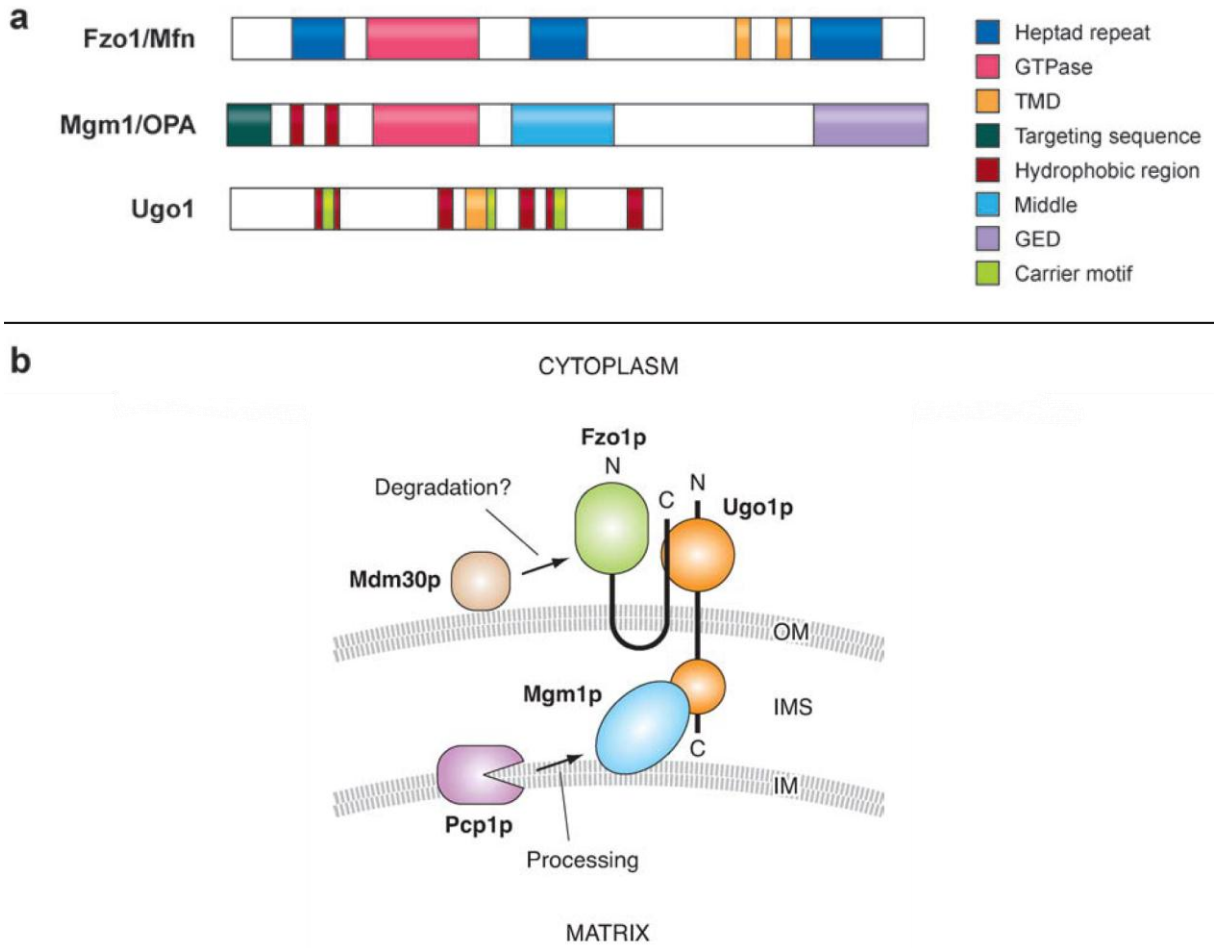

Figure 29 : Les acteurs de la fusion mitochondriale.

A. Organisation des domaines des trois principales protéines. Heptad repeat = « coiled-coil ».
B. Le complexe de fusion mitochondriale, Ugo1 est absent chez les mammifères et Fzo1 est remplacé par Mfn1/2. OM : membrane externe, IMS : espace inter-membranaire, IM : membrane interne. Adapté de (Hoppins *et al.*, 2007) et (Okamoto and Shaw, 2005).

iv. Les autres protéines.

En plus des trois protéines majeures du complexe de fusion, il existe d'autres protéines qui sont impliquées dans la fusion de façon plus ou moins directe.

• *Mdm30*

Mdm30 est une protéine présente principalement dans le cytoplasme mais aussi à la périphérie de la mitochondrie (Fritz *et al.*, 2003). Cette protéine fait partie d'un complexe E3 ubiquitine-ligase qui va contrôler l'ubiquitination de Fzo1 et sa dégradation par le protéasome

(Anton *et al.*, 2011; Cohen *et al.*, 2011; Cohen *et al.*, 2008). L'ubiquitination de Fzo1 et sa dégradation n'ont lieu qu'à la suite de l'hydrolyse du GTP par Fzo1. Aucun homologue de Mdm30 n'est retrouvé chez les mammifères mais ses fonctions peuvent probablement être assurées par une des nombreuses autres E3 présentes à la périphérie mitochondriale.

• *Pcp1*

Pcp1 est une protéase à sérine de type rhomboïde : c'est une protéase de la membrane interne dont le site actif est situé dans la bicouche lipidique. Cette protéase est à l'origine des deux isoformes de Mgm1 et des mutants *Δpcp1* sont incapables de produire l'isoforme courte ce qui produit une perte de l'ADN mitochondrial (Dimmer *et al.*, 2002) et un réseau mitochondrial partiellement fragmenté du fait de la fusion peu efficace. Il existe une forme humaine de cette protéine : PARL et son expression chez la levure complémente les mutants *Δpcp1* (Herlan *et al.*, 2003; McQuibban *et al.*, 2003; Sesaki *et al.*, 2003).

• *Ups1*

Ups1 est une protéine de l'espace inter-membranaire associée à la membrane interne. Elle augmente l'efficacité du clivage de Mgm1 par Pcp1 et sa délétion entraine une morphologie mitochondriale anormale sur des milieux fermentescibles. Cette protéine est conservée parmi les eucaryotes et l'expression de la version humaine, PREL1, complémente les défauts observés dans une souche de levure *Δups1* (Sesaki *et al.*, 2006). L'augmentation du clivage de Mgm1 serait directement lié au fait qu'Ups1 joue un rôle dans les échanges de lipides car une étude montre qu'un mauvais ratio de lipides dans la mitochondrie empêche ce clivage (Osman *et al.*, 2009a). Cette étude montre aussi que dans des souches *Δpsd1* et *Δgep1*, d'autres gènes impliqués dans le métabolisme des phospholipides, le clivage de Mgm1 peut être absent pour les mêmes causes.

v. Un modèle du processus de fusion.

Afin de déterminer le mécanisme de fusion des mitochondries, une équipe à mis au point un système de fusion *in vitro* (Meeusen *et al.*, 2004). Des mitochondries ont été isolées de plusieurs souches. Afin de visualiser la fusion de la membrane interne, des mitochondries ont été isolées à partir d'une souche de levure qui exprime soit la GFP adressée dans la matrice soit de la RFP adressée dans la matrice. Lorsque deux mitochondries à marquage matriciel différent sont mises en contact, s'il y a fusion, il y aura alors mélange des matrices et colocalisation des deux fluorophores et la matrice mitochondriale apparaîtra en jaune sur des superpositions d'image (Fig. 30). Pour déterminer comment s'effectuait la fusion de la membrane externe, des mitochondries ont été isolées à partir d'une souche exprimant une protéine de la membrane externe fusionnée à la GFP et exprimant aussi la BFP adressée à la

matrice. Ces mitochondries ont été mises en contact avec des mitochondries dont la matrice mitochondriale est marquée par de la RFP. En cas de fusion de la membrane externe seulement, la GFP va diffuser autour de la matrice bleue et de la matrice rouge. De cette manière, les conditions pour la fusion de la membrane externe ont été analysées (Fig. 30).

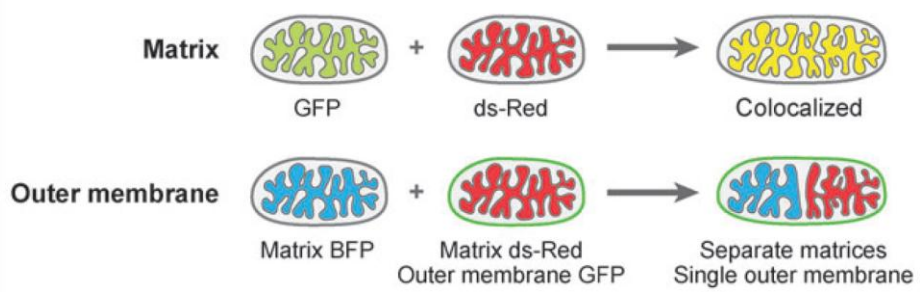

Figure 30 : Représentation du test de fusion *in vitro*.

La fusion des matrices est testée par la mise en contact de deux mitochondries, l'une exprimant de la GFP matricielle et l'autre du DsRed matriciel. En cas de fusion, les fluorophores vont colocaliser et l'image résultante montrera une matrice jaune. Pour la fusion de la membrane externe, deux mitochondries sont mises en contacts, l'une exprimant de la BFP matricielle et l'autre de la DsRed matricielle ainsi que de la GFP modifiée pour être insérée dans la membrane externe. En cas de fusion, la membrane entourant les matrices bleues et rouges sera entièrement verte. Adapté de (Hoppins *et al.*, 2007).

Cette expérience a montré qu'il fallait trois étapes pour obtenir une fusion des mitochondries : un rapprochement des membranes, la fusion de la membrane externe, la fusion de la membrane interne.

La première étape, obtenue *in vitro* par centrifugation, nécessite probablement *in vivo* l'action du cytosquelette pour diriger deux mitochondries l'une vers l'autre. Lorsque ces mitochondries sont assez proches, elles doivent alors s'attacher pour commencer la fusion. Chez les mammifères, cette fonction est probablement dévolue à Mfn1 qui est capable de former des dimères et la déstabilisation de ces dimères empêche la fusion des mitochondries (Koshiba *et al.*, 2004). Chez la levure, un processus similaire est de mise avec Fzo1 (Griffin and Chan, 2006). Les protéines GTPase impliquées dans la fusion sont des protéines DRP (« **D**ynamin-**R**elated **P**rotein ») et fonctionnent à cette étape comme les protéines SNAREs, aussi impliquées dans la fusion des membranes, en utilisant le même procédé : elles forment des dimères grâce à leur domaines « coiled-coil » ce qui rapproche les deux membranes et permet la suite du processus de fusion (Chen and Scheller, 2001; Weber *et al.*, 1998).

La seconde et la troisième étape sont coordonnées *in vivo* mais peuvent être séparées *in vitro*. Les protéines Fzo1 des deux mitochondries dimérisent grâce à la liaison du GTP et l'aide d'Ugo1, puis il y a association en *trans* des Fzo1 des deux mitochondries et hydrolyse du GTP (Fig. 31). Vient ensuite un probable changement de conformation de Fzo1 et une

ubiquitination médiée par Mdm30. Les protéines Fzo1 sont hydrolysées par le protéasome et la fusion de la membrane externe se produit (Anton *et al.*, 2011; Cohen *et al.*, 2008). La possibilité de séparer *in vitro* ces étapes et les conditions nécessaires différentes suivant la fusion des membranes suggéraient la présence de deux machineries distinctes (Meeusen *et al.*, 2004). Il faut donc un coordinateur pour associer, *in vivo*, la fusion des membranes externes et internes et c'est la protéine Ugo1 qui s'en charge chez la levure.

Ugo1 est requis dans la fusion des membranes externes et internes, après l'étape de rapprochement des membranes, et fonctionnerait donc comme un adaptateur (Hoppins *et al.*, 2009). Étant donné le rôle plutôt important de la protéine Ugo1, il existe probablement une protéine dont la fonction est équivalente chez les mammifères mais elle n'a pas encore été trouvée. Au contraire de la fusion de la membrane externe qui nécessite un ΔpH mais pas de GTP exogène, la fusion de la membrane interne nécessite un apport d'une grande concentration de GTP et un ΔΨ au niveau de la membrane externe (Meeusen *et al.*, 2004).

C'est la protéine Mgm1 qui va être l'acteur majeur de la fusion de la membrane interne. Sa forme longue attachée à la membrane interne est capable de faire une fusion de la membrane interne mais à un niveau moindre qu'en présence de la version courte soluble, issue du clivage par Pcp1. Les deux formes doivent donc agir ensemble pour la fusion mais de manière légèrement différente (Herlan *et al.*, 2003; McQuibban *et al.*, 2003; Sesaki *et al.*, 2003). La présence des deux formes de Mgm1 pourrait être un des moyens de réguler la fusion en fonction de l'état de la mitochondrie. À la suite de l'importation de Mgm1 dans la matrice, sa pré-séquence d'importation est clivée. Juste après cette pré-séquence il existe deux régions hydrophobes (Fig. 29a, page 41). Suite au clivage de la pré-séquence, Mgm1 pourrait subir deux « destins » : le premier consiste en la translocation de la protéine dans la membrane interne par le complexe Tim23 jusqu'à la première région hydrophobe ; le second correspond à une prise en charge de la translocation de manière ATP dépendante par Hsp70 jusqu'à la deuxième région hydrophobe, celle qui contient le site de clivage de Pcp1. Dans le second cas, la formation de l'isomère court de Mgm1 sera possible. Des observations corrèlent avec cette idée car la forme longue est majoritairement observée en faible présence d'ATP tandis que la forme courte prédomine lorsqu'il y a une forte concentration d'ATP (Herlan *et al.*, 2004). Tout comme Fzo1, Mgm1 va former des dimères en *cis* puis relier les membranes internes en s'associant en *trans* (Fig. 31, (Meeusen *et al.*, 2006)). Il se produira alors la fusion des membranes par hydrolyse du GTP.

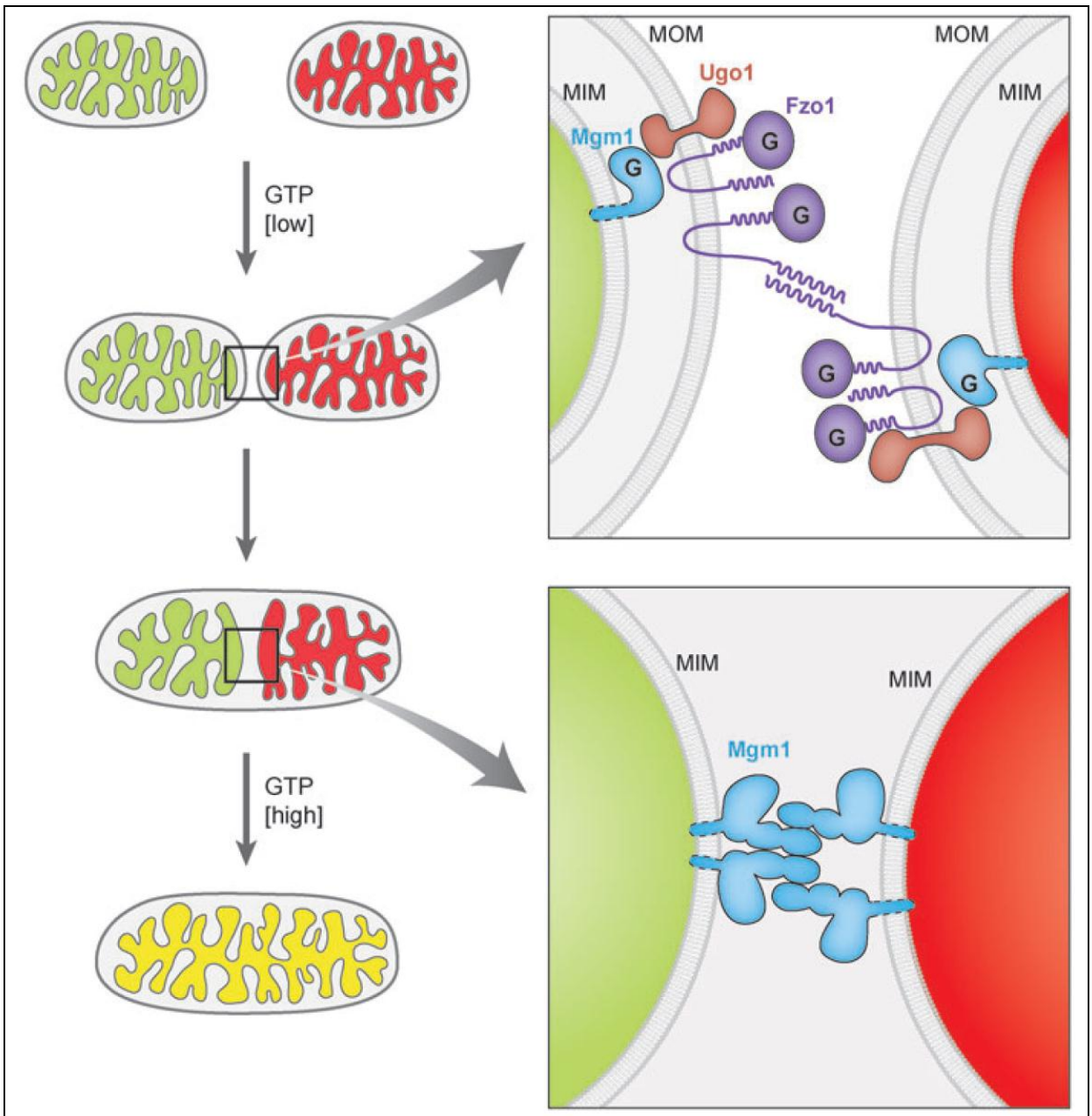

Figure 31 : Modèle du mécanisme moléculaire de fusion mitochondriale.

La fusion des mitochondries se fait de manière séquentielle. La fusion de la membrane externe nécessite peu de GTP et un ΔpH. La fusion de la membrane interne nécessite l'ajout de GTP et un ΔΨ. Le carré du haut représente la première étape de la fusion de la membrane externe : Fzo1 dimérise en *cis* et s'associe en *trans* par ses domaines « coiled-coil » et avec l'aide de Ugo1 et du GTP. L'implication exacte du complexe Fzo1/Ugo1/Mgm1 est inconnue mais sa formation relierait la fusion de la membrane externe avec la membrane interne. Le carré du bas représente la première étape de la fusion de la membrane interne avec la formation en *cis* et *trans* de Mgm1. Pour simplifier le schéma, la forme courte de Mgm1 n'est pas représentée. Adapté de (Hoppins *et al.*, 2007).

c. La fission mitochondriale.

La fission des mitochondries consiste en la séparation d'une mitochondrie en deux mitochondries, souvent de taille inégale. Pour cela, la machinerie de fission va compresser la mitochondrie jusqu'à ce que les membranes interne et externe se rompent. Chez *S. cerevisiae*, cette machinerie est constituée de quatre protéines clés et le système semblait plutôt bien

compris mais très récemment un acteur de taille est apparu remettant en cause la façon dont serait effectuée la fission.

i. Fis1

Fis1 est une protéine de type « tail-anchored » ancrée dans la membrane externe et distribuée tout autour de la mitochondrie dont la partie N-terminale fait face au cytoplasme (Fig. 32). Une protéine mutante sans partie C-terminale transmembranaire est retrouvée dans le cytoplasme et la fission mitochondriale ne peut se faire chez *S. cerevisiae* (Mozdy *et al.*, 2000). Elle est très conservée chez les eucaryotes et on la retrouve aussi chez l'homme (hFis1, (James *et al.*, 2003; Yoon *et al.*, 2003)). L'expression de la protéine humaine chez la levure est incapable de complémenter les défauts de morphologie mitochondriale d'une souche *Δfis1* (Stojanovski *et al.*, 2004). Fis1 présente dans sa partie cytoplasmique un repliement de type tetratricopeptide formant une surface concave hydrophobe pouvant servir de point d'attachement pour une autre protéine.

ii. Dnm1

Dnm1 est la protéine clé de la fission mitochondriale : c'est l'effectrice de la fission chez la levure (Bleazard *et al.*, 1999). C'est une GTPase faisant partie de la famille des dynamines et qui possède une protéine homologue, Drp1, chez les mammifères (Smirnova *et al.*, 2001). Cette protéine est majoritairement retrouvée dans des structures ponctuées issues d'oligomérisation et qui colocalisent avec les mitochondries. Une partie de ces structures colocalisent aux sites de fission mitochondriale (Bleazard *et al.*, 1999; Legesse-Miller *et al.*, 2003; Naylor *et al.*, 2006; Sesaki and Jensen, 1999). À l'inverse de Dnm1, Drp1 est présente majoritairement dans le cytoplasme et une petite fraction est retrouvée aux sites de fission mitochondriale (Labrousse *et al.*, 1999; Smirnova *et al.*, 2001). Dnm1 possède un domaine N-terminal qui porte son activité GTPase, un domaine médian, une région hydrophile appelée insert B de fonction inconnue et un domaine « **G**TPase **E**ffector **D**omain » (GED) en C-terminal (Fig. 32). L'oligomérisation est en partie dirigée par le domaine GED tandis que l'activité GTPase est essentielle pour la fission (Cerveny and Jensen, 2003; Fukushima *et al.*, 2001; Otsuga *et al.*, 1998).

iii. Mdv1

Mdv1 est une protéine du cytoplasme composée d'une extension N-terminale (NTE) qui sert à l'interaction avec Fis1, un domaine « coiled-coil » permettant son homo-oligomérisation et une partie C-terminale composée de répétitions WD qui formeront une hélice qui interagit avec Dnm1 (Fig. 32, (Tieu and Nunnari, 2000; Tieu *et al.*, 2002)). Mdv1 est présente tout autour de la mitochondrie mais est surtout concentrée dans des

structures ponctuées situées à la mitochondrie et colocalise avec Dnm1 sur la membrane externe (Bhar *et al.*, 2006; Cerveny and Jensen, 2003; Cerveny *et al.*, 2001; Tieu and Nunnari, 2000). En l'absence de Dnm1, Mdv1 est localisée de façon uniforme autour de la mitochondrie. En l'absence de Mdv1, Dnm1 est toujours localisée de façon ponctuée autour de la mitochondrie sans pouvoir effectuer la division. Enfin, en l'absence de Fis1, Mdv1 est localisée dans des structures ponctuées anormales avec Dnm1 et en l'absence de Fis1 et Dnm1, Mdv1 est retrouvée dans le cytoplasme (Mozdy *et al.*, 2000; Tieu and Nunnari, 2000). Ces expériences montrent que Dnm1 et Fis1 sont impliquées dans la localisation mitochondriale de Mdv1 et que ces protéines agissent ensemble pour effectuer la fission. La protéine Mdv1 n'est pas retrouvée chez les eucaryotes supérieurs.

iv. Caf4

Caf4 est une protéine similaire à Mdv1, elle possède la même topologie et la même localisation. Elle est capable de se lier à Fis1, Mdv1 et Dnm1 (Griffin *et al.*, 2005). Elle est capable d'effectuer les mêmes rôles que Mdv1. Une délétion de Mdv1/Caf4 empêche le recrutement de Dnm1 par Fis1. Dnm1 est toujours localisée dans des structures ponctuées anormales en absence de Mdv1/Caf4, ce qui suggère la présence potentielle d'autres facteurs de recrutement de Dnm1 encore inconnus. (Griffin *et al.*, 2005; Mozdy *et al.*, 2000; Tieu and Nunnari, 2000). Tout comme Mdv1, Caf4 n'est pas retrouvée chez les eucaryotes supérieurs.

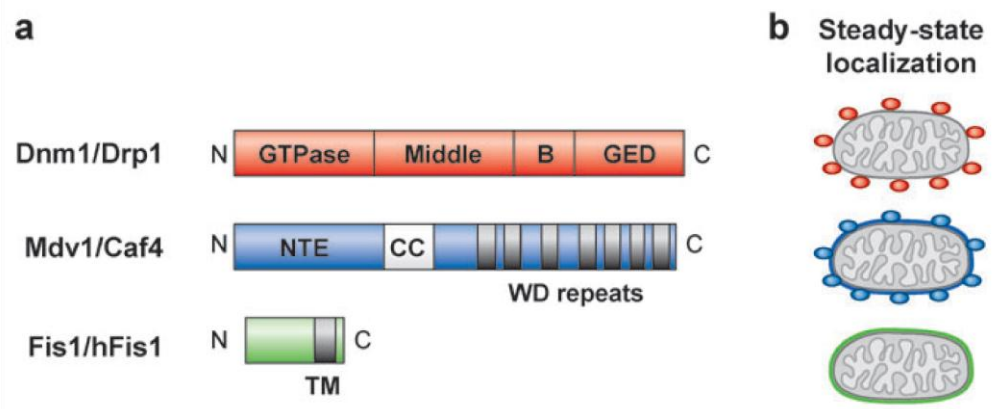

Figure 32 : Les acteurs de la fission mitochondriale.

A. Représentation des domaines des différents acteurs majeurs de la fission mitochondriale. B : insert B, GED : domaine effecteur GTPase, NTE : extension N-terminale, TM : domaine transmembranaire, CC : domaine « coiled-coil ».

B. Localisation des protéines dans des cellules sauvages de levure. Adapté de (Hoppins *et al.*, 2007).

v. Les autres protéines.

Les protéines non essentielles pour la fission ont toutes été trouvées dans le screening des gènes non essentiels (Dimmer *et al.*, 2002). Les produits de ces gènes sont nécessaires au maintien d'une morphologie normale mais leur absence n'empêche pas les cellules de pouvoir

effectuer des évènements de fission et de fusion. Aucun de ces gènes n'est retrouvé chez les eucaryotes supérieurs. Enfin, il n'est pas certain que ces protéines affectent uniquement le mécanisme de fission mais elles pourraient affecter l'équilibre entre la fission et la fusion.

• *Num1*

Les mutants Num1 montrent une morphologie mitochondriale en forme de filet identique à des cellules *Δdnm1*. Num1 s'assemble de façon ponctuée autour de la mitochondrie et certaines de ces structures colocalisent avec Dnm1 ; Num1 se lie aux mitochondries indépendamment de Fis1, Mdv1 ou Dnm1. Dans les cellules *Δnum1Δfis1*, Dnm1 conserve sa capacité de former des structures ponctuées à la mitochondrie, même si on retrouve plus de Dnm1 dans le cytoplasme, indiquant que d'autres facteurs sont en jeu pour le recrutement de Dnm1 (Cerveny *et al.*, 2007). La localisation corticale et le rôle dans la ségrégation nucléaire de Num1 (Farkasovsky and Kuntzel, 1995; Kormanec *et al.*, 1991) suggèrent que cette protéine pourrait jouer un rôle dans l'attachement des mitochondries au cortex cellulaire. Il a été proposé que Caf4 joue un rôle prépondérant dans l'attachement de Dnm1 avec Num1 et dans la localisation corticale des mitochondries tandis que Mdv1 serait plus impliqué dans la fission mitochondriale (Fig. 33, (Schauss and McBride, 2007)).

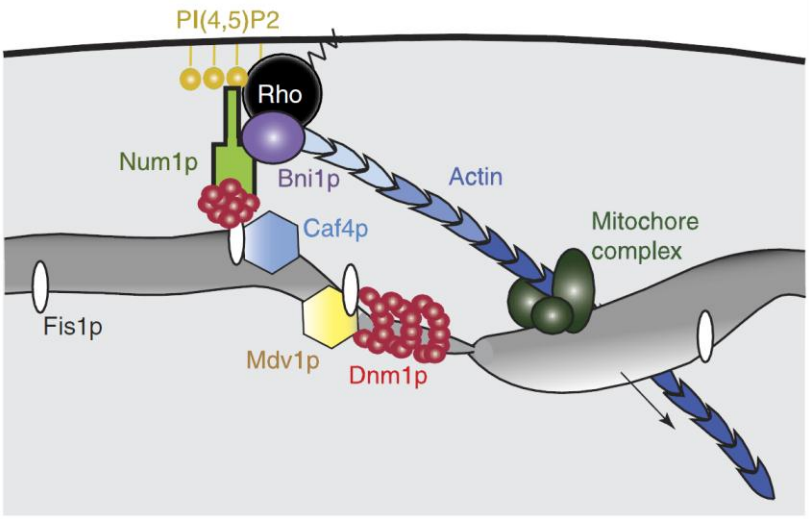

Figure 33 : Modèle du rôle de Num1 dans la ségrégation et la fission mitochondriale.

L'activation des RHO GTPase dans la cellule fille va recruter Bni1 qui va, à son tour, recruter Num1 tout en régulant la formation des câbles d'actines. Num1 attache les mitochondries à la membrane plasmique grâce à son interaction avec le PI(4,5)P_2 et Dnm1/Caf4. Adapté de (Schauss and McBride, 2007).

• *Mdm33*

Mdm33 contient deux segments transmembranaires et est intégrée dans la membrane interne, elle possède des domaines « coiled-coil » situés dans la matrice. Des cellules *Δmdm33* montrent une morphologie mitochondriale en forme de filet qui ressemble à celle

que l'on peut observer chez des mutants de la machinerie de fission. La surexpression de Mdm33 entraine la formation de mitochondries agrégées comme pour des mutants qui induisent une augmentation de la fission. Elle entraine aussi un arrêt de croissance et surtout des structures de la membrane interne aberrantes ainsi qu'une perte des crêtes mitochondriales (Messerschmitt *et al.*, 2003). Le phénotype particulier engendré par la surexpression de Mdm33 et le fait que Mdm33 est retrouvée dans un complexe d'environ 300 kDa (Messerschmitt *et al.*, 2003) soulève la question de l'existence d'une machinerie de fission de la membrane interne et d'une fission en deux étapes de façon inversée à la fusion : fission de la membrane interne puis de la membrane externe. Malheureusement, depuis cette étude aucune publication ne traite du cas de Mdm33.

• *Mdm36*

Des souches *Δmdm36* montrent un phénotype de morphologie mitochondriale en forme de filet similaire à celui des autres mutants de la machinerie de fission. Mdm36 pourrait être impliquée dans l'interaction entre Num1 et Dnm1 car leur colocalisation n'est plus retrouvée en son absence. La localisation sur la surface externe de la mitochondrie de Mdm36 est due à des protéines mitochondriales autres que Num1 ou Dnm1. Cette interaction est faible ou transitoire, pointant vers un rôle régulateur de Mdm36. Des cellules *Δmdm36* montrent que l'attachement au cortex cellulaire des mitochondries est déréglé (Hammermeister *et al.*, 2010). Mdm36/Num1/Caf4 seraient des protéines accessoires de la fission mitochondriale et seraient bien plus impliquées dans l'attachement des mitochondries au cortex cellulaire (Fig. 33, (Hammermeister *et al.*, 2010; Schauss and McBride, 2007)).

• *Le cas MIEF1.*

La protéine MIEF1 est une protéine retrouvée exclusivement chez les vertébrés. Je vais décrire son rôle rapidement car il est assez révélateur de la différence qui existe dans la régulation de la dynamique mitochondriale entre la levure et l'homme. L'expression de cette protéine mène à une morphologie mitochondriale en forme de filet, classiquement observable chez les mutants de fission. C'est une protéine de la membrane externe ancrée par sa partie N-terminale, sa partie C-terminale se trouvant dans le cytoplasme. Cette protéine recrute Drp1 de manière indépendante de hFis1 ou Mff (une protéine partiellement redondante avec hFis1). Seulement au lieu de réguler la fission, MIEF1 régule la fusion des mitochondries en recrutant Drp1, en la séquestrant et en réduisant son affinité pour le GTP. MIEF1 est aussi capable de s'associer à hFis1 indépendamment de Drp1. Enfin, la surexpression de MIEF1 est capable de complémenter les défauts de morphologie de Mfn2 et de promouvoir la fusion par un moyen encore inconnu (Zhao *et al.*, 2011). Jusqu'à présent chez la levure, aucune des protéines

impliquées dans la fission ou la fusion n'a respectivement un rôle dans les voies de fusion et de fission mitochondriale. De plus, aucune des protéines interagissant avec Dnm1 chez la levure ne facilite la fusion en inhibant la disponibilité et l'activité de Dnm1.

vi. Un modèle du processus de fission.

Il existe deux grandes étapes dans le processus de fission : recrutement de Dnm1 au site de fission et séparation des membranes par constriction. L'étape de recrutement de Dnm1 est la moins bien connue. Il existe deux hypothèses pour ce recrutement mais elles possèdent toutes deux leur faiblesses :

- La première hypothèse (Griffin *et al.*, 2005) laisse le soin du recrutement et du choix du futur site de constriction aux protéines Fis1/Mdv1. Dans cette hypothèse, Dnm1 débute son auto assemblage (Naylor *et al.*, 2006) puis la protéine Fis1 qui est positionnée sur le futur site de constriction recrute Dnm1 avec l'aide de Mdv1 en tant qu'adaptateur (Fig. 34). La principale faiblesse de cette hypothèse est que Fis1 se retrouve de façon équivalente sur toute la surface externe de la mitochondrie, ne marquant pas spécifiquement les sites de division.
- La seconde hypothèse (Cerveny and Jensen, 2003) repose plus sur Dnm1 et sa capacité d'auto assemblage. Dans cette hypothèse, Dnm1 s'auto assemble d'abord dans le cytoplasme et va se positionner sur le futur site de constriction (Bleazard *et al.*, 1999; Legesse-Miller *et al.*, 2003; Naylor *et al.*, 2006; Sesaki and Jensen, 1999). Ce positionnement recrute Fis1 au niveau du site de constriction puis Mdv1 s'adjoint pour agir comme adaptateur ou activateur (Fig. 34), la structure se stabilise et la formation subséquente de spirales de Dnm1 mènera à la constriction. Cette hypothèse repose sur des facteurs de recrutement de Fis1 et Mdv1 qui ne sont pas connus.

Après cette étape de recrutement qui reste assez floue, l'étape de constriction se produit. Cette étape repose presque entièrement sur Dnm1 et son activité GTPase. Dans cette étape, Dnm1 a commencé son auto assemblage en spirale autour du site de constriction grâce au recrutement ou à la stabilisation du complexe Fis1/Mdv1/Dnm1 qui s'est effectuée dans la première étape. Une fois les spirales formées, Dnm1 hydrolyse le GTP et le diamètre des spirales formées par Dnm1 diminue ce qui va compresser la mitochondrie et mener à sa séparation (Fig. 34). Une publication récente supporte cette idée car elle a déterminée qu'il fallait 96 monomères de Dnm1 pour former un tour de spirale. Ces 96 monomères sont répartis en deux hélices adjacentes sur tout le pourtour, soit 48 monomères par hélice. En condition de constriction, c'est-à-dire après ajout et hydrolyse du GTP, les hélices vont glisser l'une sur l'autre et il faut 50 monomères pour un tour de spirale soit 25 monomères par hélice, ce qui réduit la

circonférence du tubule d'un peu moins de la moitié mais réduit la lumière du tubule d'un facteur 3,5 (Mears *et al.*, 2011). Un problème de ce modèle concerne la formation des spirales car le diamètre moyen d'une spirale de Dnm1 est de 109 nm chez la levure (Ingerman *et al.*, 2005). Ce diamètre est très inférieur à celui d'un tubule mitochondrial qui est de l'ordre de 200 à 400 nm. Il est donc très probable qu'il existe des forces supplémentaires permettant la formation des spirales de Dnm1 autour des mitochondries et agissant antérieurement à cette formation des spirales de Dnm1.

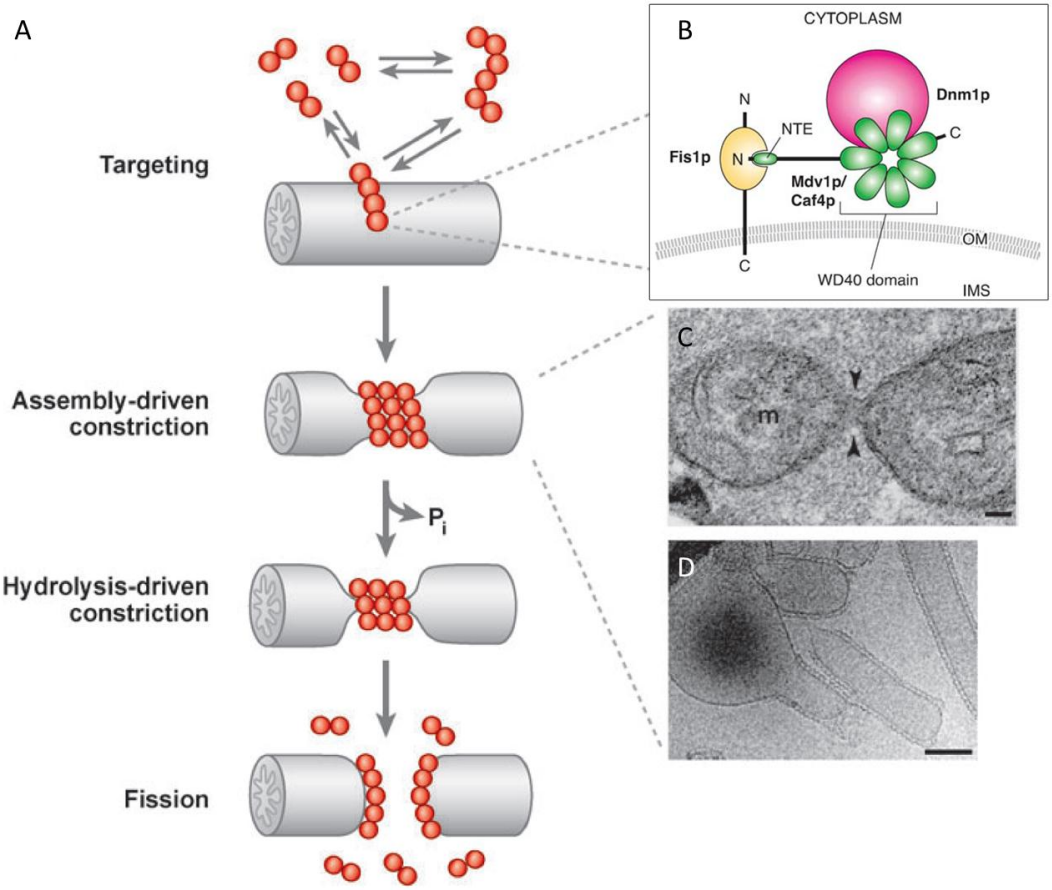

Figure 34 : Modèle du mécanisme moléculaire de fission mitochondriale.

A. Un modèle du mécanisme moléculaire de fission mitochondriale après l'étape de recrutement qui reste la moins connue.
B. Un modèle du complexe formé par Fis1/Mdv1/Dnm1. NTE : extension N-terminale, IMS : espace inter-membranaire. Adapté de (Okamoto and Shaw, 2005).
C. Image de microscopie électronique montrant un intermédiaire de constriction. Les flèches représentent des structures denses aux électrons qui seraient les anneaux de Dnm1. Barre = 100 nm.
D. Image de microscopie électronique montrant que des Dnm1 purifiés sont capables de s'assembler et de diviser des liposomes *in vitro*. Barre = 100 nm. A, C et D adaptés de (Hoppins *et al.*, 2007).

vii. Un nouvel acteur de taille : le réticulum endoplasmique.

Nous venons de voir que si Dnm1 était l'effecteur mécanique de la fission mitochondriale, elle n'en était surement pas l'initiateur. Récemment une publication a peut-être déterminé l'un des acteurs d'une des toutes premières étapes de cette fission et il s'agit du

réticulum endoplasmique (RE) (Friedman *et al.*, 2011). En étudiant par tomographie en 3D les contacts entre le RE et la mitochondrie chez la levure, les auteurs ont observé que le RE entourait parfois la mitochondrie (Fig. 35). Ils ont donc analysé le diamètre des tubules mitochondriaux au contact du RE et se sont aperçus que le diamètre des tubules mitochondriaux était fortement réduit (Fig. 35). Les auteurs ont donc résolu dans le temps les contacts entre le RE et les mitochondries et ont montré que ces contacts précédaient dans une grande majorité des cas les fissions mitochondriales (Fig. 35) et le recrutement de Drp1/Dnm1 (ainsi que le recrutement de Mff chez l'homme). Cette étude a montré que ce phénomène était conservé entre la levure et l'homme et assigne un rôle prépondérant au RE dans le marquage des sites de la fission mitochondriale. Avec cette étude, nous pouvons donc placer une étape de plus dans le modèle de division : le contact puis l'enroulement du RE autour du futur site de division, ce qui est peut-être le signal de recrutement de Fis1/Dnm1 qu'il manquait aux deux hypothèses pour les modèles de recrutement de Dnm1 à la mitochondrie. C'est en tout cas très probablement la force nécessaire qu'il manquait pour faire correspondre le diamètre d'un microtubule mitochondrial à celui d'une spirale de Dnm1.

d. La tubulation mitochondriale.

Dans l'idée d'analyser le rôle des jonctions entre RE et mitochondries, une équipe a construit une protéine chimérique (appelée ChiMERA) qui permet de relier artificiellement le RE aux mitochondries et dont l'expression peut se faire à l'aide d'un plasmide. L'idée de cette équipe est que si les jonctions entre RE et mitochondries sont importantes, après mutation de gènes impliqués dans ces jonctions, une souche de levure transformée avec le plasmide permettant l'expression de la ChiMERA ne pourra plus survivre sans le plasmide. Ils ont donc effectué une recherche de telles souches après une mutagénèse et ont retrouvé deux souches ne pouvant plus survivre sans ce plasmide. Ces deux souches avaient des mutations dans le gène *MDM12* (Kornmann *et al.*, 2009).

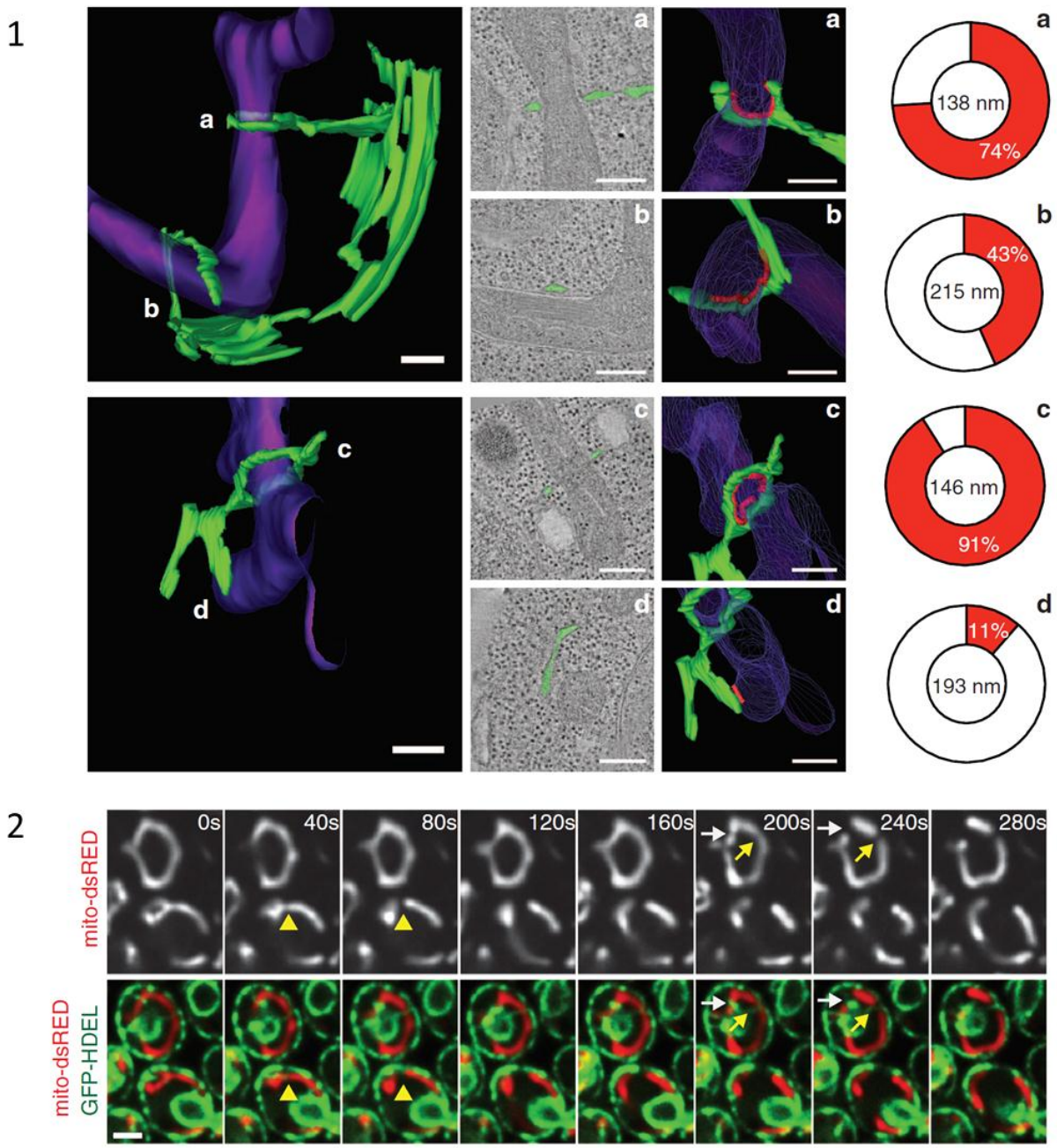

Figure 35 : Les sites de contact mitochondries-RE marquent les sites de fission mitochondriaux.

1. Les images de gauche sont des modèles 3D du RE (vert) et de la mitochondrie (violet) aux sites de contacts. Les images du milieu sont des images de tomographie en 2D des sites de contacts notés de a à d sur les images de gauche. En vert est dessiné le RE. Les images de droite correspondent aux modèles en 3D avec les sites de contacts RE-mitochondrie marqués en rouge. Les schémas de droite montrent le diamètre des tubules mitochondriaux et le pourcentage de surface de contact pour un tubule. Barre = 200 nm.

2. Images de « time-lapse » de cellules de levure exprimant du DsRed avec un ciblage mitochondrial (mito-DsRed) et de la GFP avec un ciblage RE (GFP-HDEL). Un seul plan focal est montré, les flèches blanches et jaunes montrent des sites de division Barre : 2 µm. Adapté de (Friedman *et al.*, 2011).

Mdm12 est un des quatre constituants de la machinerie de tubulation mitochondriale composée de Mmm1, Mdm12, Mdm34, Mdm10. La perte de Mmm1, Mdm10, Mdm34 ou Mdm12 cause des défauts dans la morphologie mitochondriale (Fig. 28, page 39),

l'attachement des mitochondries au réseau d'actine, dans l'héritage des mitochondries dans la cellule fille, la mobilité et la stabilité de l'ADN mitochondrial (Okamoto and Shaw, 2005). Mdm12 peut-être isolée dans des complexes contenant les autres protéines de la machinerie de tubulation lors de l'extraction des protéines totales (Boldogh *et al.*, 2003; Youngman *et al.*, 2004), l'équipe de B. Kornmann a donc effectué une délétion des quatre gènes de la machinerie de tubulation et a pu observer que l'expression de la ChiMERA était capable de complémenter plus ou moins bien les défauts de tels mutants. Ainsi, ce qui était connu comme la machinerie de tubulation mitochondriale de la levure s'est révélé être impliqué dans la jonction entre le RE et les mitochondries et cette machinerie a été renommée « **ER**-**M**itochondria **E**ncounter **S**tructure » (ERMES) (Kornmann *et al.*, 2009). Les rôles attribués au complexe ERMES sont bien plus larges : en plus du maintien de la forme tubulaire des mitochondries, du rôle probable dans l'import de protéines de la membrane externe et de l'implication dans le maintien et la ségrégation du génome mitochondrial déjà connus pour la machinerie de tubulation, le complexe ERMES pourrait être impliqué dans les échanges de lipides et l'homéostasie du calcium. Cela est dû au fait que la machinerie de tubulation fut initialement localisée comme uniquement mitochondriale alors qu'une de ses sous-unités (Mmm1) est en fait située dans le RE ; passant cette machinerie d'une localisation purement mitochondriale à une double localisation RE-mitochondries pouvant servir de plate-forme d'échange (Fig. 36, page 57 ; (Kornmann and Walter, 2010)).

Les quatre composants du complexe ERMES/machinerie de tubulation que sont Mmm1, Mdm12, Mdm34 et Mdm10 sont uniquement retrouvés chez les champignons. Le cinquième composant du complexe ERMES, Gem1, a été trouvé plus tardivement et possède un homologue chez l'homme (Kornmann *et al.*, 2011; Stroud *et al.*, 2011). Dans ce qui suit, je vais décrire les 5 protéines du complexe ERMES puis je décrirai les protéines ayant un rôle dans la tubulation sans faire partie du complexe ERMES.

i. Les protéines du complexe ERMES.

• *Mmm1*

Mmm1 a d'abord été localisée comme étant mitochondriale avec un segment transmembranaire lui permettant de traverser les deux membranes de la mitochondrie (Kondo-Okamoto *et al.*, 2003; Meeusen and Nunnari, 2003). Mmm1 est importante pour le maintien du génome mitochondrial et colocalise avec Mgm101 qui est une protéine de liaison à l'ADN importante pour le maintien de l'ADN mitochondrial et Mip1, la polymérase de l'ADN mitochondrial (Hobbs *et al.*, 2001; Meeusen and Nunnari, 2003). Cependant, les conclusions concernant sa localisation sont erronées car des études ultérieures ont démontré que Mmm1

est une protéine de la membrane du RE avec la partie N-terminale N-glycosylée pointant vers la lumière du RE (Kornmann *et al.*, 2009; Stroud *et al.*, 2011). Mmm1 est localisée au RE en l'absence des autres protéines du complexe ERMES. Cette protéine possède un domaine « **S**ynaptotagmin-like, **M**itochondrial and lipid-binding **P**rotein » (SMP), qui pourrait être impliqué dans les liaisons lipides-protéines par analogie avec des protéines humaines d'une autre famille (TULIP (**TU**bular **LIP**pid binding)) liant les lipides et permettant leur échange entre membranes (Kopec *et al.*, 2010; Lee and Hong, 2006).

• *Mdm10*

Mdm10 est une protéine de la membrane externe de la mitochondrie avec une structure en tonneau β (Sogo and Yaffe, 1994). Les protéines en tonneau β sont les protéines majoritaires de la membrane externe mitochondriale. Mdm10 est une protéine qui fait aussi partie du complexe SAM (« **S**orting and **A**ssembly **M**achinery »). Le complexe SAM est responsable de l'assemblage et de la translocation des protéines en tonneau β après leur import dans la mitochondrie par le complexe TOM (pour revue sur les mécanismes d'import : (Bolender *et al.*, 2008)). Mdm10 est donc nécessaire pour l'insertion de protéines en tonneau β (Meisinger *et al.*, 2004; Pfanner *et al.*, 2004). Mdm10 est localisée à la mitochondrie en l'absence des autres protéines du complexe ERMES (Kornmann *et al.*, 2009).

• *Mdm12*

Mdm12 est une protéine cytosolique non membranaire possédant un domaine SMP (Kopec *et al.*, 2010; Lee and Hong, 2006). Sa localisation est directement reliée à ses interactions : en cas de délétion de Mmm1, sa localisation est mitochondriale et en cas de délétion de Mdm10 ou Mdm34, sa localisation est située au niveau du RE (Kornmann *et al.*, 2009). Mdm12, Mmm1 et Mdm10 sont retrouvées proches des nucléoïdes. (Boldogh *et al.*, 2003). Mdm12 et Mmm1 joueraient un rôle dans la voie qui permet l'import des protéines en tonneau β en agissant en aval du complexe SAM (Meisinger *et al.*, 2007).

• *Mdm34*

Mdm34 (ou Mmm2) est une protéine prédite pour être intégrée dans la membrane externe mitochondriale et sa localisation en l'absence des autres protéines est diffuse autour de la mitochondrie (Kornmann *et al.*, 2009). Elle interagit physiquement avec Mmm1 (Stroud *et al.*, 2011). Mdm34 est la cible de Mdm30 pour une ubiquitination en K63, c'est-à-dire vraisemblablement une ubiquitination de « signalisation » dans ce cas car une surexpression ou une déplétion de la protéine Mdm30 ne modifie pas vraiment la quantité de Mdm34 retrouvée au sein des cellules (Ota *et al.*, 2008). Cette protéine possède aussi un domaine SMP (Kopec *et al.*, 2010; Lee and Hong, 2006).

• *Gem1*

Gem1 possède un domaine GTPase en N-terminal, deux sites de fixation pour du Ca^{2+}, un autre site GTPase et un domaine transmembranaire C-terminal. Gem1 partage 30% d'identité et 48% d'acides aminés similaires avec la protéine Miro-1 humaine. Il existe deux protéines Miro chez les mammifères, nommées Miro-1 et Miro-2, qui sont aussi localisées à la mitochondrie de façon ponctuée et qui ont la même topologie que Gem1. Gem1 interagit avec le complexe ERMES et est importante pour la rétention des nucléoïdes (Frederick *et al.*, 2004; Kornmann *et al.*, 2011). Elle n'est pas impliquée dans la formation ou la longévité du complexe ERMES mais serait importante pour la régulation du nombre de complexes par cellule ainsi que pour la taille des complexes ; son interaction serait dynamique et interviendrait après la formation du complexe ERMES constitué des quatre autres protéines du complexe (Kornmann *et al.*, 2011; Nguyen *et al.*, 2012). Avec ses domaines de liaison au Ca^{2+}, Gem1 pourrait servir de senseur entre les mitochondries et le RE pour les échanges de calcium.

ii. Les autres protéines impliquées dans la tubulation.

• *Mdm31 et Mdm32*

Ces deux protéines sont des protéines de la membrane interne de la mitochondrie qui sont conservées uniquement chez les champignons comme les protéines du complexe ERMES, mise à part Gem1. L'absence de ces protéines entraine une désorganisation des nucléoïdes et empêche la localisation de Mmm1 à proximité des nucléoïdes. Il a été proposé que leur action sur la tubulation mitochondriale se fasse en amont des rôles de Fzo1/Dnm1/Mdm33 (Fig. 37, page 61 ; (Dimmer *et al.*, 2005)). Ces deux protéines ont une structure similaire avec deux segments transmembranaire à chaque extrémité et une exposition de la majeure partie de la protéine dans le domaine intermembranaire mitochondrial. Ces protéines ont un rôle dans le maintien de la morphologie mitochondriale, le maintien de l'ADN mitochondrial et probablement un rôle dans le métabolisme des phospholipides (Dimmer *et al.*, 2005; Tamura *et al.*, 2012).

La surexpression de Mdm31, mais pas de Mdm32, peut supprimer partiellement les défauts de morphologie engendrés par la délétion des sous-unités du complexe ERMES (Tamura *et al.*, 2012). Cette surexpression est aussi capable de supprimer les défauts d'une souche *Δups1*, un gène impliqué dans le métabolisme des phospholipides. Par contre, une surexpression d'Ups1 ne permet pas de supprimer des défauts d'une souche Δ*mdm31*. Les protéines Ups1 et Mdm31 ne contrôlent pas la formation du complexe ERMES (Tamura *et al.*, 2012).

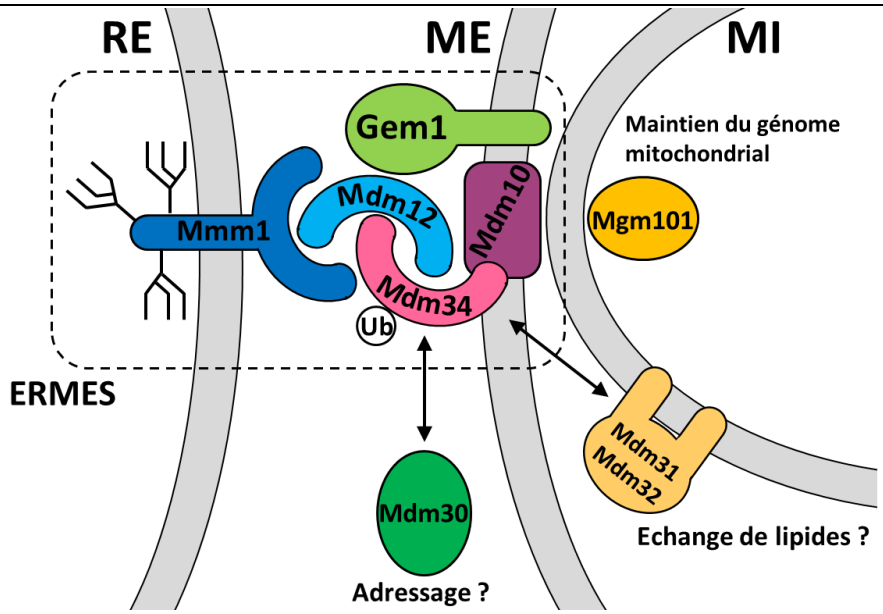

Figure 36 : Le complexe ERMES.

Schéma du complexe ERMES avec les divers rôles dans lesquels il pourrait être impliqué en interaction avec les protéines indiquées. La protéine Mdm30 pourrait être impliquée dans l'adressage de Mdm34 au complexe ERMES. RE : réticulum endoplasmique, ME : membrane externe, MI : membrane interne.

Il existerait plusieurs types de complexes ERMES, certains étant assez peu stables quand d'autres sont très stables et certains étant immobiles quand d'autres sont mobiles (Nguyen *et al.*, 2012). Les protéines Mdm31 et Mdm32 sont présentes dans deux complexes distincts non identifiés. Le complexe dans lequel Mdm31 est présent fait 600 kDa et Mmm1 est retrouvé dans un complexe de taille similaire mais différent tandis que le complexe de Mdm32 fait 175 kDa (Dimmer *et al.*, 2005). Le complexe de 600 kDa où Mmm1 est retrouvée est bien plus imposant que celui que fait ERMES, environ 263 kDa si on additionne les masses des cinq protéines. Cela laisse à penser que plusieurs complexes ERMES peuvent interagir entre eux ou bien qu'il existe encore beaucoup de protéines qui font partie de ce complexe et qui sont encore inconnues.

iii. Les rôles du complexe ERMES.

En plus de la tubulation des mitochondries, c'est-à-dire la morphologie réticulée des mitochondries (Fig. 28, page 39, image présentant les mitochondries de type sauvage), les rôles de la machinerie de tubulation sont extrêmement variés.

1. Des expériences ont montré que Mmm1 et Mdm10 relient la mitochondrie au réseau d'actine chez la levure (Boldogh *et al.*, 1998) ; que Mmm1, Mdm12 et Mdm10 forment ce qui est appelé le mitochore (Boldogh *et al.*, 2003) ; et que Mmm2 aide à la formation de ce complexe (Dimmer *et al.*, 2005; Youngman *et al.*, 2004) mais cette fonction est aujourd'hui remise en cause car des souches mutantes pour une sous-unité

du complexe ERMES ont des mitochondries qui peuvent se déplacer le long des câbles d'actine grâce à une surexpression de Ypt11 (Nguyen *et al.*, 2012).

2. Un autre rôle attribué à la machinerie de tubulation concerne le maintien et la réplication du génome mitochondrial. La réplication du génome mitochondrial est découplée du cycle cellulaire et se produit continuellement sur un petit nombre de nucléoïdes (Meeusen and Nunnari, 2003). Un nombre assez restreint de complexes ERMES (≈ machineries de tubulation) est retrouvé dans la cellule mais de façon surprenante ils sont souvent retrouvés à proximité des nucléoïdes et presque exclusivement à côté des nucléoïdes qui sont en phase de réplication de l'ADN (Hobbs *et al.*, 2001; Meeusen and Nunnari, 2003). La question actuelle est de savoir comment fait ERMES pour réguler la maintenance et la réplication de l'ADN mitochondrial. Cela pourrait se faire par l'intermédiaire d'un « super complexe » dont ERMES ferait partie et qui relierait trois membranes ensembles (celle du RE, et les deux de la mitochondrie). Toutefois, un tel complexe n'a jamais été démontré même si des indices semblent montrer son existence comme Mmm1 qui colocalise avec Mgm101, une protéine qui lie l'ADN mitochondrial dans les nucléoïdes (Fig. 36) et le fait que les mutants ERMES perdent assez vite leur génome mitochondrial (Kornmann *et al.*, 2009; Meeusen and Nunnari, 2003).
3. Cette machinerie possède aussi un rôle dans l'héritage des mitochondries de la cellule mère à la cellule fille lors des mitoses. En effet, dans des cellules possédant une mutation dans un des gènes de la machinerie de tubulation, la mitochondrie est présente sous une seule grosse sphère (Fig. 28, page 39) rendant le passage du cou du bourgeon assez difficile.
4. Le dernier rôle attribué à cette machinerie était le maintien de la morphologie tubulaire des mitochondries. Ce rôle est surtout effectué par le maintien de la connexion entre le RE et les mitochondries au moyen du complexe ERMES. Dans un mutant de ce complexe, aucune morphologie d'un organite autre que la mitochondrie n'est affectée. De plus, une expression de la ChiMERA permet de restaurer une morphologie mitochondriale normale pour des mutants de Mdm12 et Mdm34 mais pas Mmm1, Gem1 et Mdm10 (Kornmann *et al.*, 2009; Nguyen *et al.*, 2012). Les protéines Mmm1, Mdm10 et Gem1 semblent donc porter une activité critique pour la morphologie mitochondriale qui ne peut pas être restaurée par l'apposition artificielle des mitochondries et du RE. À l'heure actuelle, ce rôle est inconnu et nous ne savons pas s'il s'agit de trois rôles différents tenus par les trois protéines ou bien s'il s'agit d'un seul rôle qui nécessite la présence de ces trois protéines.

À la suite de la découverte de la possibilité d'utilisation du complexe ERMES comme plate-forme d'échange entre le RE et les mitochondries, de nouveaux rôles pour ce complexe ont été proposés. Le premier des rôles proposés pour le complexe ERMES fut l'échange des phospholipides entre le RE et les mitochondries. Comme les mitochondries ne sont pas reliées par un système de trafic vésiculaire, elles doivent obtenir les lipides dont elles ont besoin par un autre moyen (Daum and Vance, 1997). Le complexe ERMES pourrait donc servir de plate-forme d'échange pour ces lipides. Plusieurs indices laissent à penser qu'un tel rôle existe : depuis longtemps il est connu que les préparations mitochondriales issues de fractionnement cellulaire sont « contaminées » avec de la membrane issue du RE. La composition de ces membranes issues du RE a été analysée et elle est différente de celle du RE ; soulevant l'idée de l'existence de « **M**itochondria-**A**ssociated **M**embrane » (MAM) (Rusinol *et al.*, 1994; Vance, 1990). D'autres indices sont arrivés avec la découverte du complexe ERMES : les mutants ERMES ont des phénotypes assez proches de mutants de Psd1 (une protéine impliquée dans la conversion de la phosphatidylsérine en phosphatidyléthanolamine) ; des interactions génétiques existent entre les protéines ERMES et des protéines impliquées dans les échanges ou la transformation des phospholipides telles que Mdm31, Mdm32, Psd1 et Crd1 (la protéine responsable de la production de la cardiolipine) (Dimmer *et al.*, 2005; Kornmann *et al.*, 2009). Toutefois, ces phénotypes observés chez les mutants ERMES ne semblent pas être dus à des défauts dans les ratios de phospholipides au sein des organites (Nguyen *et al.*, 2012). Malgré cela, ce rôle est supporté par le fait que Mmm1, Mdm12 et Mdm34 portent un domaine SMP (Kopec *et al.*, 2010; Lee and Hong, 2006).

Un autre rôle proposé pour le complexe ERMES est celui de l'homéostasie du calcium. Le calcium est récupéré par la mitochondrie après avoir été relâché par le RE (Rizzuto *et al.*, 1993). Ainsi la mitochondrie jouerait un rôle tampon pour éviter un excès de calcium dans le cytoplasme. Toutefois, une trop grande exposition de la mitochondrie au calcium induit un relâchement du cytochrome c et provoque l'apoptose chez les métazoaires (Figure 21, page 30). Les transporteurs de calcium de la mitochondrie (ainsi que Gem1) ont une faible affinité pour le calcium. Le rapprochement du RE et des mitochondries permettrait donc de pouvoir relâcher localement suffisamment de calcium pour activer les transporteurs sans affecter la cellule.

Le dernier rôle proposé pour le complexe ERMES est celui de régulateur d'import des protéines mitochondriales. Mdm10 fait partie du complexe SAM, qui est physiquement séparable du complexe ERMES (Meisinger *et al.*, 2004). Cette association de Mdm10 aux complexes SAM et ERMES pourrait révéler un rôle régulateur de Mdm10 dans l'import des

protéines de la membrane externe en fonction des signaux en provenance du RE reçus par le complexe ERMES. Le fait que Mdm12 et Mmm1 joueraient aussi un rôle dans l'import des protéines en tonneau β en aval du complexe SAM renforce cette idée (Meisinger *et al.*, 2007).

Enfin, le complexe ERMES pourrait être un régulateur supplémentaire des évènements de fusion en affectant l'efficacité de clivage de Mgm1 ; des souches *Δups1* ou *Δpsd1*, deux protéines impliquées dans le clivage de Mgm1, présentant des phénotypes équivalents à des souches *ΔERMES*, (Osman *et al.*, 2009a). Cette idée est supportée par une étude qui a montré que les fusions mitochondriales entrainaient une réplication de l'ADN mitochondrial or des souches avec des mutations dans les protéines du complexe ERMES ou de la machinerie de fusion qui les rendent inefficaces montrent une perte de l'ADN mitochondrial (Hori *et al.*, 2011). Le complexe ERMES pourrait donc jouer un rôle de régulation en amont de la fusion mitochondriale, expliquant la perte de l'ADN mitochondrial dans des souches délétées pour des gènes du complexe ERMES. Ces deux complexes étant régulés par le système ubiquitine-protéasome au moyen d'une ubiquitination contrôlée par Mdm30. Dans cette optique, une équipe a proposé un cycle de relations épistatiques des gènes impliquant les principaux effecteurs des trois machineries en accord avec ces observations (Fig. 37, (Messerschmitt *et al.*, 2003)).

iv. Les structures mitochondries-RE chez l'homme.

Mise à part Gem1, il n'existe pas d'homologue au complexe ERMES chez l'homme. Cependant la connexion RE-mitochondries existe et peut se faire par l'intermédiaire de Mfn2. Une protéine Mfn2 située au RE relie le RE et les mitochondries par son homo-oligomérisation avec une autre protéine Mfn2 ou Mfn1 située dans la mitochondrie. Mfn2 est impliquée dans le mouvement mitochondrial dans les axones par son interaction avec Miro (dont l'équivalent levure est Gem1) en formant un complexe ayant probablement les mêmes fonctions que le complexe ERMES (Kornmann *et al.*, 2011; Misko *et al.*, 2010). Le principal rôle du complexe formé par Mfn2 semble assez différent de celui du complexe ERMES puisque Mfn2 est impliquée dans la morphologie tubulaire du RE mais pas de la mitochondrie (de Brito and Scorrano, 2008). Par contre, l'activation de Miro par sa liaison aux ions calcium à des concentrations de calcium bien supérieures à ce qui existe dans les cellules (Wang and Schwarz, 2009) laisse à penser que la plate-forme ainsi formée par le complexe Mfn2 pourrait aussi avoir des rôles assez similaires à ceux de la levure.

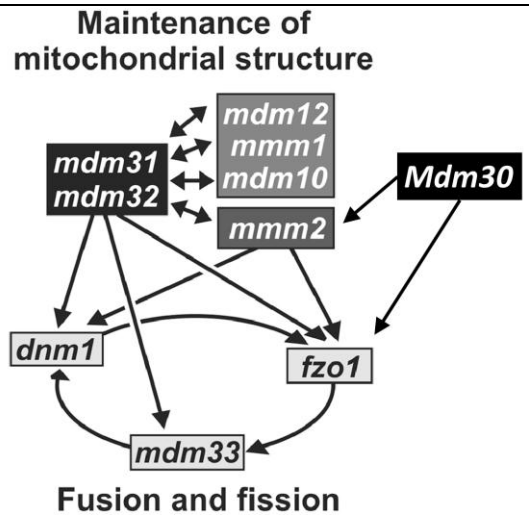

Figure 37 : Relations entre les composants impliqués dans la dynamique mitochondriale.

Ce schéma montre les relations épistatiques des différents gènes impliqués dans la régulation de la dynamique mitochondriale. Seul Mdm30 indique la relation qui existe entre cette protéine et les protéines produites par les gènes indiqués. Les épistasies sont montrées par les flèches. Les doubles flèches indiquent un comportement synthétique létal. Les mutations ne produisant pas d'effet synthétique sont dans le même encadré. Adapté de (Dimmer *et al.*, 2005).

e. La régulation des machineries de fusion et de fission.

Les composants des machineries de fusion et de fission sont très étudiés et sont donc assez bien connus. L'utilisation de multiples mutants a permis d'étudier la fonction de ces composants et des régulateurs qui interviennent. Toutefois, même si les régulateurs et les composants sont connus, la régulation de la dynamique mitochondriale est très peu connue.

Pour la fusion mitochondriale, les mitofusines (dont Fzo1 fait partie) jouent un rôle majeur et sont les principales cibles des protéines régulatrices. Cette régulation s'effectue au niveau de l'assemblage des machineries ou de la dégradation de leurs composants. Par exemple, les protéines Bax et Bak appartenant à la famille pro-apoptotique de Bcl-2 régulent l'assemblage de Mfn2. Chez les mammifères, des protéines sont chargées de l'ubiquitination de Mfn1/2 lors du cycle cellulaire normal (MITOL) ou en cas d'induction de la mitophagie (Parkin). L'ubiquitination joue aussi un rôle chez la levure : Mdm30 régule la demi-vie de Fzo1 en assurant son ubiquitination. Enfin, plusieurs protéines sont impliquées dans la maturation de Mgm1/OPA1.

Concernant la fission mitochondriale, la régulation est mieux connue chez les mammifères que chez les levures où aucun régulateur n'est encore connu. Cette régulation se fait principalement en agissant sur l'effecteur final Dnm1/Drp1. Chez les mammifères, la protéine hFis1 est ubiquitinée par l'action de MITOL et les protéines MITOL et Parkin sont responsables de l'ubiquitination de Drp1. Drp1 est aussi régulée au moyen de

phosphorylations ou de SUMOylations. Pour des revues plus complètes sur la régulation des machineries de fusion et de fission : (Palmer *et al.*, 2011) et (Zhao *et al.*, 2012). Les tables dans les deux pages qui suivent donnent une liste des acteurs des machineries de fusion et de fission ainsi que de leurs régulateurs connus à ce jour chez l'homme et la levure.

Proteins	Yeast	Mammals	Subcellular localization	Known or possible functions in mitochondrial dynamics
Key players	Dnm1p	Drp1	Cytosol and MOM-associated	Dynamin-related GTPase for fission of the outer mitochondrial membrane
	Fis1p	Fis1	MOM-anchored	Receptor for recruitment of Dnm1p/Drp1 to mitochondria, promoting fission
	Mdv1p	–	Cytosol and MOM-associated	Adaptor binding to Fis1p for recruitment of Dnm1p to mitochondria
	Caf4p	–	Cytosol and MOM-associated	Adaptor binding to Fis1p for recruitment of Dnm1p to mitochondria
	–	Mff	MOM-anchored	Receptor for recruiting Drp1 to mitochondria, promoting fission
	-	MIEF1(MiD51)/ MiD49	MOM-anchored	Receptor for recruiting Drp1 to mitochondria, inhibiting Drp1 function
Regulators	Num1p	–	Cell cortex and MOM-associated	A role in the recruitment or stability of Dnm1p on mitochondria
	Mdm36p	–	MOM-associated	Recruiting Dnm1p to mitochondria
	Mdm33p	–	MIM-anchored	Inner membrane fission
	–	Endophilin B1	Cytosol and MOM-associated	Outer membrane fission
	–	GDAP1	MOM-anchored	Outer membrane fission
	–	MTP18	MIM-associated	Inner membrane fission
	MGR2?	MTGM	MIM-anchored	Inner membrane fission
Post-translational modifications	–	MARCH-V/ MITOL /MARCH5	MOM-anchored	E3 ubiquitin ligase for Drp1 and hFis1
	–	Parkin	Cytosol and MOM-associated	E3 ubiquitin ligase for Drp1, regulating mitochondrial dynamics
	–	PINK1	Cytosol and MOM-anchored	A mitochondrial kinase, recruiting Parkin to mitochondria
	–	Cyclin B/CDK1	Cytosol and MOM-associated	Mitotic phosphorylation of Drp1
	–	CaMKIα	Cytosol	$Ca2^{+}$-dependent phosphorylation of Drp1
	–	Calcineurin (PP2B)	Cytosol and MOM-associated	$Ca2^{+}$-dependent dephosphorylation of Drp1
	–	PKA	Cytosol and MOM-associated	cAMP-dependent phosphorylation of Drp1
	–	SENP5	Nucleus and Cytosol	SUMO protease for deSUMOylation of Drp1
	–	MAPL	MOM-anchored	SUMO ligase for SUMOylation of Drp1
	–	SUMO1	Nucleus, Cytosol and MOM-associated	SUMOylation of Drp1
	–	UBC9	Cytosol	SUMO-conjugating enzyme 9 for SUMOylation of Drp1

Table 2 : Protéines impliquées dans la fission mitochondriale.

Acteurs de la fission mitochondriale chez la levure et les mammifères. MOM : membrane mitochondriale externe, MIM : membrane mitochondriale interne, ? : rôle mal défini dans la dynamique mitochondriale, - : pas d'homologue identifié. Adapté de (Zhao *et al.*, 2012).

Proteins	Yeast	Mammals	Subcellular localization	Known or possible functions in mitochondrial dynamics
Key players	Fzo1p	Mfn1/2	MOM-anchored	Dynamin-related GTPase for tethering and fusion of outer mitochondrial membrane
	Mgm1p	OPA1	MIM-anchored, IMS	Dynamin-related GTPase required for fusion of the inner mitochondrial membrane
	Ugo1p	–	MOM-anchored	Interaction with Fzo1p and Mgm1p to link the inner and outer membrane for fusion
	–	MIEF1	MOM-anchored	Promoting mitochondrial fusion in a Mfn2-independent manner
Regulators	–	MICS1/ GHITM	MIM-anchored	Required for the mitochondrial tubular network and cristae organization
	–	MIB/VAT1	Cytosol and MOM-associated	Interacting with Mfn1/2 and negatively regulating Mfn1-dependent fusion
	–	Stoml2/ SLP2	IMS/MIM-associated	Mfn2-binding protein required for stress-induced mitochondrial hyperfusion
	–	BAX and BAK	Cytoplasm and MOM-associated	Activating assembly of Mfn2 complexes
	–	mitoPLD	MOM-anchored	Regulating mitochondrial fusion
	Mdm38p	LETM1	MIM-anchored	Required for the mitochondrial tubular network and cristae organization
Post-translational modifications	Pcp1p/ Rbd1p	PARL	IMS, MIM-anchored	Processing of Mgm1p/OPA1
	Ups1p	PRELI	IMS, MIM-associated	Processing of Mgm1p/OPA1
	Yme1p?	Yme1L	IMS	Processing of OPA1
	Oma1p?	OMA1/ MPRP1	MIM-anchored	Metalloprotease, OMA1 involved in processing of OPA1
	Phb2p?	PHB2	MIM-anchored or MIM-associated	Required for controlling the stability and proper processing of OPA1
	–	Paraplegin	MIM-anchored	Processing of OPA1
	–	AFG3L1	MIM-anchored?	Processing of OPA1
	–	AFG3L2	MIM-anchored?	Processing of OPA1
	Mdm30p	–	Cytosol and MOM-associated	Ubiquitin ligase for ubiquitination of Fzo1p
	–	MARCH-V/ MITOL /MARCH5	MOM-anchored	Ubiquitin ligase for ubiquitination of Mfn1
	–	Parkin	Cytosol and MOM-associated	Ubiquitin ligase for ubiquitination of Mfn1/2 upon induction of mitophagy
	Ubp16p?	USP30	MOM-anchored	Deubiquitinating enzyme, USP30 involved in maintaining mitochondrial morphology

Table 3 : Protéines impliquées dans la fusion mitochondriale.

Acteurs de la fusion mitochondriale chez la levure et les mammifères. MOM : Membrane mitochondriale externe, MIM : membrane mitochondriale interne, IMS : espace intermembranaire, ? : rôle mal défini dans la dynamique mitochondriale, - : pas d'homologue identifié. Adapté de (Zhao *et al.*, 2012).

La régulation de la dynamique mitochondriale est un peu plus documentée chez l'homme que chez la levure et implique de nombreuses protéines qui n'ont pas d'équivalent connus à ce jour chez la levure. Mis à part les protéines effectrices des différentes machineries et les protéines qui les régulent directement par des modifications post-traductionnelles, aucun des signaux à l'origine des évènements de fusion et de fission au cours d'un cycle cellulaire

normal n'est connu. Pourtant, ce sujet est important car des problèmes de dynamiques sont à l'origine de pathologies humaines.

f. La dynamique mitochondriale et les maladies mitochondriales humaines.

La première maladie à avoir mis en évidence un lien entre dynamique mitochondriale et pathologie humaine fut l'atrophie optique dominante (ADOA) ou maladie de Kjer dont la prévalence estimée est d'environ 1/50 000 dans la population mondiale (Delettre *et al.*, 2000). Cette maladie résulte de mutations du gène *OPA1* qui vont mener à une dégénérescence des cellules rétiniennes ganglionnaires dont les axones constituent les nerfs optiques, causant une perte bilatérale de la vision.

Une autre maladie qui implique directement la dynamique mitochondriale est la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A (CMT2A) associée à des mutations dans le gène MFN2 (Zuchner *et al.*, 2004). Cette maladie entraine une dégénérescence axonale produisant *in fine* une atrophie musculaire et une perte sensorielle. *GDAP1* est un autre gène dont la mutation peut provoquer la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 4A ou 2K (Zuchner *et al.*, 2005). L'expression de GDAP1, qui n'a pas d'homologue chez la levure, est capable de complémenter les défauts d'une souche de levure *Δfis1* (Estela *et al.*, 2011).

Ces deux maladies impliquent des problèmes de fusion mitochondriale. Même s'il n'existe presque pas de cas où la fission est impliquée, un cas impliquant une mutation dans DRP1 a été reporté où le malade présentait des défauts proches de la maladie de Charcot-Marie-Tooth mais avec un développement clinique bien plus rapide et plus grave aboutissant à un décès rapide (Waterham *et al.*, 2007).

Ces maladies génétiques qui impliquent clairement des défauts dans la dynamique mitochondriale ne sont pas les seules. La maladie de Parkinson est connue pour montrer des défauts dans la dynamique mitochondriale et beaucoup d'indices semblent indiquer qu'il s'agit de la cause primaire de la maladie. Des défauts dans la dynamique mitochondriale ont aussi été mis en évidence dans la maladie d'Alzheimer et de Huntington. Ainsi, les maladies mitochondriales ne se limitent plus à des défauts de la chaine respiratoire (pour revue : (Schapira, 2012)).

III. Les peroxysomes.

A. Structure et fonction.

Les peroxysomes sont des organites à une seule membrane, retrouvés dans presque toutes les cellules eucaryotes. Ils jouent un rôle dans diverses voies anaboliques comme la synthèse des phospholipides, du cholestérol ou d'acides gras polyinsaturés mais ont aussi des rôles dans des voies métaboliques telles que le métabolisme du peroxyde d'hydrogène ou les α- et β-oxydations de certains acides gras (Schrader and Fahimi, 2006). Ils sont capables d'effectuer des rôles très variés et parfois spécifiques dans les divers organismes ; la β-oxydation des acides gras et le métabolisme du peroxyde d'hydrogène (H_2O_2) étant les deux fonctions les plus conservées.

Le fonctionnement des peroxysomes est relié métaboliquement à d'autres organites tels que le RE, les mitochondries ou les chloroplastes chez les plantes. Ceci implique donc un échange de molécules entre les divers organites ainsi qu'une coopération pour certaines voies métaboliques. Mitochondries et peroxysomes sont ainsi capables d'effectuer leur propre β-oxydation mais coopèrent dans la dégradation des acides gras pour maintenir une homéostasie des lipides (Fig. 38, (Wanders, 2004)). Chez les levures, la β-oxydation des acides gras à chaines moyenne (C8 à C12), longue (C14 à C18) et très longue (> C20) se fait exclusivement dans les peroxysomes (Kunau *et al.*, 1995).

Le contenu des peroxysomes (il existe une cinquantaine d'enzymes peroxysomales chez les mammifères), leur taille (jusqu'à 1 µm de diamètre) et leur nombre (une dizaine maximum chez la levure sous certaines conditions et jusqu'à une centaine chez l'homme) peut grandement varier pour s'adapter à la demande cellulaire. Leur densité est plus importante que celle des mitochondries (respectivement 1,25 g/cm^3 pour 1,18 g/cm^3) (Subramani, 1993). Les membranes des peroxysomes proviennent du RE et les peroxysomes ne possèdent pas de matériel génétique propre au contraire des mitochondries. La majorité de leurs protéines sont importées dans l'organite de façon post-traductionnelle (Fagarasanu *et al.*, 2007). Le ciblage des protéines est effectué par deux signaux, PTS1 et PTS2, reconnus par des protéines cytosoliques. PTS1 est un tripeptide positionné en C-terminal des protéines tandis que PTS2 est situé en N-terminal.

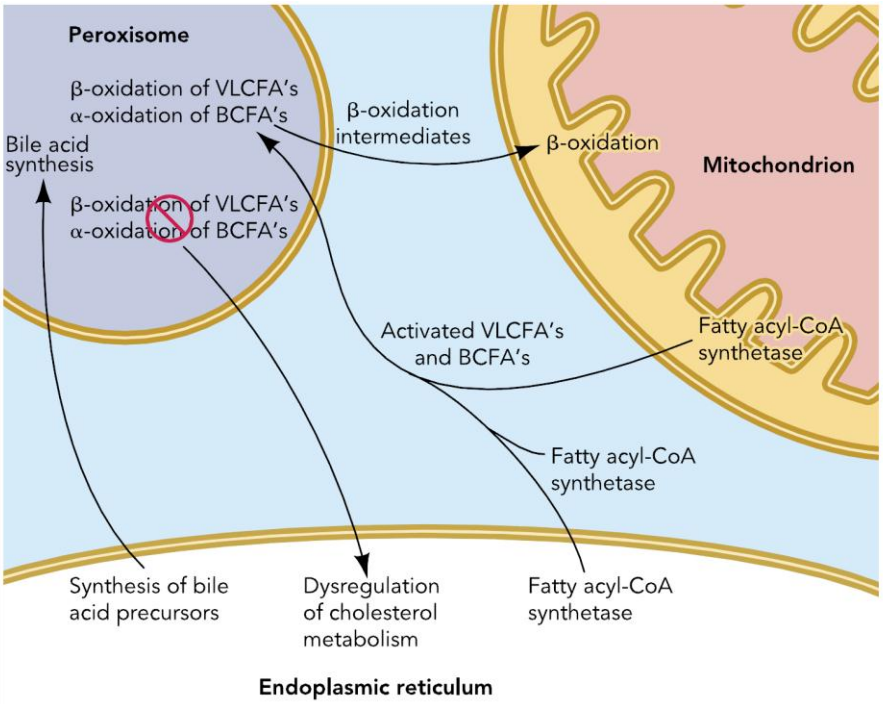

Figure 38 : Interdépendance des organites dans le métabolisme lipidique.

VLCFA : acides gras à très longue chaine, BCFA : acides gras à chaine branchée. (Mast *et al.*, 2010).

Étant donné la diversité des fonctions des peroxysomes, ces organites sont devenus indispensables dans certaines conditions de croissance. Des levures avec des mutations affectant les peroxysomes ne pourront pas croitre sur les milieux qui demandent une forte activité peroxysomale comme un milieu contenant de l'oléate pour source de carbone. Chez l'homme, des maladies sont associées aux peroxysomes. Il en existe deux types, celles qui ont pour origine une enzyme peroxysomale déficiente et celles dont la biogénèse des peroxysomes est affectée. Les maladies affectant la biogénèse sont classées en deux catégories basées sur les développements cliniques de ces maladies :

- Le syndrome cérébro-hépatorénal qui regroupe trois manifestations cliniques plus ou moins graves que sont le syndrome de Zellweger, la maladie de Refsum et l'adrénoleucodystrophie néonatale.
- La chondrodysplasie rhizomélique ponctuée de type 1, indiscernable des types 2 et 3 qui sont issues d'un problème enzymatique affectant l'activité peroxysomale.

Les manifestations les plus sévères entrainent une létalité dans la première année de vie (pour une revue plus complète des maladies liées à un défaut de la biogénèse : (Waterham and Ebberink, 2012)).

B. Biogénèse des peroxysomes.

La biogénèse des peroxysomes dépend d'un peu plus d'une trentaine de gènes appelés *PEX*. La plupart de ces gènes sont impliqués dans l'import des protéines de la matrice peroxysomale (Heiland and Erdmann, 2005). Deux de ces gènes, *PEX3* et *PEX19*, sont essentiels pour la biogénèse des peroxysomes et sont impliqués dans l'insertion des protéines membranaires peroxysomales. Ils servent dans la formation de la membrane peroxysomale depuis le RE tandis que les autres gènes régulent la taille et le nombre de peroxysomes. *PEX14* est un gène qui sert au même moment que *PEX19* avec la même fonction, à ceci près que Pex14 sert à l'import des protéines pour la matrice des peroxysomes et non la membrane. *PEX16* est un gène qui intervient en même temps que ces trois gènes mais il n'existe pas chez les levures, à l'exception de *Yarrowia lipolytica* où son rôle serait différent car il régulerait la prolifération des peroxysomes et non la formation de la membrane (Kiel *et al.*, 2006). Différents signaux peuvent être à l'origine d'une prolifération peroxysomale. Chez *S. cerevisiae*, le principal moyen d'induire la prolifération des peroxysomes est de faire croitre les cellules sur un milieu contenant des acides gras pour source de carbone (Veenhuis *et al.*, 1987). Pour d'autres organismes, cette induction peut passer par le méthanol ou des composés qui vont induire la production de ROS. Les peroxysomes sont incapables de fusionner mais ils peuvent se diviser. Le nombre de peroxysomes dans la cellule résulte donc d'un équilibre entre la création de nouveaux peroxysomes à partir du RE, la division des peroxysomes et la destruction des peroxysomes. Comme pour la mitochondrie, la façon dont est contrôlé le nombre de peroxysomes est encore largement inconnue.

1. La formation *de novo*.

Pendant longtemps, l'idée que les peroxysomes étaient autonomes et se répliquaient uniquement par fission fut admise. Puis des équipes ont montré que des cellules *Δpex3* qui sont sans peroxysome peuvent en former *de novo* et récupérer des peroxysomes fonctionnels. D'autres équipes ont alors montré que ces peroxysomes provenaient du RE (Kragt *et al.*, 2005; Tam *et al.*, 2005). Pour cela, la protéine Pex3 se regroupe sur le RE périnucléaire ou cortical, forme une invagination puis Pex19 vient s'ajouter. Ce pré-compartiment est relâché dans le cytoplasme et est appelé pré-peroxysome. Dès que la machine d'import matricielle des peroxysomes est formée et fonctionnelle, les protéines peroxysomales sont importées puis le pré-peroxysome grandit, devient mature et pourra commencer des cycles d'élongation/fission (Fig. 39). Les peroxysomes, peuvent être formés à partir de n'importe quelle membrane (y compris mitochondriale), seule la localisation de Pex3 au moment où il initie la formation du pré-peroxysome importe (Rucktaschel *et al.*, 2010).

2. La formation par fission.

Il existe une autre voie de formation des peroxysomes : la fission des peroxysomes préexistants de façon symétrique ou non (Fig. 39). C'est un processus qui se déroule en 3 étapes (Thoms and Erdmann, 2005) :

i. Insertion de Pex11 dans la membrane et élongation du peroxysome.
ii. Ségrégation de Pex11 sur les sites de divisions.
iii. Constriction et division du peroxysome.

Une surexpression de Pex11 entraine une augmentation du nombre de peroxysomes tandis que sa délétion entraine une diminution du nombre de peroxysome ainsi qu'une augmentation de leur taille ; Pex25 et Pex27 sont deux protéines avec des fonctions partiellement redondantes à celle de Pex11 (Rottensteiner *et al.*, 2003). Le rôle de Pex11 est crucial pour les deux premières étapes, probablement car elle est capable de former des tubules avec des membranes de composition identique à celle des peroxysomes (Opalinski *et al.*, 2011), la dernière étape étant intégralement assurée par la machinerie de fission.

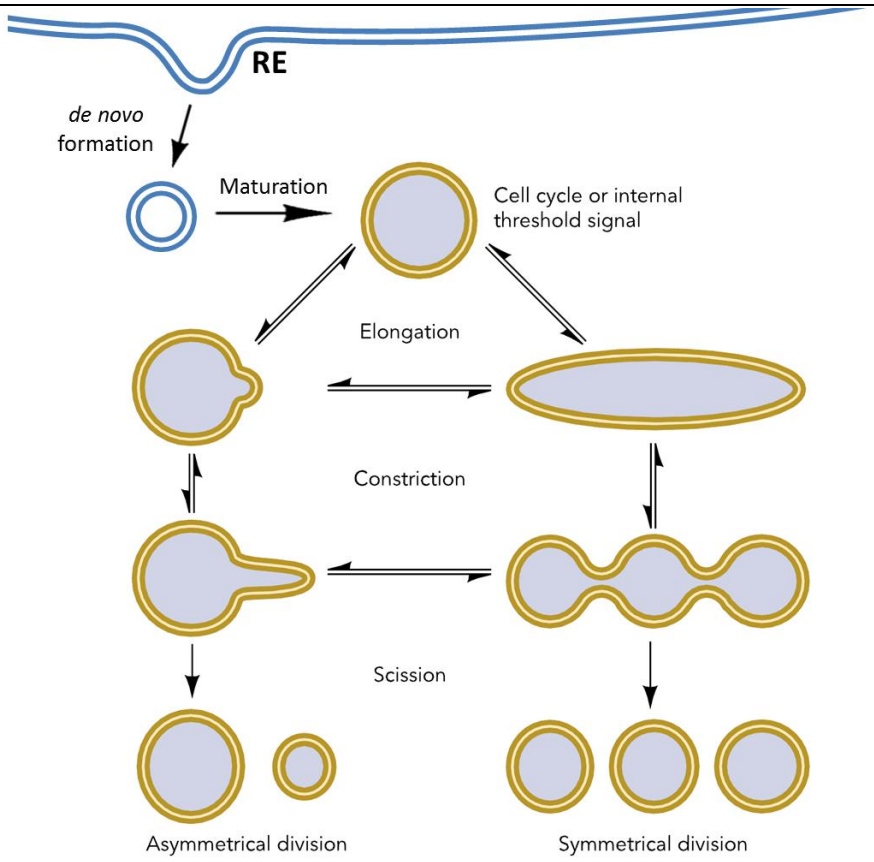

Figure 39 : La formation des peroxysomes.

En cas d'absence de peroxysome dans la cellule, ils peuvent être formés à partir de la membrane du RE par la formation *de novo*. Ils vont ensuite devenir matures puis ils pourront se diviser lors du cycle cellulaire de façon autonome et symétrique ou asymétrique. Adapté de (Mast *et al.*, 2010).

Chez la levure, il existe deux machineries de fission partiellement redondantes pour les peroxysomes et impliquent toutes deux des protéines de la famille des DRP comme effecteur final. La première machinerie nécessite la dynamine Vps1 comme effecteur final qui fait partie de la même famille de protéines GTPase que Mgm1 (Vater *et al.*, 1992). Vps1 est impliquée dans le processus de division des peroxysomes en condition physiologique comme le glucose ou d'induction comme l'oléate (Hoepfner *et al.*, 2001). La seconde machinerie nécessite Dnm1 comme effecteur final et ne fonctionne qu'en condition d'induction (Kuravi *et al.*, 2006). Cette seconde machinerie est en fait toute la machinerie de fission mitochondriale (Fig.34B, page 51) qui est partiellement délocalisée des mitochondries aux peroxysomes en cas d'induction peroxysomale (Kuravi *et al.*, 2006).

IV. Le système ubiquitine-protéasome et la biogénèse des organites.

A. Le système ubiquitine-protéasome et les peroxysomes.

L'import des protéines de la matrice peroxysomale nécessite leur reconnaissance dans le cytosol par deux protéines réceptrices : Pex5 et Pex7. Pex7 est un récepteur qui se lie au signal PTS2 tandis que Pex5 se lie au signal PTS1. La façon dont se lie Pex7 au signal PTS2 se ferait grâce aux structures tridimensionnelle de ces protéines, PTS2 présentant une structure en hélice et le domaine récepteur de Pex7 semble complémentaire permettant une liaison (Kunze *et al.*, 2011). Pex5 se lierait au signal PTS1 en formant une poche adaptée (Gatto *et al.*, 2000). Pex18 et Pex21 sont des corécepteurs de Pex7 pour l'import des protéines matricielles avec un signal PTS2. Une fois la liaison et l'import de la protéine matricielle effectuée, Pex5 est ubiquitinée par Pex4 ou Ubc4, des E2 de conjugaison, probablement aidées par les protéines membranaires Pex2, Pex10 et Pex12 qui possèdent un domaine RING, domaine souvent retrouvé dans les E3 ligases (Fig. 40, (Baker *et al.*, 2010)).

Deux types d'ubiquitination sont possibles : la monoubiquitination sur un résidu cystéine et la mono- ou polyubiquitination qui s'effectuent sur deux lysines différentes mais très proches. La protéine Pex5 ubiquitinée sera ensuite extraite de la membrane par Pex1 et Pex6 qui sont des AAA-ATPase. Ensuite, si Pex5 est monoubiquitinée, elle sera recyclée tandis qu'une polyubiquitination servira de signal de destruction par le protéasome (Fig. 40, (Baker *et al.*, 2010)). Le système de recyclage ou de destruction de Pex7 reste inconnu mais les corécepteurs Pex18 et Pex21 sont ubiquitinés. Le mécanisme d'action de ce système est

très proche du système ERAD décrit page 22 indiquant une convergence évolutive ou une duplication puis une évolution en parallèle de ces deux systèmes.

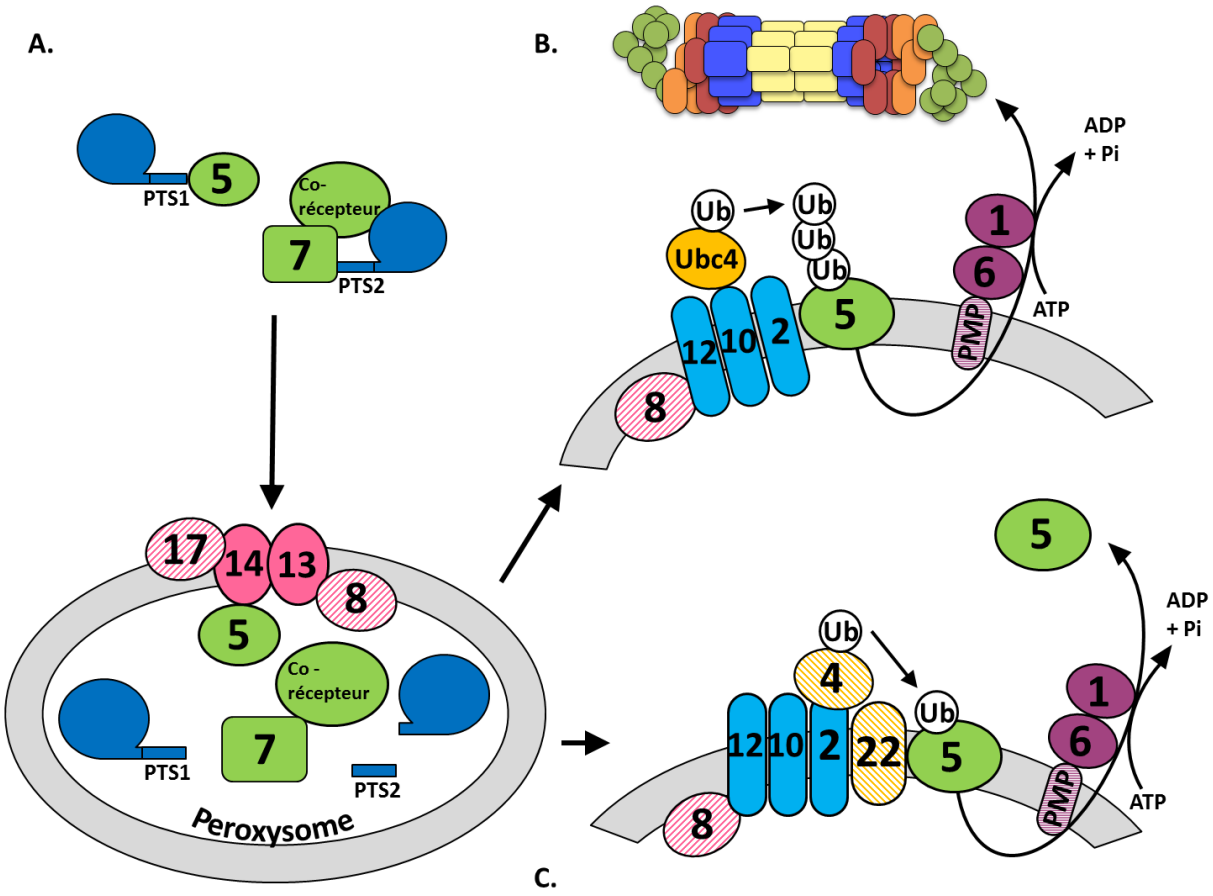

Figure 40 : Import des protéines matricielles du peroxysome chez *S. cerevisiae*.

Après reconnaissance puis import, en fonction de leur signal, par Pex5 ou Pex7 des protéines matricielles (A) ; Pex5 sera (B) polyubiquitinée par Ubc4 avec l'aide probable de Pex2, 10 et 12 puis sera extraite de la membrane du peroxysome par les AAA-ATPase Pex1 et 6 pour être dégradée par le protéasome ou (C) monoubiquitinée par Pex4 et Pex22 avec l'aide probable de Pex2, 10 et 12 puis sera extraite de la membrane du peroxysome par les AAA-ATPase Pex1 et 6 pour être recyclée. Ub : ubiquitine, PMP : Protéine de la membrane du peroxysome. Dans ce schéma, les numéros correspondent aux protéines Pex. Les protéines hachurées n'ont pas d'homologue chez les mammifères.

B. Le système ubiquitine-protéasome et la vacuole.

La fusion vacuolaire nécessite la présence de la protéine Ypt7 à la surface membranaire des deux vacuoles devant fusionner (Haas *et al.*, 1995). Ypt7 est une protéine de type Rab qui fait partie de la famille de protéines Ras GTPase (pour une revue sur cette famille de protéines : (Grosshans *et al.*, 2006)). Les protéines Rab sont des protéines dont la localisation varie constamment entre le cytoplasme (sous forme inactive liée au GDP) et les membranes (sous forme active liée au GTP). La protéine Ypt7, après formation du complexe HOPS qui permet de rapprocher les membranes, va influencer la formation d'un complexe SNAREs grâce au complexe HOPS pour aboutir à la fusion de la membrane des vacuoles.

Une équipe a montré que la protéine Ypt7 est polyubiquitinée et qu'elle est un substrat du protéasome (Kleijnen *et al.*, 2007). Tout comme pour Fzo1 et la fusion mitochondriale, tant que la protéine Ypt7 n'est pas dégradée, la fusion vacuolaire ne peut avoir lieu.

C. Le système ubiquitine-protéasome et la mitochondrie.

Plusieurs évidences montrent un lien entre le système ubiquitine-protéasome et les mitochondries :

- Une mutation de la protéine Rsp5, une E3 ubiquitine-ligase, conduit à des défauts de transmission et de morphologie mitochondriale. Un mutant de cette protéine est capable de complémenter les défauts d'une mutation de la protéine Mdm1, une protéine impliquée dans la transmission des mitochondries à la cellule fille (Fisk and Yaffe, 1999).
- Chez les mammifères, la dégradation des mitochondries paternelles après fertilisation est assurée par le système ubiquitine-protéasome. Cela se produit par l'ubiquitination d'une protéine de la membrane interne mitochondriale, probablement la prohibitine, permettant un ciblage pour la dégradation par le protéasome (Sutovsky *et al.*, 1999).
- La perte de fonction de la protéase mitochondriale Yme1 peut être compensée par la mutation d'une sous-unité de la base du protéasome nommée Ynt1 (ou Rpt3) (Campbell *et al.*, 1994).
- La délétion de Mfb1, une ubiquitine-ligase de type F-box, provoque la formation de courts tubules mitochondriaux. La surexpression de Mdm30, une autre ubiquitine-ligase de type F-box, est incapable de complémenter les défauts de la délétion de Mfb1 et inversement (Kondo-Okamoto *et al.*, 2006).
- Mdm30 régule la fusion mitochondriale par l'ubiquitination et la dégradation subséquente par le protéasome de Fzo1 (Anton *et al.*, 2011; Cohen *et al.*, 2008). Mdm30 ubiquitine aussi la protéine Mdm34 (Ota *et al.*, 2008).
- Un crible des gènes essentiels de la levure a permis de trouver 119 gènes essentiels pour la morphologie mitochondriale dont 7 codent pour des protéines du protéasome (4 du CP et 3 du 19S) (Altmann and Westermann, 2005).
- Un mutant de Rpn11, une sous-unité du lid du protéasome, a aussi montré l'implication de cette protéine dans la morphologie mitochondriale indépendamment de son rôle au sein du protéasome (Hofmann *et al.*, 2009).

Par son implication dans les systèmes ERAD, MAD et la dégradation de Pex5, Ypt7 et Fzo1, le protéasome est au cœur du contrôle qualité et de la morphologie de différents organites.

Étant donné la place centrale du protéasome dans l'effectivité de la dynamique, retrouver une sous-unité du protéasome impliquée dans la fission mitochondriale ne semble pas si surprenant.

IV. Rpn11.

A. La protéine, son rôle.

Rpn11 est une protéine essentielle de 306 acides aminés du lid du protéasome (Fig. 9, page 12). C'est la seule sous-unité du lid à posséder une activité enzymatique clairement définie : il s'agit d'une protéine qui clive la chaine d'ubiquitine des substrats du protéasome. Rpn11 appartient à une famille de protéines possédant un domaine MPN avec un site catalytique JAMM responsable de l'activité de déubiquitination. À l'inverse des autres déubiquitinases qui sont des protéases à cystéine, Rpn11 est une métalloprotéase Zn^{2+} et ATP-dépendante (Verma *et al.*, 2002; Yao and Cohen, 2002). Il semblerait que l'activité de déubiquitinase de Rpn11 soit assez spécifique des chaines d'ubiquitine K63 (Cooper *et al.*, 2009). Physiquement, Rpn11 est proche de la base du 19S et sa dépendance à l'ATP pour son activité de déubiquitination pourrait venir de cette configuration (Fig. 9, page 12 ; (Beck *et al.*, 2012; Lander *et al.*, 2012; Lasker *et al.*, 2012)). On retrouve aussi une hélice α et un domaine « coiled-coil » dans la partie C-terminale de Rpn11 (Fig. 42, page 74).

Une étude récente a permis de montrer les interactions entre les sous-unités de la particule 19S par cross-link (Fig. 41, (Kao *et al.*, 2012)). Le domaine « coiled-coil » de Rpn11 serait important pour ses interactions avec Rpn8 et Rpn6. D'autres équipes ont effectués des études d'interactions par cross-link et Rpn11 serait capable d'interagir avec Rpt3/6 et Rpn3/5/6/7/8/9 (Kao *et al.*, 2012; Krogan *et al.*, 2006; Lasker *et al.*, 2012). Il est intéressant de noter que les expériences de cross-link donnent des résultats assez variables au sein d'un même organisme mais aussi entre différents organismes alors que la structure du protéasome est très similaire entre *S. pombe* et *S. cerevisiae* (Kao *et al.*, 2012; Lander *et al.*, 2012; Lasker *et al.*, 2012).

Une tentative de cristallographie de Rpn11 a été effectuée par l'équipe d'Herman van Tilbeurgh mais elle s'est soldée par un échec car exprimée *in vivo* dans le système d'expression hétérologue *E. coli*, cette protéine est retrouvée sous deux formes : une avec la forme entière et une plus courte d'environ 100 acides aminés (résultats non publiés).

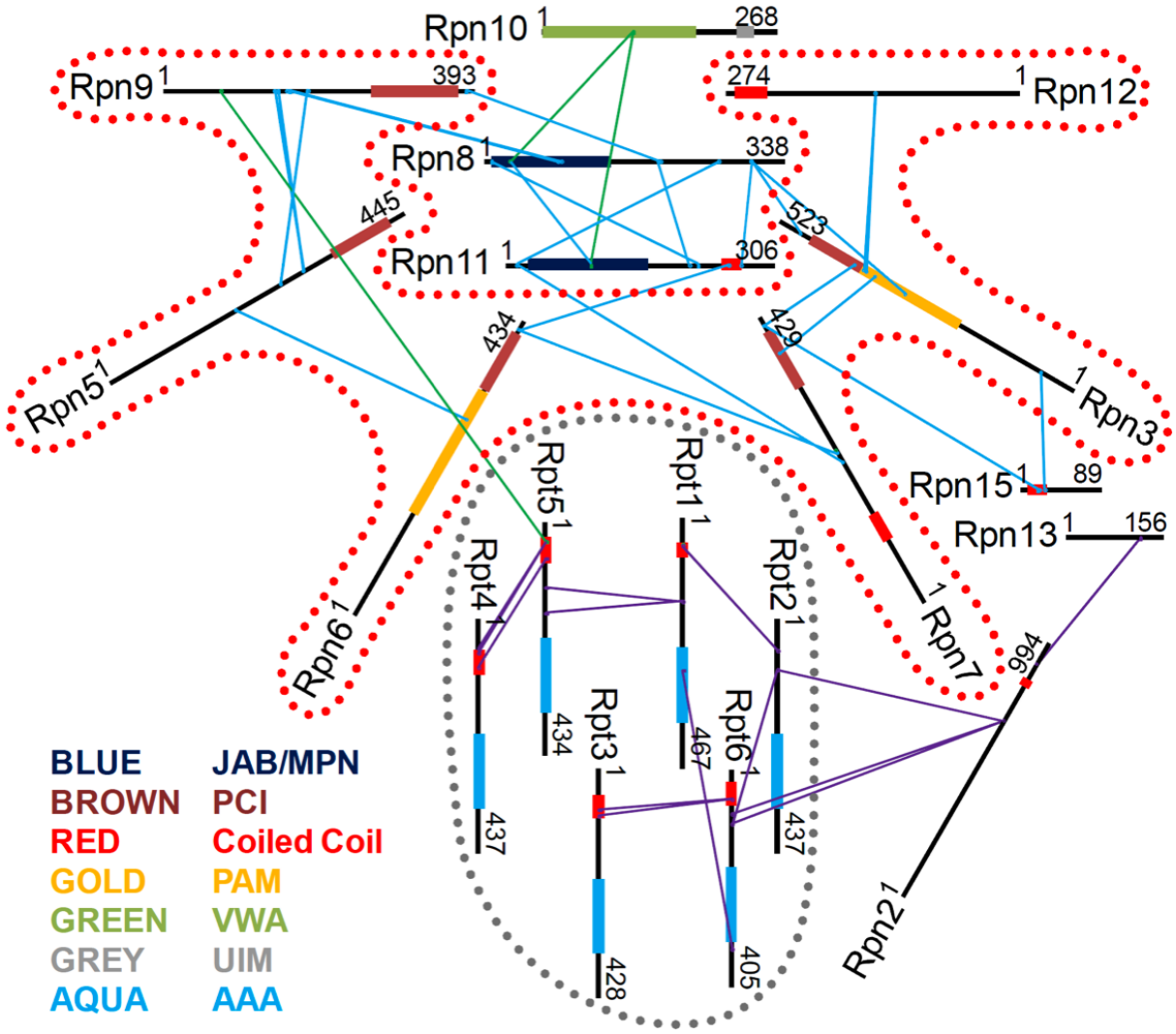

Figure 41 : Cartographie d'un cross-link du 19S de *S. cerevisiae*.

Quarante quatre liens chimiques lysine-lysine uniques sont représentés par des traits bleus entre sous-unités Rpn du lid, violet pour des liens base-base et vert pour des liens base-lid. Les sous-unités Rpn à domaine PCI (**P**roteasome/**C**OP9/eucaryotic **I**nitiation factor 3) forment un fer à cheval et sont indiqués dans un encadré à points rouge. Les sous-unités Rpt qui forment l'anneau de la base sont indiqués dans un encadré à points gris. VWA : **v**on **W**illebrand factor type **A**, UIM : **U**biquitin **I**nteracting **M**otif, AAA : domaine **AAA**-ATPase, PAM : **P**CI/PINT **A**ssociated **M**odule. (Kao *et al.*, 2012).

B. Le mutant *rpn11-m1*, son origine et ses phénotypes.

La mutation *mpr1-1*, renommée *rpn11-m1*, a été identifiée comme suppresseur d'une mutation dans l'ARNt^{Asp} mitochondrial empêchant sa maturation (Rinaldi *et al.*, 1994). La mutation *rpn11-m1* correspond à la substitution d'un dinucléotide CC par un trinucléotide GCA provoquant un décalage du cadre de lecture, un stop prématuré avec remplacement des 31 derniers acides aminés de Rpn11 par 10 acides aminés (Fig. 42).

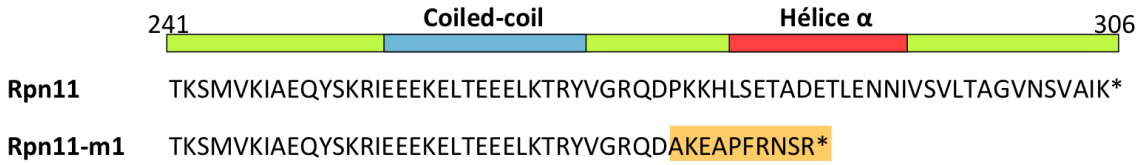

Figure 42 : La mutation *rpn11-m1*.

Détail de la séquence C-terminale de Rpn11 et de Rpn11-m1. Les acides aminés différents sont surlignés en orange. Le reste de la séquence est strictement identique entre les deux protéines.

Ce mutant est thermosensible et montre des phénotypes classiques pour un mutant du protéasome à température non-permissive : arrêt du cycle cellulaire, accumulation de protéines polyubiquitinées. À température non-permissive, il présente aussi une sur-réplication de l'ADN nucléaire et mitochondrial (Rinaldi *et al.*, 1998). C'est à température permissive, inférieure à 30°C, que ce mutant montre un intérêt particulier : il présente un défaut d'assemblage du lid assez peu classique chez les autres mutants du lid (seul des mutants de Rpn3 et Rpn10 montrent ce type de phénotype) mais surtout une fragmentation des mitochondries.

Le réseau fragmenté des mitochondries chez *rpn11-m1* n'est pas dû à un défaut de fusion comme en atteste la capacité de souches *rpn11-m1* à faire fusionner leurs mitochondries après croisement (Rinaldi *et al.*, 2008). Un autre indice qui laissait entrevoir cette absence de défaut de fusion des mitochondries était l'absence de perte de l'ADN mitochondrial au contraire de souches ayant des problèmes de fusion mitochondriale (Hermann and Shaw, 1998). Par fractionnement cellulaire, la protéine Rpn11-m1-HA est retrouvée exclusivement dans les fractions enrichies en mitochondries tandis que Rpn11-HA est principalement localisée dans le cytoplasme/noyau et légèrement aux mitochondries (Rinaldi *et al.*, 2008).

Très rapidement il a été établi que le domaine C-terminal, indépendamment du domaine MPN, était responsable des défauts mitochondriaux observés (Rinaldi *et al.*, 2004). Une surexpression de Rpn8 (ou de l'homologue humain de Rpn8) est capable de corriger les défauts de cycle cellulaire et d'assemblage du protéasome mais pas les défauts mitochondriaux de la souche *rpn11-m1*. De plus, la surexpression de la protéine chimère N-terminal Rpn8/C-terminal Rpn11 est capable de complémenter tous les défauts tandis que la surexpression de la protéine chimère N-terminal Rpn11/C-terminal Rpn8 ne complémente que le défaut de cycle cellulaire de la souche *rpn11-m1*. La surexpression de l'homologue humain de Rpn11, POH1, est capable de corriger tous ces défauts (Rinaldi *et al.*, 1998). De façon surprenante, la surexpression des 100 derniers acides aminés de Rpn11 en *trans* (ne comprenant pas le domaine MPN) est capable de complémenter les défauts mitochondriaux

induits par la mutation *rpn11-m1*. Une mutagénèse dirigée des acides aminés de l'hélice α du domaine C-terminal a montré que les deux derniers acides aminés de l'hélice α de Rpn11 sont importants dans le maintien de la morphologie mitochondrial et du génome mitochondrial (Rinaldi *et al.*, 2008).

Il a aussi été suggéré que Rpn11 pourrait jouer un rôle sur la machinerie de tubulation puisqu'un double mutant *Δfission/rpn11-m1* présente des défauts sévères de croissance et que le réseau mitochondrial anormal de cette souche ressemble à celui d'un double mutant *Δtubulation/Δfission* (Rinaldi *et al.*, 2008). Les défauts du réseau mitochondrial de *rpn11-m1* et de *Δmdm34* peuvent aussi être complémentés dès 28°C par la surexpression de Cdc14, une phosphatase requise pour la fin de mitose. Ces données suggèrent une connexion entre le cycle cellulaire et l'état des mitochondries ainsi qu'un rôle dans la même voie pour les protéines Mdm34 et Rpn11 (Esposito *et al.*, 2011).

C. Les révertants.

Les premiers révertants à être isolés furent obtenus par une expérience de réversion spontanée du défaut de croissance à 36°C (Rinaldi *et al.*, 2002). Les révertants extragéniques trouvés à ce jour sont le fait de gènes non déterminés. Le premier de ces révertants, appelé *ru*, est capable de complémenter les défauts de cycle cellulaire et permet la croissance à 36°C sur milieu fermentescible mais le réseau mitochondrial reste fragmenté. Le second révertant extragénique isolé, appelé *ry*, fut isolé à partir de la souche *ru*. Le révertant *ry* est le fait d'un autre gène que le gène *ru* et complémente tous les défauts de *rpn11-m1*. Il n'a pas été possible de trouver un révertant extragénique complémentant directement tous les défauts de *rpn11-m1*.

Une seconde étude de recherche de révertants a permis l'isolation de révertants intragéniques et extragéniques spontanés ou induits par rayonnement ultraviolets (Fig. 43). Ces révertants ont été sélectionnés suivant leur capacité à croitre sur des milieux fermentescibles ou non à température non permissive pour la souche *rpn11-m1*.

La plupart des révertants intragéniques trouvés montrent une remise en phase du cadre de lecture avant la mutation *rpn11-m1*. Seul un révertant, nommé RevA5, montre une remise en phase après cette mutation au niveau de l'hélice α avec un changement de seulement 7 acides aminés par rapport à une protéine sauvage (Fig. 43). RevA5 est intéressant car il permet une complémentation totale des défauts de cycle cellulaire et de croissance mais son réseau mitochondrial reste altéré. RevA2 est un révertant extragénique isolé lors de ce crible

et montrant les mêmes complémentations que *ru*. La réversion de RevA2 étant liée à un gène non déterminé, il est possible qu'elle soit le fait du même gène que *ru* (Rinaldi *et al.*, 2008).

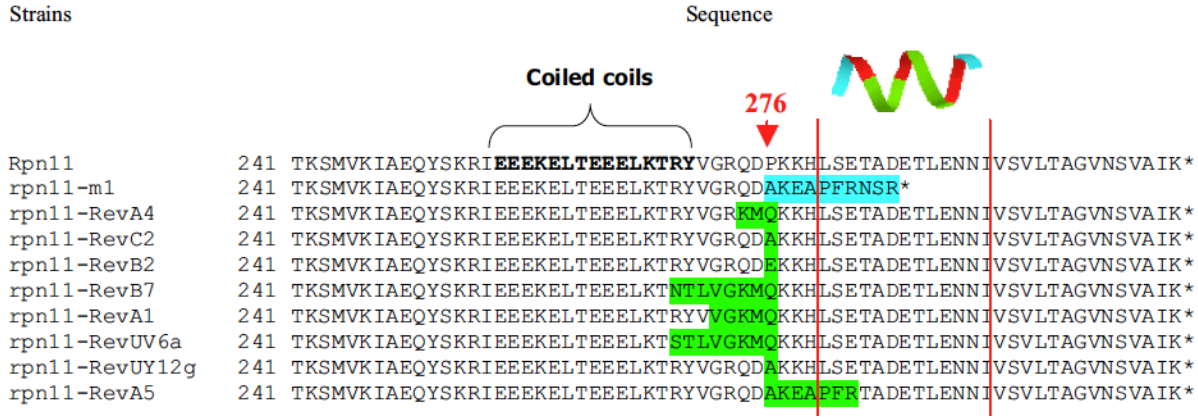

Figure 43 : Les révertants intragéniques obtenus.

Détail de la séquence C-terminale des divers révertants intragéniques obtenus et séquencés. Les acides aminés différents entre la protéine sauvage et les mutants sont surlignés. Le reste de la séquence est strictement identique entre les protéines. Adapté de (Rinaldi *et al.*, 2008).

D. Objectifs de la thèse.

Je suis arrivé au laboratoire lorsque Line Hofmann, l'étudiante en thèse qui m'a précédé, était en train de finir sa thèse et de finaliser des expériences pour une deuxième publication à laquelle j'ai participé. Les questions auxquelles devait répondre Line concernaient le rôle de Rpn11 dans la dynamique mitochondriale et l'indépendance ou non de ce rôle par rapport à l'activité du protéasome. Pour répondre à ces questions, l'utilisation des révertants comme outils pour la dissection du rôle moléculaire de Rpn11 dans la dynamique mitochondriale fut déterminante. À la fin de la thèse de Line, les deux grandes questions posées trouvèrent réponses : (i) l'appareil de fission mitochondrial est la cible de la dysfonction du mutant *rpn11-m1* sur la morphologie mitochondriale avec un rôle important du domaine C-terminal (ii) et ceci de façon indépendante de son activité au sein du protéasome.

Les travaux de Line suggéraient que la fragmentation des mitochondries, qui n'est pas liée à un défaut de fusion, dans la souche *rpn11-m1* provenait d'une fission exacerbée. Par contre, le rôle du domaine C-terminal dans la régulation de la fission mitochondriale était encore inconnu. C'est pourquoi j'ai voulu connaître :

- Les cibles moléculaires qui permettent à Rpn11 d'entrainer l'activation de l'appareil de fission.

- Comment la surexpression du domaine C-terminal sauvage en *trans* dans la souche mutante *rpn11-m1* est capable de complémenter à la fois les défauts mitochondriaux à température permissive et les défauts de croissance à température non permissive.
- La localisation subcellulaire de Rpn11 car le double rôle de Rpn11 au sein du protéasome et des mitochondries laisse supposer une double localisation potentiellement dynamique.

Travaux – Chapitre I

Travaux

I. L'origine des défauts mitochondriaux chez *rpn11-m1*.

Lors de la finalisation de la seconde publication de Line Hofmann, il venait d'être montré que le protéasome 26S régulait la fusion mitochondriale de façon protéolytique par la dégradation ubiquitine-dépendante de la protéine Fzo1 (Cohen *et al.*, 2008). Au laboratoire, il avait été montré que la fusion mitochondriale avait lieu à température permissive chez le mutant *rpn11-m1*. Ceci suggérait donc que chez le mutant *rpn11-m1* la fission des mitochondries était exacerbée. Afin de montrer le rôle spécifique de Rpn11 sur la fission mitochondriale en dehors de son activité au sein du protéasome, nous avons exploité le fait que l'appareil de fission mitochondrial est partagé avec les peroxysomes sous certaines conditions de croissance (Kuravi *et al.*, 2006; Schrader, 2006).

A. La mutation *rpn11-m1* affecte la fission des mitochondries et des peroxysomes.

Le réseau fragmenté des mitochondries d'une souche mutante peut avoir plusieurs explications possibles. Par exemple, il est possible que le réseau d'actine soit déstabilisé entrainant la fragmentation des mitochondries. Nous avons donc voulu savoir si d'autres organites ou d'autres structures cellulaires étaient affectés par la mutation *rpn11-m1*. Nous avons donc observé la morphologie des mitochondries, des vacuoles, des peroxysomes, du RE et du réseau d'actine dans une souche sauvage et une souche mutante à température permissive (Fig. 44). Mis à part le défaut mitochondrial déjà connu, les vacuoles, le RE et le réseau d'actine sont normaux dans la souche *rpn11-m1*. Par contre, le nombre de peroxysomes dans une cellule mutante était augmenté de façon très importante par rapport à une souche sauvage après croissance en milieu d'induction oléate (Fig. 44). Cette expérience nous a permis de conclure que la mutation affectait seulement deux organites : les mitochondries et les peroxysomes uniquement en condition de prolifération (oléate). De plus, la présence d'une vacuole unique indiquait que l'activité du protéasome dans la souche *rpn11-m1* n'était pas à l'origine des défauts des deux autres organites. En effet, il a été clairement démontré que la fusion vacuolaire était régulée par l'activité ubiquitine-dépendante du protéasome (Kleijnen *et al.*, 2007). Ceci a été confirmé par l'utilisation de mutants du protéasome qui montrent clairement un défaut de fusion vacuolaire mais pas de défaut du nombre moyen de peroxysomes à température non permissive (Fig. 44 et (Hofmann *et al.*, 2009)).

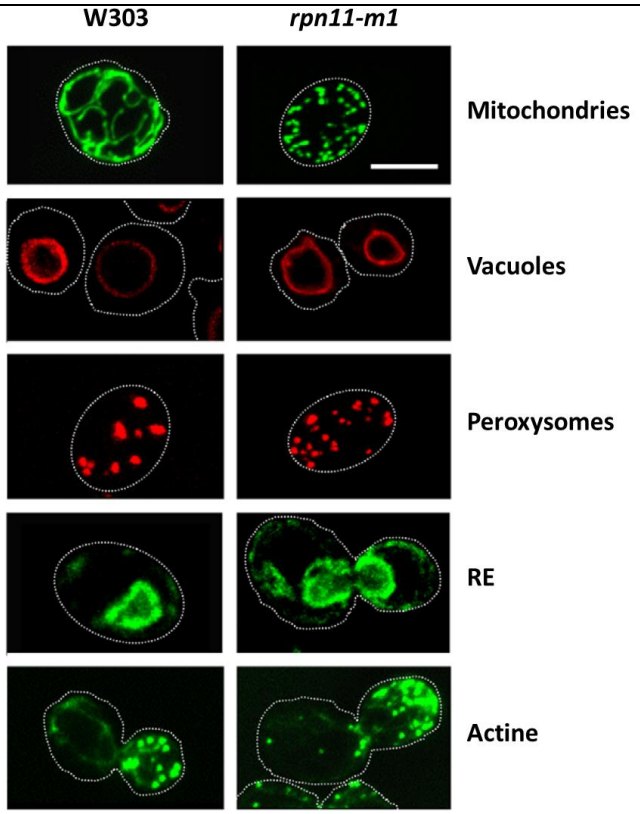

Figure 44 : La mutation *rpn11-m1* affecte deux organites.

Morphologie type des organites chez *rpn11-m1* et la souche sauvage de référence *W303* à température permissive. Les organites sont visualisés après transformation des souches par un plasmide exprimant de la GFP ciblée à la mitochondrie (pYX142 mtGFP) pour les mitochondries, un plasmide exprimant de la dsRed ciblée aux peroxysomes (pUG34 dsRed-SKL) après 14h en oléate pour les peroxysomes, un plasmide exprimant une protéine du RE en fusion avec de la GFP (pERG26-GFP-2). Les vacuoles sont visualisées après coloration par du FM4-64 et le réseau d'actine est visualisé après coloration avec de l'AlexaFluor488-phalloïdine. Barre : 5 µm. Adapté de (Hofmann *et al.*, 2009).

B. Les défauts mitochondriaux et peroxysomaux observés chez *rpn11-m1* sont liés à une activation de l'appareil de fission.

Le mutant *rpn11-m1* montre des défauts de morphologie mitochondriale et une augmentation du nombre de peroxysomes après culture en milieu oléate permettant l'induction de la fission des peroxysomes. La prolifération des peroxysomes par division des peroxysomes préexistants dans un tel milieu se fait grâce à l'appareil de fission des mitochondries. Afin de savoir si l'appareil de fission était suractivé chez le mutant *rpn11-m1*. Nous avons entièrement délocalisé l'appareil de fission mitochondrial aux peroxysomes en changeant le domaine C-terminal de Fis1 qui sert d'ancre pour la membrane mitochondriale par le domaine C-terminal de Pex15, une protéine du type « tail-anchored » comme Fis1, qui sert d'ancre pour la membrane peroxysomale (Halbach *et al.*, 2006; Motley *et al.*, 2008). Dans un milieu glucose, la majorité des protéines de l'appareil de fission mitochondrial sont retrouvées à la mitochondrie alors qu'en oléate l'appareil de fission est partagé entre les mitochondries et les peroxysomes. L'expression de la protéine chimère Fis1-Pex15 dans une

cellule a pour conséquence une localisation uniquement peroxysomale de tout l'appareil de fission. Nous avons donc exprimé cette protéine chimère dans une souche Δ*fis1* en présence ou absence de la mutation *rpn11-m1* et nous avons analysé le nombre de peroxysomes d'une telle souche après croissance dans un milieu glucose (Fig. 45). L'expression de cette protéine chimère est incapable de corriger le défaut de morphologie mitochondriale de la souche Δ*fis1/rpn11-m1* ou la forme de filet de la souche Δ*fis1* (Fig. 45). Alors qu'une souche Δ*fis1* exprimant cette protéine chimère ne montre pas d'augmentation du nombre de peroxysomes en glucose, la souche Δ*fis1/rpn11-m1* montre une augmentation très importante du nombre de peroxysome (Fig. 45). La redirection de Fis1 aux peroxysomes en présence de la mutation *rpn11-m1* est donc suffisante pour augmenter le nombre de peroxysomes. Ainsi, la mutation *rpn11-m1* est capable d'activer l'appareil de fission provoquant l'augmentation du nombre de peroxysomes en oléate et la fragmentation mitochondriale observés en présence de cette mutation.

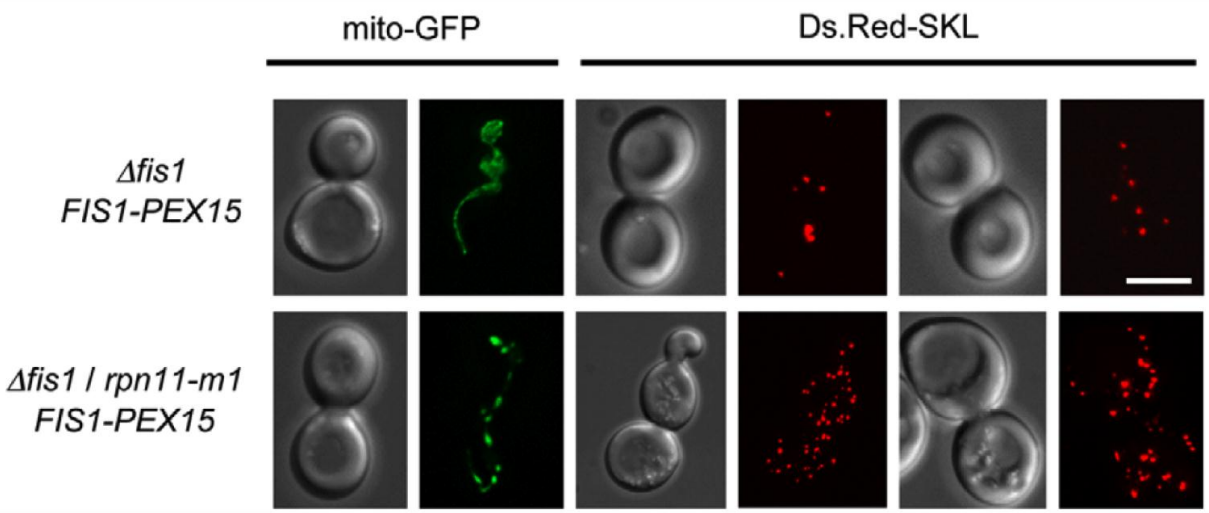

Figure 45 : La redirection de Fis1 aux peroxysomes en présence de *rpn11-m1* augmente le nombre de peroxysomes en glucose.

Morphologie des mitochondries et des peroxysomes dans la souche Δ*fis1* ou Δ*fis1/rpn11-m1* exprimant la protéine chimère Fis1-Pex15. Les organites sont visualisés après transformation des souches par un plasmide exprimant de la GFP ciblée à la mitochondrie (mito-GFP) pour les mitochondries ou un plasmide exprimant de la DsRed ciblée aux peroxysomes (DsRed-SKL). La culture a été effectuée en YPD. Barre : 5 µm. (Hofmann *et al.*, 2009).

C. Les protéines Fis1 et Dnm1 ne semblent pas être modifiées ou stabilisées chez *rpn11-m1*.

L'augmentation de l'activité de l'appareil de fission des mitochondries chez *rpn11-m1* et l'activité de cette protéine au sein du protéasome (Hofmann *et al.*, 2009) nous a amenés à vérifier si la demi-vie des protéines Fis1 et Dnm1 n'était pas perturbée. Pour répondre à cette question, j'ai effectué une analyse de la demi-vie des protéines Fis1, Dnm1 et Fzo1 en

présence de cycloheximide à température permissive. La protéine Fzo1 étant une des cibles de la dégradation ubiquitine-dépendante par le protéasome avec un temps de demi-vie connu et assez court, la comparaison de sa demi-vie dans la souche sauvage et mutante nous permettra de savoir si l'activité du protéasome est réellement affectée dans ces conditions.

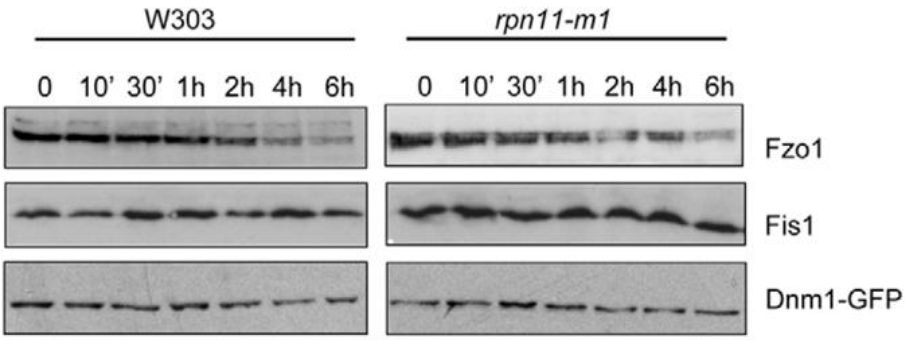

Figure 46 : Le temps de demi-vie de Dnm1, Fis1 et Fzo1 est inchangé dans les deux contextes.

La dégradation des protéines Dnm1, Fis1 et Fzo1 a été analysée dans une souche *rpn11-m1* et dans la souche sauvage de référence (*W303*) à 28°C. Les cellules ont été traitées avec de la cycloheximide puis récoltées aux temps indiqués. Les protéines ont ensuite été extraites puis analysées par western blot. (Hofmann *et al.*, 2009).

Parmi les protéines analysées, aucune d'entre-elles ne présente de modification post-traductionnelle évidente qui aurait pu entrainer une altération de la migration de ces protéines sur SDS-PAGE comme, par exemple, une phosphorylation ou une ubiquitination. Le temps de demi-vie de la protéine Fzo1 apparaît inchangé dans les deux contextes. Ceci montre que l'activité de dégradation du protéasome ne semble pas être fortement altérée chez *rpn11-m1*. Les protéines Fis1 et Dnm1 sont très stables dans le temps et ne semblent pas être déstabilisées chez *rpn11-m1* (Fig. 46). La fragmentation mitochondriale observée chez *rpn11-m1* à température permissive n'est donc pas le fait d'une stabilisation de Fzo1. Elle n'est pas non plus due à une déstabilisation de Fis1 ou Dnm1. Enfin, cette fragmentation ne semble pas être due à une modification post-traductionnelle évidente d'un des éléments des appareils de fusion ou de fission analysés.

D. Article : « A nonproteolytic proteasome activity controls organelle fission in yeast ».

A nonproteolytic proteasome activity controls organelle fission in yeast

Line Hofmann[1], Rémy Saunier[1], Raynald Cossard[1], Michela Esposito[2], Teresa Rinaldi[2] and Agnès Delahodde[1,*]

[1]University of Paris-Sud, CNRS, UMR 8621, Institute of Genetics and Microbiology, Orsay, 91405, France
[2]Pasteur Institute-Cenci Bolognetti Foundation, Department of Cell and Developmental Biology, University of Rome I, 00185 Rome, Italy
*Author for correspondence (agnes.delahodde@igmors.u-psud.fr)

Accepted 3 August 2009
Journal of Cell Science 122, 3673-3683 Published by The Company of Biologists 2009
doi:10.1242/jcs.050229

Summary

To understand the processes underlying organelle function, dynamics and inheritance, it is necessary to identify and characterize the regulatory components involved. Recently in yeast and mammals, proteins of the membrane fission machinery (Dnm1-Mdv1-Caf4-Fis1 in yeast and DLP1-FIS1 in human) have been shown to have a dual localization on mitochondria and peroxisomes, where they control mitochondrial fission and peroxisome division. Here, we show that whereas vacuole fusion is regulated by the proteasome degradation function, mitochondrial fission and peroxisomal division are not controlled by the proteasome activity but rather depend on a new function of the proteasomal lid subunit Rpn11. Rpn11 was found to regulate the Fis1-dependent fission machinery of both organelles. These findings indicate a unique role of the Rpn11 protein in mitochondrial fission and peroxisomal proliferation that is independent of its role in proteasome-associated deubiquitylation.

Supplementary material available online at
http://jcs.biologists.org/cgi/content/full/122/20/3673/DC1

Key words: Mitochondria, Peroxisomes, Fission, Proteasome

Introduction

Mitochondria are ubiquitous and essential organelles whose morphology and activity adapt to physiological states of the cell. They form a branched tubular network in the cell periphery and as a result of constant fission and fusion of individual mitochondria, form a dynamic mitochondrial network (Shaw and Nunnari, 2002; Yaffe, 1999). Most of the components of the mitochondrial fusion and fission machineries have been identified and are highly conserved between yeast and mammals. In the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, at least six proteins seem to constitute the fusion and fission core machineries (Shaw and Nunnari, 2002). Mitochondrial fusion is controlled by the outer mitochondrial membrane GTPase Fzo1 (Hermann et al., 1998), the outer mitochondrial membrane protein Ugo1 (Sesaki and Jensen, 2001) and the dynamin-related GTPase Mgm1 located in the intermembrane space (Wong et al., 2000). Deletion of either of the genes encoding either of these proteins results in the loss of mitochondrial fusion and because of the on-going fission, mitochondria fragment into small pieces (Jensen et al., 2000). Mitochondrial fission is mediated by the dynamin-related GTPase Dnm1 (Otsuga et al., 1998), the adaptor proteins Mdv1 and Caf4 (Griffin et al., 2005; Tieu and Nunnari, 2000) and the outer membrane tail-anchored (TA) protein Fis1 (Mozdy et al., 2000). Based on genetic and biochemical approaches, a model has emerged for the assembly of these fission proteins. Fis1 recruits Dnm1 to mitochondrial membranes in concert with Mdv1 and Caf4. In this process, Mdv1 is suggested to act as an adaptor protein that is important in the activation of the protein machinery and Caf4 seems to be essential for establishing polarity (Griffin et al., 2005; Schauss et al., 2006). Mutation or deletion of either of these fission proteins leads to highly interconnected, often net-like, mitochondria. Reflecting the equilibrium between fusion and fission processes, cells defective in both fusion and fission proteins harbor wild-type-like mitochondrial networks (Bleazard et al., 1999; Cerveny et al., 2001; Fekkes et al., 2000; Mozdy et al., 2000; Sesaki and Jensen, 1999; Sesaki and Jensen, 2001; Tieu and Nunnari, 2000).

In yeast and mammals, all the components of the mitochondrial fission machinery (Dnm1-Mdv1-Caf4-Fis1 in yeast and DLP1-FIS1 in human) were found to colocalize with peroxisomes and mediate both mitochondrial and peroxisomal fission (Kobayashi et al., 2007; Koch et al., 2005; Kuravi et al., 2006; Motley et al., 2008; Nagotu et al., 2008a). Peroxisomes and mitochondria are metabolically linked organelles that crosstalk and cooperate. They are also both dynamic organelles that have been shown to frequently change size and shape and to move in a motor-dependent manner along cytoskeletal tracks throughout the cell. The classical model of peroxisome biogenesis predicts that peroxisomes grow by uptake of newly synthesized matrix and membrane proteins from the cytosol and multiply by division (Lazarow and Fujiki, 1985). However, findings also suggest that peroxisomes can be formed de novo from the endoplasmic reticulum (ER) or a subdomain of the ER (Hoepfner et al., 2005). Recently, it was demonstrated in wild-type *S. cerevisiae* cells, that mature peroxisomes, which do not fuse, multiply by fission of pre-existing peroxisomes driven by two dynamin-related proteins (Vps1 and Dnm1) and do not form de novo (Motley and Hettema, 2007). Only in cells temporarily devoid of peroxisomes, can these organelles form de novo, but this process is slow and independent of the dynamin-related proteins (Motley and Hettema, 2007). *S. cerevisiae* contains only few small peroxisomes per cell under most conditions of growth. Proliferation of peroxisomes and induction of the fatty acid β-oxidation machinery is required for growth on fatty acids as the sole carbon

Journal of Cell Science

Journal of Cell Science

source. In the past few years, it has been shown that fission of elongated peroxisomes, driven by the fission machinery Fis1/Mdv1/Caf4/Dnm1, contribute to peroxisome abundance under oleate induction (Kuravi et al., 2006; Motley et al., 2008). It is still an open question how the dual targeting of the fission components is mediated, and whether organelle-specific factors exist that regulate the assembly of the division machineries of both organelles.

Regulation of the mitochondrial and peroxisomal dynamics during cell cycle or metabolic changes is poorly understood. However, the ubiquitin-proteasome system (UPS) has been found to have a role in mitochondrial morphology and dynamics. Fisk and Yaffe showed that a mutated form of ubiquitin produces mitochondrial aggregation (Fisk and Yaffe, 1999). More recently, a role for the 26S proteasome in degradation of the fusion protein Fzo1 has been reported in response to the α-factor during nonvegetative growth (Neutzner and Youle, 2005). However, there is no evidence for ubiquitylation and no ubiquitin ligase has been implicated in this process. In vegetative growth conditions, Cohen and co-workers reported ubiquitylation of Fzo1 at mitochondria and its subsequent degradation by the 26S proteasome (Cohen et al., 2008). Genes of the UPS were identified in a systematic screen of essential genes required for the maintenance of proper mitochondrial morphology (Altmann and Westermann, 2005). It has also been demonstrated that the proteasomal protein Rpn11 is essential for maintaining a correct cell cycle and normal mitochondrial morphology and physiology (Rinaldi et al., 2008; Rinaldi et al., 2004; Rinaldi et al., 2002).

The 26S proteasome is a multicatalytic protease that degrades polyubiquitylated proteins into short peptides (Glickman and Ciechanover, 2002). In addition to its role as a protease, the proteasome also functions nonproteolytically in a variety of cellular processes, including transcription (Ferdous et al., 2001; Gonzalez et al., 2002), DNA repair (Reed and Gillette, 2007) and chromatin remodeling (Collins and Tansey, 2006). The 26S proteasome is composed of two subcomplexes: a 20S core particle that carries the catalytic activity and the 19S regulatory particle (RP) (Baumeister et al., 1998). The 19S RP can be further dissociated into two subcomplexes referred to as the base and the lid (Glickman et al., 1998). The base, which mediates a direct contact with the 20S core complex, is made up of six homologous AAA-ATPases (Rpt1-Rpt6), together with two non-ATPase subunits (Rpn1 and Rpn2). The lid of the RP is made of nine non-ATPase subunits (Rpn3, Rpn5-Rpn9, Rpn11, Rpn12 and Rpn15) and contains a deubiquitinase activity. A supplementary subunit Rpn10 connects the base to the lid. The main function of the 19S RP is to recognize ubiquitylated proteins, cleave the ubiquitin moiety and to unfold and insert the substrates into the 20S (Braun et al., 1999; Glickman et al., 1999).

Consistently with the multiple involvements of the proteasome in different cellular processes, mutations in genes encoding the regulatory particle are known to have pleiotropic phenotypes. Among them, a mutation in *RPN11*, called *mpr1-1* and renamed *rpn11-m1* (Rinaldi et al., 2008), shows the phenotypic characteristics generally associated with other proteasomal mutations, such as cell cycle defects and accumulation of polyubiquitylated proteins at the nonpermissive temperature (Rinaldi et al., 1998). In addition and more specifically, *rpn11-m1* exhibits defects in mitochondrial morphology (fragmented mitochondria) at the permissive temperature. Rpn11 belongs to a subset of MPN-domain proteins that harbor a MPN+ or JAMM metalloprotease motif responsible for deubiquitylation of certain substrates (Verma et al., 2002; Yao and Cohen, 2002). Mutations in this catalytic deubiquitinase active site result in reduced proteasome-dependent deubiquitylation, but still allow formation of tubular mitochondria (Rinaldi et al., 2004). However, mutations in the C-terminal 31 amino acids of the protein lead to abnormal mitochondrial morphology (Rinaldi et al., 2008). The involvement of Rpn11 in mitochondrial biogenesis has been further supported by the isolation of extragenic suppressors of *rpn11-m1*, which can dissociate the phenotypes related to cell cycle defects from those of mitochondria (Rinaldi et al., 2002). Our recent studies identified a functional domain formed by a putative α-helix in the C-terminal part of Rpn11 that is necessary for the maintenance of a correct cell cycle. A very short region adjacent to this α-helix was found to be essential for the maintenance of tubular mitochondrial morphology and important for respiration. We showed that the absence of the last 31 C-terminal amino acids of Rpn11 does not affect the mitochondrial fusion process but rather its presence might regulate the mitochondrial fission and/or the tubulation process (Rinaldi et al., 2008).

In the present study, to investigate the molecular function of Rpn11 on the mitochondrial fission process, driven by Fis1/Mdv1/Caf4/Dnm1 and shared with the peroxisomes, we have analyzed more specifically mitochondrial morphology and peroxisome abundance. We found that whereas vacuole fusion is regulated by the proteasome degradation function as previously demonstrated (Kleijnen et al., 2007), the mitochondrial fission and the peroxisomal division processes are not controlled by the proteasome activity but depend on a new function of the lid subunit Rpn11. Together, our results indicate a new role for the Rpn11 protein on the Fis1/Mdv1/Caf4/Dnm1 fission machinery that is independent of its role in proteasome-associated degradation.

Results

Examination of organelle structures in the *rpn11-m1* mutant

It has been previously shown that the *rpn11-m1* mutant strain harbors fragmented mitochondria at the permissive temperature (Rinaldi et al., 1998; Rinaldi et al., 2002). We examined whether other intracellular structures were affected in this strain by staining wild-type and *rpn11-m1* cells with fluorescent probes specific for vacuoles, ER, actin cytoskeleton, mitochondria and peroxisomes. We studied in vivo vacuolar morphology by using the vital stain FM4-64, and observed no difference in the vacuolar morphology between the *rpn11-m1* and wild-type cells at the permissive temperature, indicating that vacuolar fusion is not impaired in the *rpn11-m1* strain (Fig. 1B). ER morphology revealed by a protein fusion between Erg6 and GFP did not seem to be affected in the *rpn11-m1* mutant cells (Fig. 1D), nor did the actin network stained with green phalloidin (Fig. 1E). However, as previously described, mitochondria of the *rpn11-m1* cells were highly fragmented (Fig. 1A) (Rinaldi et al., 2008). Interestingly, labeling the peroxisomal matrix with the red fluorescent protein DsRed containing the C-terminal peroxisomal targeting signal type 1 (PTS1, DsRed-SKL), revealed a large variation in peroxisome abundance in the *rpn11-m1* cells compared with wild-type cells grown overnight in oleate (Fig. 1C). Oleate was chosen as a carbon source for peroxisomal proliferation involving the Fis1-Mdv1-Caf4-Dnm1 apparatus. We observed no strong alteration in peroxisome morphology in *rpn11-m1* cells relative to wild-type cells.

These data reveal that only the mitochondrial morphology and the peroxisome abundance are affected in the *rpn11-m1* mutant at the permissive temperature when compared with the wild-type strain; the vacuole, ER and actin cytoskeleton are not affected.

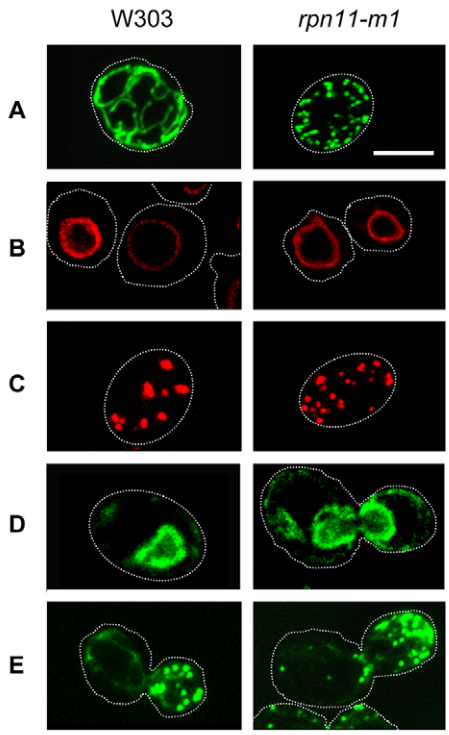

Fig. 1. Organelle morphology defects caused by the *rpn11-m1* mutation at permissive temperature. (A) Wild-type (W303) and *rpn11-m1* yeast cells transformed with the pYX142-mtGFP plasmid expressing the GFP targeted to the mitochondria. (B) Cells stained with the dye FM4-64 in glucose to visualize vacuoles. (C) Cells transformed with the pUG34 DS.Red.SKL plasmid expressing RFP targeted to the peroxisomes. Cells were grown in minimum medium and induced for 14 hours on oleate. (D) Cells transformed with the pERG26-GFP-2 plasmid expressing the Erg26 protein of the ER fused to GFP. (E) Cells stained with AlexaFluor488-phalloidin dye to label the actin network. The white dotted line corresponds to the cell wall. Scale bar: 5 μm.

Rpn11-m1, but not proteasome dysfunction, leads to an increase in peroxisome number

Defects in vacuolar morphology have already been documented in a proteasomal AAA-ATPase mutant strain as a result of impaired vacuolar fusion (Kleijnen et al., 2007). It has been shown that proteasome degradation is required for vacuolar fusion merely by degrading the vacuolar Ypt7 protein when ubiquitylated (Kleijnen et al., 2007). To investigate whether such a proteasomal function is also required for mitochondrial and peroxisomal fission events, we examined mitochondria, vacuole morphology and peroxisome abundance of thermosensitive strains mutated in different proteasomal subunits: *pre1-1pre2-2* in the 20S core particle, *Δsem1* and *rpn11-m1* in the lid and *Δrpn10*, *rpt2RF* and *rpt4R* in the base. An interaction between Pre1 and Pre2 is necessary for formation of the chymotrypsin-like active site in the proteasome (Heinemeyer et al., 1993; Hilt et al., 1993; Hilt et al., 1996; Hilt and Wolf, 1996). Degradation of polyubiquitylated proteins has been shown to be impaired in the strain deleted for *SEM1* (*RPN15*) (Sone et al., 2004). Deletion of *RPN10* was shown to have a more discrete phenotype (resistance to amino acid analogs) and contribute to the turnover of only a subset of proteins (Mayor et al., 2007). *RPT2* and *RPT4* encode two of the six AAA-ATPases within the base of the regulatory particle 19S, which have been proposed to mediate proteasome substrate unfolding before translocation into the core particle. The mutant strain *rpt2RF* shows the strongest phenotype, with a dramatic inhibition of the proteasome peptidase activity whereas *rpt4R* is less affected (Rubin et al., 1998).

All these strains were transformed with a plasmid encoding GFP targeted to mitochondria (Fig. 2B) or with a plasmid encoding the DsRed targeted to the peroxisomes (Fig. 2D). As a control of proteasome degradation inactivation, these strains were also stained with FM4-64 to allow vacuole visualization (Fig. 2C). With the exception of *Δrpn10*, which already showed a defect in vacuolar fusion at the permissive temperature, vacuolar fragmentation was observed in all the mutant strains at the nonpermissive temperature, independently of the proteasomal subunit mutation (Fig. 2C), confirming that in our conditions, the degradation function of the proteasome mutants is impaired, as previously demonstrated (Kleijnen et al., 2007). Altered mitochondrial morphologies were observed after 6 hours at the nonpermissive temperature for *rpt2RF* and *rpt4R* in agreement with earlier work (Altmann and Westermann, 2005), whereas such an effect was not observed for *Δsem1* and *Δrpn10*. Only *rpn11-m1* presented highly fragmented mitochondria at the permissive temperature (Fig. 2B). No increase in peroxisome number was observed in any of the proteasome mutants examined at 36°C compared with numbers at 26°C (Fig. 2D). Strong fragmentation of the mitochondria and a high peroxisome number could be observed only in the *rpn11-m1* cells at the permissive temperature.

We then performed quantitative analyses of peroxisome numbers in these various strains (Fig. 3). When the wild-type and *rpn11-m1* strains were grown in glucose, the distribution and the average number of peroxisomes per cell were similar between these two isogenic strains (Fig. 3A). However, when these strains were grown in oleate, a huge increase in peroxisome number was observed in *rpn11-m1* cells compared with the wild-type cells (Fig. 3B). Up to 17 fluorescent spots per wild-type cell could be detected with an average of 7.5±0.24 peroxisomes per cell. This number was largely increased in *rpn11-m1* cells, where up to 28 peroxisomes per cell could be counted, with an average of 14.34±0.47 peroxisomes per cell. Note that, not only the average number of peroxisomes, but also the frequency distribution of peroxisomes was largely affected in *rpn11-m1* (Fig. 3B). These cells contained at least three peroxisomes instead of one per wild-type cell (Fig. 3B). In the same conditions, the average number of peroxisomes per wild-type cell varied depending on the genetic background of the strains, ranging from 3.7±0.4 for BY4741 to 7.5±0.24 for the W303-1B background. Analyses of the peroxisome number of all the proteasome mutant strains compared with their isogenic parent strain, showed a comparable average number of peroxisomes at the nonpermissive temperature (Fig. 3C). For the *pre1-1pre2-2* strain, the average number of peroxisomes was compared between the permissive and nonpermissive temperatures, because the parent strain was not available. Thus, impairment of the degradation activity of the proteasome disturbs the vacuole fusion process, as previously demonstrated (Kleijnen et al., 2007), but does not affect the peroxisomal abundance on oleate. Altered function of only Rpn11 leads to fragmented mitochondria and an increase in peroxisome number on oleate.

Because mature peroxisomes do not fuse and multiply by fission of pre-existing peroxisomes (Motley and Hettema, 2007), these data strongly suggest a specific involvement of the proteasomal lid subunit Rpn11 on a mechanism that controls the division of mitochondria and peroxisomes.

Journal of Cell Science

Rpn11 has a role in the regulation of the peroxisome number independently of its role in the cell cycle

Our observation that a mutation in the C-terminal domain of Rpn11, but not five other mutations in the core (20S) or lid (19S) proteasomal subunits, led to a huge increase of peroxisome number indicates a specific role of Rpn11 on the peroxisomal proliferation process. To study the specific involvement of Rpn11 in the mitochondrial morphology and the peroxisome abundance, we first quantitatively analyzed the number and distribution of peroxisomes in two *rpn11-m1* revertant strains.

Intragenic and extragenic suppressors of *rpn11-m1* able to rescue the cell cycle defect of *rpn11-m1* but not the mitochondrial morphology defect have been previously isolated (Rinaldi et al., 2008). Among them, we selected *rpn11-m1-RevA2* an extragenic suppressor of *rpn11-m1* (mutation not identified) and *rpn11-m1-RevA5* an intragenic mutant. This latter mutant restored the complete open reading frame of *RPN11* but contained seven amino acid changes in the C-terminal domain (Fig. 4A). Both mutants were able to grow at 36°C on glucose. Only *rpn11-m1-RevA2* did not grow on glycerol at 36°C (Fig. 4B), but both mutants still clearly showed highly fragmented mitochondria at 26°C (Fig. 4C).

Quantitative distribution of peroxisomes in oleate-grown cells of the wild type, *rpn11-m1* and the two suppressor strains are shown Fig. 3B and Fig. 4D. The distribution of the peroxisomes was much more scattered for the *rpn11-m1*, *rpn11-m1-RevA2* and *rpn11-m1-RevA5* isogenic strains compared with the wild-type strain. All the mutant cells contained at least three peroxisomes instead of one, as was the case for the wild-type cells. The average number of peroxisomes per cell decreased moderately between *rpn11-m1* (14.37±0.47) and the suppressors strains *rpn11-m1-RevA2* (10.24±0.14) and *rpn11-m1-RevA5* (11.39±1.62) (Fig. 4D). Altogether, these results show that rescuing the cell cycle defect of the *rpn11-m1* cells does not correct the peroxisomal and mitochondrial defects.

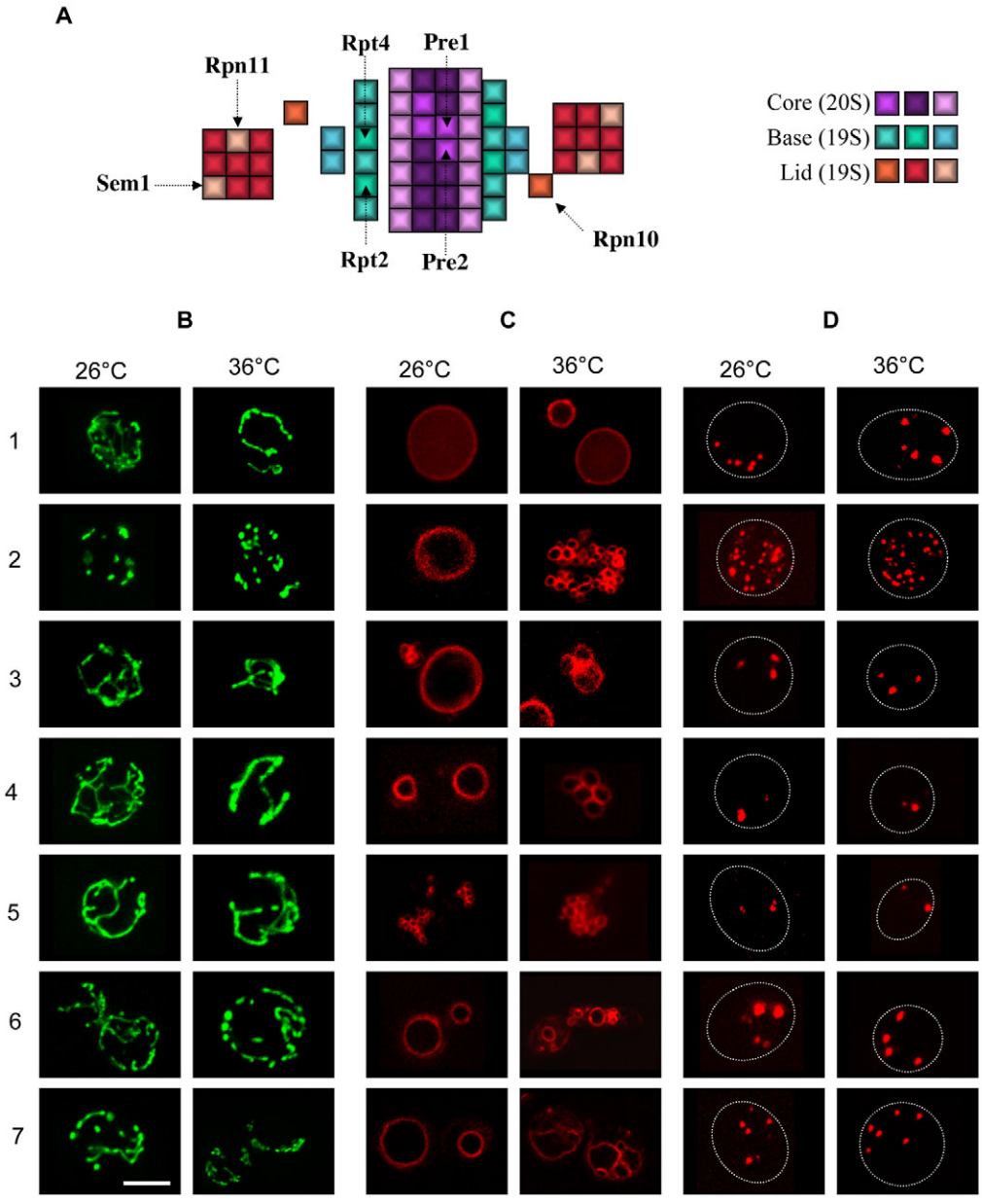

Fig. 2. The mitochondrial and peroxisomal defects are not a consequence of proteasome deficiency. (A) Schematic location of the different subunits examined in the 26S proteasome. (B-D) Mitochondria (B), vacuoles (C) and peroxisome (D) staining in cells grown in oleate. Organelles were observed in (1) wild-type (W303-1B), (2) *rpn11-m1*, (3) *pre1-1pre2-2*, (4) *Δsem1*, (5) *Δrpn10*, (6) *rpt2RF* and (7) *rpt4R* strains either at the permissive temperature of 26°C or the nonpermissive temperature of 36°C. The white dotted line corresponds to the cell wall. Scale bar: 5 μm.

Mutation in the catalytic deubiquitinase domain of Rpn11 does not increase peroxisome number

We then investigated peroxisome abundance in a single-site mutant of the MPN+ deubiquitinase catalytic domain (motif-E-$HxHx_7Sx_2D$) of Rpn11 (*rpn11-S119A*). This mutant strain exhibits general proteolytic defects, accumulation of polyubiquitylated proteins and temperature sensitivity, but contains a tubular mitochondrial network (Rinaldi et al., 2004). The quantitative distribution and the average number of peroxisomes were quantified at the nonpermissive temperature in the *Δrpn11* strain, which expresses the Rpn11 protein with or without the S119A mutation (*rpn11-S119A*) (Fig. 4D). The strain expressing Rpn11-S119A shared a frequency distribution of peroxisomes that was more scattered than the strain producing the wild-type protein. The average number of peroxisomes in cells expressing Rpn11S119A was higher (6.63±0.15) than in those expressing Rpn11 (4.51±0.4), but much lower than in *rpn11-m1* (14.34±0.47) (Fig. 4D; Fig. 3B). Importantly, both strains contained at least one peroxisome per cell, as it was the case for wild-type cells.

These results indicate that the Rpn11 deubiquitinase activity might not be involved in the oleate-induced increase of peroxisome number and suggest a new role for the Rpn11 C-terminal domain in regulating the peroxisome abundance.

Rpn11-m1 does not alter Pex11 expression

To grow on a fatty acid as sole carbon source, proliferation of peroxisomes and induction of the fatty acid β-oxidation machinery is required. Pex11 is a peroxin of the inner surface of the peroxisomal membrane that is the most strongly induced peroxin on oleic acid and is absolutely required for peroxisome proliferation (Marshall et al., 1995). Yeast mutants lacking *PEX11* are unable to increase the peroxisome number, whereas overexpression of Pex11 induces peroxisome division in a multi-step process involving elongation of pre-existing peroxisomes followed by their division (Gurvitz et al., 2001). Therefore, we first asked whether Rpn11-m1 would affect Pex11 expression. We examined Pex11 levels in *rpn11-m1* cells grown in glucose and oleate (Fig. 5). Pex11 was tagged with 3×HA and expressed from its chromosomal locus in both genetic contexts. No variation in Pex11 level was detected in cells grown in glucose between the two genetic contexts compared with the cytosolic marker eRF1. Note that in W303-1B, the concentration of Pex11 is quite high in cells grown in glucose compared with the study of Marshall and colleagues (Marshall et al., 1995). In cells grown in oleate, the Pex11 levels were higher than those in glucose-grown cells, but were at the same level in *rpn11-m1* and wild-type cells. This result shows that Rpn11-m1 does not alter the Pex11 expression.

Rpn11 regulates the Fis1-dependent fission of peroxisomes

It has been previously demonstrated that Vps1 is the major dynamin-related protein that regulates the peroxisome division process in yeast (Hoepfner et al., 2005; Li and Gould, 2003). However, the mitochondrial fission machinery (Fis1-Mdv1-Caf4-Dnm1) was also shown to localize to peroxisomes and control peroxisome division in oleate-grown cells in addition to the Vps1 protein (Kuravi et al., 2006; Motley et al., 2008; Nagotu et al., 2008a; Nagotu et al., 2008b). As the mitochondrial fission apparatus is common to both mitochondria and peroxisomes, we decided to investigate the number of peroxisomes in oleate-grown strains deleted for *VPS1* and/or *DNM1*, *MDV1*, *CAF4* and *FIS1* in the presence or absence of the *rpn11-m1* allele (Fig. 6).

As previously shown, deletion of *VPS1* led to an important decrease in the average number of peroxisomes per cell: 1.28±0.19 compared with 3.72±0.4 for the isogenic wild-type cells (Fig. 6). This number (1.28±0.19 for *Δvps1*) more than doubled in the double mutant strain *Δvps1/rpn11-m1* (2.82±0.04). The frequency distribution of the peroxisomes in *Δvps1/rpn11-m1* cells was much more dispersed, with cells containing up to 11 peroxisomes whereas the *Δvps1* cells contained no more than four peroxisomes (Fig. 6). Deletion of *DNM1* led to an average

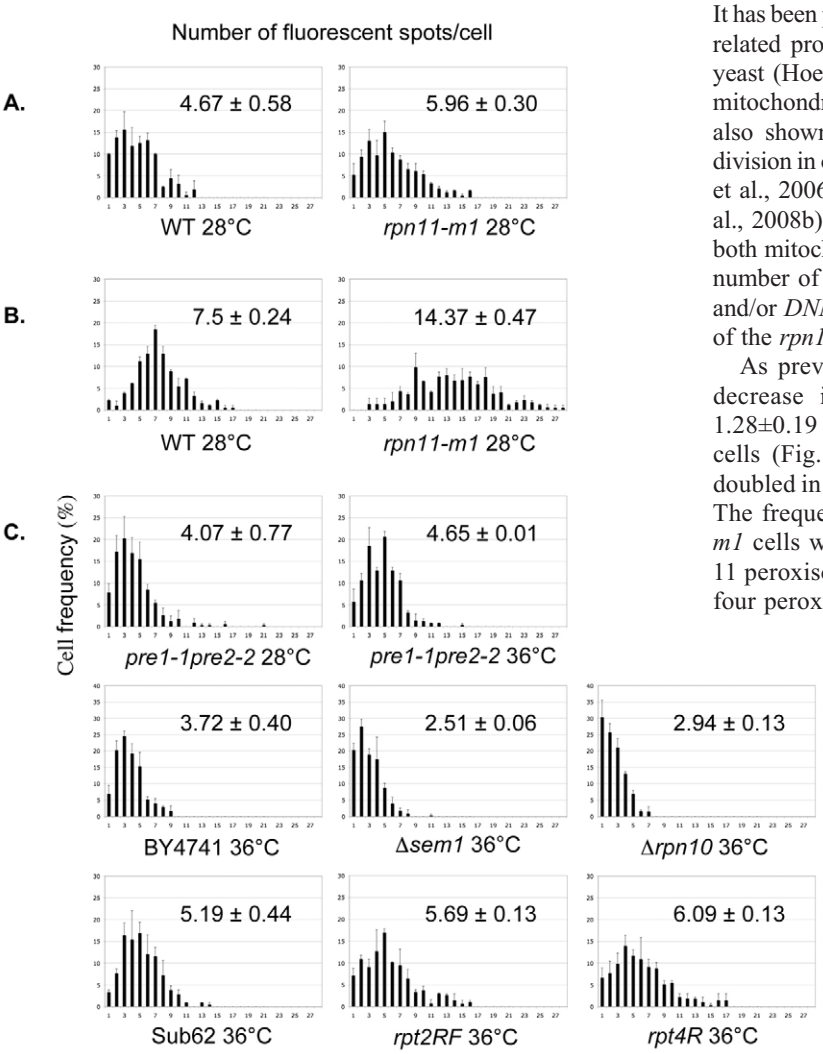

Fig. 3. Rpn11 regulates peroxisome numbers in cells grown in oleate. (A) Distribution of peroxisomes in wild-type and *rpn11-m1* cells grown in glucose. (B) Quantification of peroxisome in wild-type and *rpn11-m1* cells grown in oleate. (C) Quantitative distribution of the peroxisomes in different proteasome mutant cells grown in oleate. For each sample, the number of fluorescent spots was counted from images of two counts of 100 non-budding cells from two independent experiments. The frequency distributions of cells with number of peroxisomes per cell are shown. The average numbers of fluorescent spots per cell observed are presented as means ± s.d. Peroxisomes were labeled with DsRFP-SKL.

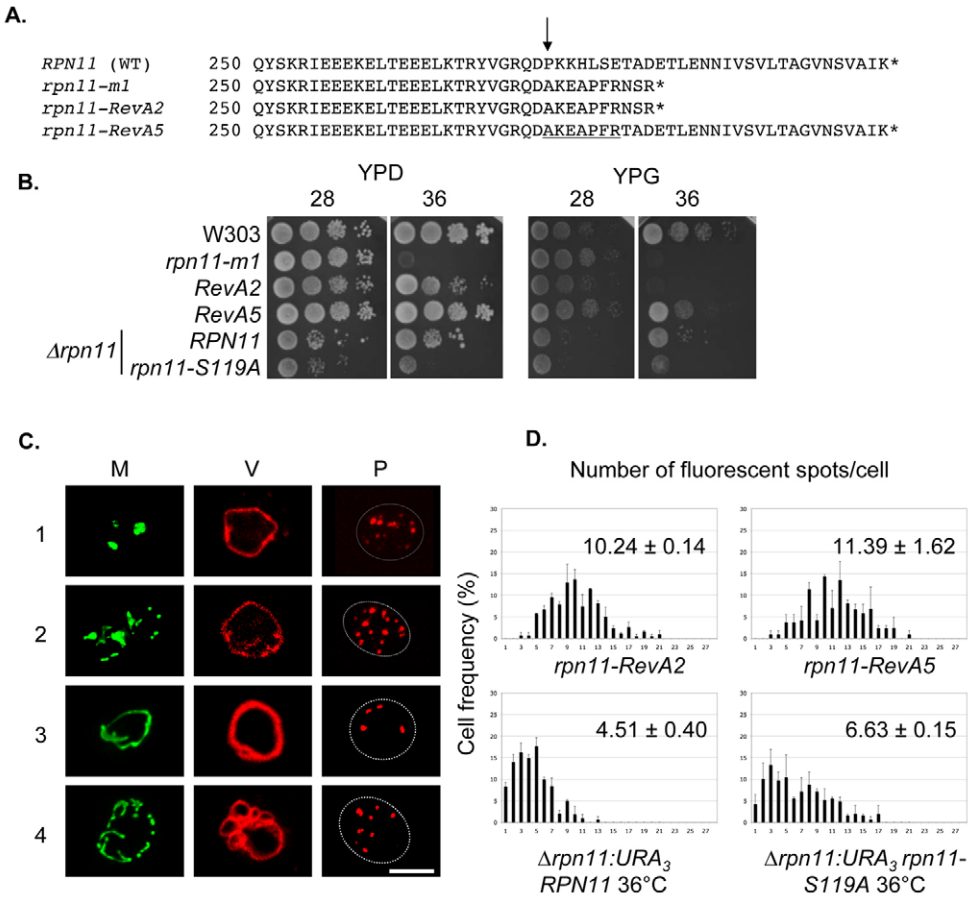

Fig. 4. Integrity of the C-terminal domain but not the deubiquitinase activity of Rpn11 is involved in peroxisome proliferation. (A) Amino acid sequence of the Rpn11 protein and the mutated proteins Rpn11-m1, Rpn11-RevA2 (extragenic revertant) and Rpn11-RevA5 (intragenic revertant). The localization of the *rpn11-m1* mutation (P256A + fs) is indicated with an arrow. The underlined sequence in Rpn11-RevA5 is different from the WT sequence. (B) Phenotype of the wild-type and mutant strains on fermentable (YPD) and respiratory (YPG) medium at 28°C and 36°C. (C) Morphologies of mitochondria (M), vacuoles (V) and peroxisomes (P) in *rpn11-revA2* (1) and *rpn11-revA5* (2) strains at 28°C and *Δrpn11:URA3* /yepLac111 *RPN11* (3) and *Δrpn11:URA*$_3$ /yepLac111 *rpn11(S119A)* (4) strains at 36°C. (D) Frequency distributions of the peroxisomes in mutant cells grown in oleate. The average numbers of fluorescent spots per cell observed in oleate-grown cells are presented as means ± s.d. Peroxisomes were labeled with DsRFP-SKL. Scale bar: 5 μm.

number of 3.43±0.47 peroxisomes per cell, whereas the presence of the *rpn11-m1* allele in this strain showed an average number of 6.67±0.62 peroxisomes per cell. Because Vps1 and Dnm1 are redundant for peroxisome fission, we analyzed the effect of *rpn11-m1* in a *Δvps1 Δdnm1* double deletion strain. In this context, the presence (1.13±0.03) or the absence (1.1 ±0.04) of the *rpn11-m1* allele had no effect on peroxisome number. These results show that the presence of either dynamin-related protein Vps1 or Dnm1 in *rpn11-m1* is necessary and sufficient for the increase in peroxisome number.

Deletion of *FIS1* led to 3.59±0.19 peroxisomes per cells compared with 4.09±0.27 peroxisomes in *Δfis1*/*rpn11-m1* cells (Fig. 6). Thus, the Fis1 protein is required for the *rpn11-m1* increase in peroxisome number. However, deletion of *MDV1* did not decrease the peroxisome number of *rpn11-1* cells. Since Caf4 has been shown to be redundant with Mdv1 for peroxisome fission in glucose (Motley et al., 2008), we also examined peroxisome abundance in a *Δcaf4*/*rpn11-m1* background. Interestingly, those oleate-grown cells presented severe growth defect and abnormal morphologies (giant cells, elongated and multibuds). It was impossible to reasonably compare the peroxisome number in such cells, because we always counted the peroxisome number in healthy nonbudding cells. Altogether, these data indicate that Rpn11 has a role in the Fis1-dependent fission process of peroxisomes.

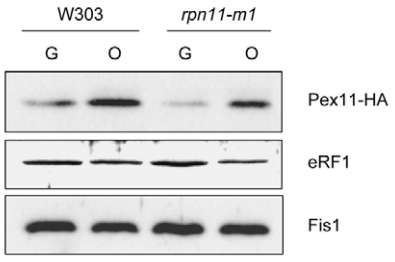

Fig. 5. Rpn11-m1 does not alter Pex11 expression. Wild-type and *rpn11-m1* cells expressing 3×HA-tagged Pex11 protein from its chromosomal locus were grown overnight in glucose (G) or oleate (O). Total cell extracts were immunoblotted for endogenous Pex11-HA and Fis1 proteins. eRF1 is a cytosolic protein used as loading control.

Redirecting Fis1 entirely to peroxisomes in *rpn11-m1* increases peroxisome number in cells grown in glucose

In glucose, most of the Fis1 and Dnm1 proteins were found to predominantly localize to mitochondria and few Fis1 localized to peroxisomes (Kuravi et al., 2006). In *rpn11-m1* cells, mitochondria are highly fragmented when cells are grown in glucose and the increase in peroxisome number in *rpn11-m1* cells was only observed when cells were grown in oleate. To determine whether the increase in peroxisome number in *rpn11-m1* cells was restricted to the oleate inducing conditions, we redirected all Fis1 protein exclusively to peroxisomes and analyzed the peroxisome number and the mitochondrial morphology of cells grown in glucose. Exchanging the C-terminal membrane-anchor sequence of Fis1 with that of the peroxisomal membrane protein Pex15 has been shown to result in

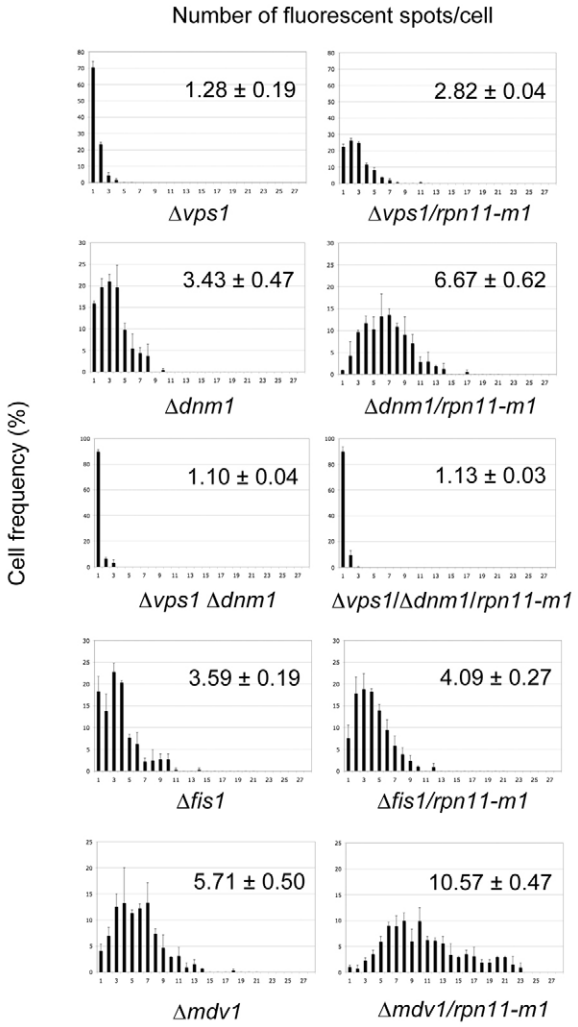

Fig. 6. Rpn11 regulates the Fis1-dependent division process of peroxisomes. (A) Quantitative distribution of peroxisomes in *Δvps1*, *Δdnm1*, *Δvps1/Δdnm1*, *Δfis1* and *Δmdv1* cells with or without the *rpn11-m1* mutated allele grown in oleate. For each strain, fluorescent spots were counted in two counts of 100 non-budding cells from two independent experiments. The frequency distributions of cells with numbers of peroxisomes are shown. The average numbers of fluorescent spots per cell observed are presented as means ± s.d.

an exclusive localization of the fusion protein to peroxisomes (Halbach et al., 2006; Motley et al., 2008). We expressed this chimeric protein in *Δfis1* cells in the presence or absence of the *rpn11-m1* allele and analyzed the peroxisome number and mitochondria morphology in glucose-grown cells (Fig. 7). Expression of the Fis1-Pex15 fusion protein in the *Δfis1* strain did not restore the mitochondrial fission defect of this strain but restored the peroxisome abundance to wild-type levels, as previously shown (Motley et al., 2008). Interestingly, expression of the fusion protein in the double mutant strain *Δfis1/rpn11-m1* led to a huge increase in peroxisome number in glucose. Mitochondria of this strain resemble those of the *Δfis1/rpn11-m1* strain, with elongated and collapsed mitochondria, not the interconnected tubules of the *Δfis1* parent, as previously shown (Rinaldi et al., 2008). These results show that redirecting Fis1 to peroxisomes in the presence of the *rpn11-m1* allele is sufficient to increase the peroxisome fission process when cells are grown in glucose.

Dnm1 and Fis1 are very stable proteins

The increased fission of mitochondria and peroxisomes, which was dependent on the Fis1 protein, prompted us to examine the involvement of Rpn11 on potential post-translational regulation of the fission proteins common to both organelles. The turnover of two fission proteins Dnm1 and Fis1 was examined in *rpn11-m1* cells compared with the wild-type strain. We carried out cycloheximide-chase experiments in both strains at the permissive temperature, in which the Dnm1 protein was expressed as a fusion with GFP from its chromosomal locus. As a control, we also examined the turnover of the fusion protein Fzo1 known to be a substrate of the proteasome. As shown in Fig. 8, the turnover of the Fzo1 protein was comparable in wild-type and mutant cells, indicating that the proteasome is functional at the permissive temperature. In the same conditions, the Dnm1 and Fis1 proteins were very stable, and their turnover was comparable in the two genetic backgrounds. These data indicate that the increased fission observed in *rpn11-m1* is not a consequence of stabilization of the fission proteins Dnm1 and Fis1.

Rpn11 copurifies with mitochondria and peroxisomes

We previously showed that a fraction of Rpn11 and most of the Rpn11-m1 proteins are found in the enriched mitochondrial fraction after cellular fractionation (Rinaldi et al., 2008). To explore a potential dual association of Rpn11 and Rpn11-m1 at both peroxisomes and mitochondria, enriched mitochondrial pellets of strains expressing Rpn11 or its mutated form, tagged with 3×HA at the chromosomal locus, were subjected to further cell fractionation by ultracentrifugation through a sucrose step gradient. Aliquots of each gradient fraction were analyzed for protein content. The data presented in Fig. 9, show that fractions 8, 9 and 10 were further enriched in mitochondria and peroxisomes. Mitochondria appeared more abundant in fractions 8 and 9 whereas fraction 10 contained more peroxisomes. Both Rpn11 and Rpn11-m1 copurified in fractions corresponding to mitochondria and peroxisomes. These data support evidence for the association of Rpn11 and its mutated form to both peroxisomes and mitochondria.

Discussion

Our previous work showed that the C-terminal domain of Rpn11 is involved in the regulation of the mitochondrial morphology independently of the known deubiquitylating activity of this protein (Rinaldi et al., 2008). However, the process (fission and tubulation) regulating the mitochondrial morphology controlled by Rpn11 was not clear. Here, we establish that the Fis1-dependent fission machinery common to mitochondria and peroxisomes is regulated by the proteasomal lid subunit Rpn11. We show that effective regulation of peroxisome fission in oleate inducing conditions does not require the proteolytic activity of the proteasome but rather a novel function of Rpn11 that might be independent of its deubiquitylating activity.

Two recent studies confirmed the connections between proteasome and mitochondria. Very recently, in *S. cerevisiae*, proof for the involvement of the proteasome activity on the mitochondrial morphology was established by showing the ubiquitylation and the proteasomal degradation of the fusion protein Fzo1 (Cohen et al., 2008). A different connection has also emerged with our study on the *rpn11-m1* mutant in the lid subunit Rpn11. We previously showed that the absence of the C-terminal domain of Rpn11 did not affect the mitochondrial fusion process. Here, we pointed out that the division process of peroxisomes, driven by the Fis1 protein,

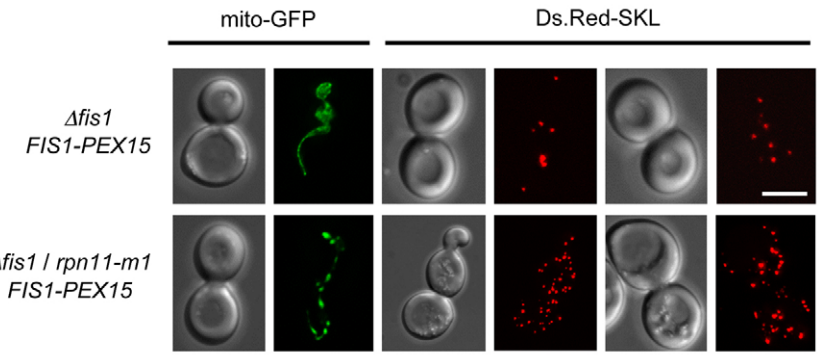

Fig. 7. Redirection of all Fis1 to peroxisomes in *rpn11-m1* increases peroxisome number in glucose. *Δfis1* and *Δfis1/rpn11-m1* cells were transformed with a plasmid expressing the Fis1-Pex15 fusion protein and expressing either GFP targeted to mitochondria or DsRed to label peroxisomes. Cells were grown in glucose medium. Images are flattened *z*-stacks. Scale bar: 5 μm.

is specially affected in *rpn11-m1*. Since Fis1 was shown to have a pivotal role in recruiting other fission components such as Dnm1, Mdv1 and Caf4 at mitochondria and peroxisomes, our results indicate that the huge fragmentation of the *rpn11-m1* mitochondria is also a result of an increased Fis1-dependent fission of mitochondria. This effect is specific for the Rpn11 function, because five other thermosensitive mutants of the proteasome, in the catalytic core, the base or the lid, do not show abnormal peroxisome number in oleate-inducing condition. These data demonstrate that proteasome degradation is unlikely to be involved in the peroxisomal division process induced by oleate.

These results have been further supported by the use of extragenic and intragenic suppressors of *rpn11-m1*. These isogenic revertants have a correct cell cycle and restore the lidless conformation of the proteasome for *RevA5* (data not shown); they still contain abnormal peroxisome abundance and highly fragmented mitochondria. Interestingly, a mutant in the Rpn11 deubiquitinase active site that fails to deubiquitylate proteins (Rinaldi et al., 2004), has a normal peroxisome number under oleate induction, indicating that the catalytic activity of Rpn11 might not be involved in the peroxisomal division process; a property that has already been shown for mitochondrial fragmentation (Rinaldi et al., 2004).

A number of reports have provided indirect links between the UPS and mitochondrial dynamics (Altmann and Westermann, 2005; Durr et al., 2006; Fisk and Yaffe, 1999; Hitchcock et al., 2003; Peng et al., 2003; Rinaldi et al., 2004; Sutovsky et al., 1999; Thompson et al., 2003; Thorsness et al., 1993). Today, the only evidence for involvement of the UPS in directly regulating the mitochondrial fission process is in mammals, where a specific ubiquitin ligase, MARCHV/MITOL, is implicated in ubiquitylating two components of the mitochondrial fission apparatus, DLP1 and FIS1. However, there is a lack of consensus as to whether this ubiquitylation serves to target these factors for proteasomal degradation or facilitates other nonproteolytic functions and/or activity and/or trafficking of these proteins (Karbowski et al., 2007; Nakamura et al., 2006; Yonashiro et al., 2006). Parkin was the other mammalian ubiquitin ligase implicated in the mitochondrial fission process; however, it was recently shown that parkin is selectively recruited to dysfunctional mitochondria to promote and mediate their engulfment and subsequent degradation by autophagosomes (Narendra et al., 2008). The implication of a proteasomal subunit in the mitochondrial fission process in yeast, independently of its role in the degradation function of the proteasome, suggests a nonproteolytic regulation of the fission proteins.

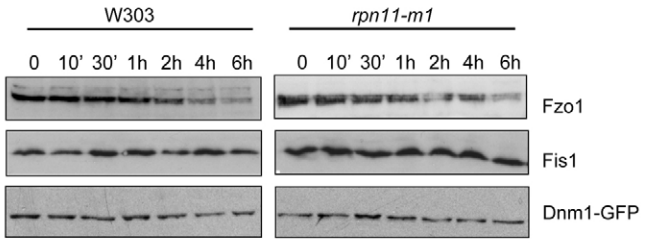

Fig. 8. Dnm1 and Fis1 proteins are stable proteins even in the *rpn11-m1*. Degradation of Dnm1, Fis1 and Fzo1 was assessed in wild-type and *rpn11-m1* strains by treating cells with cycloheximide. Yeast extracts were prepared at the indicated time points and remaining proteins evaluated by immunoblotting.

Rpn11 as a bifunctional protein

The proteasome (26S) was considered for a long time to be a static garbage disposal unit for cellular waste. Because of its modular and dynamic composition, it is now recognized as a multifaceted mediator of many essential cellular processes involving proteolytic and nonproteolytic mechanisms (Demartino and Gillette, 2007). We have already shown that a small fraction of Rpn11 and most of Rpn11-m1 were associated with mitochondria-enriched pellets after cellular fractionation (Rinaldi et al., 2008). A deeper purification of the mitochondrial fraction with sucrose step gradients confirms the mitochondrial localization, but also reveals a peroxisomal localization of these proteins. This suggests that a subpopulation of Rpn11 might interact dynamically with both

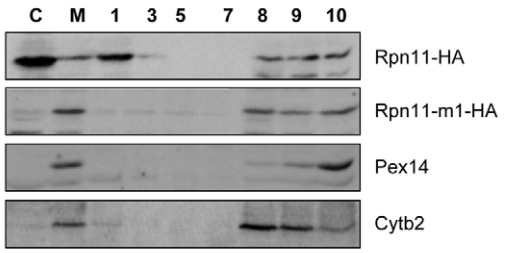

Fig. 9. Subcellular localization of Rpn11 and Rpn11-m1. Organelle pellets (mitochondrial-enriched pellets) from yeast expressing the Rpn11 and Rpn11-m1 proteins tagged with 3×HA at their chromosomal locus were further purified and separated by sucrose equilibrium density gradient centrifugation. Fraction C represents the cytosolic extract before the mitochondrial enriched pellet (M) was collected. Fractions 1 to 10 represent the top to the bottom of the gradient, respectively. Aliquots of each gradient fraction were separated by SDS-PAGE and probed with polyclonal antibodies against cytochrome b2 (mitochondrial intermembrane space) and Pex14 (peroxisomal membrane peroxin). Rpn11-HA and Rpn11-m1-HA were detected with a monoclonal anti-HA antibody.

Journal of Cell Science

Journal of Cell Science

organelles and that Rpn11-m1 is associated more stably than the full-length protein. These localization data support an important function of Rpn11 at mitochondria and peroxisomes in the fission process of both organelles. We propose that the dissociation of Rpn11 from the proteasome or the independent role of Rpn11 on the Fis1-dependent division machinery allows Rpn11 to act as a 'moonlighting protein' (Gancedo and Flores, 2008). However, we do not know whether Rpn11 acts on the membrane fission process alone or in combination with other lid subunits or in a completely new complex. Experiments are in progress to address this question.

Regulation of the mitochondrial and peroxisomal fission machinery

Peroxisomes have been shown to multiply in response to mitochondrial dysfunction (Butow and Avadhani, 2004; Motley et al., 2008). In glucose, an increased number of peroxisomes are observed in cells impaired in respiration for different reasons (metabolic *atp7* mutant or loss of mtDNA *mgm1* mutant) (Motley et al., 2008). Interestingly, the *rpn11-m1* cells for which we previously showed a defect in the rate of respiration (Rinaldi et al., 2008), do not present an abnormal number of peroxisomes in glucose compared with numbers in wild-type cells. Thus, the huge increase of peroxisome number in *rpn11-m1* in oleate is not a consequence of the mitochondrial dysfunction of these cells and points to a specific regulatory role of Rpn11 on the fission machinery.

Here, we show that *rpn11-m1* mitochondria are highly fragmented in glucose, whereas the peroxisome number was normal in these conditions. The increase in peroxisome number was only observed in oleate. However, by artificially redirecting Fis1 to peroxisomes, we showed that the effect of Rpn11-m1 on peroxisome number was then clearly observed in glucose. Because Fis1 is present predominantly at the mitochondrial surface and very few to peroxisomes when cells are grown in glucose (Kuravi et al., 2006), these results suggest that the Fis1 localization, which has a pivotal role in distribution of Dnm1 for fission, might be differentially controlled in cells grown in glucose and oleate. Furthermore, as the steady state levels of Fis1 in oleate and glucose (Fig. 5) and turnover of Fis1 and Dnm1 (Fig. 8) do not change in *rpn11-m1* cells, these data imply that the Fis1 and/or Dnm1 activity is exacerbated.

The fact that Fis1, and both Vps1 and Dnm1, are required for the *rpn11-m1* increase in peroxisome number is surprising, because Fis1 is thought to act with Dnm1 and not with Vps1. Unfortunately, the absence of the two other fission factors Mdv1 and Caf4 could not be examined because deletion of *CAF4* in the *rpn11-m1* context is deleterious to cells in the peroxisome-inducing condition (oleate). This result indicates that Mdv1 and Caf4 might not be functionally redundant for peroxisome fission in oleate, unlike in glucose (Motley et al., 2008). Thus, the currently accepted fission pathway in cells grown in glucose could somehow differ in peroxisome-inducing conditions. More experiments are needed to address this very interesting question.

Recently, a new model for the assembly of the fission machinery has been proposed in yeast (Wells et al., 2007) that could be conserved in humans (Serasinghe and Yoon, 2008). In this model, Fis1 binds directly to Dnm1 and to Mdv1 instead of Fis1 binding to Mdv1, which subsequently recruits Dnm1 to sites of scissions. Dnm1 binds directly to the concave surface of the Fis1 TPR-like domain and does so independently of Mdv1. Access to this Dnm1-binding site is masked by the N-terminal region (Fis1 arm) of Fis1 itself (Picton et al., 2009; Wells et al., 2007), thus negatively regulating access to the GTPase. In this scenario, the role of Mdv1 and Caf4 is unclear. Upon an unknown stimulus (protein binding, post-translational modification), the Fis1 arm autoinhibition might be relieved to allow Dnm1 binding and fission. It is possible that Rpn11 has a role in this regulatory process in concert with Mdv1, by controlling the relief of the Fis1 inhibitory arm. The mutated protein Rpn11-m1 would hold the Fis1 protein in an active state for Dnm1 binding. However, we cannot exclude the idea that Rpn11 participates in a yet unknown process that would activate directly Mdv1, which could further enhance Dnm1-binding to Fis1. Furthermore, a recent study in humans showed that FIS1 is able to form oligomers, a process that can also be negatively regulated by the FIS1 arm. This oligomerization is proposed to provide a site for DLP recruitment, serving as a template for DLP helical ring assembly and also possibly mediating the initial constriction of the membrane (Serasinghe and Yoon, 2008). It is possible that Rpn11-m1, by allowing oligomerization of Fis1, can recruit Dnm1 but also provides a suitable environment for Vps1 action at these constriction sites.

Finally, our findings indicate that peroxisomes and mitochondria share not only some basic characteristics but also a common regulation of their dynamics. These findings add further evidence that they are much closer than previously assumed, underlying the tight cooperation and crosstalk between both organelles. Interestingly, a lethal defect in peroxisomal and mitochondrial fission in mammals, which appears to be based on a point mutation in the dynamin-related DLP1 gene, has recently been described (Waterham et al., 2007).

Materials and Methods

Strains and growth conditions

The *S. cerevisiae* strains used in this study are listed in supplementary material Table S1. The double mutants used in this study were generated by mating of haploid strains, sporulation, and tetrad dissection except for the *Δvps1Δdnm1* strain (see below). YPD (1% bactopeptone, 1% yeast extract, and 2% glucose), YPG (1% bactopeptone, 1% yeast extract and 2% glycerol) were used as rich media. W0 (0.67% yeast nitrogen base without amino acids and 2% glucose) was used as minimal medium. Oleate induction medium (0.67% yeast nitrogen base without amino acids, 0.1% glucose, 0.1% oleate, 0.05% Tween 40, and 0.1% yeast extract, pH 6.0) was used for peroxisome proliferation experiments. Whenever necessary, media were supplemented with the appropriate nutritional requirements according to the strains. All media were supplemented with 2% bacto agar (Difco) for solid media. Yeast cultures were grown at 26°C, if not indicated otherwise. For oleate induction, cells are grown to log-phase in glucose and then shifted to oleate for 14 hours. When required, cells were further incubated for 6 hours in oleate at the nonpermissive temperature.

Construction of *Δdnm1Δvps1* strain

A URA3 cassette flanked by VPS1 sequences was generated by PCR using the plasmid pFL38 as template, and oligonucleotides VPS1up: 5′-ATGGATGAGCATTTAATTTCTACTATTAACAAGCTTCAGGgtcgggaaacctgtcgtgcc-3′ and VPS1dw: 5′-CTAAACAGAGGAGACGATTTGACTAGCGTTTCTCAATATcgcgttggccgattcattaat-3′ (upper case letters indicate nucleotides homologous to VPS1: 37 bp upstream of the ATG codon for VPS1up and 38 bp downstream of the VPS1 ORF for VPS1dw; lower case letters indicate nucleotides homologous to the plasmid pFL38). The resulting integration cassette was transformed into *Δdnm1* and *Δdnm1/rpn11-m1* strains, and correct integration was verified by PCR using external oligonucleotides.

Construction of PEX11-HA strains

The triple HA-KanMX cassette was generated by PCR using the plasmid pFA6a-3HA-KanMX6 (Longtine et al., 1998) as template, and oligonucleotides PEX11d: 5′-CACATCTATCCTTGGTATGCAAGACATGTGGAAAGCTACAcggatccccgggttaattaa-3′ and L29: 5′-AATTATAAAGAAGGGTCGAATCAAACATAAGCGGAGAATAGaattcgagctcgtttaaac-3′ (upper case letters indicate nucleotides homologous to the C-terminus of PEX11, 41 bp upstream of the stop codon for PEX11d and 40 bp downstream of the PEX11 ORF for L29; lower case letters indicate nucleotides homologous to the plasmid pFA6a-3HA-KanMX6). The resulting integration cassette was transformed into WT and rpn11-m1 strains, and correct integration was verified by PCR using external oligonucleotides.

Journal of Cell Science

Fluorescence microscopy and image treatment

For visualization of mitochondria, cells were transformed with pYX142-mtGFP or pYX232-mtGFP plasmid, which expresses GFP fused to a mitochondrial import sequence. For visualization of ER, cells were transformed with the pERG26-GFP-2 plasmid expressing GFP in fusion with the Erg26 protein of the ER. Cells were grown to mid-log phase in complete medium (YPD), washed in 1× PBS, transferred to slides and analyzed by fluorescence microscopy. For observations at high temperature, cells were shifted to 36°C for 6 hours.

For visualization of vacuoles, yeast cells were grown to mid-log phase in rich medium (YPD) at 26°C or 36°C for 4 hours. Cell pellets from 1 ml cultures were resuspended in 50 μl of rich media containing FM4-64 (Molecular Probes, final concentration 10 μM) and incubated at the temperature assay for 1 hour more, in the dark, with gentle shaking. Cells were chased in rich medium for 1.5 hours and resuspended in 1× PBS, transferred to slides and analyzed by fluorescence microscopy.

Actin network was visualized by adding 100 μl of a stationary phase culture (26°C) to 3 ml fresh rich medium (YPD) for 6 hours at the temperature assay. Cells were then fixed in 3.7% formaldehyde directly added to the medium for 30 minutes at room temperature. Cells were then washed twice with 1× PBS and resuspended in 1× PBS. 100 μl of cells were stained with 0.033 μM green-phalloidin (Molecular Probes) for 1 hour at room temperature in the dark and washed in 1× PBS, transferred to slides and analyzed by fluorescence microscopy.

To visualize peroxisomes, yeast strains were transformed with the plasmid pUG34DsRed.SKL expressing RFP fused to a PTS1 peroxisomal import sequence (SKL). Yeast cells were cultured overnight in minimal medium, then transferred in YPD or oleate and incubated overnight at 26°C. For thermosensitive mutants, cells were inoculated overnight in fresh oleate induction medium and shifted to assay temperature for 6 hours.

For quantitative determination of the number of fluorescent spots per cell, cells were fixed in 3.7% formaldehyde directly added to the medium for 20 minutes at 26°C or 36°C. Fluorescent spots were counted in single cells. In each quantification experiment, 200 cells were counted (100 cells from two independent cultures).

The slides were examined with a DMIRE2 microscope (Leica, Deerfield, IL). Filters for GFP (450/490 nm excitation and 500/550 nm emission) and TxRED (542/582 nm excitation and 604/644 nm emission) were used. Images were captured using a CCD camera (Roper Scientific, Tucson, AZ). Metamorph software (Universal Imaging, West Chester, PA) was used to deconvolute *Z*-series and treat the images. The cell wall was reconstructed by manual tracing the contours in the bright-field images.

Cycloheximide chase assay

Yeasts were grown in rich medium (YPD) at 26°C until reaching an OD_{600} of 1. Cycloheximide was added to a final concentration of 100 μg/ml. At the indicated times, 10 ml of the cultures were collected, harvested and TCA protein extraction was performed. Proteins in the samples were resolved on 10% or 16% SDS-PAGE gels, transferred to nitrocellulose membranes and analyzed by immunoblotting using the polyclonal anti-Fis1 (a gift from Doron Rapaport), anti-Fzo1 (a gift from Janet M. Shaw), anti-GFP (Roche) and anti-HA (BABCO) antibodies.

Cellular fractionation

For cell fractionation, yeast cells were grown overnight to mid-log phase (2×10^7 cells/ml) in rich galactose (2%) medium. Enriched mitochondria fraction was generated essentially as described previously (Rinaldi et al., 2008). Briefly, spheroplasts were generated by a 60-minute incubation at 30°C in 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1.35 M sorbitol, 1 mM EDTA containing Zymolyase 20T at 1.5 mg/g wet weight yeast. Spheroplasts were harvested by centrifugation (10 minutes at 2000 ***g***), washed twice in a solution of 20 mM Tris-HCl, pH 7.5, 1.35 M sorbitol, 1 mM EDTA and carefully resuspended in 1 ml chilled lysis buffer (0.7 M sorbitol, 50 mM Tris-HCl, pH 7.5, 2 mM EDTA) plus protease inhibitors (protease inhibitor cocktail; Roche Mannheim). Cell lysis was performed using 15 strokes of a 5 ml Dounce glass homogenizer, and unlysed cells, nuclei and cell debris were removed by centrifugation at 3000 ***g*** and 4°C for 10 minutes. The supernatant containing the crude yeast cell organelles was centrifuged at 15,000 ***g*** at 4°C for 15 minutes, and the crude organelle fraction was resuspended in a total volume of 500 ml of 0.6 M mannitol, 20 mM HEPES-KOH pH 7.4, 1 mM EDTA plus protease inhibitors. Purity of each organelle fraction was routinely determined by western blot analysis. For the separation of cell organelles, in particular to separate peroxisomes from mitochondria, the crude organelle fraction was layered on top of a sucrose step gradient consisting of 15, 23, 32, 50 and 60% sucrose in 20 mM HEPES-KOH pH 7.4, 1 mM EDTA. The sucrose gradient was centrifuged at 134,000 ***g*** at 4°C for 60 minutes in an SW41 rotor (Beckman) and the gradient was subsequently fractionated from the top. Each fraction (1 ml) was TCA precipitated (13% final) and proteins dissolved in protein loading buffer.

We are grateful to Doron Rapaport (Interfakultäres Institute für Biochemie, Tübingen, Germany), Janet M. Shaw (University of Utah School of Medecine, Salt Lake City, UT), Nurit Livnat-Levanon and Michael H. Glickman (Technion, Haifa, Israel), Ralf Erdmann (Institute für Physiologische, Bochum, Germany), Bernard Guiard (Centre de Génétique Moléculaire, Gif sur Yvette, France), Ewald H. Hettema (Department of Molecular Biology and Biotechnology, Sheffield, UK) and Ida van der Klei (GBB, University of Groningen, Haren, Netherlands) for their generous gifts of antibodies, plasmids, yeast strains and discussions. We also thank Monique Bolotin-Fukuhara (Institut de Génétique et Microbiologie, Orsay, France) for continuous support, invaluable discussions and critical comments on the manuscript. L.H. was supported by the French FRM (Fondation pour la Recherche Médicale).

References

Altmann, K. and Westermann, B. (2005). Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Biol. Cell* **16**, 5410-5417.

Baumeister, W., Walz, J., Zuhl, F. and Seemuller, E. (1998). The proteasome: paradigm of a self-compartmentalizing protease. *Cell* **92**, 367-380.

Bleazard, W., McCaffery, J. M., King, E. J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J. and Shaw, J. M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.* **1**, 298-304.

Braun, B. C., Glickman, M., Kraft, R., Dahlmann, B., Kloetzel, P. M., Finley, D. and Schmidt, M. (1999). The base of the proteasome regulatory particle exhibits chaperone-like activity. *Nat. Cell Biol.* **1**, 221-226.

Butow, R. A. and Avadhani, N. G. (2004). Mitochondrial signaling: the retrograde response. *Mol. Cell* **14**, 1-15.

Cerveny, K. L., McCaffery, J. M. and Jensen, R. E. (2001). Division of mitochondria requires a novel DMN1-interacting protein, Net2p. *Mol. Biol. Cell* **12**, 309-321.

Cohen, M. M., Leboucher, G. P., Livnat-Levanon, N., Glickman, M. H. and Weissman, A. M. (2008). Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of a mitofusin, a critical regulator of mitochondrial fusion. *Mol. Biol. Cell* **19**, 2457-2464.

Collins, G. A. and Tansey, W. P. (2006). The proteasome: a utility tool for transcription? *Curr. Opin. Genet. Dev.* **16**, 197-202.

Demartino, G. N. and Gillette, T. G. (2007). Proteasomes: machines for all reasons. *Cell* **129**, 659-662.

Durr, M., Escobar-Henriques, M., Merz, S., Geimer, S., Langer, T. and Westermann, B. (2006). Nonredundant roles of mitochondria-associated F-box proteins Mfb1 and Mdm30 in maintenance of mitochondrial morphology in yeast. *Mol. Biol. Cell* **17**, 3745-3755.

Fekkes, P., Shepard, K. A. and Yaffe, M. P. (2000). Gag3p, an outer membrane protein required for fission of mitochondrial tubules. *J. Cell Biol.* **151**, 333-340.

Ferdous, A., Gonzalez, F., Sun, L., Kodadek, T. and Johnston, S. A. (2001). The 19S regulatory particle of the proteasome is required for efficient transcription elongation by RNA polymerase II. *Mol. Cell* **7**, 981-991.

Fisk, H. A. and Yaffe, M. P. (1999). A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in Saccharomyces cerevisiae. *J. Cell Biol.* **145**, 1199-1208.

Gancedo, C. and Flores, C. L. (2008). Moonlighting proteins in yeasts. *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **72**, 197-210; table of contents.

Glickman, M. H. and Ciechanover, A. (2002). The ubiquitin-proteasome proteolytic pathway: destruction for the sake of construction. *Physiol. Rev.* **82**, 373-428.

Glickman, M. H., Rubin, D. M., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Baumeister, W., Fried, V. A. and Finley, D. (1998). A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell* **94**, 615-623.

Glickman, M. H., Rubin, D. M., Fu, H., Larsen, C. N., Coux, O., Wefes, I., Pfeifer, G., Cjeka, Z., Vierstra, R., Baumeister, W. et al. (1999). Functional analysis of the proteasome regulatory particle. *Mol. Biol. Rep.* **26**, 21-28.

Gonzalez, F., Delahodde, A., Kodadek, T. and Johnston, S. A. (2002). Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter. *Science* **296**, 548-550.

Griffin, E. E., Graumann, J. and Chan, D. C. (2005). The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J. Cell Biol.* **170**, 237-248.

Gurvitz, A., Hiltunen, J. K., Erdmann, R., Hamilton, B., Hartig, A., Ruis, H. and Rottensteiner, H. (2001). Saccharomyces cerevisiae Adr1p governs fatty acid beta-oxidation and peroxisome proliferation by regulating POX1 and PEX11. *J. Biol. Chem.* **276**, 31825-31830.

Halbach, A., Landgraf, C., Lorenzen, S., Rosenkranz, K., Volkmer-Engert, R., Erdmann, R. and Rottensteiner, H. (2006). Targeting of the tail-anchored peroxisomal membrane proteins PEX26 and PEX15 occurs through C-terminal PEX19-binding sites. *J. Cell Sci.* **119**, 2508-2517.

Heinemeyer, W., Gruhler, A., Mohrle, V., Mahe, Y. and Wolf, D. H. (1993). PRE2, highly homologous to the human major histocompatibility complex-linked RING10 gene, codes for a yeast proteasome subunit necessary for chrymotryptic activity and degradation of ubiquitinated proteins. *J. Biol. Chem.* **268**, 5115-5120.

Hermann, G. J., Thatcher, J. W., Mills, J. P., Hales, K. G., Fuller, M. T., Nunnari, J. and Shaw, J. M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biol.* **143**, 359-373.

Hilt, W. and Wolf, D. H. (1996). Proteasomes: destruction as a programme. *Trends Biochem. Sci.* **21**, 96-102.

Hilt, W., Heinemeyer, W. and Wolf, D. H. (1993). Studies on the yeast proteasome uncover its basic structural features and multiple in vivo functions. *Enzyme Protein* **47**, 189-201.

Hilt, W., Heinemeyer, W. and Wolf, D. H. (1996). The proteasome and protein degradation in yeast. *Adv. Exp. Med. Biol.* **389**, 197-202.

Hitchcock, A. L., Auld, K., Gygi, S. P. and Silver, P. A. (2003). A subset of membrane-associated proteins is ubiquitinated in response to mutations in the endoplasmic reticulum degradation machinery. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **100**, 12735-12740.

Hoepfner, D., Schildknegt, D., Braakman, I., Philippsen, P. and Tabak, H. F. (2005). Contribution of the endoplasmic reticulum to peroxisome formation. *Cell* **122**, 85-95.

Jensen, R. E., Hobbs, A. E., Cerveny, K. L. and Sesaki, H. (2000). Yeast mitochondrial dynamics: fusion, division, segregation, and shape. *Microsc. Res. Tech.* **51**, 573-583.

Karbowski, M., Neutzner, A. and Youle, R. J. (2007). The mitochondrial E3 ubiquitin ligase MARCH5 is required for Drp1 dependent mitochondrial division. *J. Cell Biol.* **178**, 71-84.

Kleijnen, M. F., Kirkpatrick, D. S. and Gygi, S. P. (2007). The ubiquitin-proteasome system regulates membrane fusion of yeast vacuoles. *EMBO J.* **26**, 275-287.

Kobayashi, S., Tanaka, A. and Fujiki, Y. (2007). Fis1, DLP1, and Pex11p coordinately regulate peroxisome morphogenesis. *Exp. Cell Res.* **313**, 1675-1686.

Koch, A., Yoon, Y., Bonekamp, N. A., McNiven, M. A. and Schrader, M. (2005). A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol. Biol. Cell* **16**, 5077-5086.

Kuravi, K., Nagotu, S., Krikken, A. M., Sjollema, K., Deckers, M., Erdmann, R., Veenhuis, M. and van der Klei, I. J. (2006). Dynamin-related proteins Vps1p and Dnm1p control peroxisome abundance in Saccharomyces cerevisiae. *J. Cell Sci.* **119**, 3994-4001.

Lazarow, P. B. and Fujiki, Y. (1985). Biogenesis of peroxisomes. *Annu. Rev. Cell Biol.* **1**, 489-530.

Li, X. and Gould, S. J. (2003). The dynamin-like GTPase DLP1 is essential for peroxisome division and is recruited to peroxisomes in part by PEX11. *J. Biol. Chem.* **278**, 17012-17020.

Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, J. R. (1998). Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast* **14**, 953-961.

Marshall, P. A., Krimkevich, Y. I., Lark, R. H., Dyer, J. M., Veenhuis, M. and Goodman, J. M. (1995). Pmp27 promotes peroxisomal proliferation. *J. Cell Biol.* **129**, 345-355.

Mayor, T., Graumann, J., Bryan, J., MacCoss, M. J. and Deshaies, R. J. (2007). Quantitative profiling of ubiquitylated proteins reveals proteasome substrates and the substrate repertoire influenced by the Rpn10 receptor pathway. *Mol. Cell Proteomics* **6**, 1885-1895.

Motley, A. M. and Hettema, E. H. (2007). Yeast peroxisomes multiply by growth and division. *J. Cell Biol.* **178**, 399-410.

Motley, A. M., Ward, G. P. and Hettema, E. H. (2008). Dnm1p-dependent peroxisome fission requires Caf4p, Mdv1p and Fis1p. *J. Cell Sci.* **121**, 1633-1640.

Mozdy, A. D., McCaffery, J. M. and Shaw, J. M. (2000). Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J. Cell Biol.* **151**, 367-380.

Nagotu, S., Krikken, A. M., Otzen, M., Kiel, J. A., Veenhuis, M. and van der Klei, I. J. (2008a). Peroxisome fission in Hansenula polymorpha requires Mdv1 and Fis1, two proteins also involved in mitochondrial fission. *Traffic* **9**, 1471-1484.

Nagotu, S., Saraya, R., Otzen, M., Veenhuis, M. and van der Klei, I. J. (2008b). Peroxisome proliferation in Hansenula polymorpha requires Dnm1p which mediates fission but not de novo formation. *Biochim. Biophys. Acta* **1783**, 760-769.

Nakamura, A., Kitami, T., Mori, H., Mizuno, Y. and Hattori, N. (2006). Nuclear localization of the 20S proteasome subunit in Parkinson's disease. *Neurosci. Lett.* **406**, 43-48.

Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D. F. and Youle, R. J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* **183**, 795-803.

Neutzner, A. and Youle, R. J. (2005). Instability of the mitofusin Fzo1 regulates mitochondrial morphology during the mating response of the yeast Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* **280**, 18598-18603.

Otsuga, D., Keegan, B. R., Brisch, E., Thatcher, J. W., Hermann, G. J., Bleazard, W. and Shaw, J. M. (1998). The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.* **143**, 333-349.

Peng, Z., Shen, Y., Feng, S., Wang, X., Chitteti, B. N., Vierstra, R. D. and Deng, X. W. (2003). Evidence for a physical association of the COP9 signalosome, the proteasome, and specific SCF E3 ligases in vivo. *Curr. Biol.* **13**, R504-R505.

Picton, L. K., Casares, S., Monahan, A. C., Majumdar, A. and Hill, R. B. (2009). Evidence for conformational heterogeneity of fission protein Fis1 from Saccharomyces cerevisiae. *Biochemistry* **48**, 6598-6609.

Reed, S. H. and Gillette, T. G. (2007). Nucleotide excision repair and the ubiquitin proteasome pathway-do all roads lead to Rome? *DNA Repair (Amst.)* **6**, 149-156.

Rinaldi, T., Ricci, C., Porro, D., Bolotin-Fukuhara, M. and Frontali, L. (1998). A mutation in a novel yeast proteasomal gene, RPN11/MPR1, produces a cell cycle arrest, overreplication of nuclear and mitochondrial DNA, and an altered mitochondrial morphology. *Mol. Biol. Cell* **9**, 2917-2931.

Rinaldi, T., Ricordy, R., Bolotin-Fukuhara, M. and Frontali, L. (2002). Mitochondrial effects of the pleiotropic proteasomal mutation mpr1/rpn11: uncoupling from cell cycle defects in extragenic revertants. *Gene* **286**, 43-51.

Rinaldi, T., Pick, E., Gambadoro, A., Zilli, S., Maytal-Kivity, V., Frontali, L. and Glickman, M. H. (2004). Participation of the proteasomal lid subunit Rpn11 in mitochondrial morphology and function is mapped to a distinct C-terminal domain. *Biochem. J.* **381**, 275-285.

Rinaldi, T., Hofmann, L., Gambadoro, A., Cossard, R., Livnat-Levanon, N., Glickman, M. H., Frontali, L. and Delahodde, A. (2008). Dissection of the carboxyl-terminal domain of the proteasomal subunit Rpn11 in maintenance of mitochondrial structure and function. *Mol. Biol. Cell* **19**, 1022-1031.

Rubin, D. M., Glickman, M. H., Larsen, C. N., Dhruvakumar, S. and Finley, D. (1998). Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *EMBO J.* **17**, 4909-4919.

Schauss, A. C., Bewersdorf, J. and Jakobs, S. (2006). Fis1p and Caf4p, but not Mdv1p, determine the polar localization of Dnm1p clusters on the mitochondrial surface. *J. Cell Sci.* **119**, 3098-3106.

Serasinghe, M. N. and Yoon, Y. (2008). The mitochondrial outer membrane protein hFis1 regulates mitochondrial morphology and fission through self-interaction. *Exp. Cell Res.* **314**, 3494-3507.

Sesaki, H. and Jensen, R. E. (1999). Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J. Cell Biol.* **147**, 699-706.

Sesaki, H. and Jensen, R. E. (2001). UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.* **152**, 1123-1134.

Shaw, J. M. and Nunnari, J. (2002). Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol.* **12**, 178-184.

Sone, T., Saeki, Y., Toh-e, A. and Yokosawa, H. (2004). Sem1p is a novel subunit of the 26 S proteasome from Saccharomyces cerevisiae. *J. Biol. Chem.* **279**, 28807-28816.

Sutovsky, P., Moreno, R. D., Ramalho-Santos, J., Dominko, T., Simerly, C. and Schatten, G. (1999). Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature* **402**, 371-372.

Thompson, W. E., Ramalho-Santos, J. and Sutovsky, P. (2003). Ubiquitination of prohibitin in mammalian sperm mitochondria: possible roles in the regulation of mitochondrial inheritance and sperm quality control. *Biol. Reprod.* **69**, 254-260.

Thorsness, P. E., White, K. H. and Fox, T. D. (1993). Inactivation of YME1, a member of the ftsH-SEC18-PAS1-CDC48 family of putative ATPase-encoding genes, causes increased escape of DNA from mitochondria in Saccharomyces cerevisiae. *Mol. Cell. Biol.* **13**, 5418-5426.

Tieu, Q. and Nunnari, J. (2000). Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J. Cell Biol.* **151**, 353-366.

Verma, R., Aravind, L., Oania, R., McDonald, W. H., Yates, J. R., 3rd, Koonin, E. V. and Deshaies, R. J. (2002). Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science* **298**, 611-615.

Waterham, H. R., Koster, J., van Roermund, C. W., Mooyer, P. A., Wanders, R. J. and Leonard, J. V. (2007). A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N. Engl. J. Med.* **356**, 1736-1741.

Wells, R. C., Picton, L. K., Williams, S. C., Tan, F. J. and Hill, R. B. (2007). Direct binding of the dynamin-like GTPase, Dnm1, to mitochondrial dynamics protein Fis1 is negatively regulated by the Fis1 N-terminal arm. *J. Biol. Chem.* **282**, 33769-33775.

Wong, E. D., Wagner, J. A., Gorsich, S. W., McCaffery, J. M., Shaw, J. M. and Nunnari, J. (2000). The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J. Cell Biol.* **151**, 341-352.

Yaffe, M. P. (1999). The machinery of mitochondrial inheritance and behavior. *Science* **283**, 1493-1497.

Yao, T. and Cohen, R. E. (2002). A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature* **419**, 403-407.

Yonashiro, R., Ishido, S., Kyo, S., Fukuda, T., Goto, E., Matsuki, Y., Ohmura-Hoshino, M., Sada, K., Hotta, H., Yamamura, H. et al. (2006). A novel mitochondrial ubiquitin ligase plays a critical role in mitochondrial dynamics. *EMBO J.* **25**, 3618-3626.

Journal of Cell Science

E. Résultats complémentaires.

1. Deux des partenaires de Rpn11 ne montrent pas de localisation mitochondriale.

Après fractionnement cellulaire, nous avions montré qu'une fraction de la protéine Rpn11 et que la majeure partie de Rpn11-m1 étiquetées au locus chromosomique avec des épitopes HA en C-terminal étaient retrouvées au niveau mitochondrial. Nous avons voulu savoir si deux autres protéines du lid du protéasome qui interagissent avec Rpn11 montraient une localisation similaire. Rpn5 et Rpn8 sont, avec Rpn6 et Rpn9, les sous-unités du lid qui interagissent avec Rpn11 dans un des modules d'assemblage du protéasome (Fig. 11, page 15). J'ai construit par croisement des souches *RPN11-HA/RPN8-GFP* ou *RPN5-GFP* et j'ai effectué une expérience de fractionnement cellulaire et de purification des mitochondries afin de localiser les sous-unités Rpn5-GFP et Rpn8-GFP (Fig. 47).

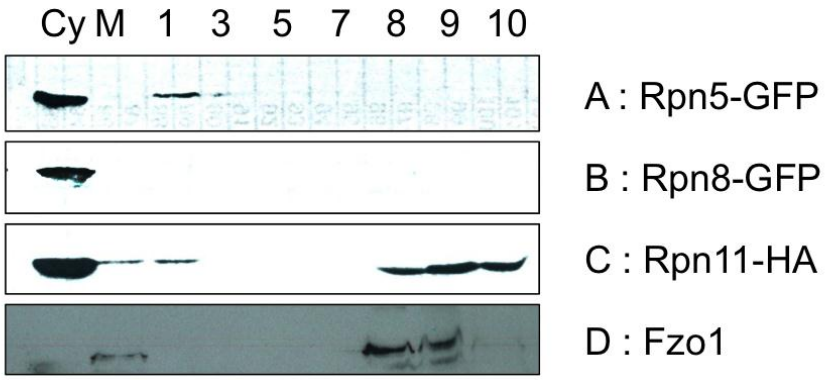

Figure 47 : Localisation subcellulaire de Rpn5-GFP et Rpn8-GFP.

Localisation de Rpn5-GFP (A) ou Rpn8-GFP (B) dans des souches *Rpn11-HA* (C) après fractionnement cellulaire. Les protéines ont été extraites puis les mitochondries (M) ont été enrichies par rapport au cytoplasme (Cy) avec plusieurs centrifugations différentielles. Les mitochondries ont ensuite été purifiées sur gradient de sucrose (1 à 10). Les protéines ont été précipitées au TCA puis analysées par western blot. La présence des mitochondries a été testée avec des anticorps anti-Fzo1 (D).

Après un fractionnement cellulaire, la localisation de Rpn5-GFP ou de Rpn8-GFP est identique : elle est uniquement cytosolique. Je n'ai pas retrouvé ces protéines dans les fractions enrichies en mitochondries. Après une purification sur gradient de sucrose des fractions enrichies en mitochondries, la protéine Rpn5-GFP est retrouvée dans la première fraction (qui contient des restes de membrane du RE) tandis que Rpn8-GFP en est absente (Fig. 47A-B). Parmi les protéines testées, la double localisation cytosolique et mitochondriale de Rpn11 semble donc être spécifique.

2. La délétion d'une sous-unité de l'appareil de fission a un impact inhabituel sur la morphologie mitochondriale observée dans la souche *rpn11-m1*.

Une souche dont un des gènes de l'appareil de fission a été supprimé présente des mitochondries incapables d'effectuer des évènements de fission et a donc une morphologie des mitochondries en forme de filet. La mutation *rpn11-m1* provoquant une augmentation des évènements de fission d'une façon dépendante de l'appareil de fission, nous avons voulu savoir si la morphologie mitochondriale d'une souche dont un des gènes de l'appareil de fission a été supprimé montrait toujours une forme de filet en présence de la mutation *rpn11-m1*. Avec une telle expérience, si l'appareil de fission est la seule cible de Rpn11 concernant la morphologie mitochondriale, nous devrions obtenir des mitochondries sous forme de filet (Fig. 28, page 39).

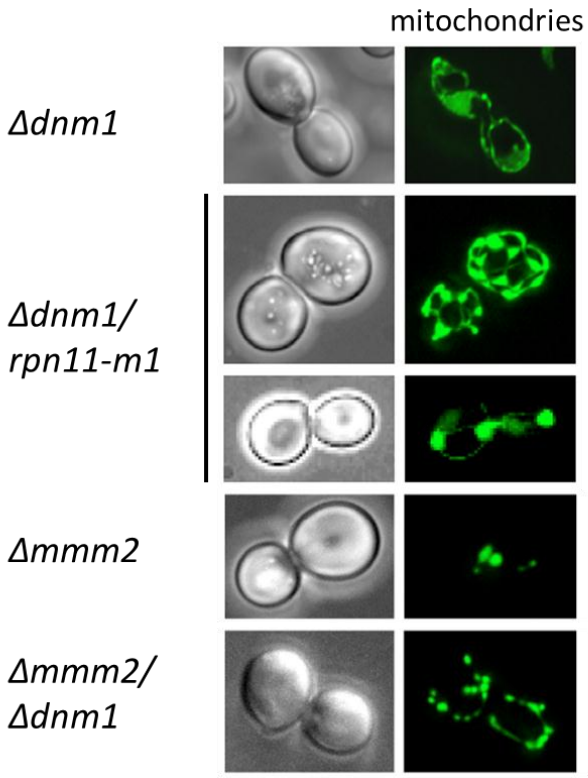

Figure 48 : Rpn11 est impliquée dans la tubulation.

Morphologie mitochondriale observée dans des cellules cultivées en YPD. Les cellules ont été transformées par un plasmide exprimant de la GFP avec une préséquence mitochondriale puis les cellules ont été observées par microscopie à fluorescence (droite) ou en contraste de phase (gauche). Adapté de (Rinaldi *et al.*, 2008).

Un simple mutant *Δdnm1* montre une morphologie mitochondriale en forme de filet (Fig. 48, ligne 1). Le double mutant *Δdnm1/rpn11-m1* (Fig. 48, ligne 2-3) ne présente pas la même morphologie qu'un simple mutant *Δdnm1* (Fig. 48, ligne 1) ; dans le double mutant, les mitochondries ne montrent pas une forme de filet mais présentent de très grosses

mitochondries reliées entre elles par ce qui semble être un « tubule » très fin (Fig. 48, ligne 2). Le phénotype de ce double mutant se rapproche de celui d'un double mutant *Δdnm1/Δmmm2* (Fig. 48, ligne 5) qui montre des mitochondries fragmentées mais qui peuvent aussi être reliées entre elles. Certaines cellules du double mutant *Δdnm1/rpn11-m1* présentent même un phénotype assez proche d'un simple mutant *Δmmm2* (Fig. 48, comparer ligne 3 et 4) avec quelques grosses mitochondries par cellule. Ces résultats sont équivalents lorsqu'il s'agit d'une délétion de *fis1* ou *mdv1* à la place de *dnm1*. Ainsi, Rpn11 ne semble pas agir uniquement sur la fission mitochondriale mais pourrait jouer aussi un rôle sur la tubulation des mitochondries.

3. Rpn11 ne semble pas interagir avec l'appareil de fission.

a. Pas d'interaction mise en évidence par pulldown.

Le domaine C-terminal de Rpn11 exprimé en *trans* est capable de corriger les défauts mitochondriaux de *rpn11-m1*. J'ai donc choisi d'utiliser les domaines C-terminaux des protéines Rpn11 et Rpn11-m1 pour éviter de provoquer des interactions avec tous les partenaires connus de Rpn11 au sein du protéasome puisque la plupart des interactions entre Rpn11 et les sous–unités du protéasome se font au moyen du domaine MPN N-terminal. De plus, comme le domaine C-terminal de Rpn11 est suffisant pour complémenter les défauts mitochondriaux de la souche *rpn11-m1*, cela signifie que ce domaine est suffisant pour l'interaction avec la cible qui permet à Rpn11 de réguler l'activité de l'appareil de fission. J'ai donc construit les plasmides permettant l'expression de la « **G**lutathion-**S**-**T**ransferase » (GST) en fusion avec le domaine C-terminal de Rpn11 (GST-cRpn11). La GST est une enzyme qui a une forte affinité pour le glutathion. Cette propriété est utilisée lors d'une expérience de pulldown ; dans une telle expérience, le glutathion est fixé sur une molécule insoluble (dans notre cas le sépharose) ce qui permet la fixation de la GST et permet donc une purification des protéines fusion GST-protéine d'intérêt par des étapes d'incubation, de centrifugations et de lavages. Une expérience de pulldown peut être séparée en plusieurs étapes (qui peuvent être effectuées en parallèle pour les deux premières) :

- Expression et extraction de la protéine chimère GST- domaine C-terminal. Dans mon cas, cette expression a été effectuée dans des bactéries *E. coli* après une induction par l'IPTG car le plasmide utilisé possède le promoteur de l'opéron lactose inductible pour l'expression de la protéine d'intérêt.
- Extraction des protéines dont on souhaite tester l'interaction. Cette expression peut se faire dans l'organisme d'intérêt ou dans un système hétérologue. Dans mon cas, j'ai utilisé trois souches de levure qui expriment les protéines Dnm1, Mdv1 ou Caf4 avec

un tag GFP en C-terminal et dont la transcription se fait à partir du locus chromosomique. J'ai aussi utilisé une souche *W303* transformée avec un plasmide surexprimant la protéine Fis1 avec un tag HA en N-terminal.

- Purification des protéines chimères GST-domaine C-terminal par la mise en présence des billes de sépharose complexées avec le glutathion puis lavages.
- Incubation des extraits de levure sur les billes de sépharose couplées aux protéines d'intérêts.
- Lavages des billes puis électrophorèse sur SDS-PAGE et western blot (Fig. 49).

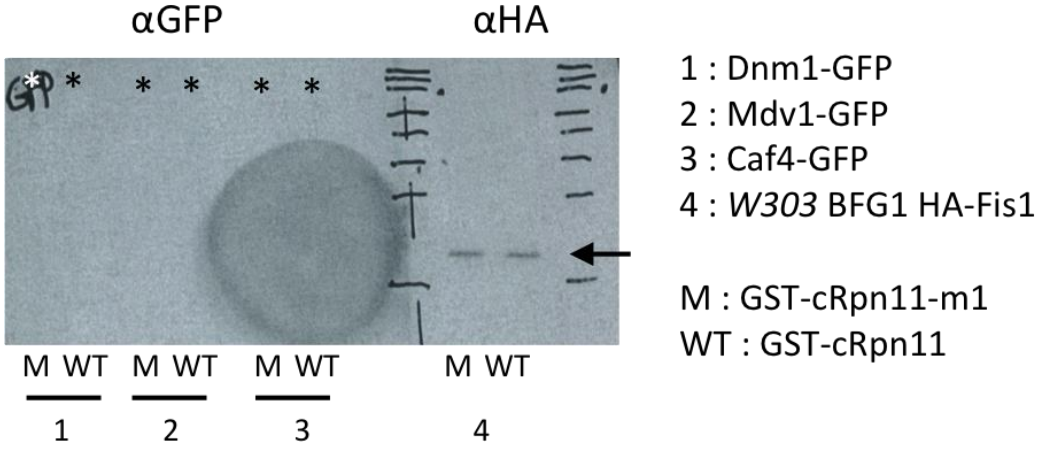

Figure 49 : Pulldowns avec les sous-unités de l'appareil de fission.

Les domaines C-terminaux sauvage (GST-cRpn11) et mutant (GST-cRpn11-m1) en fusion avec de la GST purifiés sur des billes de sépharose liées à du glutathion ont été mis en présence de lysats provenant des souches exprimant les diverses sous-unités de l'appareil de fission en fusion avec un tag GFP C-terminal (Dnm1, Caf4, Mdv1) ou HA N-terminal (Fis1). Les billes de sépharose ont ensuite été lavées puis la présence des protéines d'intérêt a été analysée par western blot. Les étoiles indiquent la position attendue des protéines Dnm1-GFP ; Mdv1-GFP et Caf4-GFP. La flèche indique la taille attendue de la protéine HA-Fis1.

Je n'ai pas testé l'induction des plasmides au sein des bactéries mais j'ai vérifié la purification des protéines GST-C-terminal Rpn11 ou Rpn11-m1 après le lavage des billes. Dans tous les cas, la présence de protéine avec la masse attendue est observée laissant supposer que l'induction a été effective (Fig. 50, flèches). Les diverses souches de levures exprimant les protéines que je souhaite tester ayant déjà été utilisées plusieurs fois sans problème, je n'ai pas testé la présence de ces protéines dans les extraits totaux.

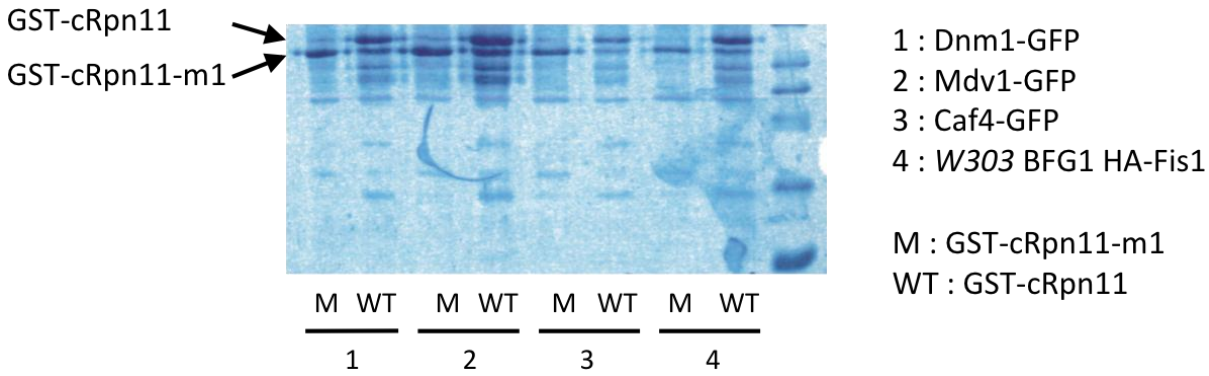

Figure 50 : Vérification de la présence des protéines chimères appât.

La présence des domaines C-terminaux sauvage (GST-cRpn11) et mutant (GST-cRpn11-m1) en fusion avec de la GST purifiés sur des billes de sépharose après incubation avec les extraits de levure et lavage a été testée par une coloration au bleu de Coomassie.

Les protéines Dnm1-GFP ; Mdv1-GFP et Caf4-GFP ne semblent montrer aucune interaction avec les domaines C-terminaux (Fig. 49). Par contre, j'ai retrouvé une interaction potentielle entre la protéine HA-Fis1 et les domaines C-terminaux. Afin de vérifier la spécificité de cette interaction, j'ai effectué cette expérience avec les contrôles nécessaires qui manquaient dans cette expérience (Fig. 51).

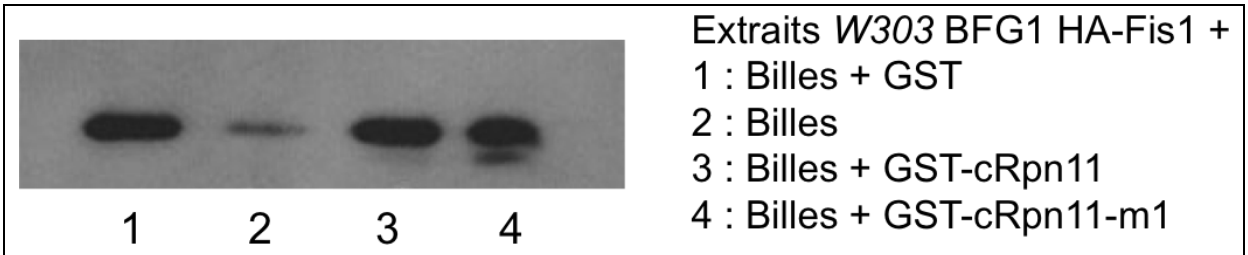

Figure 51 : Pulldown de HA-Fis1.

Les extraits d'une souche *W303* surexprimant la protéine Fis1 portant un tag HA en N-terminal ont été mis au contact des domaines C-terminaux de la protéine Rpn11 et Rpn11-m1 ainsi que des contrôles. Les billes de sépharose ont ensuite été lavées puis la présence de la protéine d'intérêt a été analysée par western blot avec un anticorps anti-HA.

Les contrôles effectués par une incubation avec les billes de sépharose-glutathion seules ou avec de la GST seule montrent que la protéine HA-Fis1 est « collante » et qu'il n'est pas possible de conclure quant à une interaction éventuelle entre cette protéine et les domaines C-terminaux.

b. L'appareil de fission n'est pas requis pour la localisation de Rpn11 et Rpn11-m1 à la mitochondrie.

Je n'ai pas pu mettre en évidence d'interaction entre le domaine C-terminal de Rpn11 et les différentes protéines de l'appareil de fission mitochondrial par pulldown, la protéine Fis1 étant un potentiel bon candidat pour la régulation de l'appareil de fission par Rpn11 mais étant « collante », j'ai voulu effectuer une autre expérience, moins directe, pour tester cette

éventualité. Pour cela, j'ai choisi le fractionnement cellulaire dans des souches délétées pour Fis1. Puisque Fis1 recrute tout l'appareil de fission sur les sites de fission, si Rpn11 nécessite un appareil de fission fonctionnel pour sa localisation ; l'absence de Fis1 devrait entrainer la relocalisation dans le cytoplasme de Rpn11 qui sera visible en fractionnement cellulaire. Le principe est exactement le même concernant la version mutante de Rpn11.

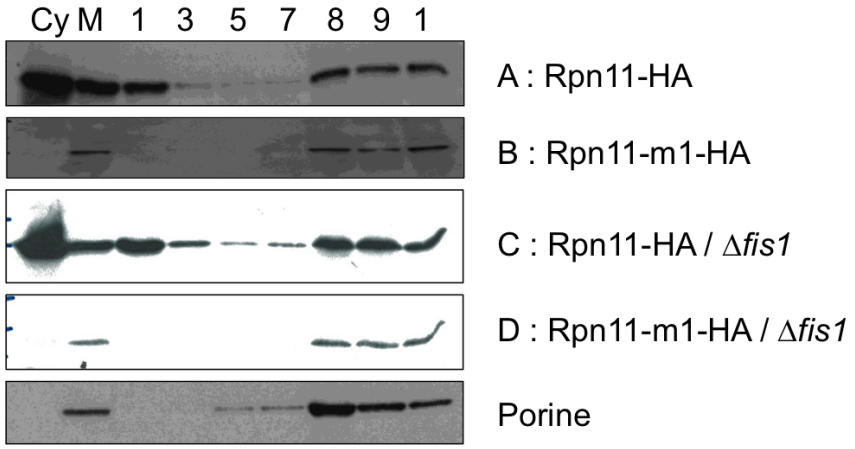

Figure 52 : Localisation subcellulaire de Rpn11 dans des souches *Δfis1*.

Localisation de Rpn11 ou Rpn11-m1 avec un tag HA en présence ou absence de Fis1 après fractionnement cellulaire. Les protéines ont été extraites puis les mitochondries (M) ont été enrichies par rapport au cytoplasme (Cy) avec plusieurs centrifugations différentielles. Les mitochondries ont ensuite été purifiées sur gradient de sucrose (1 à 10). Les protéines ont été précipitées au TCA puis analysées par western blot. La présence des mitochondries a été testée avec des anticorps anti-porine.

Après un fractionnement cellulaire, la localisation de Rpn11-HA est principalement cytosolique (Fig. 52, Cy) mais aussi dans la fraction enrichie en mitochondries (Fig. 52, M). Après une purification sur gradient de sucrose des fractions enrichies en mitochondries, la protéine est retrouvée dans la première fraction (membrane du RE) mais surtout dans les trois dernières fractions qui contiennent les mitochondries (Fig. 52A, comparer avec la porine). La localisation de Rpn11-m1-HA est uniquement mitochondriale dans les deux cas (Fig. 52B). Lorsque j'ai effectué la même expérience dans des souches dont le gène *FIS1* avait été délété, je n'ai pas trouvé de différence de localisation de Rpn11-HA et Rpn11-m1-HA par rapport à des souches sauvage (Fig. 52, comparer A-C et B-D). Comme Fis1 recrute les autres sous-unités de l'appareil de fission sur les sites de fission, la localisation mitochondriale de Rpn11 ne nécessite pas la présence de l'appareil de fission.

4. Implication du complexe ERMES et du système ERAD dans la localisation mitochondriale de Rpn11.

Je n'ai pas trouvé de défaut directement lié à l'appareil de fission qui pourrait expliquer la localisation mitochondriale de Rpn11. La morphologie mitochondriale chez le

mutant en absence de fission mitochondriale (*Δfission/rpn11-m1*) montre des liens possibles avec l'appareil de tubulation. Il n'est pas impossible qu'un effet de Rpn11-m1 sur l'appareil de tubulation cause un défaut secondaire correspondant à l'activation de la fission chez *rpn11-m1*.

a. Analyse de l'implication du complexe ERMES dans la localisation mitochondriale de Rpn11.

J'ai décidé de faire des expériences de localisation de Rpn11 ou *rpn11-m1* par fractionnement cellulaire dans des souches dont un gène d'une des sous-unités de l'appareil de tubulation a été délété.

Quelle que soit la sous-unité de l'appareil de tubulation délétée dans la souche *RPN11-HA*, Rpn11-HA est toujours principalement localisée dans le cytosol et légèrement aux mitochondries. Après purification des fractions enrichies en mitochondries, cette localisation est toujours présente majoritairement dans les trois dernières fractions correspondantes aux mitochondries purifiées (Fig. 53, ligne 1-4 et comparer avec la figure 52A). Le complexe ERMES n'est donc pas à l'origine de la localisation mitochondriale de Rpn11-HA.

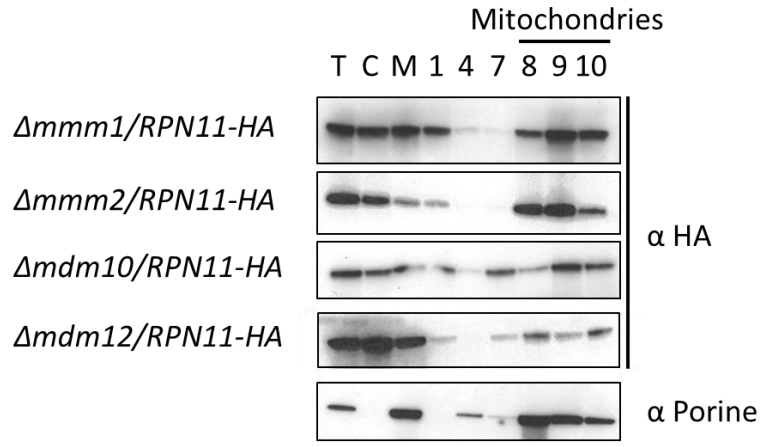

Figure 53 : Localisation de Rpn11-HA dans des souches *ΔERMES*.

Localisation de Rpn11 avec un tag HA en absence d'une sous-unité du complexe ERMES après fractionnement cellulaire. Les protéines totales ont été extraites (T) puis les mitochondries (M) ont été enrichies par rapport au cytoplasme (C) avec plusieurs centrifugations différentielles. Les mitochondries ont ensuite été purifiées sur gradient de sucrose (1 à 10). Les protéines ont été précipitées au TCA puis analysées par western blot. La présence des mitochondries a été testée par des anticorps anti-porine.

J'ai aussi effectué cette expérience en présence de la mutation *rpn11-m1*. Encore une fois, quel que soit la sous-unité de l'appareil de tubulation supprimée dans la souche, Rpn11-m1-HA est toujours uniquement localisée dans les fractions enrichies en mitochondries. Après purification des fractions enrichies en mitochondries, cette localisation est toujours présente

majoritairement dans les fractions correspondantes aux mitochondries purifiées (Fig. 54 et comparer avec la figure 52B). Le complexe ERMES n'est pas requis pour la localisation mitochondriale de Rpn11-m1-HA.

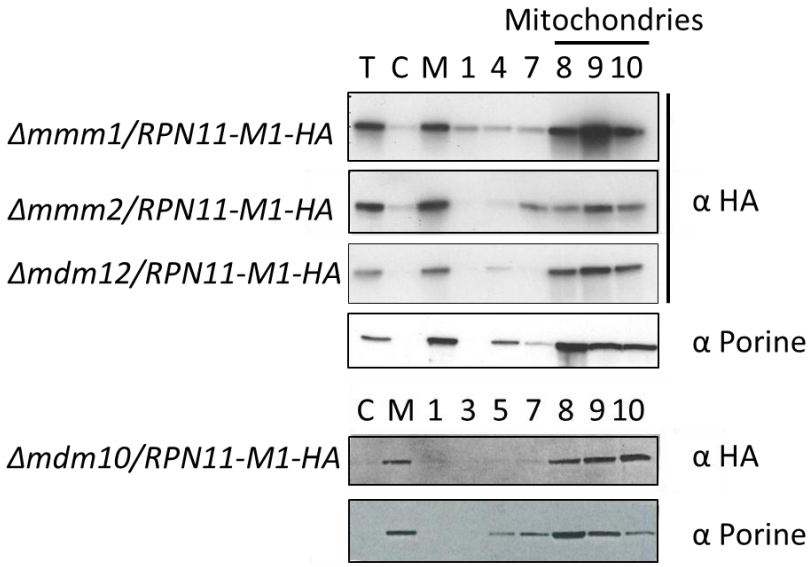

Figure 54 : Localisation de Rpn11-m1-HA dans des souches *ΔERMES*.

Localisation de Rpn11-m1 avec un tag HA en absence d'une sous-unité du complexe ERMES après fractionnement cellulaire. Les protéines totales ont été extraites (T) puis les mitochondries (M) ont été enrichies par rapport au cytoplasme (C) avec plusieurs centrifugations différentielles. Les mitochondries ont ensuite été purifiées sur gradient de sucrose (1 à 10). Les protéines ont été précipitées au TCA puis analysées par western blot. La présence des mitochondries a été testée par des anticorps anti-porine.

b. Un nouvel acteur potentiel : le système ERAD.

Ni les appareils de fission ou de tubulation ne sont responsables de la localisation mitochondriale de Rpn11. Il a été montré qu'en cas de stress oxydant, le système ERAD, qui extrait les protéines mal repliées situées dans le RE pour les dégrader par le protéasome, pouvait être délocalisé à la mitochondrie et former un système nommé MAD qui possède la même fonction que le système ERAD mais à la mitochondrie (Heo *et al.*, 2010). Cette délocalisation du système ERAD à la mitochondrie pourrait s'accompagner d'une délocalisation du protéasome, et donc de Rpn11, autour de la mitochondrie pour dégrader les protéines ciblées par le système MAD. Pour tester cette hypothèse, j'ai choisi de faire un fractionnement cellulaire dans des cellules *Δvms1*, la protéine qui est à l'origine de la localisation mitochondriale du système ERAD en cas de stress oxydant. En cas de stress oxydant, les cellules *Δvms1* montrent une accumulation des protéines ubiquitinées dans les fractions enrichies en mitochondries issues de fractionnement cellulaire, les cellules sont alors beaucoup plus dépendantes des protéases mitochondriales. La capacité de respiration de ces cellules est perdue assez rapidement et la mitophagie est augmentée (Heo *et al.*, 2010). Ces

phénotypes semblent donc indiquer que Vms1 ferait partie d'un système de contrôle qualité des mitochondries avec le protéasome pour effecteur final.

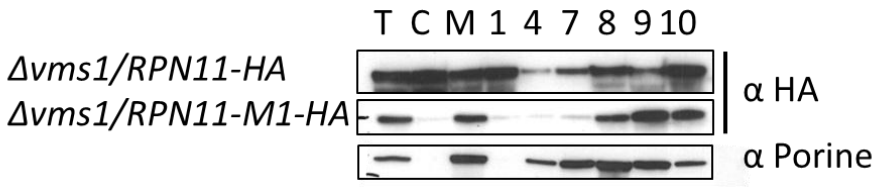

Figure 55 : Localisation de Rpn11-HA et Rpn11-m1-HA dans des souches *Δvms1*.

Localisation de Rpn11 et Rpn11-m1 avec un tag HA en absence de Vms1 après fractionnement cellulaire. Les protéines totales ont été extraites (T) puis les mitochondries (M) ont été enrichies par rapport au cytoplasme (C) avec plusieurs centrifugations différentielles. Les mitochondries ont ensuite été purifiées sur gradient de sucrose (1 à 10). Les protéines ont été précipitées au TCA puis analysées par western blot. La présence des mitochondries est indiquée par la porine.

Sans stress oxydant (Fig. 55), la protéine Rpn11-HA est toujours principalement localisée dans le cytosol et légèrement aux mitochondries tandis que Rpn11-m1-HA est toujours uniquement localisée dans les fractions enrichies en mitochondries. Après purification des fractions enrichies en mitochondries, la localisation des deux protéines est toujours observée majoritairement dans les fractions contenant les mitochondries purifiées. Un fractionnement cellulaire après un stress oxydant de 10 mM H_2O_2 dans le milieu de culture pendant 2h, suffisant pour relocaliser Vms1 à la mitochondrie (Heo *et al.*, 2010), a aussi été effectué pour un résultat identique. La protéine Vms1, en condition normale ou après un stress oxydant, n'est donc pas impliquée dans la localisation mitochondriale de Rpn11.

F. Conclusions.

Dans cette première partie de mon travail, nous avons montré que la souche *rpn11-m1* ne présentait que des défauts des peroxysomes et des mitochondries parmi les organites étudiés. Le défaut de fragmentation mitochondriale est lié à une augmentation de l'activité de fission qui se traduit par un nombre exacerbé de peroxysomes soit en condition d'induction oléate soit par la redirection totale de l'appareil de fission mitochondrial aux peroxysomes. D'autres mutants du protéasome ne montrent pas ce type de défaut, tout comme les mutants du domaine catalytique de Rpn11. L'activité de Rpn11 à la mitochondrie est donc spécifique à cette sous-unité et se fait en dehors de son activité au sein du protéasome. Nous avons aussi montré que l'activation de la fission n'était pas due à une déstabilisation de l'appareil de fission. Enfin, la localisation mitochondriale de Rpn11 n'est pas partagée avec deux de ses plus proches partenaires dans le lid, laissant supposer que la localisation mitochondriale de Rpn11 est indépendante de ses partenaires au sein du protéasome. Nous avons pu montrer que *rpn11-m1* présente ce phénotype en augmentant l'activité de l'appareil de fission de cet

organite sans affecter la fusion mitochondriale. Cette activité est indépendante du protéasome et est liée au domaine fonctionnel C-terminal de Rpn11. En essayant de connaître le mécanisme qui permet le recrutement de Rpn11 à la mitochondrie, j'ai pu mettre en évidence que l'appareil de fission, l'appareil de tubulation et Vms1 ne semblaient pas jouer un rôle dans ce recrutement.

Travaux – Chapitre II

II. Recherche d'interactants des domaines C-terminaux de Rpn11 et Rpn11-m1.

Nous avons commencé à rechercher le mécanisme de recrutement de Rpn11 à la mitochondrie par l'analyse des interactions avec les cibles qui nous semblaient les plus évidentes : les appareils de fission et de tubulation ainsi que la protéine à l'origine du système MAD. Il s'avère que ces cibles ne sont pas à l'origine de la localisation mitochondriale de Rpn11, rendant un peu plus complexe l'idée de la régulation de la fission mitochondriale par Rpn11. Nous avons donc décidé de rechercher les partenaires de Rpn11 par une approche plus globale avec une expérience de double hybride (Fromont-Racine *et al.*, 1997). J'ai utilisé les domaines C-terminaux sauvage et mutant qui sont des domaines fonctionnels pour la fonction mitochondriale de Rpn11 et qui vont permettre d'éviter toutes les interactions du domaine MPN avec des cibles plutôt reliées à sa fonction au sein du protéasome.

L'expérience de double hybride s'est faite par croisement des souches portant les appâts avec la banque FRYL (souche Y187, une aliquote nous a été fournie par A. Peyroche) qui est constituée de fragments d'ADN de 700 paires de bases en moyenne et clonés en fusion avec le domaine activateur de Gal4 dans un plasmide pACT2 puis introduits dans la souche *Y190* (Fromont-Racine *et al.*, 1997). Les $5*10^6$ clones de cette banque et les $13*10^6$ paires de base du génome de *S. cerevisiae* laissent supposer une fusion des fragments d'ADN dans le vecteur tous les 3 nucléotides du génome de *S. cerevisiae* permettant théoriquement une identification de tous les interactants possibles, si un nombre de clones suffisant est testé. Les domaines C-terminaux servant d'appât (les 100 derniers acides aminés de la version sauvage et son équivalent de la version mutée) ont été introduits dans le plasmide pGBKT7 en fusion avec le domaine de liaison à l'ADN de Gal4 contenu dans ce plasmide. Nous avons testé la capacité potentielle d'activation des appâts. Pour cela, un test de sensibilité au 3-amino-1,2,4,triazole (3-AT) pour la souche *Y190* transformée avec les plasmides pGBKT7 portant les constructions « appâts » croisée par la souche Y187 transformée avec le plasmide pACT2 vide. Le 3-AT est un inhibiteur compétitif du produit de l'enzyme His3 qui servira de rapporteur lors du crible. Après transformation de la souche *Y187* par les plasmides pGBKT7 portant une construction Gal4BD-cRpn11 ou Gal4BD-cRpn11-m1, la souche a été croisée avec l'aliquote de la souche *Y190* de signe sexuel opposé et contenant la banque FRYL. Les diploïdes sont sélectionnés sur un milieu ne permettant pas la croissance des haploïdes. Les tests pour identifier les diploïdes qui montrent une interaction positive spécifique entre les deux protéines chimères sont ensuite effectués.

Pour ce crible, il existe deux gènes rapporteurs : *HIS3* et LacZ. Ces deux gènes ont été placés sous le promoteur de *GAL1* inductible par le facteur de transcription Gal4, ce qui permettra leur induction en cas d'interaction entre les deux protéines hybrides. Le gène rapporteur LacZ est présent dans les souches *Y187* et *Y190* tandis que le gène rapporteur *HIS3* n'est présent que dans la souche *Y190*. Une première sélection des diploïdes a été effectuée sur un milieu déplété pour les acides aminé leucine/tryptophane/histidine. La leucine est le marqueur de sélection du plasmide pACT2 apporté par la souche *Y190*. Le tryptophane est le marqueur de sélection du plasmide pGBKT7 apporté par la souche *Y187*.

L'efficacité de croisement est d'environ 28% entre la souche *Y190* contenant la banque FRYL et la souche *Y187* portant la construction Gal4BD-cRpn11. Comme la banque FRYL est constituée de $5*10^6$ clones, que chaque aliquote de la banque contient $4*10^8$ cellules (soit environ 30 fois le génome complet de *S. cerevisiae*) et que nous avons obtenu environ 28% d'efficacité, cela signifie que nous avons couvert environ 8,5 fois le génome de *S. cerevisiae*. Cette efficacité de croisement entre la souche *Y190* contenant la banque FRYL et la souche *Y187* portant la construction Gal4BD-cRpn11-m1 n'a pu être calculée par oubli d'un contrôle. Après croisement, les souches ont été étalées sur un milieu avec une concentration adéquate de 3-AT. Les souches diploïdes poussant sur 3-AT et possédant une réponse positive pour le gène rapporteur LacZ après ajout de X-Gal par recouvrement ont été conservées. Le X-Gal est un composé aromatique qui pourra être hydrolysé par la β-galactosidase produite par le gène LacZ et qui donnera un composé bleu après l'oxydation du noyau indole libéré par cette réaction. Dans chaque croisement, un peu plus de 300 clones positifs ont été récupérés. Parmi ces clones une soixantaine sont devenus positifs en moins de deux heures après le recouvrement X-Gal, une centaine de plus est devenue positive en moins de quatre heures et le reste des clones est devenu positif en moins de six heures. Nous avons arrêté la recherche de clones au-delà de six heures.

Les plasmides pACT2 provenant de la banque dans les clones positifs ont été extraits des diploïdes. Pour confirmer l'interaction et tester l'interaction pour d'autres protéines fusion Gal4BD-C-terminal, les souches *Y190* haploïdes contenant les appâts ont été transformées avec les plasmides isolés. Un exemple de candidats intéressants est donné figure 56 (flèches). Ensuite, un séquençage suivi d'un BLAST a été effectué afin d'identifier les proies obtenues. La procédure exacte pour l'exécution complète de ce crible est décrite dans la publication de l'équipe créatrice de la banque (Fromont-Racine *et al.*, 1997).

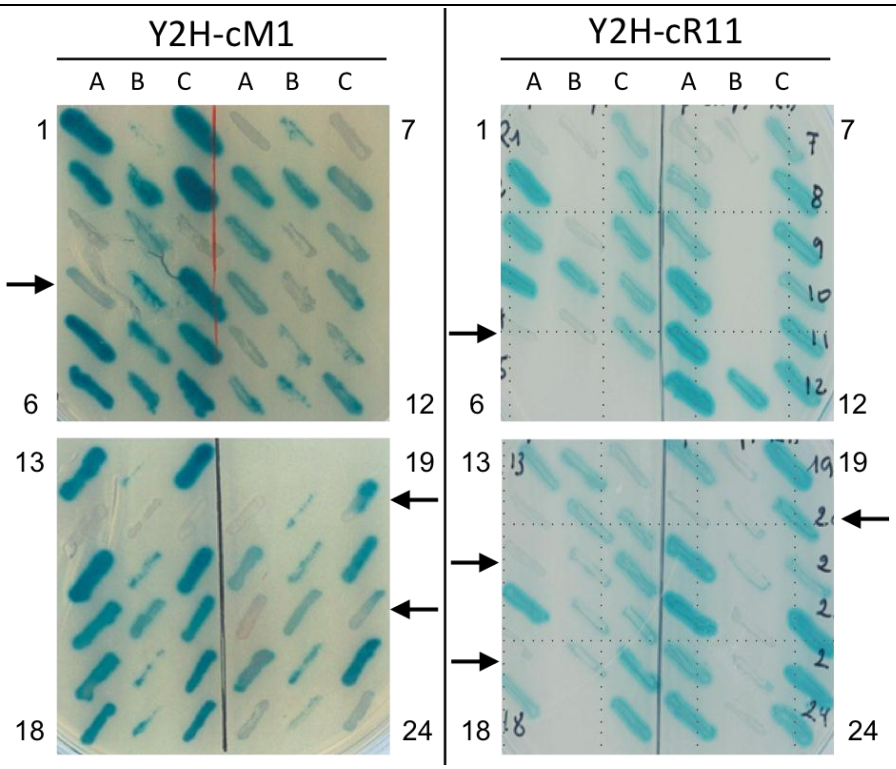

Figure 56 : Exemple de résultat pour la confirmation des interactions.

Les 24 premiers clones positifs obtenus à partir du crible double hybride effectué avec la construction Gal4BD-cRpn11 (Y2H-cR11) ou la construction Gal4BD-cRpn11-m1 (Y2H-cM1) ont été testés. Des souches Y190 transformées avec les plasmides pACT2 correspondant aux clones 1 à 24 dans chaque cas ont aussi été transformées avec des plasmides pGBKT7 vide (A), pGBKT7 cRpn11-m1 (B) ou pGBKT7 cRpn11 (C). Les clones qui se sont révélés intéressant à la suite de ce type de contrôle ont été séquencés.

A. Les interactants obtenus.

Parmi les plasmides pACT2 récupérés, nous avons fait séquencer 53 clones pour ceux issus des interactions avec le Gal4BD-cRpn11-m1 et 68 pour ceux issus des interactions avec le Gal4BD-cRpn11. Certains interactants sont retrouvés seulement avec le domaine C-terminal sauvage, d'autres seulement avec le domaine C-terminal mutant et enfin certains interagissent avec les deux à la fois (Bem2, Sld7 et Mpa43 ; Tab. 4). Parmi ces interactants, certains sont des protéines mitochondriales (Phb2, Mpa43 ; Tab. 4) dont une est une protéine de fonction inconnue (Mpa43, Tab. 4). Dans ce crible, certaines protéines candidates ont été retrouvées une seule fois (Tab. 4 en bleu clair). D'autres ont été retrouvées plusieurs fois mais en une seule fusion avec le domaine Gal4AD (Tab. 4 en bleu ciel). Les protéines candidates les plus intéressantes sont celles qui ont été retrouvées plusieurs fois en fusions différentes avec le domaine Gal4AD (Tab. 4 en bleu foncé). Plus le nombre de fusions différentes est important, plus l'interactant candidat semble sérieux et plus il est facile de localiser la zone d'interaction entre le domaine C-terminal et la protéine candidate.

Pour les expériences de confirmation d'interaction, les protéines retenues dans un premier temps sont celles qui ont été retrouvées plusieurs fois et qui présentaient plusieurs fusions différentes à l'exception de Nup42 et Pus9 retrouvés plusieurs fois en fusion unique.

Table 4 : Interactants obtenus avec le crible double hybride.

Table page suivante. Interactants obtenus après crible double hybride par croisement et séquençage. Dans la catégorie « commun », le nombre de fois où la protéine indiquée a été retrouvée en interaction est indiqué par X M1 pour le domaine C-terminal mutant et X R11 pour le domaine C-terminal sauvage dans la colonne « Positifs » (X étant un nombre). Le nombre de fusions différentes retrouvées pour cette protéine est indiqué dans la colonne « Fusions ». Par exemple, Duf1 (première ligne de cRpn11), a été retrouvée six fois en interaction positive avec le domaine C-terminal sauvage et en trois fusions distinctes. Bem2 (première ligne du commun), a été retrouvée deux fois en interaction positive avec le domaine C-terminal sauvage, deux fois en interaction positive avec le domaine C-terminal mutant et en quatre fusions distinctes au total.
Le nombre total de protéines présentées dans ce tableau est inférieur au nombre de séquençage effectués car beaucoup de séquençages montraient des séquences d'ADN ribosomique. La fonction des gènes donnés dans cette table est fournie en annexe I.

cRpn11-m1		
Protéine	Positifs	Fusions
ARP6	2	2
PUS9	3	1
BUL2	1	1
ECM21	1	1
EPS1	1	1
GDB1	1	1
GRH1	1	1
MAP2	1	1
PDC6	1	1
PIH1	1	1
POL1	1	1
RRN6	1	1
RRN7	1	1
RTT10	1	1
SHF1	1	1
SNX41	1	1
SOL2	1	1
TUP1	1	1
UBP1	1	1
YKU80	1	1
YDR374C	1	1
YNR071C	1	1
YPL216W	1	1

Commun		
Protéine	Positifs	Fusions
BEM2	2M1/2R11	4
SLD7	1M1/1R11	2
MPA43	2M1/2R11	2

cRpn11		
Protéine	Positifs	Fusions
DUF1	6	3
SRB4	4	3
PHB2	6	2
MAF1	3	2
RTA1	3	2
ADE1	2	2
ARA2	2	2
NUP42	9	1
CSN12	2	1
KGD1	2	1
VHR1	2	1
APM1	1	1
CNA1	1	1
GTT2	1	1
IOC2	1	1
KCC4	1	1
MRPL35	1	1
MRPS16	1	1
PCH2	1	1
PFY1	1	1
PHO81	1	1
POC4	1	1
RSC1	1	1
SAW1	1	1
SHE4	1	1
SSQ1	1	1
TRS120	1	1
UPC2	1	1
VPS25	1	1
YVH1	1	1
ZPR1	1	1

Nous avons entrepris de tester l'interaction des proies avec les protéines Rpn11 et Rpn11-m1 entières. Malheureusement, la plupart des doubles transformations de la souche Y190 avec les divers plasmides pGBKT7 et divers plasmides pACT2 effectuées lors de cette expérience n'a donné aucun transformant. Toutefois, j'ai pu obtenir lors de cette expérience une confirmation assez intéressante concernant Nup42. Cette protéine est capable d'interagir avec Rpn11, RevA5 et Δcoil mais pas Rpn11-m1 (Fig. 57). La double transformation avec le plasmide pGBKT7 vide et pACT2 Nup42 dans la souche Y190 n'a pas fonctionné.

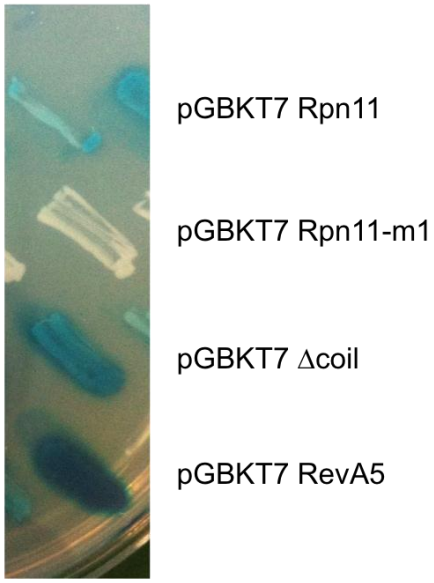

Figure 57 : Seul le mutant *rpn11-m1* semble incapable d'interagir avec Nup42.

La coloration bleue a été obtenue après recouvrement des repiquages des clones par du X-Gal et incubation à 30°C.

B. Confirmation des interactions.

Nous nous sommes attachés à tenter de confirmer les interactions pour plusieurs protéines présentées en table 5.

Protéine	Fonction
Bem2	Protéine RhoGAP impliquée dans le contrôle de l'organisation du cytosquelette ; requise pour l'émergence du bourgeon.
Duf1	Protéine avec une répétition WD40 qui interagit avec les protéines Ubp9 et Ubp13 ; sa fonction dans la déubiquitination joue un rôle à la mitochondrie ; la protéine fusionnée à la GFP est localisée dans le cytoplasme.
Mpa43	Protéine de fonction inconnue ; la protéine non taguée est localisée dans des mitochondries purifiées par des études à haut débit.
Nup42	Sous-unité du pore nucléaire ; impliquée dans le passage des ARN du noyau vers le cytoplasme ; localisée exclusivement dans la partie cytoplasmique du pore nucléaire.
Phb2	Sous-unité du complexe prohibitine ; impliquée dans la ségrégation mitochondriale.

Table 5 : Les premiers interactants que nous avons souhaité confirmer.

Les fonctions ont été obtenues à partir de http://www.yeastgenome.org/ et la fonction de la protéine Duf1 a été obtenue d'une publication récente : (Kanga *et al.*, 2012).

Les deux premières protéines testées furent Phb2 et Duf1. La confirmation de l'interaction s'est faite par co-immunoprécipitation. Cela consiste à immunoprécipiter, c'est-à-dire purifier, à partir d'un extrait total natif une protéine grâce à un anticorps dirigé contre celle-ci et d'essayer de retrouver ensuite la présence de l'autre partenaire. Pour ces expériences de co-immunoprécipitation, il a fallu construire des souches ou en transformer. Dans le cas de Duf1, la souche *DUF1-GFP* étiquetée au chromosome a été transformée par des plasmides permettant la surexpression de Rpn11 ou des domaines C-terminaux sauvage ou muté. Par contre, pour Phb2, la souche *PHB2-GFP* étiquetée au chromosome a été croisée avec des souches *RPN11-HA* ou *rpn11-m1-HA* elles aussi étiquetées au chromosome. Ensuite, les souches ont été mises en culture et des extraits cellulaires totaux natifs ont été effectués. Ces extraits ont été mis en contact d'anticorps anti-GFP qui vont donc interagir avec la protéine portant le tag GFP. Les anticorps vont alors être purifiés sur des billes d'agarose couplées avec de la protéine G, une protéine bactérienne capable de se lier aux chaines lourdes de certains anticorps. Les billes sont lavées et une analyse par migration sur SDS-PAGE et western blot a été entreprise.

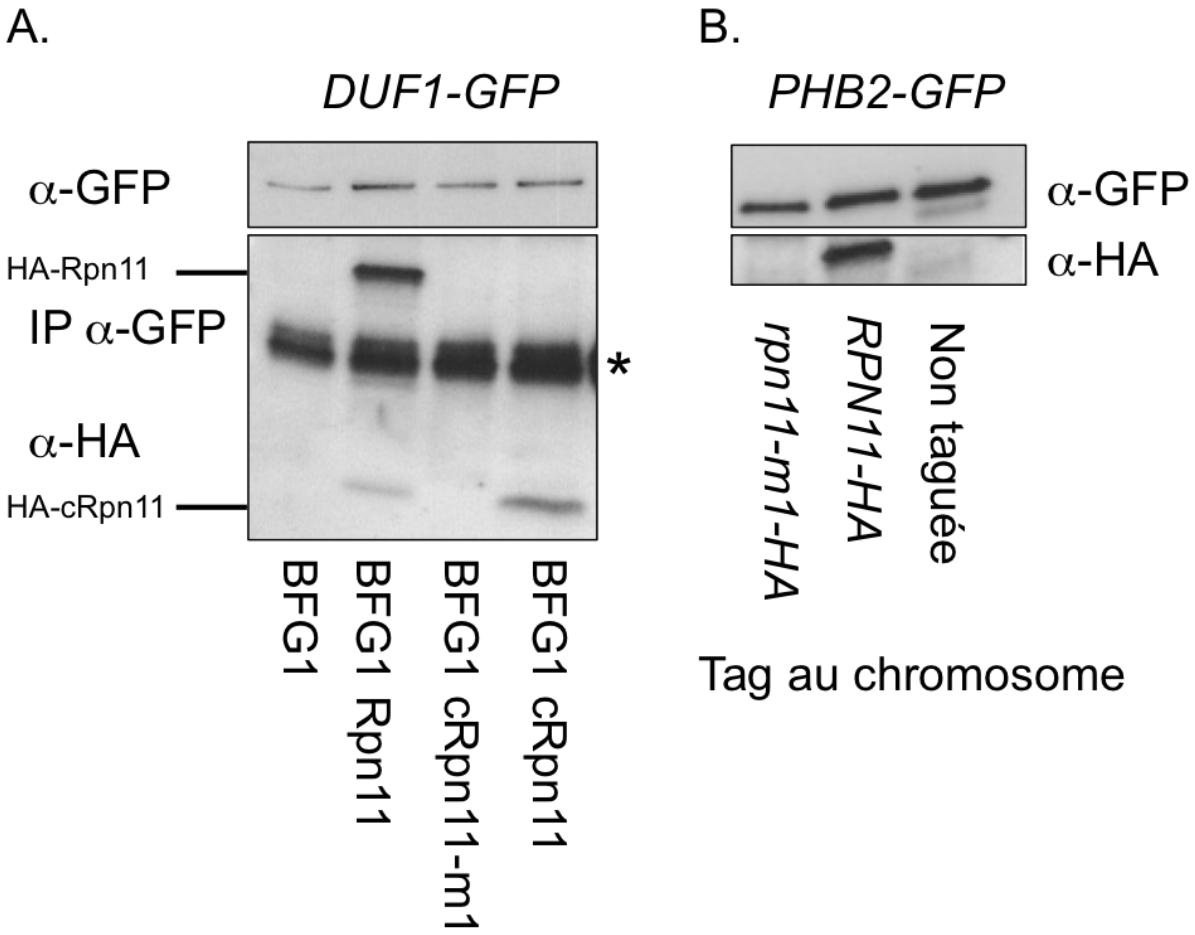

Figure 58 : Confirmation d'interaction pour Duf1 et Phb2.

A. Des souches *DUF1-GFP* transformées par des plasmides BFG1 portant la protéine Rpn11 entière (BFG1 Rpn11), le domaine C-terminal Rpn11 (BFG1 cRpn11) ou le domaine C-terminal mutant (BFG1 cRpn11-m1) ont été mises en cultures, les protéines ont été extraites puis immunoprécipitées avec des anticorps anti-GFP (IP α-GFP). * = chaines lourdes des anticorps anti-GFP.

B. Des souches *PHB2-GFP* portant la protéine Rpn11 ou Rpn11-m1 avec un tag HA ont été mises en cultures, les protéines ont été extraites puis immunoprécipitées avec des anticorps anti-GFP (IP α-GFP).

A la suite de l'immunoprécipitation, les protéines retenues ont été analysées par western blot avec des anticorps anti-GFP (α-GFP, panneau du haut) ou anti-HA (α-HA, panneau du bas).

Pour la protéine Duf1-GFP, les interactions avec Rpn11 et le domaine C-terminal de Rpn11 ont été confirmées (Fig. 58A, colonnes 2 et 4). En adéquation avec le crible double hybride, il n'y a pas d'interaction avec le domaine C-terminal de Rpn11-m1 (Fig. 58A, colonne 3). Pour la protéine Phb2-GFP, l'interaction avec Rpn11 est confirmée (Fig. 58B, colonne 2). En accord avec le crible double hybride, il n'y a pas d'interaction avec Rpn11-m1 (Fig. 58B, colonne 1).

Nous avons fait la même expérience avec d'autres souches étiquetées au chromosome. Pour ces expériences de co-immunoprécipitation, les souches *MPA43-GFP* ou *BEM2-GFP* étiquetées au chromosome contenant *RPN11-HA* ou *rpn11-m1-HA* tagués au chromosome ont

été construites. À des fins de contrôle et confirmation, la souche *DUF1-GFP* a aussi été croisée avec une souche *RPN11-HA*.

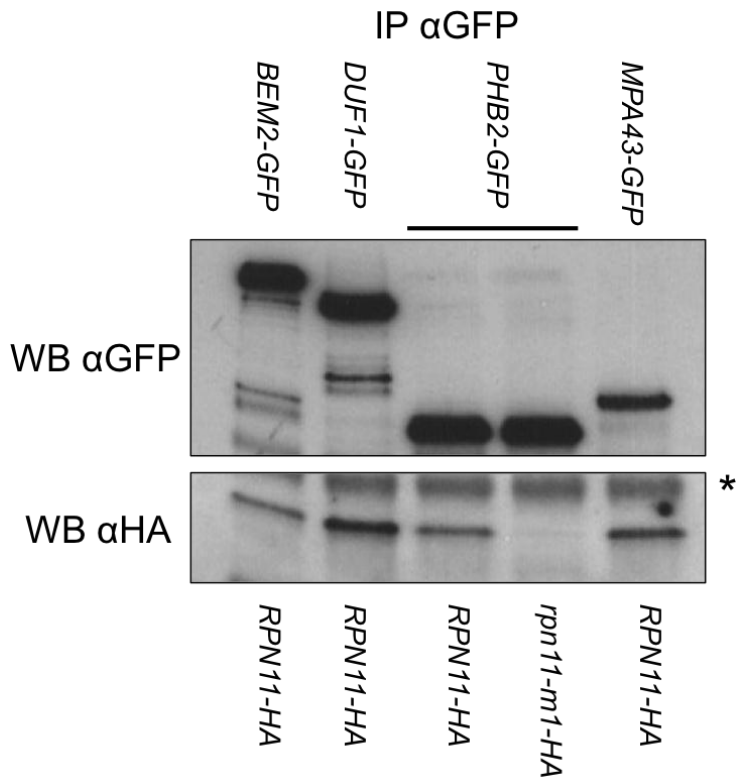

Figure 59 : Confirmation d'interaction pour Mpa43 et Bem2.

Des souches *BEM2-GFP*, *DUF1-GFP*, *PHB2-GFP*, *MPA43-GFP*, portant la protéine Rpn11 ou *rpn11-m1* avec un tag HA au chromosome ont été mises en cultures, les protéines ont été extraites puis immunoprécipitées avec des anticorps anti-GFP (IP αGFP). À la suite de l'immunoprécipitation, les protéines retenues ont été analysées par western blot avec des anticorps anti-GFP (WB αGFP, panneau du haut) ou anti-HA (WB αHA, panneau du bas). * = non spécifique.

Cette expérience a permis de confirmer l'interaction de Rpn11-HA avec Duf1-GFP, Phb2-GFP, Bem2-GFP et Mpa43-GFP (Fig. 59). Rpn11-m1-HA n'interagit pas avec Duf1-GFP et Phb2-GFP en accord avec l'expérience de double hybride (Fig. 59). L'interaction entre Rpn11-m1-HA et Mpa43-GFP ou Bem2-GFP n'a pas été testée.

Enfin, l'interaction avec Nup42, une protéine du pore nucléaire impliquée dans le passage des ARN du noyau vers le cytoplasme, a été étudiée puisque elle interagit avec le domaine C-terminal sauvage mais pas muté. Pour cette interaction, une méthode de pulldown a été utilisée car nous ne possédions pas la souche *NUP42-GFP* qui n'existe pas dans la banque commerciale de protéines avec un tag GFP en domaine C-terminal. Nous avons donc construit un plasmide permettant la surexpression de Nup42 avec des épitopes HA en N-terminal dans la levure puisque l'absence de cette protéine avec un tag GFP en C-terminal pouvait signifier une létalité ou une non fonctionnalité. Nous avons transformé des cellules de levure et effectué des extraits protéiques totaux. En parallèle, nous avons induit la production

de protéines fusion GST avec le domaine C-terminal de Rpn11, Rpn11-m1 ou bien la protéine Rpn11 entière dans des bactéries. Les protéines fusion GST ont été purifiées avec des billes de sépharose couplées au glutathion. Après lavage des billes, nous avons mis les extraits protéiques de levure en contact avec les billes. Les billes ont été de nouveau lavées puis une migration sur SDS-PAGE et un western blot ont été effectués.

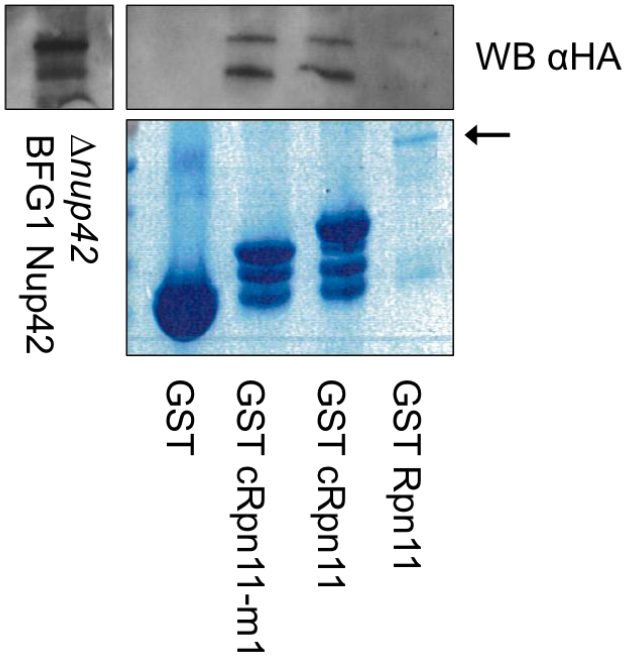

Figure 60 : Confirmation d'interaction avec Nup42.

Les extraits protéiques d'une souche de levure transformée avec un plasmide BFG1 permettant la surexpression de Nup42 portant des épitopes en N-terminal ont été mis en contact avec des extraits de bactéries ayant exprimé des protéines fusion GST avec Rpn11 (GST Rpn11) ou le domaine C-terminal de Rpn11 (GST cRpn11), de Rpn11-m1 (GST cRpn11-m1). Après récupération de l'éluat ; deux gels avec les mêmes dépôts ont été mis à migrer, l'un a été coloré au bleu de Coomassie (panneau du bas) et l'autre a été révélé par western blot avec des anticorps anti HA (panneau du haut). Une souche Δnup42 transformée par le plasmide permettant la surexpression de la protéine HA-Nup42 a permis d'effectuer un contrôle de l'expression de la protéine (panneau du haut, gauche)

L'interaction entre Nup42 et le domaine C-terminal de Rpn11 est confirmée (Fig. 60, colonne 3). Concernant une interaction avec la protéine Rpn11, nous n'avons pas pu mettre en évidence d'interaction de façon formelle. Nous ne pouvons exclure que cette interaction existe réellement puisque la production et/ou la purification de la protéine fusion GST-Rpn11 a eu un rendement trop faible (Fig. 60, colonne 4, flèche). Toutefois, on semble deviner la présence de Nup42 lors du western blot, laissant à penser que cette interaction existerait (Fig. 60, colonne 4). Étonnement, la protéine Nup42 interagit avec la protéine fusion GST-cRpn11-m1 alors que nous n'avons pas pu mettre en évidence une telle interaction par double hybride (Tab. 4, page 107 et Fig. 60, colonne 2).

C. Conclusions.

Le test de double hybride que nous avons mené a permis d'identifier de nouveaux interactants dont certains interagissent seulement avec le domaine C-terminal sauvage, d'autres seulement avec le domaine C-terminal mutant et enfin certains interagissent avec les deux à la fois. Parmi ces interactants, certains sont des protéines mitochondriales dont l'une est une protéine de fonction inconnue. Afin de confirmer ces différentes interactions trouvées en double hybride, nous avons testé par co-immunoprécipitation ou pulldown ces interactions pour les protéines qui nous semblaient les plus intéressantes. J'ai ainsi pu confirmer les interactions entre les protéines Duf1-GFP et HA-Nup42 avec le domaine C-terminal sauvage. Alors que je n'ai pas mis en évidence d'interaction entre le domaine C-terminal muté et Nup42, cette interaction semble avoir lieu par pulldown. J'ai aussi pu confirmer que des interactions trouvées entre le domaine C-terminal sauvage et les protéines Phb2, Mpa43, Duf1, Bem2 pouvaient s'effectuer avec la protéine Rpn11 entière. Ceci semble aussi possible pour Nup42 même si je ne peux formellement l'affirmer.

Travaux – Chapitre III

III. Étude du domaine C-terminal de Rpn11.

L'équipe et ses collaborateurs avait déjà mis en évidence l'importance du domaine C-terminal de Rpn11 pour la fonction mitochondriale de Rpn11 par la mise en évidence que la surexpression du domaine sauvage dans une souche mutante *rpn11-m1* est capable de complémenter tous les défauts de cette souche, faisant de ce domaine un domaine fonctionnel à part entière. J'ai voulu étudier plus finement ce domaine C-terminal dans l'optique de comprendre comment cette complémentation pouvait s'effectuer.

A. Détermination d'un domaine C-terminal minimum.

La taille du domaine C-terminal de Rpn11 équivalente aux 100 derniers acides aminés ayant été définie de façon assez arbitraire par l'exclusion du domaine JAMM et l'inclusion d'un domaine NES (« **N**uclear **E**xport **S**ignal ») putatif trouvé dans une thèse allemande que je n'ai pas réussi à retrouver *in silico*, j'ai voulu savoir quelle était la taille réelle suffisante que l'on pouvait attribuer au domaine C-terminal de Rpn11 pour remplir toutes ses fonctions. Pour cela, j'ai créé des peptides de 45, 60, 75 et 85 acides aminés (Fig. 61) qui seront surexprimés dans les levures à partir d'un plasmide BFG1. De plus, ce plasmide permet d'ajouter un tag HA en N-terminal des peptides.

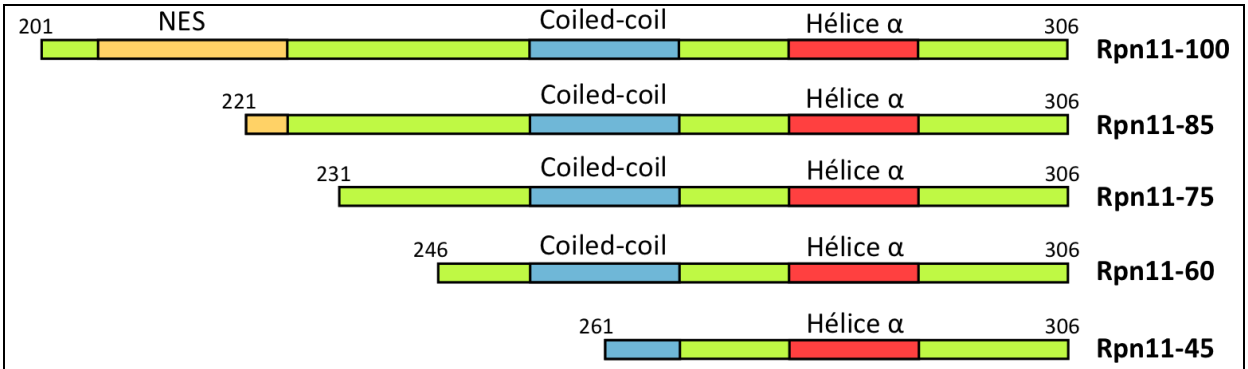

Figure 61 : Cartographie des domaines C-terminaux de Rpn11 de différentes tailles.

Détail des domaines C-terminaux de Rpn11 utilisés dans la détermination du domaine de taille minimum. NES : domaine « **N**uclear **E**xport **S**ignal » putatif que je n'ai pas retrouvé *in silico*.

1. Capacité de complémentation des peptides.

J'ai transformé des souches *W303* et *rpn11-m1* avec les plasmides permettant l'expression des peptides de différentes tailles. J'ai ensuite testé leur capacité de complémentation des défauts de croissance sur milieu YPD et YPG à 37°C.

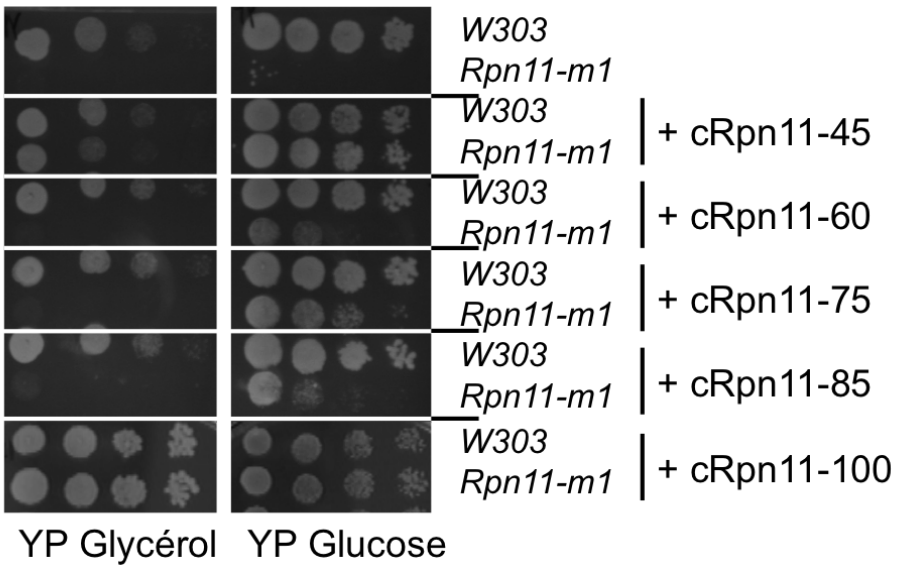

Figure 62 : Capacité de complémentation des peptides.

Dilution en série par pas de 10 après culture en YPD ON. La première goutte est ajustée à DO_{600} = 1. La capacité de complémentation des peptides a été testée à 37°C sur les milieux indiqués. Le peptide surexprimé dans les souches est indiqué par un nombre à côté des souches l'exprimant. Par exemple, sur la troisième ligne, la souche sauvage *W303* surexprime le domaine C-terminal de Rpn11 de 45 acides aminés.

Seul les peptides de 45 et 100 acides aminés sont capables de complémenter les défauts de croissance de la souche *rpn11-m1* sur milieux glucose et glycérol à 37°C. Les autres ne parviennent qu'à complémenter partiellement le défaut de croissance sur glucose et ne complémentent pas la croissance en glycérol à haute température (Fig. 62). Les domaines de 45 et 100 acides aminés sont les seuls à être parfaitement capables de complémenter les défauts de croissance. Ainsi, le domaine NES putatif et le domaine « coiled-coil » ne semblent pas nécessaires pour la complémentation en *trans* du défaut de croissance sur YPD et YPG de *rpn11-m1* par le domaine C-terminal de Rpn11. J'ai créé l'équivalent du domaine C-terminal de 45 acides aminés avec la mutation *rpn11-m1*. Ce domaine C-terminal ne fait donc que 25 acides aminés (c25) et n'est pas capable de complémenter en *trans* les défauts de *rpn11-m1*.

2. Expression des peptides.

Afin d'observer l'expression correcte de ces divers domaines C-terminaux dans les souches, j'ai extrait les protéines totales à 28°C puis effectué une analyse par western blot.

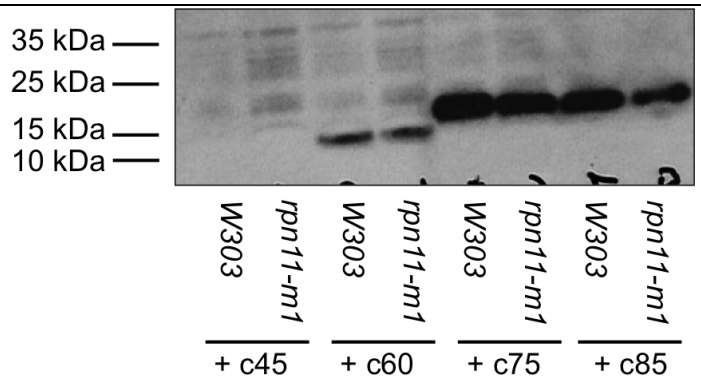

Figure 63 : Analyse des domaines C-terminaux par western blot.

Analyse de la quantité des domaines C-terminaux dans la souche sauvage (*W303*) ou mutante (*rpn11-m1*). Une même quantité de protéine est déposée pour l'analyse par western blot. Le peptide surexprimé dans les souches est indiqué par un nombre sous les souches l'exprimant. Par exemple, sur la troisième colonne, la souche sauvage *W303* surexprime le peptide domaine C-terminal de Rpn11 de 60 acides aminés.

Lors de cette analyse d'expression protéique par western blot avec des anticorps anti-HA, qui a été répétée plusieurs fois avec toujours les mêmes résultats, seules les souches qui surexpriment le domaine C-terminal de 85 acides aminés ne présentent pas de réelle surprise par rapport aux attentes. Dans ces souches, le domaine C-terminal est retrouvé en quantité comparable (en le comparant avec les signaux non spécifiques) et la migration s'effectue à la masse attendue (Fig. 63). Concernant la quantité, il n'y a pas de différence apparente pour les souches surexprimant la version de 75 acides aminés. Par contre, ce domaine C-terminal migre au niveau de celui de 85 acides aminés ce qui pourrait suggérer une modification post-traductionnelle du domaine C-terminal de 75 acides aminés (Fig. 63). Le résultat est cependant très différent pour les deux autres domaines C-terminaux. Celui de 60 acides aminés migre à la masse attendue mais la quantité retrouvée semble bien moindre que pour les domaines C-terminaux de 75 et 85 acides aminés. Ceci est valable dans les deux souches et laisse donc supposer que le phénomène n'est pas lié à la présence ou l'absence de la mutation *rpn11-m1* (Fig. 63). L'instabilité ou la diminution de l'expression qui semble être observée pour le domaine C-terminal de 60 acides aminés est encore exacerbée pour le domaine C-terminal de 45 acides aminés puisque je ne peux détecter ce domaine C-terminal dans les deux souches.

Le domaine C-terminal de 45 acides aminés est celui qui possède le meilleur potentiel de complémentation, j'ai voulu connaitre les conditions permettant d'observer la présence de cette protéine. La seule condition que j'ai trouvée pour observer ce domaine C-terminal consiste en l'utilisation d'une souche défectueuse pour l'assemblage du protéasome à haute température (Fig. 64). Cette souche nous a été fournie par A. Peyroche et possède une

mutation thermosensible du gène *HSM3*. Hsm3 est une chaperonne d'assemblage de la base du protéasome (Fig. 11, page 15 et (Le Tallec *et al.*, 2009)). À température non permissive, l'assemblage de la base du protéasome est défectueux et la quantité de protéasome 26S est très réduite. Cette expérience montre que le domaine C-terminal de 45 acides aminés est une cible de dégradation par le protéasome 26S. N'ayant jamais travaillé avec d'autres peptides surexprimés faisant moins de 60 acides aminés, cette dégradation pourrait être lié à un rôle très général du protéasome. En effet, le contrôle avec une souche transformée par le plasmide BFG1 vide codant 3 épitopes HA montre que ce phénomène existe aussi pour ces épitopes (Fig. 64). Enfin, même si ce domaine C-terminal de Rpn11 est cible d'une dégradation aspécifique par le protéasome, il possède un temps de demi-vie suffisant pour effectuer une complémentation des phénotypes défectueux de la souche *rpn11-m1*.

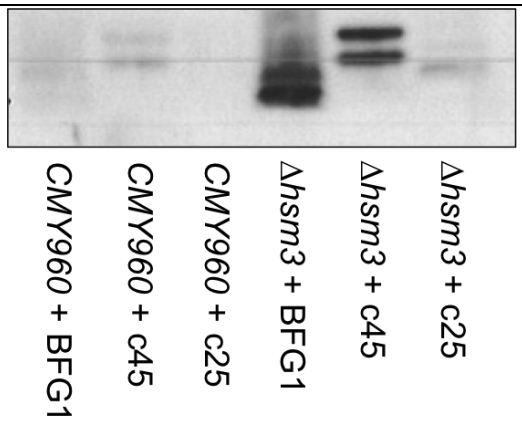

Figure 64 : Analyse du domaine C-terminal de 45 acides aminés par western blot.

Analyse de la quantité du domaine C-terminal de 45 acides aminés dans une souche thermosensible pour la protéine Hsm3 (appelée Δ*hsm3*) et dans son contexte isogénique *CMY960*. Les protéines totales ont été extraites après une croissance cellulaire à 28°C puis un shift à 37°C. Les souches ont été fournies par A. Peyroche. Le peptide surexprimé dans les souches est indiqué par un nombre à côté des souches l'exprimant. Par exemple, sur la troisième colonne, la souche sauvage *CMY960* surexprime le peptide domaine C-terminal de *rpn11-m1* de 25 acides aminés.

B. L'accessibilité du domaine C-terminal est importante.

J'ai souhaité localiser le domaine C-terminal *in vivo* par microscopie. Pour cela, j'ai construit des plasmides permettant l'expression des protéines fusion c100-GFP, c45-GFP, GFP-c45 et mCherry-c45-GFP.

Plusieurs fois lors de ma thèse, nous avons eu l'impression qu'il existait un clivage naturel du domaine C-terminal de Rpn11. Par exemple, cela s'est produit lors d'une immunoprécipitation (Fig. 65). Lors de cette expérience, je voulais vérifier que les anticorps que nous possédions étaient utilisables pour une immunoprécipitation. J'ai donc extrait les protéines d'une souche *W303* transformée par un plasmide BFG1 cRpn11-100-GFP

permettant la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 en fusion avec de la GFP et un tag HA en N-terminal. J'ai ensuite effectué une immunoprécipitation avec des anticorps anti-HA puis j'ai analysé les protéines immunoprécipitées après migration sur SDS-PAGE et western blot avec des anticorps anti-HA ou anti-GFP (Fig. 65). Dans cette expérience, il existe plusieurs types de protéines retrouvées dans l'extrait total et révélées par les anticorps anti-GFP ou anti-HA utilisés (Fig. 65, colonnes T). J'ai pu retrouver la protéine fusion HA-cRpn11-GFP révélée par les deux anticorps et retrouvée aussi dans la fraction immunoprécipitée (Fig. 65 colonnes F). J'ai aussi trouvé la protéine GFP seule révélée uniquement par l'anticorps anti-GFP et uniquement dans les extraits protéiques totaux. Il existe aussi une protéine de taille intermédiaire entre la GFP et la protéine fusion HA-cRpn11-GFP révélée uniquement par l'anticorps anti-GFP et retrouvée uniquement dans les extraits protéiques totaux. Enfin, une protéine de petite taille uniquement révélée par l'anticorps anti-HA et retrouvée aussi dans la fraction immunoprécipitée (Fig. 65, colonnes F). Avec l'aide du marqueur de masse moléculaire, j'ai pu trouver que l'addition de la masse moléculaire de la petite protéine possédant un tag HA qui a pu être immunoprécipitée avec la masse moléculaire de la protéine de taille intermédiaire donnait une masse moléculaire équivalente à celle de la protéine HA-cRpn11-GFP.

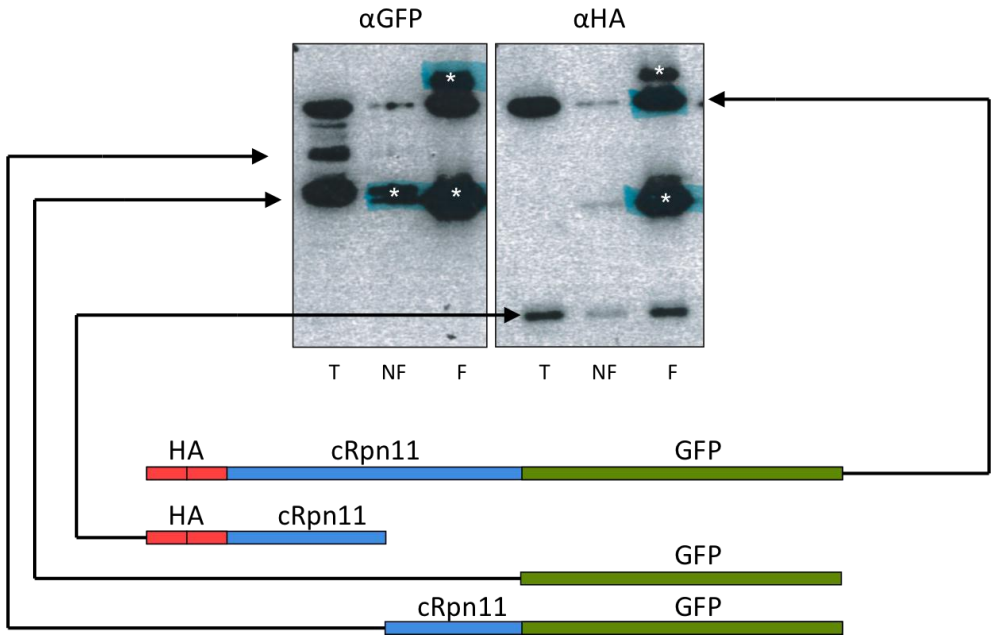

Figure 65 : Soupçon du clivage du domaine C-terminal de Rpn11 de 100 acides aminés.

Les protéines totales extraites d'une souche *W303* surexprimant le domaine C-terminal de Rpn11 en fusion avec de la GFP et un tag HA ont été soumises à une expérience d'immunoprécipitation. Le résultat a été analysé par western blot avec des anticorps anti-GFP (αGFP) ou anti-HA (αHA). T : protéines totales, NF : protéines après lavage non immunoprécipitées, F : protéines après lavage immunoprécipitées. * = chaines lourdes et légères des anticorps utilisés pour l'immunoprécipitation.

C'est pour tenter de savoir si ce phénomène pouvait avoir lieu *in vivo* que j'ai construit un plasmide permettant l'expression de la protéine mCherry-c45-GFP. J'ai donc effectué une localisation de la construction c45 ou c25 flanquée de la mCherry en N-terminal et de la GFP en domaine C-terminal (Fig. 66). Avec cette construction, le signal est assez diffus dans toute la cellule. Dans la souche mutante, il est possible que la construction soit un peu plus concentrée autour du noyau (Fig. 66A, lignes 3 et 4). De plus, dans cette souche mutante, j'ai observé des points rouges (indiqués par les pointes de flèche blanches sur la figure 66A lignes 3, 4 et sur la figure 66B) que je ne retrouve pas en observant la GFP signifiant que la mCherry est plus concentrée que la GFP dans cette zone. Cela laisse à penser que la cellule clive la GFP de la construction afin de rendre accessible la partie C-terminale du domaine C-terminal de Rpn11 ou Rpn11-m1.

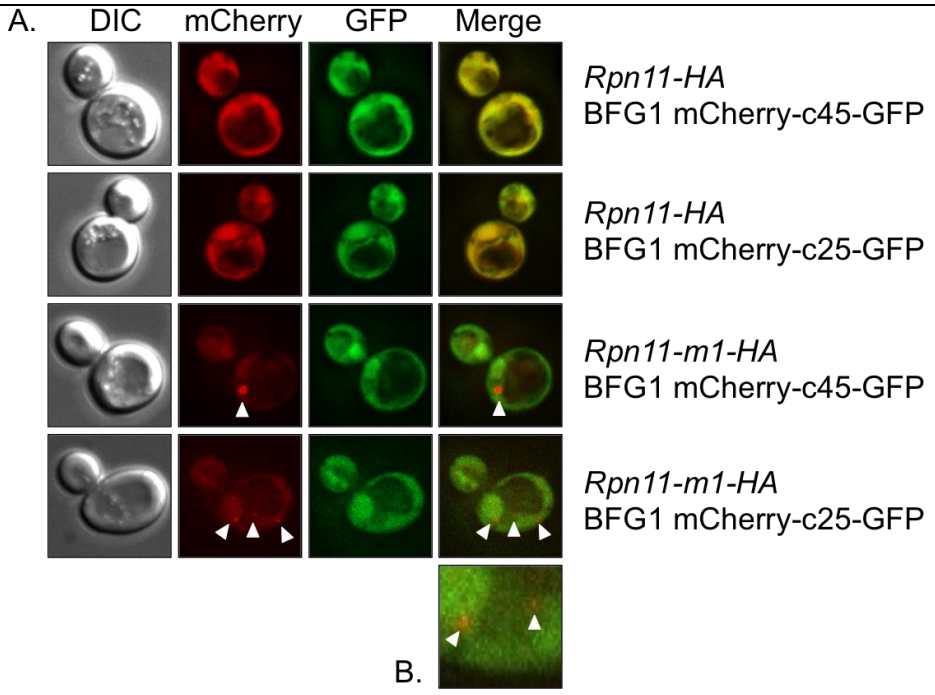

Figure 66 : Localisation de la « mCherry- domaine C-terminal-GFP » par microscopie.

A. Localisation de la construction mCherry- domaine C-terminal-GFP de 45 acides aminés (WT) ou 25 acides aminés (mutant). La localisation a été effectuée dans les souches sauvage (Rpn11-HA) ou mutante (Rpn11-m1-HA). L'observation a été effectuée en lumière blanche (DIC) ou en fluorescence avec un filtre pour observer la mCherry ou la GFP ; les images « Merge » correspondent à une superposition des images mCherry et GFP.
B. Agrandissement de l'image située au-dessus.

J'ai ensuite testé la capacité de complémentation du défaut de croissance d'une souche mutante par la surexpression des protéines chimères, en fusion N- ou C- terminale avec la GFP (Fig. 67). Comme attendu, aucune des constructions comportant le c25 n'est capable de complémenter en surexpression le défaut de croissance du mutant *rpn11-m1*. Une construction GFP-c45 est capable de complémenter en surexpression le défaut de croissance

de la souche mutante tandis que la construction c45-GFP en est incapable (Fig. 67). Ceci est d'autant plus intéressant qu'une construction c100-GFP (le domaine C-terminal « entier » de 100 acides aminés en fusion avec la GFP) est capable de complémenter ce défaut. Ceci montre que l'accessibilité du domaine C-terminal de 45 acides aminés est importante pour sa capacité de complémentation. Cette observation est supportée par le fait que la surexpression de la construction mCherry-c45-GFP est incapable de complémenter les défauts de croissance de la souche mutante.

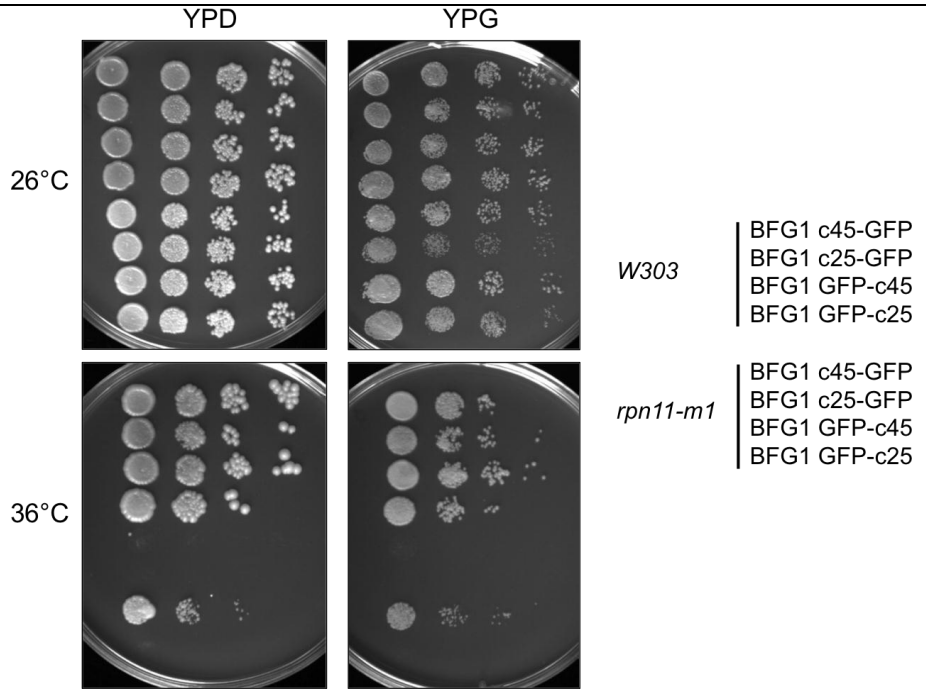

Figure 67 : L'accessibilité du domaine C-terminal est importante.

Dilution en série par pas de 10 après culture en YPD ON. La première goutte est ajustée à DO_{600} = 1. La capacité de complémentation des peptides a été testée à 26°C et 36°C sur les milieux YP glucose (YPD) et YP glycérol (YPG). L'ordre de dépôt est indiqué à droite des images.

C. La localisation du domaine C-terminal est importante.

1. Localisation par microscopie.

Les souches mutante et sauvage ont été transformées avec les plasmides exprimant les protéines fusion c45 ou c25 avec la GFP en N- ou C-terminal des domaines C-terminaux (Fig. 68).

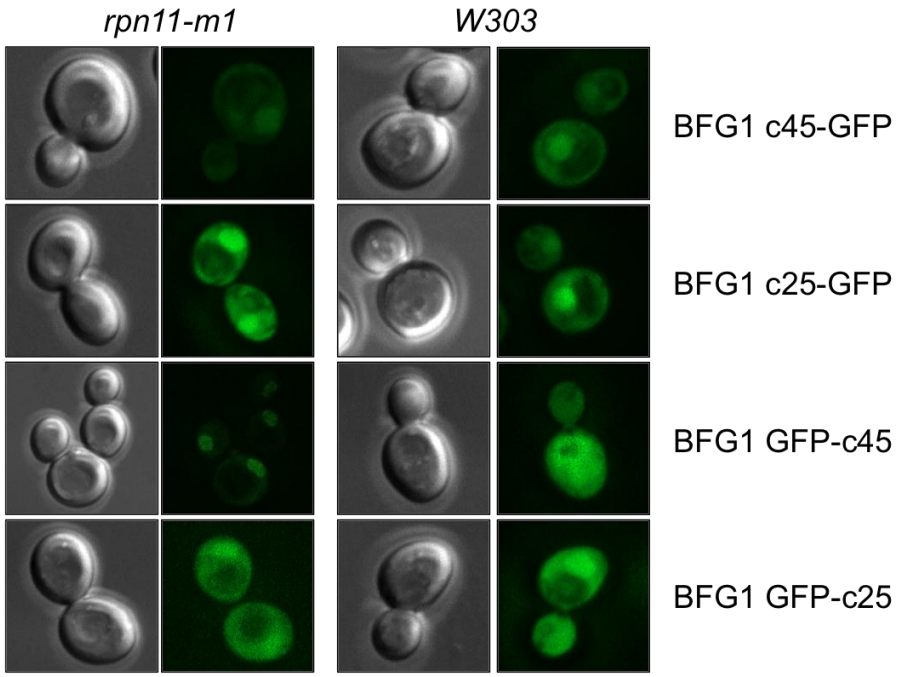

Figure 68 : Localisation du domaine C-terminal par microscopie.

Localisation du domaine C-terminal de 45 acides aminés (WT) ou 25 acides aminés (mutant) en fusion avec de la GFP en N- ou C-terminal. La localisation a été effectuée dans les souches sauvage (*W303*) ou mutante (*rpn11-m1*).

Lorsque la fusion de la GFP a lieu en C-terminal des différents domaines, la localisation ne varie ni entre les souches ni en fonction du domaine C-terminal (Fig. 68, ligne 1 et 2). Du fait de la surexpression, on retrouve beaucoup de signal dans toute la cellule mais ce signal est légèrement plus concentré au niveau du noyau. Ce résultat est différent lorsque la fusion de la GFP est en N-terminal. Dans le cas GFP-c45, la localisation est très clairement nucléaire et péri-nucléaire dans la souche *rpn11-m1* tandis qu'elle est diffuse dans la souche sauvage (Fig. 68, ligne 3). Cette localisation n'est par contre pas différente dans les souches surexprimant du GFP-c25 et est assez similaire à celle du c25-GFP (Fig. 68, lignes 2 et 4). Pour la construction GFP-c45, les résultats suggèrent que cette protéine est incorporée dans le protéasome dans une souche *rpn11-m1*. Elle n'est pas incorporée aussi efficacement dans les autres cas et montre donc que, suivant la partie du domaine C-terminal de Rpn11 rendue accessible pour les interactions, la protéine sera plus ou moins bien incorporée en plus de la protéine mutante. Ceci pourrait expliquer la différence d'efficacité dans la complémentation des défauts de croissance de la souche *rpn11-m1* observée entre une protéine GFP-c45 et c45-GFP.

2. La localisation au sein de la cellule est importante.

Pour l'expérience de double hybride, j'ai construit des plasmides qui permettent l'expression des protéines Gal4BD-cRpn11 de 100 ou 45 acides aminés. Le domaine Gal4BD contient une séquence NLS qui entraine sa localisation dans le noyau. Ce domaine Gal4BD,

par sa surexpression et sa fusion avec les domaines C-terminaux, entrainera les protéines chimères dans le noyau. Ces protéines chimères seront majoritairement « piégées » par leur interaction avec les séquences UAS (**U**pstream **A**ctivating **S**equence) reconnues par le Gal4BD. J'ai testé la capacité de complémentation de ces protéines pour les défauts de croissance d'une souche mutante (Fig. 70).

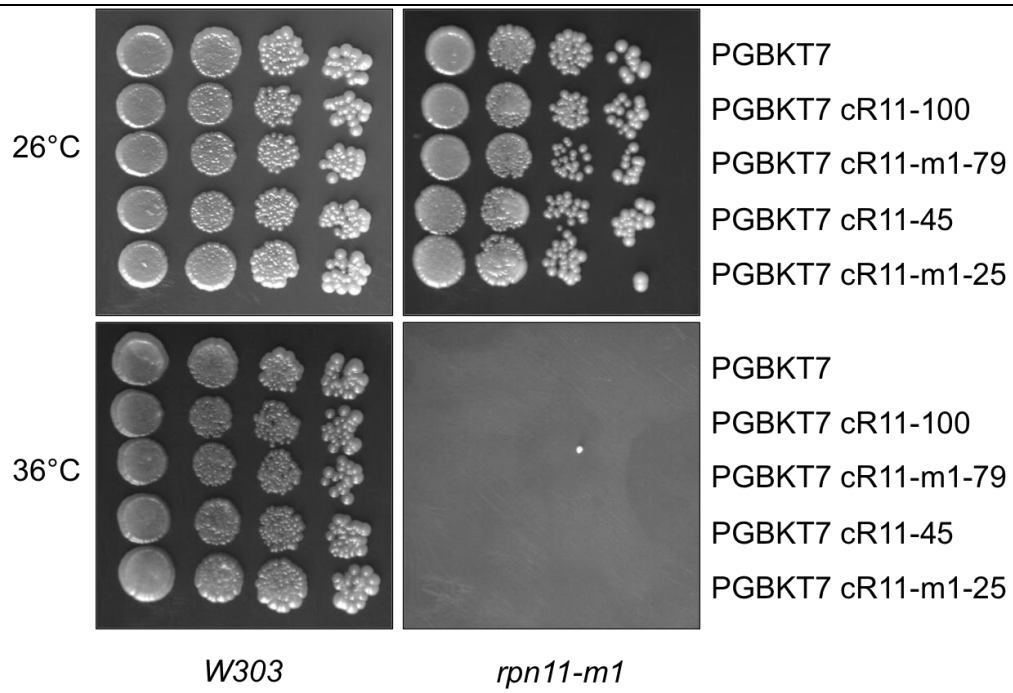

Figure 70 : La localisation du domaine C-terminal est importante pour la complémentation.

Dilution en série par pas de 10 après culture en YPD ON. La première goutte est ajustée à DO_{600} = 1. La capacité de complémentation de protéines a été testée à 26°C et 36°C sur YPD. Le peptide surexprimé dans les souches est indiqué soit par cR11-100 ou cR11-m1-79 lorsqu'il s'agit respectivement des domaines C-terminaux sauvage et mutants « entiers » soit par cR11-45 ou cR11-m1-25 lorsqu'il s'agit respectivement des domaines C-terminaux sauvage et mutants « minimums ». Par exemple, sur la troisième ligne, la souche sauvage W303 surexprime le peptide domaine C-terminal de Rpn11-m1 de 79 acides aminés à gauche tandis que la souche mutante Rpn11-m1 surexprime ce même domaine C-terminal à droite.

Bien que la fusion avec le domaine Gal4BD ait lieu en N-terminal des différentes versions du domaine C-terminal, aucune des protéines chimères surexprimée n'est capable de complémenter les défauts de croissance de la souche mutante à 36°C sur glucose. Des résultats similaires ont été obtenus sur glycérol. Ce résultat indique qu'une localisation purement nucléaire du domaine C-terminal de Rpn11 ne permet pas la complémentation du défaut de croissance d'une souche mutante sans toutefois avoir des effets délétères sur une souche sauvage. Ceci indique que les mécanismes moléculaires sur lesquels agit le domaine C-terminal de Rpn11 sont cytoplasmiques ou bien que les cibles nucléaires ne peuvent être atteintes à cause de l'interaction forte des protéines chimères avec les UAS.

D. L'intégrité du domaine C-terminal est importante.

Compte tenu des différents phénotypes associés aux divers mutants du domaine C-terminal de Rpn11, j'ai voulu savoir si la surexpression de ces domaines mutés pouvait complémenter en *trans* les défauts de la souche mutante *rpn11-m1* ou provoquer des défauts dans la souche sauvage. Les constructions ont toutes été effectuées dans le plasmide BFG1 permettant une surexpression (origine de réplication 2µ et promoteur PGK) ainsi que l'ajout d'un tag HA en N-terminal.

1. Les phénotypes étudiés avec les différentes souches.

À mon arrivée au laboratoire, l'étude du nombre de peroxysomes et de l'assemblage du protéasome dans les souches *W303*, *rpn11-m1* et *RevA5* était en cours. La surexpression des domaines C-terminaux mutants dans des souches sauvage et *rpn11-m1* avait déjà été effectuée et plusieurs phénotypes avaient été observés pour connaître leur capacité de complémentation (Tab. 6). *RevA5*, un révertant intragénique, avait déjà montré son intérêt puisqu'il était capable de croitre à haute température sur glucose mais le réseau mitochondrial était toujours fragmenté. J'ai aussi choisi d'étudier le domaine « coiled-coil » situé dans le domaine C-terminal de Rpn11 en créant une souche Δ*coil* où ce domaine a été délété au locus chromosomique.

	W303	*rpn11-m1*	*RevA5*
Mitochondries	Tubulaires	Fragmentées	Fragmentées
Petite	3%	3%	2%
Température	36°C	28°C	36°C
	WT + cR11	*WT* + cR11-m1	*WT* + cRevA5
Mitochondries	Tubulaires	Tubulaires	Tubulaires
Température	36°C	36°C	36°C
	M1 + cR11	*M1* + cR11-m1	*M1* + cRevA5
Mitochondries	Tubulaires	Fragmentées	Anormales
Température	36°C	28°C	36°C

Table 6 : Les divers phénotypes déjà étudiés.

Ce tableau résume les différents phénotypes déjà étudiés à mon arrivée au laboratoire avec les souches déjà isolées. Le terme « petite » correspond au nombre de colonies qui perdent spontanément leur ADN mitochondrial en phase exponentielle. La température correspond à la température maximale à laquelle la souche indiquée est capable de croitre. *M1 = rpn11-m1*.

Lorsque je suis arrivé au laboratoire, Agnès m'avait demandé de confirmer les observations déjà effectuées pour les trois souches. Au cours des différentes expériences et des changements de milieux de culture pour les souches transformées, je me suis rendu compte que la souche *RevA5* présentait un retard important de croissance spécifique en milieu

minimum. Ce retard est indépendant des marqueurs d'auxotrophie mais très dépendant du plasmide utilisé pour la transformation de *RevA5*. Ce défaut est beaucoup plus prononcé lors de l'utilisation d'un plasmide avec une origine de réplication 2µ qu'avec un plasmide avec une origine ARS-CEN. J'ai donc transformé les souches *W303*, *rpn11-m1* et *RevA5* avec un plasmide permettant la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11. J'ai ensuite mis en culture ces souches dans du milieu YPD puis j'ai quantifié le pourcentage de cellules qui avaient perdu leur plasmide au terme de 48h de croissance (Fig. 71). Comme on peut s'y attendre, si le plasmide confère un avantage pour la cellule, il est plus facilement conservé même sans pression de sélection (Fig. 71, cinquième série). Cette expérience a surtout permis de confirmer mon observation, la souche *RevA5* ne conserve pas les plasmides sans pression de sélection au contraire des souches sauvage ou *rpn11-m1* (Fig. 71, trois dernières séries). Nous n'avons pour l'instant aucune explication pour ce phénotype particulier.

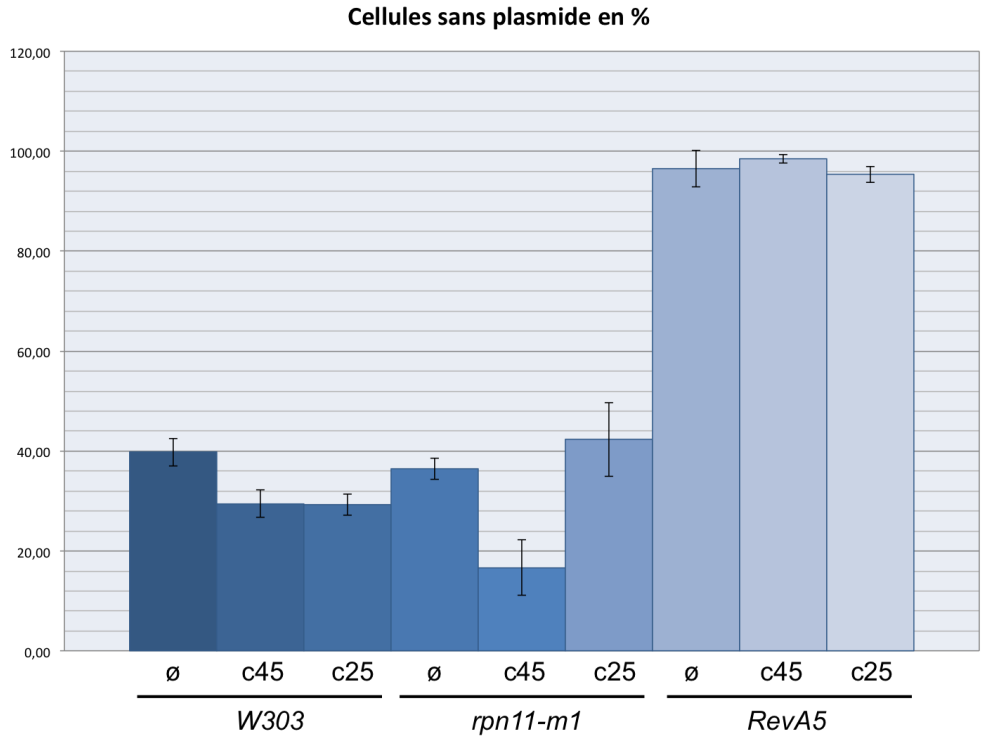

Figure 71 : La souche *RevA5* ne conserve pas les plasmides 2µ sans pression de sélection.

Les souches *W303*, *rpn11-m1* et *RevA5* ont été transformées soit par un plasmide BFG1 vide (Ø), portant le domaine C-terminal sauvage de 45 acides aminés (c45) ou portant le domaine C-terminal mutant de 25 acides aminés (c25). Les cellules ont été mises en culture 24h dans du milieu YPD puis une centaine de cellule par boîte a été étalée sur milieu YPD, après 24h chaque boite a été répliquée sur milieu sélectif. Cette expérience a été effectuée trois fois. La moyenne de chaque expérience est donnée par les histogrammes, l'écart type est donné par les barres d'erreurs sur chaque histogramme.

2. Effet de la surexpression des divers domaines C-terminaux sur la morphologie des mitochondries.

Afin de confirmer les observations déjà effectuées sur les souches originelles, j'ai décidé de reconstruire les divers mutants intragéniques dans les contextes W303 et BY4741. J'ai aussi construit un mutant : Rpn11-Δcoil (appelé Δcoil) où le domaine « coiled-coil » en C-terminal est supprimé. À la suite de ces constructions, j'ai donc obtenu dans les deux contextes génétiques des souches avec *RPN11-HA, rpn11-m1-HA, RevA5-HA* et Δ*coil-HA* au locus chromosomique de *RPN11*. Dans la suite de la thèse, toutes les références à ces constructions concerneront le contexte W303. J'ai tout d'abord analysé la morphologie mitochondriale dans ces souches (Fig. 72).

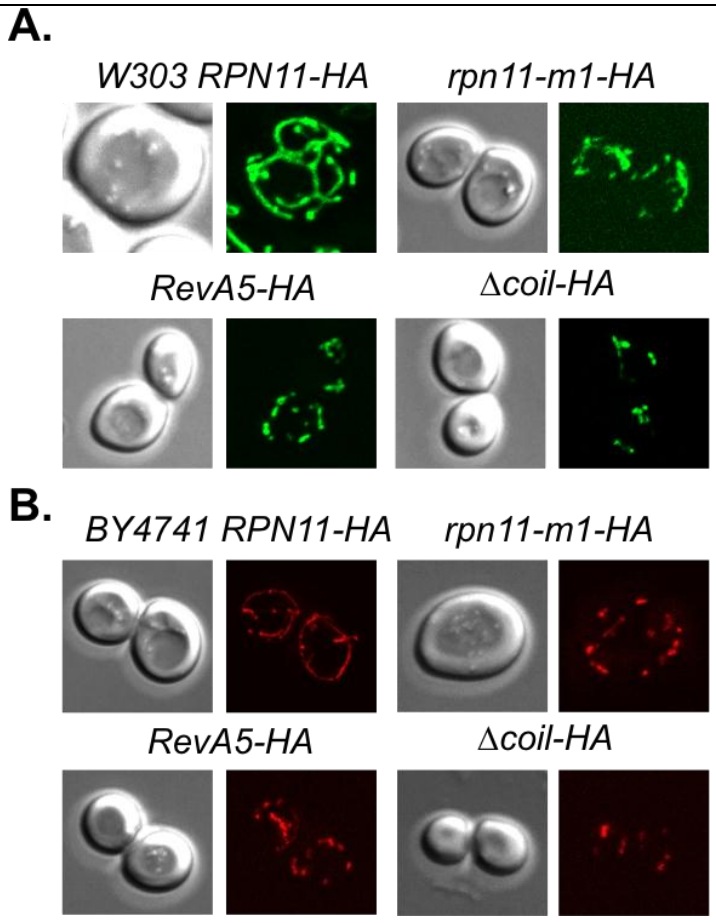

Figure 72 : Morphologie mitochondriale dans les contextes W303 et BY4741.

Morphologie mitochondriale dans les contextes génétiques W303 (A) et BY4741 (B). Les souches ont été transformées par un plasmide permettant l'expression de la GFP avec une préséquence mitochondriale (W303) ou de la mCherry avec une préséquence mitochondriale (BY4741). Les mitochondries ont été observées par microscopie à fluorescence.

Pour les deux contextes génétiques, les résultats sont similaires. La souche sauvage montre un réseau mitochondrial réticulé tandis que tous les mutants construits montrent un réseau anormal. Les mitochondries sont fragmentées dans les deux contextes pour les souches

rpn11-m1-HA, *RevA5-HA* et Δ*coil-HA*. Avec ces constructions, j'ai pu confirmer le défaut morphologique des mitochondries de *rpn11-m1* et de *RevA5* dans les contextes W303 ou BY4741. J'ai aussi pu montrer que le réseau mitochondrial d'une souche Δ*coil-HA* est fragmenté.

J'ai analysé l'effet de la surexpression de ces différents domaines C-terminaux sur la morphologie mitochondriale des souches *W303* et *rpn11-m1* (Fig. 73). La surexpression du domaine C-terminal sauvage permet de complémenter le défaut mitochondrial de la souche *rpn11-m1* en permettant aux mitochondries de cette souche de former un réseau réticulé (Fig. 73, ligne 1). Pour le domaine C-terminal de *rpn11-m1*, sa surexpression ne permet pas de complémenter le défaut mitochondrial de la souche mutante, puisque le réseau est toujours fragmenté, mais il n'induit pas de défaut dans la souche sauvage (Fig. 73, ligne 2). Concernant la surexpression du domaine C-terminal de RevA5 dans une souche sauvage, le réseau mitochondrial semble normal (Fig. 73, ligne 3). Concernant sa surexpression dans une souche mutante, le réseau mitochondrial de la souche est plus réticulé que *rpn11-m1* mais moins réticulé que *W303*. Enfin, la surexpression du domaine C-terminal Δcoil entraine la fragmentation du réseau mitochondrial à la fois dans les souches mutantes et sauvages (Fig. 73, ligne 4).

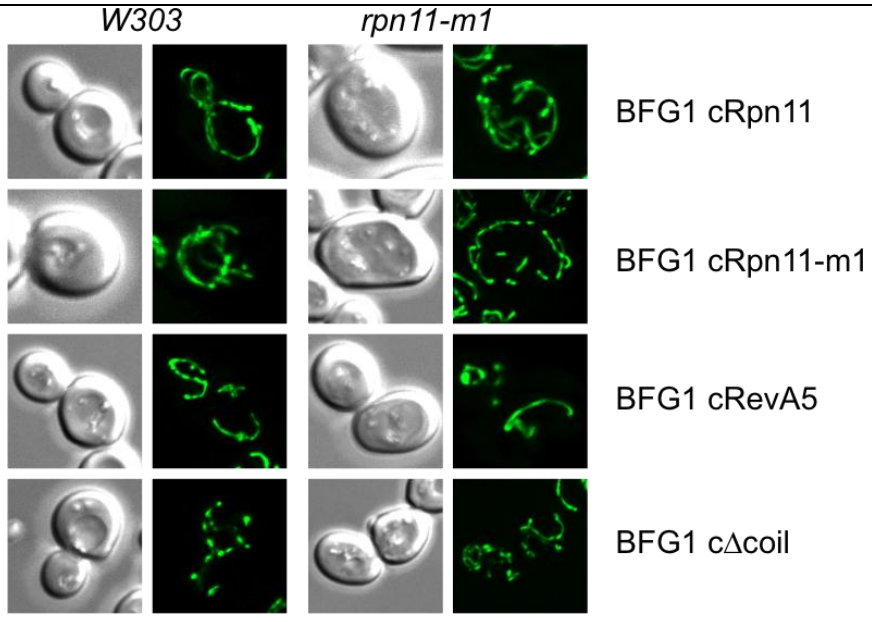

Figure 73 : Morphologie mitochondriale lors de la surexpression des domaines C-terminaux.

Morphologie mitochondriale dans les contextes génétiques W303 (gauche) et *rpn11-m1* (droite). Les souches ont été transformées par un plasmide permettant l'expression de la GFP avec une préséquence mitochondriale ainsi qu'un plasmide permettant la surexpression du domaine C-terminal sauvage (cRpn11), mutant (cRpn11-m1), révertant (cRevA5) ou délété pour le domaine « coiled-coil » (cΔcoil). Les mitochondries ont été observées par microscopie à fluorescence.

Ainsi, la surexpression des domaines C-terminaux montre à nouveau ce que nous connaissions : le domaine C-terminal sauvage est capable de complémenter le défaut de la morphologie mitochondriale de la souche mutante au contraire de la surexpression du domaine C-terminal mutant qui en est incapable. Pour le domaine C-terminal de RevA5, il semble capable de complémenter au moins partiellement les défauts de la morphologie mitochondriale de la souche mutante. Enfin, le domaine C-terminal Δcoil ne complémente pas les défauts de la morphologie mitochondriale de la souche mutante et induit des défauts dans une souche sauvage ; ce domaine C-terminal se comporte donc comme un mutant dominant négatif.

3. Effet de la surexpression des divers domaines C-terminaux sur le nombre de peroxysomes.

Nous avons montré que le défaut de fragmentation mitochondriale de la souche mutante est dû à une activation exacerbée de l'appareil de fission. Comme la surexpression du domaine C-terminal sauvage est capable de complémenter les défauts de morphologie mitochondriale de la souche mutante et que les mitochondries partagent avec les peroxysomes leur appareil de fission sous certaines conditions, la surexpression du domaine C-terminal sauvage pourrait complémenter l'importante augmentation du nombre de peroxysomes dans la souche mutante après une croissance en milieu oléate. Pour cela, j'ai transformé les souches sauvages et mutantes par des plasmides permettant la surexpression des domaines C-terminaux que je souhaite analyser ainsi qu'avec un plasmide exprimant de la DsRed avec un signal C-terminal permettant la localisation de la DsRed dans les peroxysomes matures (SKL). Les souches ont été mises en croissance dans un milieu YPD ou oléate et les peroxysomes ont été dénombrés dans chaque souche (Table 7).

	W303-HA	*rpn11-m1-HA*	*RevA5-HA*	*Δcoil-HA*
Peroxysomes	+	+++	+++	+++
	WT + cR11	*WT* + cR11-m1	*WT* + cRevA5	*WT* + cΔcoil
Peroxysomes	+	+	+	+++
	M1 + cR11	*M1* + cR11-m1	*M1* + cRevA5	*M1* + cΔcoil
Peroxysomes	+	+++	+++	+++

Table 7 : L'augmentation du nombre de peroxysomes en oléate chez *rpn11-m1* est complémentée par la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11.

Ce tableau résume le nombre moyen de peroxysomes dans les souches indiquées après induction de leur prolifération en milieu oléate. *M1* = *rpn11-m1*. Nombre de peroxysomes : + < 5/cellule et +++ > 5/cellule.

Seule la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 est capable de complémenter l'augmentation du nombre de peroxysomes de la souche *rpn11-m1* en oléate. Seule la

surexpression du domaine C-terminal Δcoil est capable de provoquer une augmentation du nombre moyen de peroxysomes dans une souche sauvage en oléate. Ceci indique donc que l'effet dominant négatif de ce domaine C-terminal sur le réseau mitochondrial dans une souche sauvage est aussi valable pour la fission des peroxysomes dans une telle souche.

4. Effet de la surexpression des divers domaines C-terminaux sur le défaut d'assemblage du protéasome.

La souche *rpn11-m1* présente un défaut d'assemblage du protéasome dès la température permissive. J'ai examiné l'assemblage du protéasome à température permissive dans la souche *RevA5*. J'ai pu démontrer que le défaut d'assemblage de la souche mutante était corrigé dans la souche *RevA5* (Fig. 74). Ceci nous a permis de montrer que le défaut de la morphologie mitochondriale toujours présent dans la souche *RevA5* pouvait être dissocié du défaut d'assemblage du protéasome.

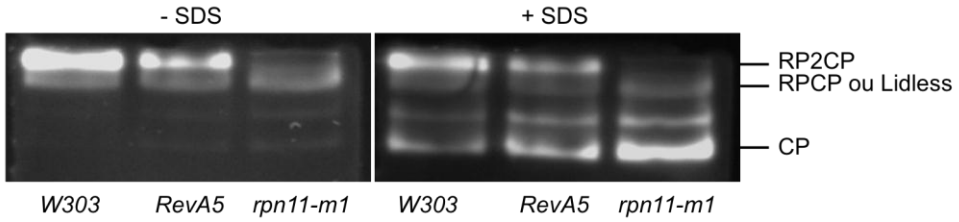

Figure 74 : L'assemblage du protéasome est normal dans la souche *RevA5*.

Des extraits totaux des souches indiquées ont été mis à migrer sur un gel natif. Après migration, le gel a été recouvert par du tampon contenant un substrat fluorogénique hydrolysable par le protéasome permettant la visualisation de sa présence sous UV en cas d'hydrolyse. Du SDS a été ajouté afin de visualiser la présence du CP.

Après la construction des différentes souches mutantes avec un tag HA en C-terminal dans les contextes génétique W303 et BY4741, j'ai aussi examiné l'assemblage du protéasome de ces souches (Fig. 75).

Lors de cette expérience, j'ai pu clairement retrouver du protéasome 26S dans la souche *Rpn11-HA*. Je n'ai pas trouvé de protéasome 26S pour la souche *rpn11-m1-HA*. La souche *RevA5-HA* semblerait présenter une petite quantité de protéasome 26S mais cette quantité serait bien moindre que ce que j'avais pu trouver dans la souche *RevA5* sans tag. La souche *RevA5-HA* est capable de croitre à une température assez haute (34°C) sans toutefois pouvoir atteindre la température de croissance de 36°C, permissive pour RevA5 sans tag. Ces deux observations combinées semblent indiquer que la souche *RevA5* serait capable de procéder à un assemblage normal du protéasome 26S mais qu'il serait assez instable. Cette instabilité serait exacerbée par la présence des tags HA en C-terminal. Pour la souche Δ*coil-HA*, elle présente clairement un assemblage identique à celui de la souche sauvage (Fig. 75,

comparer 1 et 4). Il faut aussi noter qu'il semble y avoir plus de protéasome 20S libre dans les souches *rpn11-m1-HA* et *RevA5-HA* (Fig. 75, comparer puits 2-3 avec 1 et 4) ce qui conforte l'idée d'un assemblage moins stable.

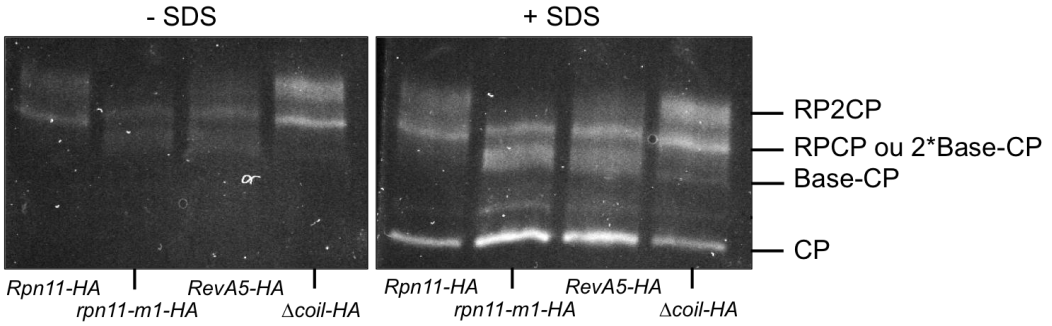

Figure 75 : Assemblage du protéasome dans les diverses souches.

100µg d'extrait total des souches *Rpn11-HA*, *rpn11-m1-HA*, *RevA5-HA* et Δ*coil-HA* ont été mis à migrer sur un gel natif. Après migration, le gel a été recouvert par du tampon contenant un substrat fluorogénique hydrolysable par le protéasome permettant la visualisation de sa présence sous UV en cas d'hydrolyse. Du SDS a été ajouté afin de visualiser la présence du CP.

Pour savoir si la surexpression des divers domaines C-terminaux était capable de provoquer des défauts d'assemblage du protéasome dans la souche sauvage (Fig. 76), j'ai effectué la même expérience. Bien que le gel soit assez peu défini, il ne semble pas y avoir de problème d'assemblage dans ces souches car on peut assez nettement observer le protéasome 26S dans chaque extrait. L'effet délétère de la surexpression du domaine C-terminal Δcoil dans une souche sauvage semble donc être limité au réseau mitochondrial et à la fission des peroxysomes.

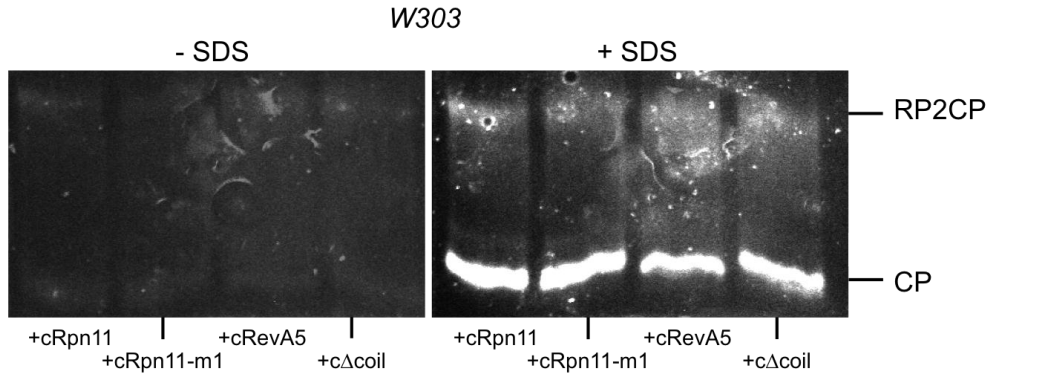

Figure 76 : La surexpression des domaines C-terminaux ne provoque pas de défaut d'assemblage du protéasome dans la souche sauvage.

150µg d'extrait total des souches *W303* transformées avec un plasmide BFG1 permettant la surexpression des domaines C-terminaux Rpn11 (+cRpn11), *rpn11-m1* (+cRpn11-m1), RevA5 (+cRevA5) et Δcoil (+cΔcoil) ont été mis à migrer sur un gel natif. Après migration, le gel a été recouvert par du tampon contenant un substrat fluorogénique hydrolysable par le protéasome permettant la visualisation de sa présence sous UV en cas d'hydrolyse. Du SDS a été ajouté afin de visualiser la présence du CP.

J'ai aussi voulu savoir si la surexpression des divers domaines C-terminaux permettait la restauration d'un assemblage correct du protéasome dans une souche *rpn11-m1*. J'ai donc refait l'expérience avec une souche mutante exprimant les quatre types de domaines C-terminaux de Rpn11 (Fig. 77).

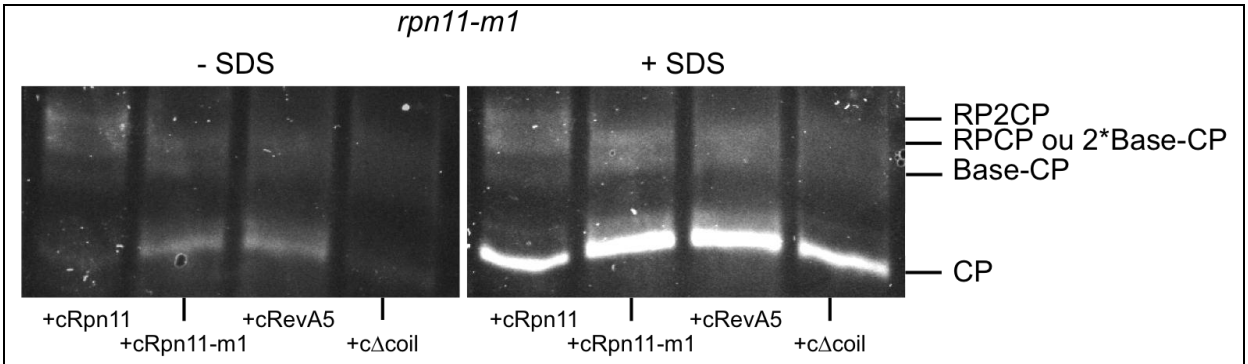

Figure 77 : La surexpression du domaine C-terminal sauvage complémente le défaut d'assemblage du protéasome de la souche mutante.

100µg d'extrait total des souches *rpn11-m1* transformées avec un plasmide BFG1 permettant la surexpression des domaines C-terminaux Rpn11 (+cRpn11), *rpn11-m1* (+cRpn11-m1), RevA5 (+cRevA5) et Δcoil (+cΔcoil) ont été mis à migrer sur un gel natif. Après migration, le gel a été recouvert par du tampon contenant un substrat fluorogénique hydrolysable par le protéasome permettant la visualisation de sa présence sous UV en cas d'hydrolyse. Du SDS a été ajouté afin de visualiser la présence du CP.

Il semble qu'il y ait beaucoup de 20S chez *rpn11-m1* en présence des domaines C-terminaux de Rpn11-m1 et RevA5 comparé aux C-terminaux Rpn11 ou Δcoil. Ceci confirmerait bien un défaut d'assemblage avec une trop grande présence de 20S libre dans la cellule. Pour le domaine C-terminal Δcoil, il pourrait être capable d'effectuer cette complémentation car la souche mutante présente très peu de 20S libre dans ce cas (Fig. 77, comparer les lignes 2-3 avec la ligne 4 et la ligne 1) mais le gel n'est pas assez propre pour un avis définitif car il est impossible de distinguer clairement le 26S. Ces résultats sont en accord avec les capacités de complémentation observées précédemment. La surexpression du domaine C-terminal sauvage est capable de complémenter le défaut d'assemblage de la souche mutante (Fig. 77, ligne 1 ; comparer avec la Fig. 74, ligne 1). Par contre, ni le domaine C-terminal de Rpn11-m1 ou de RevA5 n'est capable de complémenter ce défaut (Fig. 77, ligne 2-3). Les résultats obtenus lors de cette expérience sont résumés dans la table 8.

	W303-HA	*rpn11-m1-HA*	*RevA5-HA*	*Δcoil-HA*
Protéasome	26S	Non 20S + 2*base	26S ?	26S

	WT + cR11	*WT* + cR11-m1	*WT* + cRevA5	*WT* + cΔcoil
Protéasome	26S	26S	26S	26S

	M1 + cR11	*M1* + cR11-m1	*M1* + cRevA5	*M1* + cΔcoil
Protéasome	26S	Non 20S + 2*base	Non 20S + 2*base	26S ?

Table 8 : Le défaut d'assemblage du protéasome chez *rpn11-m1* peut être complémenté par la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11.

Ce tableau montre la présence du protéasome 26S dans les souches indiquées. *M1* = *rpn11-m1*.

5. La complémentation du défaut de croissance par la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 est spécifique pour la mutation *rpn11-m1*.

J'ai voulu savoir si la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 était capable de complémenter les défauts de croissance de souches présentant des défauts d'assemblage du protéasome et particulièrement du lid (Δ*rpn10*) ou de la base (Δ*hsm3*). Pour cela, j'ai transformé ces souches avec un plasmide permettant la surexpression du domaine C-terminal sauvage de 45 acides aminés ou de la version mutante de 25 acides aminés et j'ai réalisé des tests de croissance à température permissive ou non. Il apparaît très clairement que la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 est incapable de complémenter les défauts de croissance à haute température de ces deux souches (Fig. 78). Ainsi le domaine C-terminal est capable de complémenter spécifiquement le défaut d'assemblage de la souche *rpn11-m1*, permettant la complémentation du défaut de croissance à haute température.

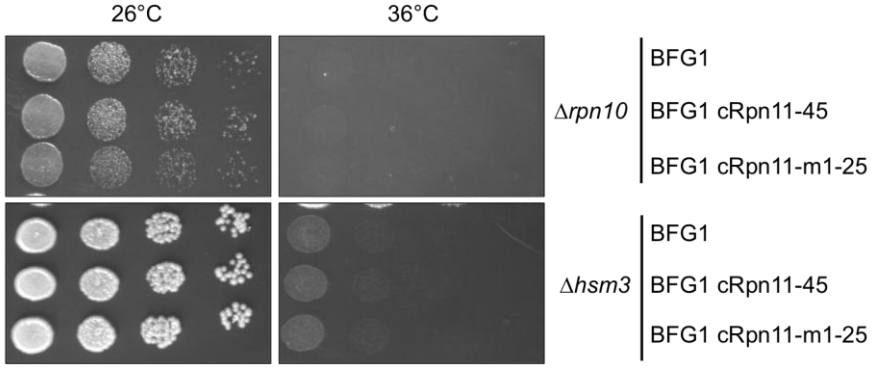

Figure 78 : La surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 ne permet pas la complémentation du défaut de croissance à haute température d'autres souches avec des défauts d'assemblage du protéasome.

Dilution en série par pas de 10 après culture en YPD ON. La première goutte est ajustée à DO_{600} = 1. La capacité de complémentation de protéines a été testée à 26°C et 36°C sur YPD. Le peptide surexprimé dans les souches est indiqué par cRpn11-45 ou cRpn11-m1-25 lorsqu'il s'agit respectivement des domaines C-terminaux sauvage et mutants « minimums ».

E. Conclusions.

J'ai pu définir que le domaine C-terminal « minimum » pour complémenter le défaut de croissance de la souche *rpn11-m1* était de 45 acides aminés. Lorsque j'ai effectué cette expérience, une équipe venait de publier que la surexpression d'une version de 39 acides aminés pouvait complémenter partiellement le défaut de croissance de la souche *rpn11-m1* (Chandra *et al.*, 2010). La version de 45 acides aminés que j'ai trouvée est bien plus efficace, j'ai donc décidé de continuer à l'utiliser et de la définir comme étant la version « minimum ». J'ai aussi pu montrer que cette version était la cible d'une dégradation protéolytique non spécifique par le protéasome.

Ces expériences ont permis de définir que l'accessibilité du domaine C-terminal était importante puisque la fusion en N- ou C-terminal de la GFP avec le domaine C-terminal montre des différences dans la capacité de complémentation du défaut de croissance : la surexpression d'une version GFP-C-terminal étant plus efficace pour complémenter les défauts de croissance de la souche *rpn11-m1*. Ce domaine C-terminal doit aussi être rendu accessible dans le cytoplasme et/ou la mitochondrie afin de permettre la complémentation de ce défaut de croissance puisque surexprimer une version qui sera « piégée » au niveau des UAS ne permet pas de complémenter le défaut de croissance de la souche *rpn11-m1*. Dans une souche *rpn11-m1* exprimant le domaine C-terminal de Rpn11 en *trans*, il est très probable que le domaine C-terminal soit recruté dans le protéasome afin de palier au défaut d'assemblage du 26S de la souche. Ainsi, l'intégrité du domaine C-terminal est importante puisque seule la surexpression du domaine C-terminal dans sa version sauvage montre une complémentation complète de tous les défauts étudiés dans la souche mutante. Par contre, la surexpression du domaine C-terminal de RevA5 montre des capacités de complémentation intermédiaires et un assemblage du protéasome sans doute plus « fragile » tandis que la surexpression du domaine Δcoil est capable de complémenter le défaut de croissance à haute température ainsi que le défaut d'assemblage du protéasome de la souche *rpn11-m1*.

De manière inattendue, la surexpression du domaine C-terminal Δcoil est capable d'induire une fragmentation des mitochondries et une augmentation du nombre moyen de peroxysomes en oléate dans une souche sauvage, montrant une fois de plus l'importance de la structure de ce domaine C-terminal.

Travaux – Chapitre IV

IV. Étude de la localisation mitochondriale de Rpn11.

J'ai beaucoup utilisé de souches portant des épitopes HA en fusion C-terminale avec la protéine Rpn11 ou Rpn11-m1 pour détecter ces protéines lors de mes westerns blots. Le fait de ne pas posséder d'anticorps spécifique pour Rpn11 rendait certaines expériences un peu plus longues puisqu'il fallait effectuer des croisements entre souches ou intégrer les épitopes HA au locus par transformation pour ensuite pouvoir les utiliser lors de western blots. J'ai donc essayé de trouver un anticorps commercial pour Rpn11 et j'ai trouvé un fournisseur qui produit des anticorps dirigés contre l'homologue humain de Rpn11, POH1. J'ai pu les essayer et voir qu'ils fonctionnaient contre les protéines Rpn11 et Rpn11-m1 de *S. cerevisiae*. Seulement, l'utilisation de ces anticorps s'est révélée être pleine de surprises très informatives.

A. La détection de Rpn11 et Rpn11-m1 peut être effectuée par un anticorps dirigé contre POH1.

Lors de la réception de ces anticorps, j'ai testé leur réactivité et leur spécificité avec les protéines de levure. Pour cela, j'ai extrait les protéines totales des souches *W303* et *rpn11-m1* avec ou sans tag HA C-terminal au locus. J'ai ensuite effectué une migration sur SDS-PAGE suivi d'un western blot avec les anticorps dirigés contre la protéine POH1. J'ai obtenu un signal. Afin de vérifier que ce signal correspondait bien à la protéine Rpn11, j'ai ensuite effectué une hybridation avec des anticorps dirigés contre les épitopes HA. Cette deuxième étape m'a permis de confirmer que les anticorps dirigés contre POH1 reconnaissaient la même protéine que les anticorps dirigé contre les épitopes HA de Rpn11. Cependant la superposition des deux films nous a aussi renseignés sur un phénomène que nous ne soupçonnions pas : la souche *rpn11-m1-HA* présentait deux signaux avec l'anticorps anti-POH1 et un signal avec l'anticorps anti-HA. J'ai donc utilisé les trois clones obtenus indépendamment de la souche *rpn11-m1-HA* que nous possédions au laboratoire et les trois donnent le même résultat (Fig. 79). Les anticorps anti-HA reconnaissent une seule protéine tandis que les anticorps anti-POH1 reconnaissent très fortement une protéine à migration plus rapide mais aussi une protéine de même masse que celle reconnue par les anticorps anti-HA si on effectue une surexposition des films. La protéine Rpn11-m1-HA produite dans la souche *rpn11-m1-HA* semble être clivée de ses épitopes HA au minimum. Ce type de clivage n'a pas pu être mis en évidence dans une souche *Rpn11-HA*.

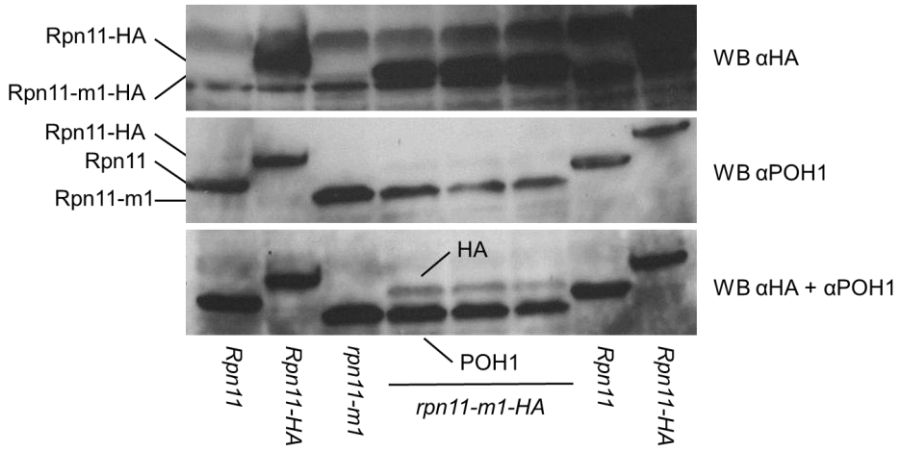

Figure 79 : Les épitopes HA sont clivés dans la souche *rpn11-m1-HA*.

Les extraits totaux des souches indiquées ont été mis à migrer sur un gel SDS-PAGE puis la réactivité de l'anticorps commercial dirigé contre POH1 a été testée par western blot. Pour la souche *rpn11-m1-HA*, les trois clones que nous possédons ont été testés. Dans cette souche sur le panneau WB αHA+αPOH1, le signal très fort en bas correspond à celui des protéines reconnues par les anticorps dirigés contre POH1 et le signal plus faible en haut correspond à celui des protéines reconnues par les anticorps dirigés contre les épitopes HA.

B. Examen de la localisation subcellulaire des différentes formes.

Après cette découverte, nous nous sommes immédiatement posés la question de la localisation subcellulaire de la protéine Rpn11-m1. Jusqu'à présent, cette localisation était très différente entre Rpn11-HA et Rpn11-m1HA lors des fractionnements cellulaires. La version sauvage est présente majoritairement dans le cytoplasme et légèrement à la mitochondrie ; la version mutée est présente uniquement à la mitochondrie (Fig. 52, page 106). J'ai donc effectué de nouveau une expérience de fractionnement cellulaire avec les souches *Rpn11-HA* et *rpn11-m1-HA*. J'ai ensuite effectué un western blot en utilisant les deux anticorps. Avec cette nouvelle expérience, j'ai confirmé la localisation principalement cytoplasmique et légèrement mitochondriale de Rpn11-HA. Par contre, pour la souche *rpn11-m1-HA* le résultat est différent (Fig. 80).

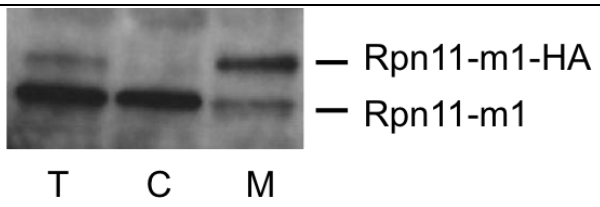

Figure 80 : La localisation subcellulaire de la protéine Rpn11-m1 est différente de celle de Rpn11-m1-HA.

Localisation de Rpn11-m1 avec ou sans tag HA après un fractionnement cellulaire. Les protéines ont été extraites puis les mitochondries ont été enrichies (M) par rapport au cytoplasme (C) avec plusieurs centrifugations différentielles. Une fraction des protéines totales a été conservée (T). Les protéines ont été précipitées au TCA puis analysées par western blot. L'hybridation du western blot a été réalisée avec les anticorps anti- POH1 et anti-HA séparément.

La figure 80 montre un western blot à la suite de l'hybridation par les deux anticorps (une hybridation séparée ayant été effectuée auparavant). Cette expérience révèle une nouvelle fois la présence des deux protéines de masse différente. Ces protéines diffèrent dans leur localisation subcellulaire. La protéine Rpn11-m1-HA montre une localisation exclusivement mitochondriale que nous connaissions jusqu'alors. Par contre la protéine « Rpn11-m1 », issue du clivage d'au minimum les épitopes HA de la protéine Rpn11-m1-HA, montre une localisation préférentiellement cytosolique. La localisation cytosolique de la protéine Rpn11-m1 permet d'expliquer la « viabilité » de la souche *rpn11-m1-HA*. En effet, nous avions du mal à concevoir comment le protéasome dont la localisation est cytosolique ou nucléaire pouvait être fonctionnel sans la protéine Rpn11, même mutée, tout en permettant la croissance de la cellule. Le fait de trouver la forme Rpn11-m1-HA exclusivement à la mitochondrie permet de proposer que celle-ci soit protégée du clivage des épitopes HA. L'essai de validation de cette hypothèse est présenté dans la partie C de cette section.

La fraction enrichie en mitochondries contenant encore des portions de membranes du RE, j'ai voulu confirmer la présence de Rpn11 et Rpn11-m1 sans tag à la mitochondrie. Pour cela, j'ai effectué une extraction des protéines totales des souches *W303* et *rpn11-m1*, puis un fractionnement cellulaire suivi d'une purification de la fraction enrichie en mitochondrie par ultracentrifugation sur gradient de sucrose. J'ai ensuite fait une migration sur SDS-PAGE et un western blot (Fig. 81). Comme attendu, on retrouve les protéines Rpn11 et Rpn11-m1 dans les fractions cytosolique et enrichies en mitochondries. Après purification sur gradient de sucrose, on retrouve ces protéines dans la première fraction qui contient le reste de membrane du RE qui n'a pas été éliminé par les centrifugations différentielles. On parvient aussi à retrouver ces protéines dans les fractions 8-10 qui contiennent les mitochondries. Les protéines Rpn11 et Rpn11-m1 sont donc bien retrouvées à la mitochondrie.

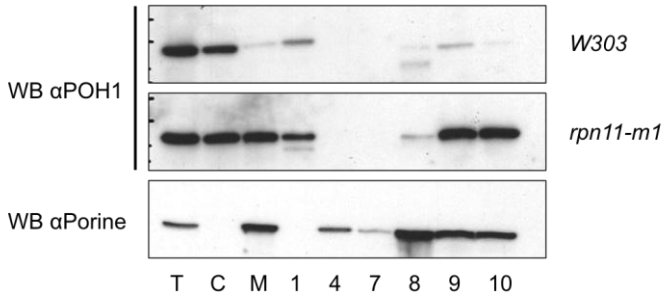

Figure 81 : Les protéines Rpn11 et Rpn11-m1 sont bien localisées à la mitochondrie.

Localisation de Rpn11 et Rpn11-m1 après un fractionnement cellulaire et purification sur gradient de sucrose. Les protéines ont été extraites puis les mitochondries ont été enrichies (M) par rapport au cytoplasme (C) avec plusieurs centrifugations différentielles. Une fraction des protéines totales a été conservée (T). Les protéines ont été précipitées au TCA puis analysées par western blot. L'hybridation du western blot a été réalisée avec les anticorps anti-POH1 et anti-Porine.

C. Étude de la localisation au sein de la mitochondrie.

Une des hypothèses serait que la protéine qui conserve les épitopes HA soit protégée de ce clivage à l'intérieur de la mitochondrie. J'ai donc effectué une expérience de protéolyse ménagée afin de tester cette hypothèse. Pour une telle expérience, après récupération des fractions enrichies en mitochondries à la suite d'un fractionnement cellulaire, j'ai soumis une même quantité de mitochondries à une quantité croissante de protéinase K avec ou sans présence de détergent. Soumettre les mitochondries à la présence d'une petite quantité de protéinase K entrainera une digestion de toutes les protéines situées à l'extérieur ou à la surface de la membrane mitochondriale externe côté cytosolique. Une quantité plus importante permettra une entrée de la protéinase K dans l'espace intermembranaire par gradient de concentration. Enfin, en présence de détergent les protéines de la matrice seront accessibles à la protéinase K. Après cette expérience, les protéines sont précipitées puis mises à migrer sur SDS-PAGE et un western blot est effectué. L'hybridation de la membrane avec des anticorps dirigés contre des protéines dont la localisation au niveau de la mitochondrie est connue permettra, par comparaison, de connaître la localisation de Rpn11 (Fig. 82).

La protéine Abf2, qui est dans la matrice, n'est digérée qu'en présence de détergent (Fig. 82), signe que la matrice des mitochondries extraites n'est pas accessible sans détergent. La protéine Mmm2-GFP, qui est une protéine membranaire située du côté cytosolique de la mitochondrie, est digérée à de petites concentrations de protéinase K. La protéine Cox4, qui est située dans l'espace intermembranaire, semble être digérée dans des concentrations intermédiaires entre celles nécessaires pour la digestion des protéines externe et celle nécessaire avec du détergent pour la digestion de protéines de la matrice. Ces contrôles indiquent que cette expérience a plutôt bien fonctionné. Lorsque l'on compare la digestion de la protéine Rpn11-HA, elle semble proche de celle des protéines de l'espace intermembranaire. Le résultat est identique pour la protéine Rpn11-m1-HA. Cette expérience a été répétée plusieurs fois. Ainsi les protéines Rpn11-HA et Rpn11-m1-HA se comportent comme des protéines de l'espace intermembranaire. Cependant, la localisation mitochondriale de Rpn11 et de Rpn11-m1 pourrait être aussi externe puisqu'une partie des protéines Rpn11-HA et Rpn11-m1-HA est digérée à de très faibles concentrations de protéinase K. Une localisation dans la matrice de la mitochondrie peut être exclue.

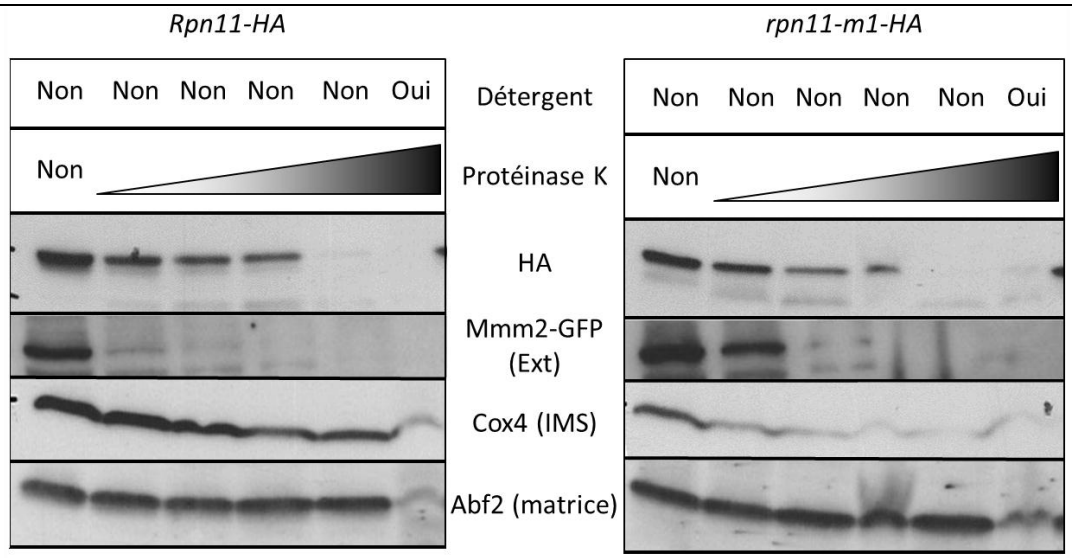

Figure 82 : Les protéines Rpn11 et Rpn11-m1 pourraient être situées dans l'espace intermembranaire mitochondrial.

Localisation de Rpn11-HA et Rpn11-m1-HA après un fractionnement cellulaire, récupération des fractions enrichies en mitochondries et protéolyse ménagée. Une même quantité de protéine a été soumise à des quantités croissantes de protéinase K avec ou sans détergent. Les protéines ont été précipitées au TCA puis une même quantité de protéine a été déposée et analysée par western blot. L'hybridation du western blot a été réalisée avec les anticorps indiqués. Des souches *RPN11-HA/MMM2-GFP* et *rpn11-m1-HA/MMM2-GFP* ont été utilisées pour cette expérience. IMS : protéine de l'espace intermembranaire, Ext : protéine situées du côté externe de la membrane externe de la mitochondrie.

D. La localisation mitochondriale est différente entre la souche sauvage et les souches mutantes.

Afin de connaître la localisation des protéines au niveau membranaire, nous avons décidé d'effectuer des extractions de protéines au carbonate. Lors d'une telle extraction, les fractions enrichies en mitochondries sont mises dans du tampon contenant du carbonate. Le carbonate à un pH d'environ 11,5 et entraine une solubilisation des protéines associées aux membranes. Après ultracentrifugation, les protéines membranaires seront retrouvées dans le culot avec les lipides et les protéines non membranaires ou associées à des protéines membranaires seront retrouvées dans le surnageant. Comme dans l'expérience précédente, les protéines sont précipitées puis mises à migrer sur SDS-PAGE et un western blot est effectué. L'hybridation de la membrane avec des anticorps dirigés contre des protéines dont la localisation membranaire est connue permettra, par comparaison, de connaître la localisation de Rpn11. J'ai effectué cette expérience pour les quatre souches afin de savoir s'il existait une différence dans la localisation mitochondriale entre une protéine sauvage et les différents mutants (Fig. 83).

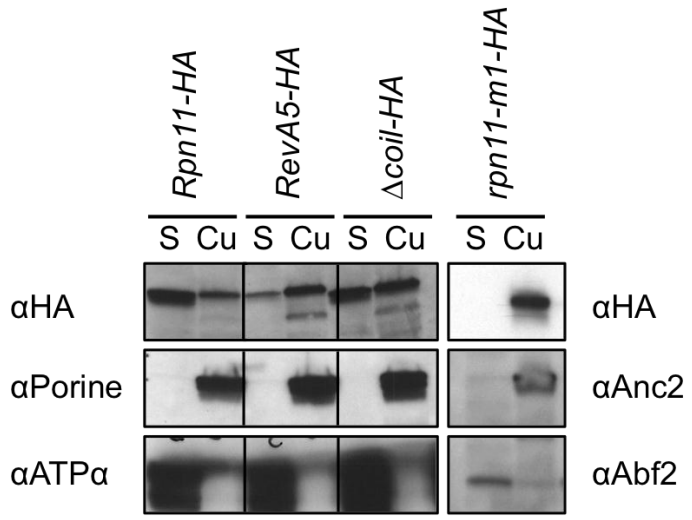

Figure 83 : La localisation membranaire diffère entre une protéine Rpn11 et les versions mutées.

Localisation de Rpn11-HA, Rpn11-m1-HA, RevA5-HA et Δcoil-HA après un fractionnement cellulaire. Les protéines ont été extraites puis les mitochondries ont été enrichies par rapport au cytoplasme avec plusieurs centrifugations différentielles. Une même quantité de protéines issues des fractions enrichies en mitochondries a été soumise à l'extraction avec du tampon carbonate puis ultracentrifugation. Le culot (Cu) et le surnageant (S) obtenus à la suite de cette ultracentrifugation ont été séparés. Les protéines ont été précipitées au TCA puis une même quantité de protéines a été déposée et analysée par western blot. L'hybridation du western blot a été réalisée avec les anticorps indiqués.

La porine et Anc2, toutes deux étant des protéines membranaires, sont retrouvées dans le culot. Abf2 et la sous-unité α du complexe V de la chaine respiratoire (ATP α), qui sont des protéines solubles, sont retrouvées dans le surnageant (Fig. 83). Ces deux contrôles indiquent que l'extraction a fonctionné. Concernant les protéines d'intérêt ; seule la protéine Rpn11-HA est retrouvée très majoritairement dans le surnageant. Rpn11-m1-HA et RevA5-HA sont retrouvées très majoritairement dans le culot suggérant une forte association aux membranes tandis que Δcoil-HA montre une localisation équivalente entre culot et surnageant, suggérant une interaction moins forte avec les membranes. Ce résultat est extrêmement étonnant dans la mesure où aucune analyse *in silico* ne m'a permis de retrouver de domaine hydrophobe ou d'ancrage membranaire permettant d'expliquer ce résultat.

E. La surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 n'empêche pas le clivage des épitopes HA de Rpn11-m1-HA et ne perturbe pas sa localisation mitochondriale.

Nous avons voulu regarder l'effet de la surexpression du domaine C-terminal sur la localisation de Rpn11-m1-HA et sur le clivage de ses épitopes. J'ai donc effectué un fractionnement cellulaire sur des souches *rpn11-m1-HA* qui ont été transformées avec un plasmide permettant la surexpression du domaine C-terminal de 45 acides aminés. Les

protéines sont ensuite précipitées puis mises à migrer sur SDS-PAGE et un western blot est effectué (Fig. 84).

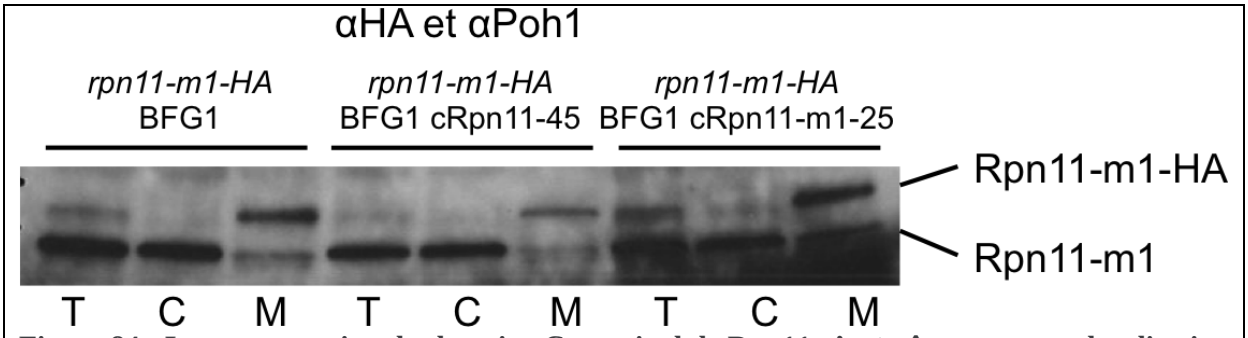

Figure 84 : La surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 n'entraîne pas une relocalisation de *rpn11-m1*-HA dans le cytoplasme.

Localisation de Rpn11-m1-HA après un fractionnement cellulaire et purification sur gradient de sucrose. Les protéines ont été extraites puis les mitochondries ont été enrichies (M) par rapport au cytoplasme (C) avec plusieurs centrifugations différentielles. Une fraction des protéines totales a été conservée (T). Les protéines ont été précipitées au TCA puis analysées par western blot. L'hybridation du western blot a été réalisée avec des anticorps anti-POH1 et anti-HA.

La figure 84 montre un western blot à la suite de l'hybridation par les anticorps anti-POH1 et anti-HA. Cette expérience permet de voir que la souche *rpn11-m1-HA* possède toujours les protéines Rpn11-m1-HA préférentiellement mitochondriales et Rpn11-m1 préférentiellement cytosolique, quel que soit le plasmide utilisé lors de la transformation. La protéine Rpn11-m1-HA montre une localisation exclusivement mitochondriale et la protéine Rpn11-m1, montre une localisation semblable à celle de la protéine préférentiellement cytosolique. Cette localisation ne change pas en présence de la surexpression du domaine C-terminal de 45 ou 25 acides aminés. Cette expérience apporte donc deux réponses : la surexpression du domaine C-terminal de 45 acides aminés n'empêche pas le clivage des épitopes HA de la protéine Rpn11-m1-HA et sa présence ne change pas la localisation mitochondriale de la protéine Rpn11-m1-HA.

F. La surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 n'empêche pas la localisation membranaire de Rpn11-m1-HA.

Sachant que la protéine Rpn11-m1-HA présente une localisation membranaire anormale par rapport à une forme sauvage, la surexpression du domaine C-terminal de 45 acides aminés pourrait complémenter ce défaut. Pour cela, j'ai effectué une extraction carbonate des protéines associées aux membranes mitochondriales d'une souche *rpn11-m1-HA* qui surexprime le domaine C-terminal de 45 acides aminés sauvage, de RevA5 ou celui de 25 acides aminés de *rpn11-m1* (Fig. 85).

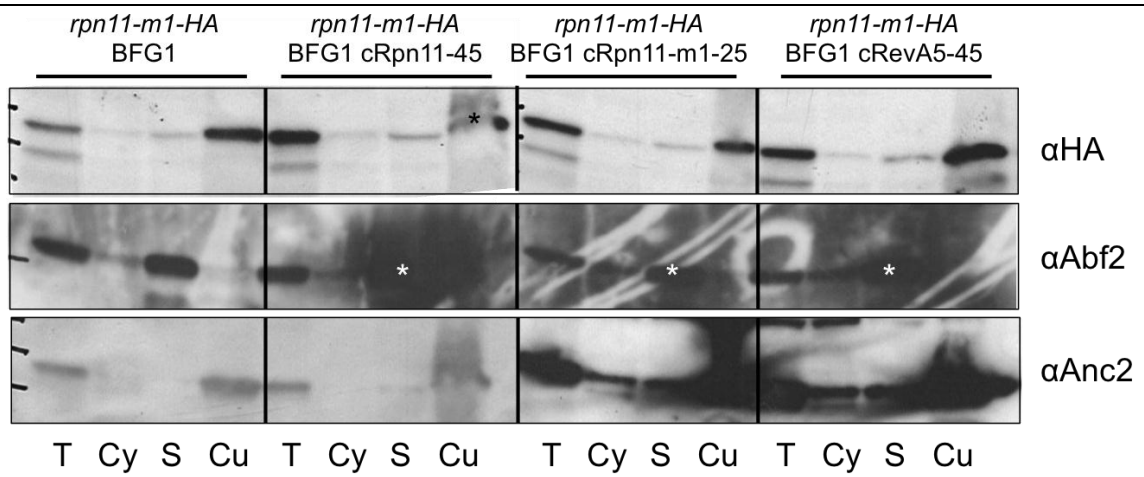

Figure 85 : La surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 ne permet pas une complémentation du défaut de localisation de Rpn11-m1-HA.

Localisation de *rpn11-m1*-HA après un fractionnement cellulaire dans des souches *rpn11-m1*-HA transformées avec les plasmides indiqués. Les protéines ont été extraites puis les mitochondries ont été enrichies (S et Cu) par rapport au cytoplasme (Cy) avec plusieurs centrifugations différentielles. Une fraction des protéines totales a été conservée (T). Une même quantité de protéine issue des fractions enrichies en mitochondries a été soumise à l'extraction avec du tampon carbonate puis ultracentrifugation. Le culot (Cu) et le surnageant (S) obtenus à la suite de cette ultracentrifugation ont été séparés. Les protéines ont été précipitées au TCA puis une même quantité de protéine a été déposée et analysée par western blot. L'hybridation du western blot a été réalisée avec les anticorps indiqués. * = localisation du signal sur les films.

J'ai utilisé deux protéines mitochondriales comme contrôle pour cette expérience. La protéine Anc2, une protéine membranaire, est retrouvée dans le culot tandis qu'Abf2, une protéine soluble, est retrouvée dans le surnageant (Fig. 85). Ces deux contrôles indiquent que l'extraction a fonctionné. Les protéines Rpn11-m1-HA produites dans les diverses souches sont toutes majoritairement retrouvées dans le culot. Ce résultat montre que la surexpression du domaine C-terminal de 45 acides aminés sauvage ou de RevA5 ne permet pas de complémenter le défaut de localisation de Rpn11-m1-HA.

G. Récapitulatif et conclusions.

L'utilisation des anticorps anti-POH1 nous a permis de voir qu'une fraction importante de la protéine Rpn11-m1-HA subissait un clivage d'au moins leurs épitopes. Les protéines « Rpn11-m1 » qui en résultent se comportent comme les protéines Rpn11 ou Rpn11-HA lors des fractionnements cellulaires : majoritairement au cytosol mais aussi à la mitochondrie. Il semblerait qu'une partie des protéines retrouvées à la mitochondrie puisse se retrouver dans l'espace intermembranaire. Enfin, les protéines mutées sont capables de se comporter comme des protéines membranaires. Ainsi, les mutations étudiées entraineraient une localisation anormale de la protéine Rpn11 mutée en séquestrant cette protéine dans la membrane externe mitochondriale ou la membrane interne mitochondriale du côté espace

intermembranaire alors que Rpn11 est soluble. La surexpression du domaine C-terminal de 45 acides aminés ne permet pas de relocaliser Rpn11-m1 dans la fraction soluble. La complémentation de ce domaine C-terminal s'effectue donc par un autre moyen qu'une relocalisation de Rpn11-m1.

Travaux – Chapitre V

V. Rpn11 et la longévité chronologique.

Le protéasome et les mitochondries jouent un grand rôle sur la longévité cellulaire. Le protéasome dégrade les protéines mal repliées qui ont tendance à s'accumuler lors du vieillissement cellulaire tandis que la fragmentation mitochondriale serait concomitante avec l'augmentation de la production de ROS qui sont aussi soupçonnés d'être à l'origine du vieillissement cellulaire. Comme *rpn11-m1* montre des défauts d'assemblage de protéasome et de morphologie mitochondriale, nous avons décidé de tester sa longévité par rapport à une souche sauvage. La levure possède deux types de longévité, la « replicative lifespan » et la « chronological lifespan » (Fig. 86). Dans le premier cas, il s'agit du nombre de cellules filles qu'une seule cellule est capable de produire tandis que le deuxième cas correspond aux nombres de jours où une cellule est capable de survivre en phase stationnaire. La phase stationnaire arrive après le shift diauxique, lorsque les sources de carbones sont toutes épuisées, ce qui se traduit par une DO_{600} très forte et assez stable. J'ai choisi de tester la « chronological lifespan » car elle est bien plus facile à étudier que la « replicative lifespan ».

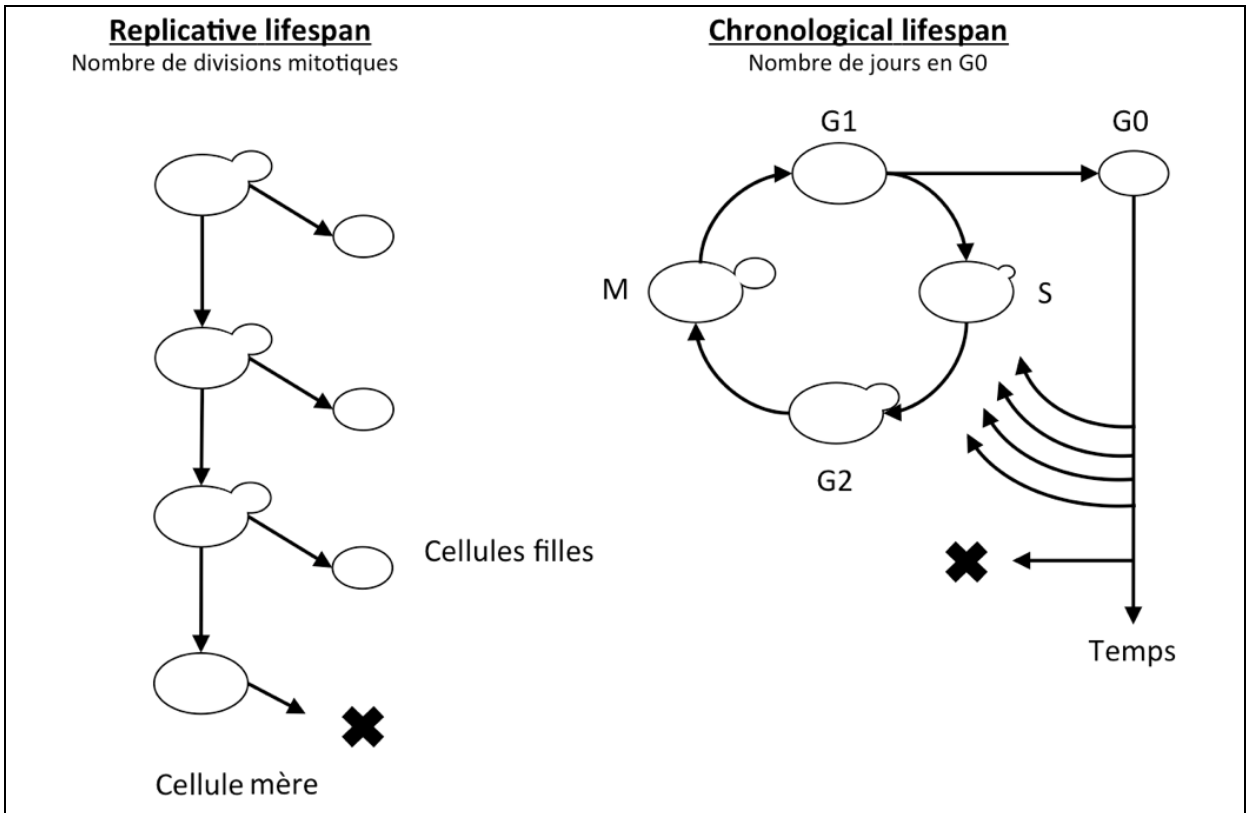

Figure 86 : Illustration de la « replicative et chronological lifespan ».

La « replicative lifespan » correspond au nombre de cellules filles qu'une cellule mère est capable de produire. La « chronological lifespan » correspond au nombre de jours qu'une cellule peut passer dans un milieu avant de ne plus pouvoir produire de nouvelles cellules si on la place dans un milieu frais.

A. La souche *rpn11-m1* présente un défaut de « chronological lifespan ».

Pour tester s'il existait un défaut dans la « chronological lifespan » de *rpn11-m1*, j'ai mis en culture les souches *W303* et *rpn11-m1* dans un milieu liquide YPD à 26°C jusqu'à atteindre la phase stationnaire. J'ai ensuite effectué une dilution en série par pas de 10. La première goutte est ajustée à DO_{600} = 1 et la capacité de croissance a été testée tous les jours sur milieu YPD et YPG à 26°C et 36°C. De cette expérience, j'ai obtenu une longévité de plus de 40 jours pour *W303* tandis que *rpn11-m1* ne dépasse pas les 20 jours. Il y a donc une diminution de moitié de la « chronological lifespan » chez *rpn11-m1*. J'ai ensuite choisi de tester *RevA5* et les diverses souches que j'ai construites et seule la souche *rpn11-m1* (ou *rpn11-m1-HA*) présente une diminution de moitié de la « chronological lifespan ». Les autres souches montrent une longévité de plus de 40 jours (Fig. 87). Il est intéressant de noter que l'ajout du tag HA pourrait influer légèrement sur cette « chronological lifespan » puisque la souche *rpn11-m1-HA* montre une longévité légèrement supérieure à la vingtaine de jours trouvée précédemment.

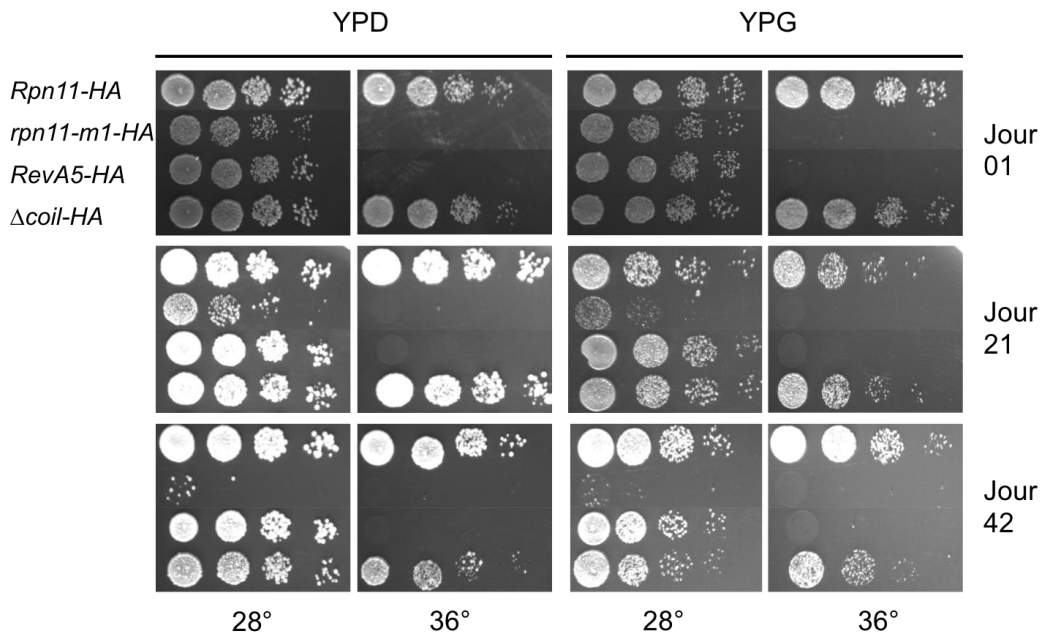

Figure 87 : Seule la souche *rpn11-m1-HA* montre une « chronological lifespan » réduite.
Dilution en série par pas de 10 après culture en YPD. La première goutte est ajustée à DO_{600} = 1. La capacité de croissance a été testée à 26°C et 36°C sur YPD et YPG.

B. La surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 peut complémenter le défaut de « chronological lifespan » de *rpn11-m1*.

Comme la souche *rpn11-m1* présente un défaut de longévité, la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 pourrait être capable de complémenter ce défaut de longévité.

La même expérience a donc été effectuée avec des souches *W303* et *rpn11-m1* transformées avec un plasmide permettant la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 de longueur de 45 ou 100 acides aminés ou bien 25 ou 79 acides aminés pour le domaine C-terminal de Rpn11-m1 (Fig. 88).

L'introduction du plasmide BFG1 vide et/ou la culture des cellules en milieu « pauvre » permettant de maintenir une pression de sélection pour la conservation du plasmide provoque une forte diminution de la « chronological lifespan » des cellules : les souches *W303* transformées ne dépassent pas les 18 jours de survie dans de telles conditions et *rpn11-m1* ne dépasse pas 7 jours (Fig. 88). La surexpression du domaine C-terminal sauvage, en version 100 acides aminés ou 45 acides aminés, est capable de complémenter le défaut de longévité de la souche mutante (Fig. 88, lignes 1, 3, 6 et 8). Le domaine C-terminal de 45 acides aminés est même plus efficace puisqu'il est capable d'effectuer cette complémentation à 36°C pendant toute la durée de l'expérience (Fig. 88, ligne 8) et permet même d'allonger très légèrement la survie des souches sauvages et mutantes : 18 jours pour une *W303* surexprimant un tel domaine C-terminal contre 15 jours pour une *W303* transformée avec n'importe quel autre plasmide.

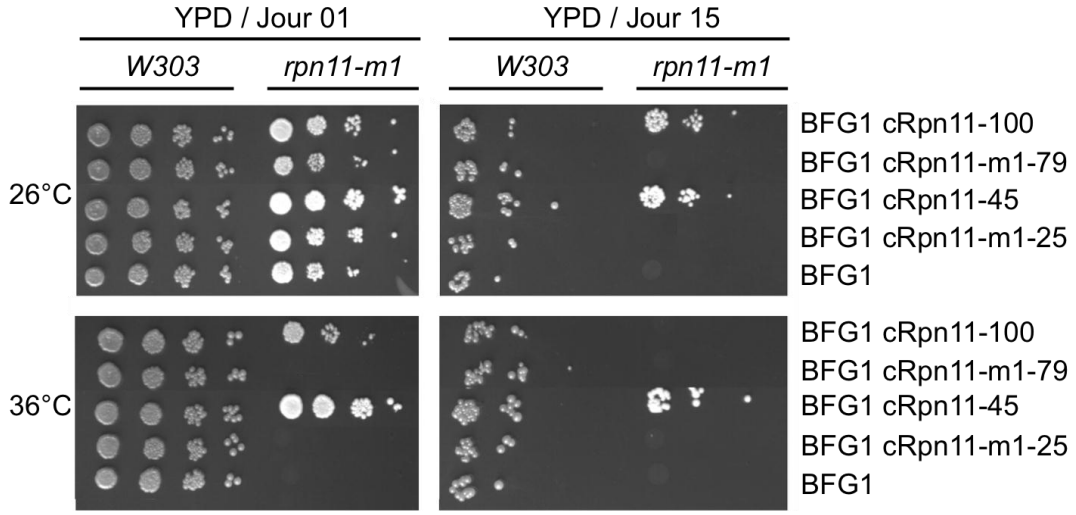

Figure 88 : La surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 complémente le défaut de « chronological lifespan » de la souche *rpn11-m1*.

Dilution en série par pas de 10 après culture en YPD. La première goutte est ajustée à DO_{600} = 1. La capacité de complémentation des peptides a été testée à 26°C et 36°C sur YPD. Le peptide surexprimé dans les souches est indiqué par cRpn11-45 ou cRpn11-m1-25 lorsqu'il s'agit respectivement des domaines C-terminaux sauvage et mutants « minimums » et cRpn11-100 ou cRpn11-m1-79 lorsqu'il s'agit respectivement des domaines C-terminaux sauvage et mutants « entiers ».

C. Les souches sont capables d'entrer en quiescence.

Si les cellules n'entrent pas en quiescence, la « chronological lifespan » pourrait être affectée. Nous avons donc voulu savoir si les souches testées étaient capables d'entrer en quiescence. Il a été montré que l'entrée en quiescence, qui correspond à la phase stationnaire, se traduit dans les cellules par une réorganisation du réseau d'actine et la formation des « actin bodies » (Sagot *et al.*, 2006). Pour savoir si l'entrée en quiescence est effective, trois phases de croissance sont utilisés pour analyser le réseau d'actine dans les cellules : la phase exponentielle, le shift diauxique où les cellules de levures vont passer d'un métabolisme utilisant le glucose à un métabolisme utilisant l'éthanol et la phase stationnaire. Le réseau d'actine est suivi au cours de ces trois phases après fixation des cellules par de la phalloïdine couplée au fluorochrome Alexa Fluor 488 ; ceci permettra de visualiser directement le réseau d'actine par microscopie à fluorescence en utilisant la longueur d'onde d'excitation et d'émission de la GFP. Lors de la phase exponentielle, il est possible d'observer le réseau d'actine ainsi que quelques patchs d'actine ; cette organisation est visible dans les quatre souches (Fig. 89, lignes « exponential phase »). Ce réseau est polarisé avec une très forte présence des patchs et des filaments dans les zones de croissance active telles que le bourgeon (Fig. 89, lignes « exponential phase »). En shift diauxique, les filaments sont désorganisés et les patchs se retrouvent « dépolarisés » au sein de toute la cellule ; cette organisation est visible pour les quatre souches (Fig. 89, lignes « diauxic shift »). Enfin, en phase stationnaire, les patchs d'actine se réorganisent en « actin bodies ». Les cellules peuvent présenter un ou plusieurs de ces « actin bodies » mais ils sont toujours formés de F-actine puisque cette structure est visible par l'utilisation de phalloïdine couplée au fluorochrome Alexa Fluor 488. Encore une fois, les quatre souches présentent cette structure particulière (Fig. 89, lignes « post diauxic phase »). Les quatre souches sont donc toutes capables d'entrer en quiescence. Le défaut de longévité cellulaire de la souche *rpn11-m1* n'a donc pas pour cause un défaut d'entrée en quiescence.

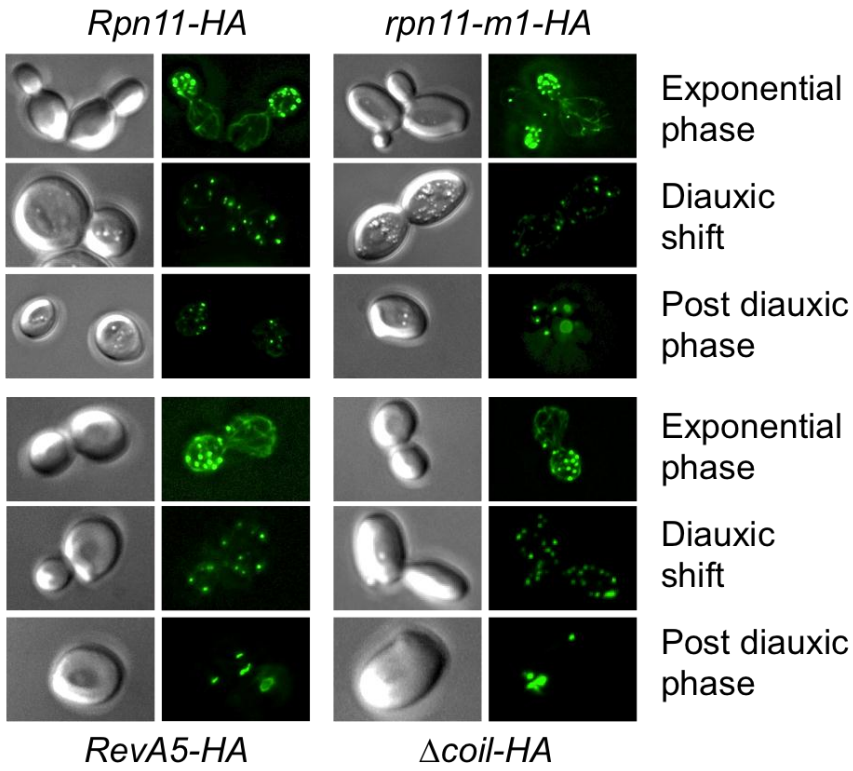

Figure 89 : Les souches sont capables d'entrer en quiescence.

La structure du réseau d'actine a été observée à différents stades par microscopie à fluorescence en utilisant de la phalloïdine couplée au fluorochrome Alexa Fluor 488.

D. La formation des PSG est absente chez *rpn11-m1*.

Une équipe a montré que lorsqu'une culture arrive en phase stationnaire, la localisation des protéasomes passe du noyau à la périphérie nucléaire puis au cytoplasme dans une ou plusieurs structures ponctuées appelées « **P**roteasome **S**torage **G**ranule » (PSG) (Laporte *et al.*, 2008). En cas d'ajout de milieu frais, les protéasomes sont relocalisés rapidement au noyau (Fig. 90) et ceci même en absence de synthèse protéique (présence de cycloheximide).

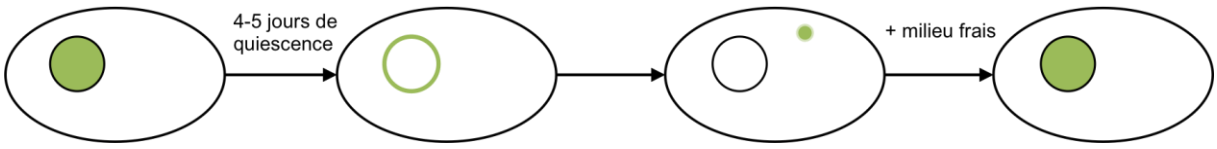

Figure 90 : Localisation des PSG.

La localisation du protéasome dans la cellule est indiquée en vert. La formation des PSG s'effectue après quelques jours de quiescence. En cas d'ajout de milieu frais, ces structures disparaissent et le protéasome est relocalisé au noyau sans besoin de synthèse protéique.

1. La souche *rpn11-m1* est incapable de former les PSG.

Étant donné que le protéasome est mal assemblé dans la souche *rpn11-m1*, nous avons voulu savoir si la formation de ces granules pouvait se faire. La formation des PSG a été suivie avec les sous–unités Pre6 (20S), Rpn1 ou Rpt6 (base) et Rpn5 (lid) du protéasome en

fusion avec un tag GFP en C-terminal et exprimées à partir du locus chromosomique en présence ou non de la mutation *rpn11-m1*. La souche *rpn11-m1/RPT6-GFP* présentant un phénotype synthétique létal, cette sous-unité n'a pas été utilisée par la suite. J'ai aussi suivi la formation des PSG en présence des mutations *RevA5* et *Δcoil*.

Nous avons mis en culture les diverses souches que nous avons choisi d'utiliser jusqu'à la phase stationnaire et nous avons suivi la localisation des sous-unités étiquetées avec la GFP au microscope pendant 5 jours. Avec les conditions de culture que j'utilise, 5 jours de croissance dans un milieu liquide sont suffisants pour atteindre la phase stationnaire. J'ai aussi vérifié la DO_{600} des cultures pour confirmer l'atteinte de la phase stationnaire. Au terme de l'expérience, les souches *Rpn11-HA, RevA5-HA* et *Δcoil-HA* montraient une localisation ponctuée de Pre6-GFP, Rpn1-GFP et Rpn5-GFP (exemple avec Pre6-GFP, Fig. 91). Je n'ai retrouvé aucune structure ponctuée pour la souche *rpn11-m1-HA*, quel que soit la sous-unité du protéasome utilisée. Très peu de protéasome 26S est formé dans la souche *rpn11-m1*, ce résultat indique que seul le protéasome 26S peut former des PSG et qu'il n'existe pas de structure ponctuée avec le protéasome 20S seul ou 20S + base chez *rpn11-m1*.

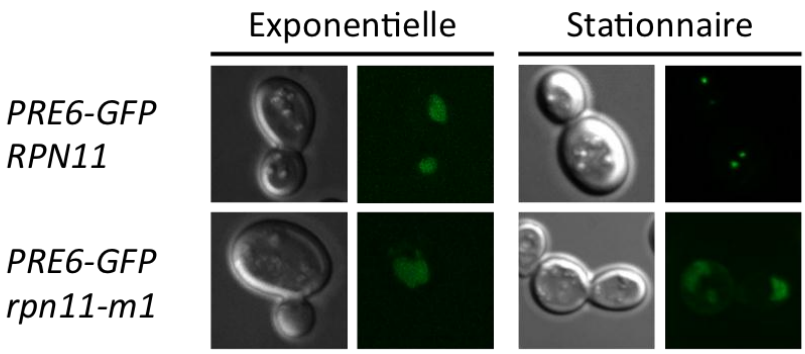

Figure 91 : Une souche *rpn11-m1/PRE6-GFP* est incapable de former des PSG.

La formation des PSG n'a pas pu être observée en phase stationnaire dans une souche *rpn11-m1/PRE6-GFP*. La localisation de Pre6-GFP dans les souches indiquées a été effectuée par microscopie à fluorescence en phase exponentielle ou stationnaire.

Nous avons mené une étude quantitative avec les sous-unités Rpn1-GFP et Rpn5-GFP en présence ou absence de la mutation *rpn11-m1*. Pour cette expérience, nous avons suivi la DO_{600} pour connaître la phase dans laquelle se situaient les cultures. Les cellules ont été examinées après J+1/2/5/8/11 pour les souches suivies avec Rpn1-GFP et J+1/2/5/7/8 pour les souches suivies avec Rpn5-GFP. Dans chaque cas, au minimum 100 cellules furent analysées au microscope. Le taux de survie des cellules a aussi été analysé. Les résultats montrent que la plupart des cellules des souches sans la mutation *rpn11-m1* présentent un signal GFP très rapidement localisé comme les PSG. Par contre les cellules des souches avec la mutation *rpn11-m1* montrent au mieux 40% de cellules avec une localisation de la GFP périnucléaire

(Fig. 92). Il résulte de cette expérience que *rpn11-m1* est incapable de former des PSG. Il est intéressant de noter que les courbes de survie décroissent assez vite pour toutes les souches sauf pour *Rpn5-GFP*. Cela laisse à penser que l'ajout de GFP en C-terminal de Rpn1 serait délétère pour la longévité cellulaire.

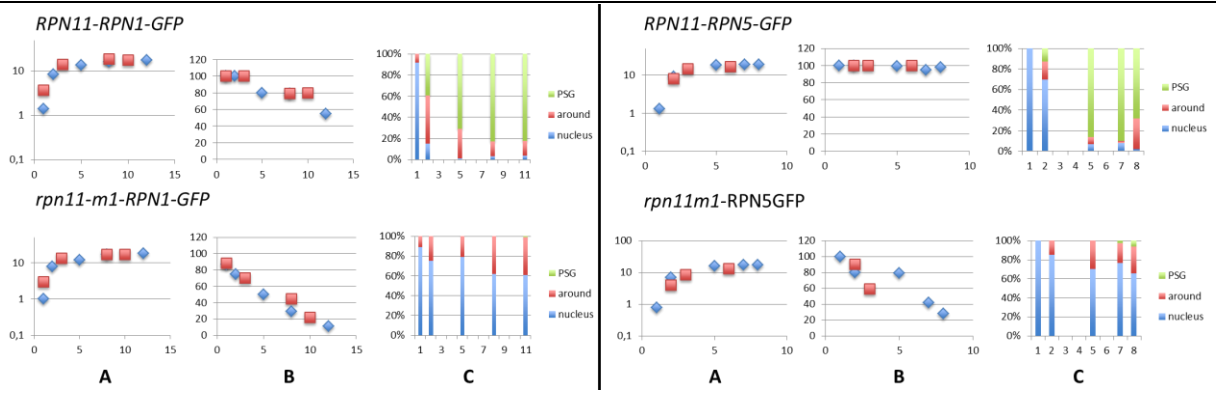

Figure 92 : La formation des PSG est défectueuse dans la souche *rpn11-m1*.

A. Courbes de croissance de deux expériences distinctes pour les souches indiquées (carré rouge et losange bleu). Ces courbes ont été obtenues par l'analyse de la DO_{600} aux jours indiqués pour l'analyse des PSG.
B. Courbe de survie de deux expériences distinctes pour les souches indiquées (carré rouge et losange bleu). Ces courbes ont été obtenues après étalement théorique d'une centaine de cellules sur boite de Petri et du comptage du nombre de colonies formées aux jours indiqués pour l'analyse des PSG.
C. La formation des PSG a été suivie en microscopie avec les sous-unités Rpn1-GFP ou Rpn5-GFP. Une analyse de la localisation de la GFP a été effectuée aux jours indiqués sur un minimum de 100 cellules dans chaque cas. Est indiquée la moyenne du pourcentage de cellules présentant une localisation de la GFP au noyau (bleu), en périnucléaire (rouge) ou en PSG (vert).

2. La surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 est capable de complémenter le défaut de formation des PSG de la souche *rpn11-m1*.

Étant donné la correction du défaut d'assemblage du protéasome de la souche *rpn11-m1* apportée par le domaine C-terminal de Rpn11, j'ai voulu savoir si ce domaine était aussi capable de restaurer la formation des PSG. J'ai donc transformé les souches Rpn1-GFP et Rpn5-GFP qui portaient ou non la mutation *rpn11-m1* avec un plasmide permettant la surexpression du domaine C-terminal de 45 ou de 25 acides aminés. J'ai ensuite mis en culture ces souches jusqu'à la phase stationnaire et j'ai suivi la localisation de Rpn1-GFP ou Rpn5-GFP au microscope pendant 5 jours. Au terme de l'expérience, les souches qui ne portaient pas la mutation *rpn11-m1* ainsi que les souches *rpn11-m1* qui surexprimaient le domaine C-terminal sauvage de 45 acides aminés montraient une localisation ponctuée des sous-unités suivies (Fig. 93). La surexpression du domaine C-terminal sauvage de 45 acides aminés est donc capable de permettre à une souche *rpn11-m1* de former des PSG.

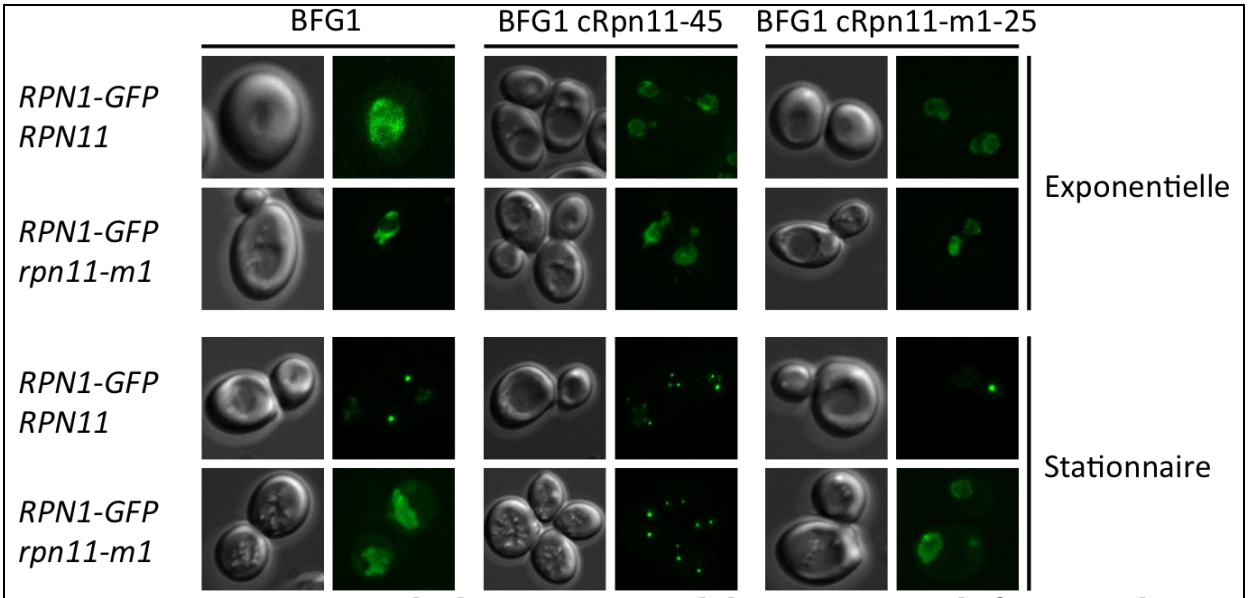

Figure 93 : La surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 permet la formation de PSG dans une souche *rpn11-m1*.

La formation des PSG n'a pas pu être observée après 5 jours de culture dans une souche *rpn11-m1* ; la surexpression du domaine C-terminal de 45 acides aminés de Rpn11 permet de complémenter ce défaut. La localisation de Rpn1-GFP a été effectuée par microscopie à fluorescence au premier jour de culture (exponentielle) ou au cinquième jour (stationnaire) de culture.

Nous avons aussi mené une étude quantitative avec la sous-unité Rpn1-GFP en présence ou absence de la mutation *rpn11-m1*. Pour cette expérience, nous avons suivi la DO_{600} pour connaître la phase dans laquelle se situaient les cultures. Dans chaque cas, au minimum 100 cellules furent analysées en microscopie. Les résultats montrent que la formation des PSG dans la souche *RPN1-GFP/rpn11-m1* qui surexprime le domaine C-terminal sauvage de 45 acides aminés pourrait être légèrement plus tardive qu'une souche sauvage. Cependant, ce retard pourrait être dû à la faible perte du plasmide permettant la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 en milieu riche. Malgré ce retard de formation, le nombre de cellules qui possèdent des PSG en fin d'expérience est identique à celui d'une souche sauvage (Fig. 94).

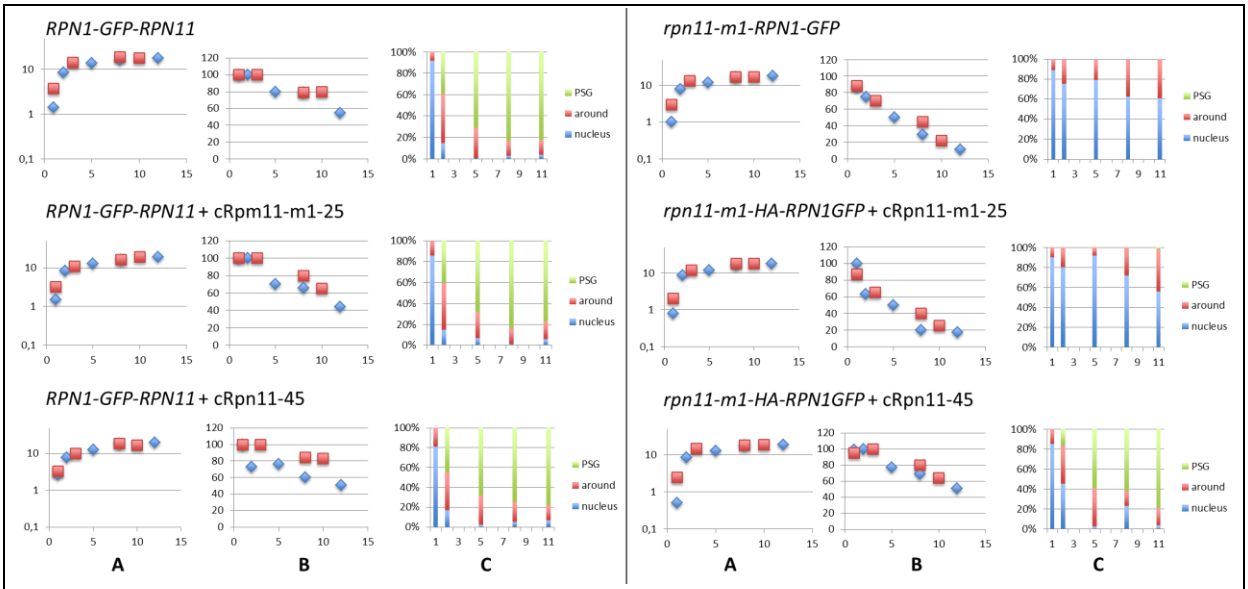

Figure 94 : La formation des PSG permise par la surexpression du domaine C-terminal sauvage dans une souche *rpn11-m1* pourrait être retardée.

Les souches ont été transformées par des plasmides BFG1 vide, ou permettant la surexpression des domaines C-terminaux de 45 ou 25 acides aminés. L'expérience s'est déroulée sur 11 jours.
A. Courbes de croissance de deux expériences distinctes pour les souches indiquées (carré rouge et losange bleu). Ces courbes ont été obtenues par l'analyse de la DO_{600} aux jours indiqués pour l'analyse des PSG.
B. Courbe de survie de deux expériences distinctes pour les souches indiquées (carré rouge et losange bleu). Ces courbes ont été obtenues après étalement théorique d'une centaine de cellules sur boite de Petri et du comptage du nombre de colonies formées aux jours indiqués pour l'analyse des PSG.
C. La formation des PSG a été suivie en microscopie avec les sous-unités Rpn1-GFP. Une analyse de la localisation de la GFP a été effectuée aux jours indiqués sur un minimum de 100 cellules dans chaque cas. Est indiquée la moyenne du pourcentage de cellules présentant une localisation de la GFP au noyau (bleu), en périnucléaire (rouge) ou en PSG (vert).

3. Le domaine C-terminal Rpn11 de 45 acides aminés est incorporé aux PSG.

Afin de savoir si le domaine C-terminal de 45 acides aminés pouvait aussi être localisé dans les PSG, j'ai fait la même expérience en transformant une souche *RPN5-GFP* avec ou sans la mutation *rpn11-m1* par un plasmide permettant la surexpression de la mCherry en fusion avec le domaine C-terminal de 45 acides aminés de Rpn11 (mCherry-cRpn11-45). La surexpression de cette protéine fusion est capable de complémenter les défauts de croissance à haute température de la souche *rpn11-m1*. Au terme des 5 jours de l'expérience, j'ai pu trouver une colocalisation entre les spots de Rpn5-GFP et les spots de mCHerry-cRpn11-45 (Fig. 95, flèche blanche et encadré de la dernière ligne). Un point intéressant est que je n'ai jamais observé de structure similaire avec cette construction surexprimée dans la souche sauvage. La construction mCherry-cRpn11-45 permettrait donc l'assemblage du protéasome 26S dans la souche *rpn11-m1* et y serait intégrée. Le protéasome 26S reconstitué pourrait alors former les PSG.

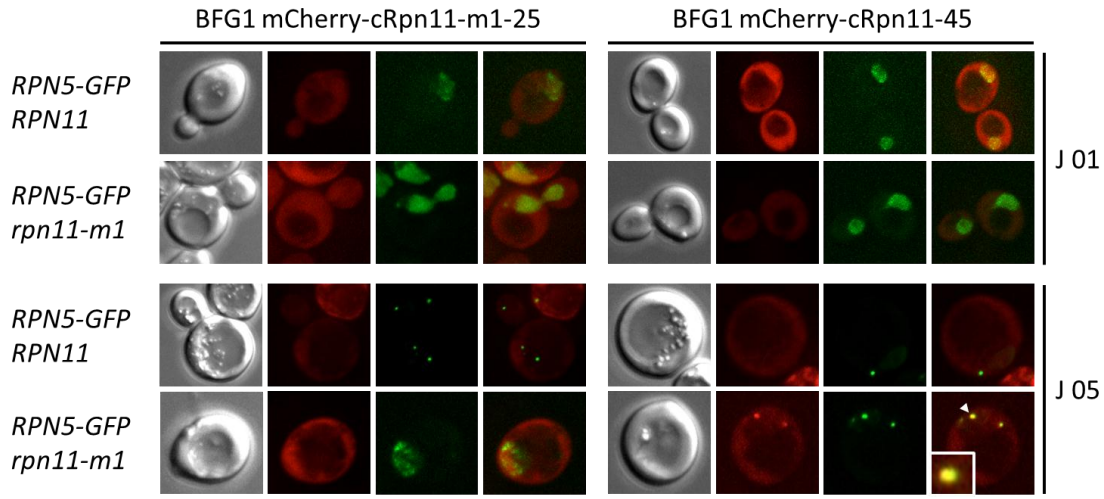

Figure 95 : Le domaine C-terminal peut être intégré aux PSG.

La localisation des protéines Rpn5-GFP et des constructions mCherry-cRpn11-45 ou mCherry-cRpn11-m1-25 a été effectuée par microscopie à fluorescence au premier jour de culture (J 01) ou au cinquième jour (J 05) de culture. La zone agrandie dans l'image en bas à droite est indiquée par une flèche blanche. Les cellules analysées en J 01 sont dans la phase exponentielle tandis que celles analysées en J 05 sont en phase stationnaire.

E. Récapitulatif et conclusions.

Il est intéressant de noter que la « chronological lifespan » diminuée de la souche *rpn11-m1* corrèle parfaitement avec l'absence de formation des PSG tandis que des souches formant des PSG ont une « chronological lifespan » normale. La présence du domaine C-terminal de Rpn11 est requise pour une formation des PSG dans la souche *rpn11-m1*. Le domaine C-terminal de Rpn11 est incorporé dans les PSG ainsi formés. Enfin, les souches *RevA5-HA* et *Δcoil-HA* montrent qu'il n'existe pas de corrélation entre un réseau mitochondrial anormal et une diminution de la « chronological lifespan » dans ces souches.

Discussion

Discussion

L'assemblage dynamique du protéasome peut permettre à des sous-unités ou des modules du protéasome d'effectuer des fonctions cellulaires en dehors du système ubiquitine-protéasome. À titre d'exemple, il a été montré que Rpn15, une sous-unité du lid, peut s'associer à d'autres complexes, Thp1/Sac3 pour l'export des ARNm ou Thp3/Csn12 pour l'épissage des ARNm (Wilmes *et al.*, 2008). Ainsi, le protéasome 26S est impliqué dans de nombreux processus cellulaires mais une de ses fonctions principales reste la dégradation des protéines. C'est avec sa fonction de protéase que le protéasome 26S régule la fusion mitochondriale. Pour effectuer cette fonction, les protéines cibles de la dégradation sont ubiquitinées puis doivent être déubiquitinées afin de permettre le passage de la protéine cible dans la cavité du protéasome 20S. Pour cela, le protéasome peut agir avec plusieurs déubiquitinases dont Rpn11. Rpn11 est une protéine essentielle de 306 acides aminés. C'est actuellement la seule déubiquitinase admise comme « résidente » au sein du lid du protéasome 26S. Elle possède une forte identité avec la protéine POH1 humaine en comparaison de l'identité conservée des autres sous-unités du lid.

L'utilisation du mutant isolé au laboratoire, nommé *rpn11-m1*, nous a permis de montrer que cette protéine provoquait une dérégulation de l'équilibre de la dynamique mitochondriale en augmentant la fission mitochondriale. Ceci se traduit par une fragmentation mitochondriale ainsi qu'une augmentation du nombre moyen de peroxysomes par cellule en condition de prolifération sur milieu oléate car dans un tel milieu, l'appareil de fission est partagé entre les mitochondries et les peroxysomes. Il avait déjà été montré que cette fonction de régulation s'effectuait en dehors de l'activité de déubiquitinase de Rpn11 au sein du protéasome et était supportée par le domaine C-terminal de Rpn11. Ce domaine contient un domaine « coiled-coil », dont la fonction exacte n'est pas connue, et une hélice α qui est importante pour un cycle cellulaire correct et une morphologie mitochondriale normale. Enfin, la localisation subcellulaire exclusivement mitochondriale de la protéine mutante Rpn11-m1-HA était très différente de la localisation cytosolique et mitochondriale de la protéine sauvage Rpn11-HA.

Lors de ma thèse je me suis beaucoup attaché à comprendre la fonction du domaine C-terminal avec l'étude de différents mutants de ce domaine. Ces divers mutants exprimés à partir du locus chromosomique ne présentent pas les mêmes défauts. De plus, la surexpression en *trans* de ces différents domaines C-terminaux mutés dans la souche *rpn11-m1* ne présente pas les mêmes capacités de complémentation. Leurs différentes caractéristiques nous

permettent de les utiliser comme des outils pour disséquer les fonctions des différents sous-domaines du domaine C-terminal de Rpn11. Les phénotypes trouvés au cours de ma thèse sont résumés dans la table 9 et vont être discutés plus en détail dans cette partie.

	W303-HA	*rpn11-m1-HA*	*RevA5-HA*	*Δcoil-HA*
Protéasome	26S	20S + 2*base	26S	26S
Mitochondries	Tubulaires	Fragmentées	Fragmentées	Anormales
Peroxysomes	+	+++	+++	+++
Petite	3%	3%	2%	2%
Température	36°C	28°C	34°C	36°C
PSG	Oui	Non	Oui	Oui
Longévité	Normale	Réduite	Normale	Normale

	M1 + cR11	*M1* + cR11-m1	*M1* + cRevA5	*M1* + cΔcoil
Protéasome	26S	20S + 2*base	20S + 2*base	26S ?
Mitochondries	Tubulaires	Fragmentées	Anormales	Anormales
Peroxysomes	+	+++	+++	+++
Température	36°C	28°C	36°C	36°C
PSG	Oui	Non	Oui	ND
Longévité	Normale	Réduite	ND	ND

	WT + cR11	*WT* + cR11-m1	*WT* + cRevA5	*WT* + cΔcoil
Protéasome	26S	26S	26S	26S
Mitochondries	Tubulaires	Tubulaires	Tubulaires	Fragmentées
Peroxysomes	+	+	+	+++
Température	36°C	36°C	36°C	36°C
PSG	Oui	Oui	Oui	ND
Longévité	Normale	Normale	ND	ND

Table 9 : L'intégrité du domaine C-terminal est importante pour la cellule.

Ce tableau résume les différents phénotypes obtenus dans chaque cas. Le terme « petite » correspond au nombre de colonies qui perdent leur ADN mitochondrial en phase exponentielle. La forme indiquée pour le protéasome est la forme la plus complète qu'il est possible de retrouver entre le 20S et le 26S. La ligne température indique la température maximale à laquelle une souche est capable de croitre sur milieu riche. ND : non déterminé.

I. Localisation mitochondriale de Rpn11.

Les expériences de localisation menées au laboratoire avaient déjà démontré que la protéine Rpn11-HA avait une double localisation cytosolique et mitochondriale. La protéine mutante Rpn11-m1-HA montrait par contre une localisation exclusivement mitochondriale. Au cours de ma thèse, j'ai confirmé ces résultats par fractionnement cellulaire et à la suite de purifications mitochondriales sur gradient de sucrose. Lors d'essais de réactivité d'anticorps dirigés contre POH1, l'homologue humain de Rpn11, j'ai pu mettre en évidence que la protéine mutée Rpn11-m1-HA subissait un clivage d'au moins ses épitopes HA fusionnés en C-terminal et qu'une fraction non négligeable de Rpn11-m1-HA était protégée de ce clivage. Nous avons mis en évidence que la protéine ayant subi le clivage d'au moins ses épitopes HA était localisée très majoritairement dans le cytosol alors que la protéine étiquetée était

exclusivement mitochondriale suggérant que cette forme était protégée du clivage à l'intérieur de la mitochondrie. Cette hypothèse semble être la bonne dans la mesure où nous avons pu montrer par des expériences de protéolyse ménagée que Rpn11-m1-HA pouvait se trouver à l'intérieur de la mitochondrie. Toutefois, ces expériences de localisation intramitochondriale mériteraient d'être affinées par un traitement à la protéinase K sur des mitoplastes pour pouvoir confirmer définitivement cette hypothèse. Les mitoplastes sont des mitochondries dont l'espace intermembranaire est rendu directement accessible à des protéases par élimination de la membrane externe. Ceci peut s'effectuer par un choc osmotique.

La localisation mitochondriale de Rpn11 et Rpn11-m1 est surement très spécifique puisque je n'ai pas pu mettre en évidence la présence de Rpn5 ou Rpn8, qui sont parmi les partenaires les plus directs de Rpn11, dans les purifications mitochondriales. Le protéasome n'est donc pas entièrement retrouvé à la mitochondrie. Toutefois, il est très intéressant de noter que Rpn11 ne serait pas la seule sous-unité du protéasome qui puisse être retrouvée dans la mitochondrie. En effet, la protéine Rpt3-GFP est localisée aux mitochondries. Cette localisation est observée en microscopie (résultats obtenus au laboratoire et sur http://www.yeastgenome.org/). De plus, il a été montré que la surexpression de Rpt3 est capable de complémenter les défauts d'une souche Δ*yme1* (Campbell *et al.*, 1994). Yme1 est une protéase mitochondriale située dans la membrane interne. Elle est responsable de la dégradation des protéines mitochondriales mal repliées et a aussi un rôle dans le repliement des protéines de l'espace intermembranaire. Enfin, Rpt3 et Yme1 sont des protéines qui font partie d'une même famille de protéine : les AAA-ATPases. Rpt3 pourrait donc être présente dans la mitochondrie pour agir dans une voie similaire à celle de Yme1. Par analyse *in silico*, je n'ai pas retrouvé de signal d'import mitochondrial pour Rpn11 et Rpt3. Cependant, un nombre important de protéines mitochondriales ne possède pas non plus ce signal d'import. Il serait intéressant de confirmer la localisation mitochondriale de Rpt3 par fractionnement cellulaire et d'affiner sa localisation au niveau de la mitochondrie.

II. Fonction de Rpn11 à la mitochondrie.

Nous avons montré qu'il était possible de provoquer une augmentation du nombre moyen de peroxysomes par cellule en glucose lors de la délocalisation de l'appareil de fission mitochondrial aux peroxysomes dans une souche Δ*fis1* (Hofmann *et al.*, 2009). L'action de Rpn11 pour augmenter la fission des mitochondries et des peroxysomes s'effectue donc directement ou indirectement sur cet appareil. Lors de ma thèse, je n'ai pas pu montrer une interaction entre l'appareil de fission et Rpn11 lors de pulldown ou plus indirectement par

fractionnement cellulaire. Toutefois, un résultat récent suggère qu'il faudrait effectuer de nouveau ces expériences pour s'assurer du résultat obtenu lors de ma thèse. En effet, les protéines adaptatrices entre Fis1 et Dnm1, que sont Mdv1 et Caf4, sont supposées être redondantes dans leur fonction de protéine adaptatrice mais une souche Δ*caf4/rpn11-m1* montre un phénotype bien différent d'une souche Δ*mdv1/rpn11-m1*. Dans une souche Δ*caf4/rpn11-m1,* on observe des amas de cellules de morphologie anormale qui restent attachées entre elles dans un milieu glucose et dès la température permissive (Fig. 96). Ceci montre une relation spécifique de Caf4 avec Rpn11-m1 et pose la question de la redondance fonctionnelle réelle de ces protéines ainsi que de leur rôle principal au sein de la cellule.

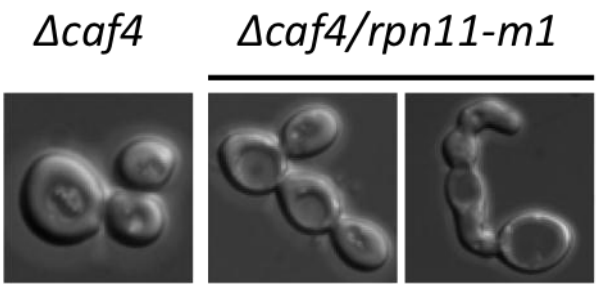

Figure 96 : Une souche Δ*caf4/rpn11-m1* présente un phénotype très particulier.
Ces images ont été obtenues par microscopie après une culture en milieu glucose à 26°C.

J'ai mis en évidence que la localisation membranaire des protéines Rpn11 mutées comparée à celle de la forme sauvage est très différente. La protéine Rpn11-m1 ainsi que RevA5 sont retrouvées comme exclusivement membranaires. Ceci contraste fortement avec la localisation exclusivement soluble de la protéine Rpn11. L'affinité pour la membrane externe et/ou interne des protéines mutées est donc plus forte que l'affinité d'une protéine sauvage. Avec cette expérience, dans les conditions que j'ai utilisées, je ne peux pas distinguer s'il s'agit de la membrane mitochondriale externe ou interne dans lesquelles on retrouve les protéines mutées. Par analyse *in silico*, je n'ai pas retrouvé de segments transmembranaires. Cependant, j'ai pu partiellement extraire ces protéines des membranes lors du traitement au carbonate. Plusieurs équipes travaillant sur des protéines mitochondriales avec un simple insert membranaire ont suggéré que le traitement avec le tampon carbonate, qui est très basique, est capable d'extraire ce type de protéine de la membrane au moins partiellement (Dimmer *et al.*, 2005; Frederick *et al.*, 2004; Mokranjac *et al.*, 2003). On peut suggérer que les mutations de Rpn11 modifient la structure tertiaire de la protéine et permettent son insertion dans la membrane mitochondriale interne ou externe dont la partie soluble ferait face à l'espace intermembranaire. Cette partie soluble pourrait être le domaine C-terminal des protéines mutées puisque les épitopes HA sont protégés du clivage cytosolique. Le défaut de

la morphologie mitochondriale des souches *rpn11-m1*, *RevA5* et *Δcoil* pourrait être en partie expliqué par l'affinité des protéines mutées pour les membranes.

Au laboratoire, en comparant les morphologies mitochondriales de souches *Δfission/rpn11-m1* et *Δtubulation/Δfission* ; nous avons aussi mis en évidence qu'il existait un lien entre *rpn11-m1* et l'appareil de tubulation. La localisation mitochondriale de Rpn11 à la périphérie des mitochondries semble normale par rapport à sa fonction de régulation de la fission des mitochondries et potentiellement son interaction avec l'appareil de tubulation. Par contre, la localisation intramitochondriale de Rpn11, si elle est confirmée, ouvre la voie à de nouvelles perspectives. Il est possible que Rpn11 ne fasse pas qu'une régulation de la fission externe des mitochondries. En effet, tous les acteurs connus de la fission mitochondriale ou de la tubulation sont sur la membrane externe mitochondriale (RE pour Mmm1) et l'accès à l'espace intermembranaire de la protéine Rpn11 soulève la question d'un nouveau rôle de Rpn11.

Une étude suggère l'existence d'un appareil de fission de la membrane mitochondriale interne avec un complexe qui contiendrait Mdm33, une protéine de la membrane mitochondriale interne de fonction inconnue (Messerschmitt *et al.*, 2003). Nous pourrions donc imaginer que Rpn11, qui régule la fission mitochondriale, soit aussi obligée d'accéder à l'espace intermembranaire pour réguler la fission de la membrane interne avant la fission de la membrane externe. L'action de Rpn11 pourrait donc être à la périphérie des mitochondries pour la fission de la membrane mitochondriale externe et des peroxysomes, mais aussi intramitochondriale pour la fission de la membrane mitochondriale interne. L'action de Rpn11 sur la membrane mitochondriale interne pourrait aussi se faire par un mécanisme impliquant Phb2 et Mpa43. Ces deux protéines, retrouvées comme interactants lors du crible double hybride, sont des protéines mitochondriales.

Ces observations effectuées au cours de ma thèse soutiennent l'idée que la double localisation de la protéine Rpn11 est liée à sa double fonction au sein de la cellule.

III. Les partenaires de Rpn11.

J'ai recherché les protéines qui interagissent avec le domaine C-terminal de Rpn11 en commençant par analyser les protéines requises pour la localisation mitochondriale de Rpn11. J'ai pu mettre en évidence qu'il ne s'agissait pas de l'appareil de tubulation, du système MAD ou de l'appareil de fission mitochondrial. Pour tenter d'obtenir d'autres candidats, j'ai donc

mené un crible double hybride qui m'a permis de trouver plusieurs cibles mitochondriales potentielles : Pus9, Phb2, Ssq1 et Mpa43.

Parmi ces interactants, nous avons testé et confirmé l'interaction des protéines Mpa43, protéine mitochondriale de fonction inconnue et la prohibitine Phb2. Phb2 est une protéine de la membrane interne mitochondriale formant une structure en anneau avec Phb1. Les anneaux de prohibitine ont été proposés pour créer et servir de limite à des microdomaines en incluant ou en excluant des protéines membranaires ou des lipides particuliers en leur sein (Osman *et al.*, 2009b). Phb2 n'interagit qu'avec la protéine Rpn11 sauvage et Phb1 n'a pas été retrouvée comme interactant lors de notre crible double hybride. Cette interaction spécifique est très intéressante puisque Phb1 et Phb2 ont 50% d'identité de séquence. De plus, les deux fusions différentes de Phb2 avec le domaine Gal4AD retrouvées plusieurs fois lors du crible double hybride se recouvrent sur une région qui montre 65% d'identité entre Phb1 et Phb2. Une étude a montré que plusieurs gènes dont des gènes de l'appareil de tubulation ainsi qu'*YME1* devenaient essentiels en absence de *PHB2*, démontrant ainsi un lien génétique entre Phb2 et ces différents gènes (Osman *et al.*, 2009a). Nous avons montré que Mpa43 interagit plus fortement avec la protéine mutée Rpn11-m1 que Rpn11 sauvage. Mpa43 est une protéine mitochondriale de fonction inconnue et son étude mériterait d'être poursuivie.

Pus9 est une protéine mitochondriale qui catalyse la formation de pseudouridine sur les ARNt mitochondriaux. Elle a été retrouvée plusieurs fois comme interactant avec le domaine C-terminal muté de Rpn11 lors du crible double hybride mais en une seule fusion. Ssq1 est une protéine chaperonne de type Hsp70 (homologue de la frataxine humaine) requise pour l'assemblage des clusters fer-soufre. Elle n'a été retrouvée qu'une seule fois comme interactant avec le domaine C-terminal sauvage lors du crible double hybride.

J'ai indiqué, dans la partie résultats, les premiers interactants que nous avons choisis pour confirmer une interaction physique entre les domaines C-terminaux Rpn11 ou Rpn11-m1 et ces cibles potentielles. Par exemple, nous avions choisi Duf1 car cette protéine est capable de lier deux déubiquitinases, Ubp9 et Ubp13, et de les activer. Les mutants *Δduf1*, *Δubp9 ou Δubp13* montrent un défaut respiratoire qui n'est pas aggravé dans un mutant *Δduf1Δubp9Δubp13*. Ce phénotype a pour origine un défaut dans la traduction d'Atp9, une sous-unité du complexe ATP synthase qui est codée à partir du génome mitochondrial de levure (Kanga *et al.*, 2012). J'ai pu montrer ici que les 139 derniers acides aminés de Duf1 étaient capables d'interagir avec Rpn11, une autre déubiquitinase. La protéine Duf1 pourrait donc servir de plate-forme pour activer ces déubiquitinases afin qu'elles puissent effectuer leur fonction mitochondriale.

D'autres interactants n'ont pas été choisi lors des premiers tests soit parce qu'ils ne se sont révélés intéressants qu'après une relecture attentive des résultats, soit par manque de temps pour effectuer les tests. Toutefois cette relecture attentive a permis de voir que Rpn11 pourrait intervenir dans différents processus cellulaires regroupés sur la figure 97. On retrouve quatre grandes fonctions : la fonction de déubiquitinase avec Duf1 ; la fonction mitochondriale ; une fonction de transcription/métabolisme des ARN et une fonction en relation avec un complexe E3 ubiquitine-ligase (Rsp5).

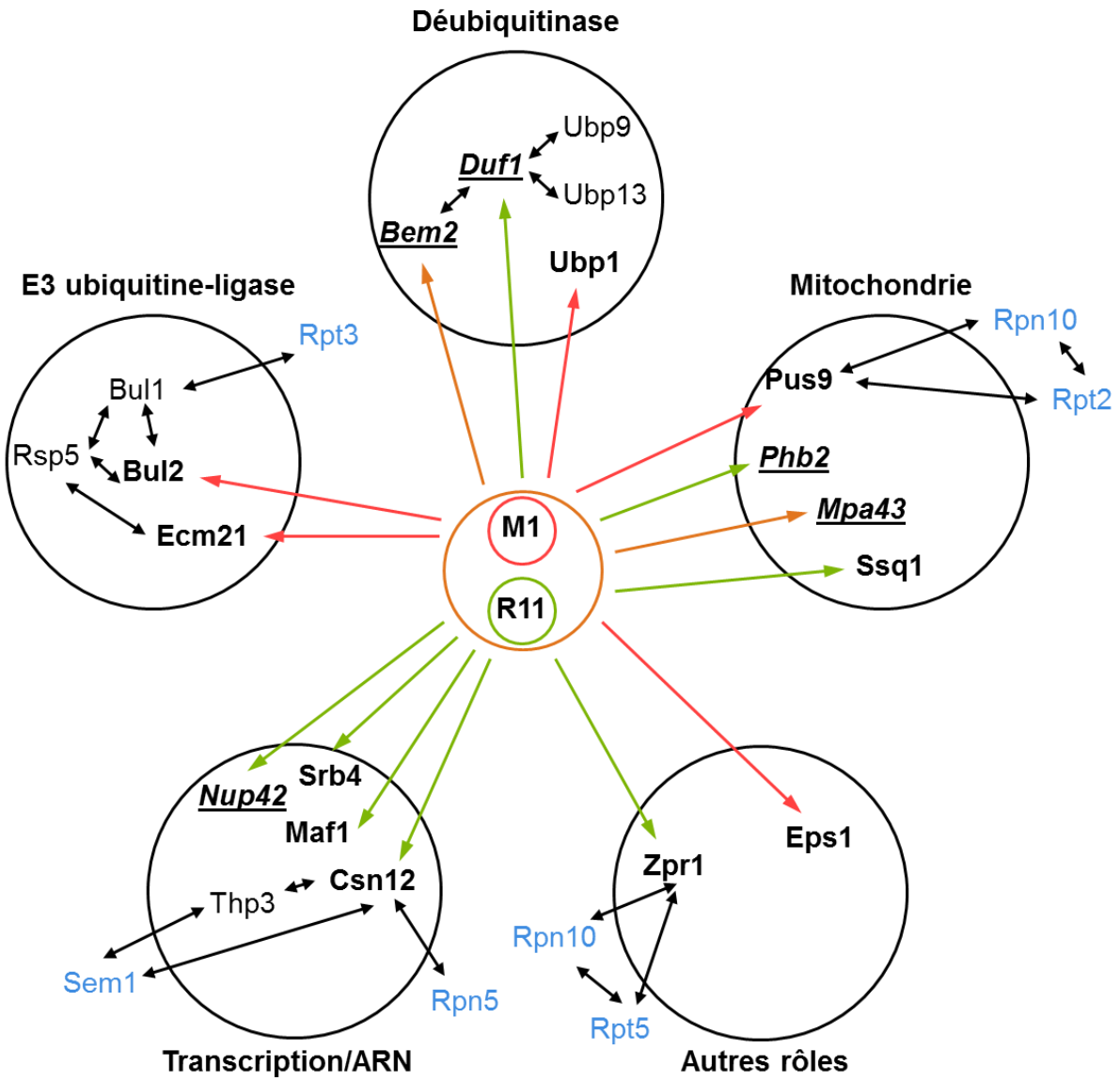

Figure 97 : Les divers processus cellulaires où Rpn11 pourrait être impliquée.

Ce schéma a été effectué à partir des interactants obtenus lors du crible double hybride effectué au laboratoire (en gras). Les processus ont été déduits à partir du regroupement des interactants qui me semblaient les plus intéressants. Les interactions spécifiques à Rpn11 sont indiquées en vert ; celles spécifiques à Rpn11-m1 en rouge. Les interactions où les deux protéines ont été retrouvées sont indiquées en orange. En italique et souligné sont indiqués les interactants dont l'interaction a déjà été testée. En bleu sont indiquées les sous-unités du protéasome qui ont des interactions avec les protéines ou les complexes retrouvés dans le crible. R11 = Rpn11, M1 = Rpn11-m1.

Parmi tous ces interactants impliqués dans ces processus, certains me paraissent particulièrement intéressants :

- Bem2 : cette protéine interagirait avec le domaine C-terminal sauvage (retrouvée 2 fois) et muté (retrouvée 2 fois). Chaque fusion avec le domaine Gal4AD est différente mais encadre la région des acides aminés 230-626 sur les 2168 acides aminés de Bem2. C'est une protéine Rho GTPase requise pour l'émergence du bourgeon et pourrait donner une piste pour expliquer le défaut de morphologie cellulaire observé chez *rpn11-m1* à température permissive où on observe souvent des cellules avec des bourgeons allongés. La souche *BEM2-GFP/rpn11-m1-HA* montre un phénotype synthétique létal. De plus, Bem2 semble interagir avec Duf1 (« **S**accharomyces **G**enome **D**atabase », SGD).
- Bul2 : cette protéine qui n'interagirait qu'avec le domaine C-terminal muté (retrouvée 1 fois) est un composant du complexe E3 ubiquitine-ligase Rsp5. Les données disponibles sur SGD indiquent que l'homologue fonctionnel de cette protéine, Bul1, serait capable d'interagir avec Rpt3.
- Ecm21 : cette protéine interagirait uniquement avec le domaine C-terminal muté (retrouvée 1 fois). Ecm21 est un substrat de Rsp5. Si l'interaction avec Bul2 est aussi confirmée, l'interaction avec cette protéine renforcerait l'implication de Rpn11 avec des E3 ubiquitine-ligases dont Rsp5 fait partie.
- Eps1 : cette protéine a un rôle dans la reconnaissance des cibles du système ERAD. Elle pourrait donc aussi être impliquée pour la reconnaissance des cibles du système MAD. Elle n'interagirait qu'avec le domaine C-terminal muté (retrouvée 1 fois) et cette interaction anormale pourrait expliquer les défauts de morphologie mitochondriale observés dans des souches *rpn11-m1* par la dérégulation de la dégradation de protéines cibles du système MAD. Cependant, Fzo1, qui est une cible du système ubiquitine-protéasome (Cohen *et al.*, 2008) et potentiellement MAD, ne montre pas un temps de demi-vie modifié chez *rpn11-m1* à 28°C.
- Zpr1 : c'est une protéine essentielle avec deux domaines « doigts de zinc » qui est localisée dans le noyau dans les cellules en phase exponentielle mais se relocalise au cytoplasme pendant la phase stationnaire. Cette protéine a déjà été retrouvée comme interagissant physiquement avec Rpn11 (retrouvée 1 fois lors du crible double hybride effectué au laboratoire et 2 fois en interaction physique dans des cribles à grande échelle, SGD). Deux autres sous-unités du protéasome ont été retrouvées comme interagissant avec Zpr1 dans plusieurs études indépendantes : Rpn10 et Rpt5. Étant

donné la localisation de Zpr1 en phase stationnaire, il serait intéressant de savoir si cette protéine ne pourrait pas jouer un rôle dans la formation des PSG ce qui pourrait donner une piste d'étude pour expliquer l'absence de formation de PSG chez *rpn11-m1*.

Le classement des interactants retrouvés lors du crible double hybride permet de montrer que Rpn11 aurait une implication dans différents processus cellulaires (Fig. 97). Toutefois, ce classement ne permet pas d'exclure le fait que les rôles où Rpn11 serait impliquée pourraient être en relation avec le rôle de Rpn11 au sein du protéasome.

Il a été proposé que POH1, l'homologue humain de Rpn11, soit principalement une protéine capable de cliver les ubiquitines liées en K63 (Cooper *et al.*, 2009). Il a été suggéré que ce type de marquage serait plutôt lié à une signalisation mais il a aussi été montré que cette ubiquitination pouvait servir de cible de dégradation par le protéasome 26S (Hoppe *et al.*, 2000; Ossareh-Nazari *et al.*, 2010; Saeki *et al.*, 2009a). Certaines de ces ubiquitinations sont effectuées par Rsp5, une E3-ligase de la famille Nedd4 (la seule représentante de cette famille chez *S. cerevisiae*) qui forme un complexe pour l'ubiquitination de protéines cibles avec notamment Bul1/Bul2 (Costanzo *et al.*, 2010). Nous venons de voir que Bul2 et Ecm21, si l'interaction est confirmée, pourraient permettre d'établir une relation forte entre le complexe Rsp5 et Rpn11. Un mutant de Rsp5 ou de Bul1 peut complémenter les défauts d'une mutation de la protéine Mdm1, une protéine requise pour le passage des mitochondries et du noyau dans la cellule fille (Fisk and Yaffe, 1999). Même si *rpn11-m1* ne présente pas ce genre de défaut, il n'est pas impossible que le complexe Rsp5 joue un rôle assez important à la mitochondrie et que ce rôle soit relié aux fonctions mitochondriales de Rpn11 et Rpt3. L'idée que Rsp5 et Rpn11 puisse jouer un rôle en commun à la mitochondrie est renforcée par le fait que Rsp5 est capable d'interagir avec Mdm34, une des protéines du complexe de tubulation.

Afin d'affiner la compréhension des interactions retrouvées en double hybride, les tests pour savoir si les autres domaines C-terminaux Δcoil et RevA5 peuvent interagir avec les cibles déjà retrouvées lors du crible double hybride sont en cours.

IV. Effet pléiotrope des différentes mutations.

La surexpression en *trans* d'un domaine C-terminal sauvage dans une souche *rpn11-m1* est capable de complémenter à la fois le défaut de croissance à haute température et le défaut de morphologie mitochondriale. Les mutants utilisés au cours de ma thèse ou

caractérisés dans une étude précédente (Fig. 98, (Rinaldi *et al.*, 2008)) montrent des phénotypes communs mais aussi des phénotypes spécifiques à certaines mutations. Ainsi, de tous les mutants étudiés du domaine C-terminal ; seuls les mutants Rpn11-N291A et Rpn11-I292P (Fig. 98) qui ont été obtenus par mutagénèse dirigée montrent une augmentation importante du nombre de cellules ayant remanié ou perdu leur génome mitochondrial, perdant de ce fait leur capacité respiratoire. Cela suggère que ces mutants présentent un défaut du réseau mitochondrial qui serait dû à un défaut de fusion ou de tubulation plutôt qu'à un défaut de fission. Tous les autres mutants que j'ai étudiés ont un génome mitochondrial stable, ce qui rend improbable une action sur la fusion mitochondriale. Les mutants *rpn11-m1*, RevA5 et Δcoil que j'ai utilisés au cours de ma thèse montrent une augmentation du nombre de peroxysomes en condition d'induction et un réseau mitochondrial fragmenté à cause d'une fission exacerbée.

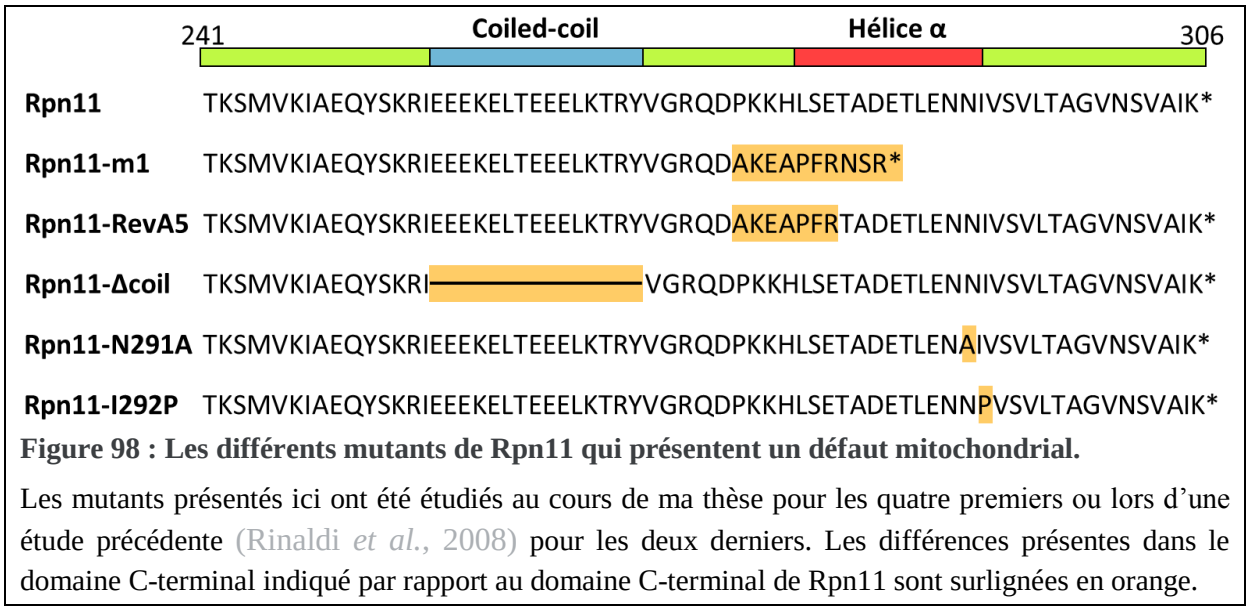

Figure 98 : Les différents mutants de Rpn11 qui présentent un défaut mitochondrial.

Les mutants présentés ici ont été étudiés au cours de ma thèse pour les quatre premiers ou lors d'une étude précédente (Rinaldi *et al.*, 2008) pour les deux derniers. Les différences présentes dans le domaine C-terminal indiqué par rapport au domaine C-terminal de Rpn11 sont surlignées en orange.

Les mutants utilisés ont donc permis d'affiner les domaines importants du domaine C-terminal de Rpn11 pour la morphologie mitochondriale. Le domaine « coiled-coil », les deux derniers acides aminés de l'hélice α et les 7 acides aminés différents entre RevA5 et Rpn11 sont importants pour une morphologie mitochondriale normale. Je vais discuter dans cette partie des mécanismes potentiels qui pourraient rendre compte de l'importance des domaines susmentionnés et de la capacité de complémentation du défaut de croissance et de morphologie mitochondriale du domaine C-terminal de Rpn11.

A. Complémentation du défaut de croissance.

La surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 est capable de complémenter le défaut de croissance de la souche *rpn11-m1* à haute température. J'ai pu déterminer le domaine fonctionnel C-terminal minimum de Rpn11 comme étant constitué des 45 derniers

acides aminés puisque la surexpression de ce peptide est capable de complémenter le défaut de croissance sur glucose et glycérol de la souche *rpn11-m1* à haute température. La capacité de ce domaine à augmenter légèrement la longévité d'une souche sauvage lors de sa surexpression montre que le domaine C-terminal de 45 acides aminés est plus efficace que le domaine C-terminal de 100 acides aminés précédemment utilisé au laboratoire. Je me suis donc concentré au cours de ma thèse sur le domaine C-terminal de 45 acides aminés. Toutefois les domaines C-terminaux de 60, 75 et 85 acides aminés seraient aussi intéressants à étudier car ils montrent une capacité de complémentation du défaut de croissance de *rpn11-m1* sur glucose mais aucun d'entre eux n'est capable de complémenter le défaut de croissance sur glycérol à haute température. C'est la première fois que ce phénotype est observé lors de la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11. Cela suggère qu'il existe une information importante entre les acides aminés 100 et 60 du domaine C-terminal (soit respectivement les acides aminés 206 et 246 de Rpn11) pour la complémentation du défaut de croissance en glycérol par un domaine C-terminal supérieur à 45 acides aminés. Ces versions « intermédiaires » du domaine C-terminal de Rpn11 peuvent donc servir d'outils moléculaires pour analyser les sous domaines importants du domaine C-terminal de Rpn11 à la manière des domaines C-terminaux de RevA5 et Δcoil.

Nous avons étudié la capacité des souches à former des « proteasome storage granule » (PSG) en phase stationnaire en suivant la localisation des protéines Rpn1-GFP (base) ; Rpn5-GFP (lid) et Pre6-GFP (20S). J'ai pu montrer que seule la souche *rpn11-m1* était incapable de former des PSG et que cela semble être relié à l'incapacité de cette souche à former du protéasome 26S. J'ai aussi pu montrer que la surexpression d'un domaine C-terminal de 45 acides aminés dans une souche *rpn11-m1* était capable de permettre la formation de (PSG) en phase stationnaire. Le domaine C-terminal de 45 acides aminés serait intégré dans la structure du protéasome comme en atteste la colocalisation d'une protéine chimère mCherry-c45 surexprimée avec les PSG dans la souche *rpn11-m1*. Il a été montré que les protéines Rpn8 et Rpn11 forment une « pince » qui semblerait être nécessaire au maintien du lid (Beck *et al.*, 2012). On peut donc imaginer assez aisément que la complémentation du défaut de croissance du domaine C-terminal surexprimé en *trans* passe par des interactions avec le protéasome et surtout Rpn8. Cependant, des expériences de pulldown avec des protéines GST-C-terminal Rpn11 ou des protéines GST-Rpn8 avec des extraits cellulaires totaux n'ont pas permis de mettre en évidence une interaction entre ces deux protéines (Rinaldi *et al.*, 2008). Ceci pourrait s'expliquer par le fait que cette « pince » se formerait grâce à l'interaction du domaine C-terminal de Rpn11 avec plusieurs sous-unités du protéasome et notamment la base (Beck *et al.*, 2012).

Le domaine C-terminal de Rpn11 surexprimé dans une souche *rpn11-m1* serait donc capable dans un premier temps d'être recruté au niveau du protéasome, probablement parce qu'il permet à Rpn8 et *rpn11-m1* de former cette pince. Ceci est conforté par le fait que l'on retrouve en microscopie des protéines GFP-c45 avec une localisation qui ressemble à celle du protéasome lorsqu'il est surexprimé dans une souche *rpn11-m1*. Cette idée de complémentation du défaut de croissance qui passerait de façon primaire par la reformation de cette « pince » est aussi confortée par le fait que la surexpression du domaine C-terminal de 45 acides aminés est incapable de complémenter des défauts de croissance des souches Δ*rpn10* et Δ*hsm3* qui présentent des défauts d'assemblage du protéasome clairement non imputables à Rpn11.

B. Complémentation du défaut de morphologie mitochondriale.

J'ai montré que les souches *RevA5* et Δ*coil* présentent un assemblage du protéasome complet, c'est-à-dire sous forme 26S, et sont capables de former des PSG. Cependant, dans ces souches, les mitochondries sont toujours fragmentées. Lors de la surexpression des domaines C-terminaux de RevA5 et Δcoil dans une souche sauvage, leur présence n'affecte pas l'assemblage du protéasome mais la présence du domaine C-terminal Δcoil est capable de provoquer une fragmentation du réseau mitochondrial. La mutation RevA5, et surtout la mutation Δcoil, permettent donc de confirmer cette séparation entre l'assemblage défectueux du protéasome et la morphologie mitochondriale anormale. L'implication spécifique du domaine C-terminal dans la morphologie mitochondriale pourrait rendre compte de cet effet. La capacité du domaine C-terminal à interagir avec des protéines mitochondriales identifiées en double hybride permet aussi d'appuyer cette théorie.

La surexpression de protéines chimères N-terminal-Rpn11/C-terminal-Rpn8 est capable de complémenter le défaut de croissance mais pas celui du réseau mitochondrial bien que le protéasome soit correctement assemblé (Rinaldi *et al.*, 2004). Cela suggère que les cibles pour la complémentation du défaut mitochondrial et du défaut de croissance ne sont probablement pas les mêmes. Certaines cibles seraient plutôt engagées dans le cycle cellulaire, une activité de Rpn11 protéasome-dépendante, et d'autres cibles interviendraient dans la régulation de la morphologie mitochondriale, où l'activité de Rpn11 est protéasome-indépendante. La surexpression du domaine C-terminal Δcoil dans une souche sauvage est capable de provoquer une fragmentation mitochondriale mais n'affecte pas l'assemblage du protéasome. Cette observation indique que la surexpression du domaine C-terminal Δcoil dans une souche sauvage pourrait titrer un facteur nécessaire à une fission coordonnée (régulateur de la fission mitochondriale). Cette titration ne s'effectuerait pas ou moins bien par les

domaines C-terminaux de RevA5 et de Rpn11-m1 car l'affinité de ces domaines C-terminaux pour le facteur serait moins importante que celle du domaine C-terminal Δcoil ou Rpn11.

Une autre observation effectuée au cours de ma thèse fut l'affinité très forte des protéines mutées pour les membranes. J'ai cherché à savoir si la complémentation du défaut mitochondrial de la souche *rpn11-m1* par la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 se faisait grâce à une relocalisation de Rpn11-m1 dans la fraction soluble. Ce n'est pas le cas et ceci indique que cette complémentation ne s'effectue pas par la solubilisation des protéines mutées. Ainsi, dans l'hypothèse de la titration par le domaine C-terminal de Rpn11 d'un régulateur de la fission mitochondriale encore inconnu, nous pouvons distinguer quatre cas (Fig. 99). Le cas de la souche sauvage où Rpn11, et particulièrement le domaine C-terminal de Rpn11, interagit avec le facteur X et permet une inhibition du facteur X (Fig. 99A). Le second cas est celui de Rpn11-m1 où la protéine serait insérée dans la membrane externe mitochondriale, et particulièrement le domaine C-terminal, empêchant l'interaction entre Rpn11-m1 et le facteur X ce qui entraînerait une fission excessive (Fig. 99C). Le troisième cas correspond à la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 dans la souche rpn11-m1. Dans ce cas, le domaine C-terminal de Rpn11 peut interagir avec le facteur X, ce qui permet son inhibition et entraine un phénotype où le réseau mitochondrial est normal (Fig. 99D). Le dernier cas est celui de la surexpression du domaine C-terminal Δcoil dans la souche sauvage. Dans ce cas, le domaine C-terminal Δcoil, qui aurait une affinité plus importante pour le facteur X que Rpn11, serait incapable d'inhiber le partenaire X et provoquerait une fragmentation du réseau mitochondrial dans la souche sauvage (Fig. 99B). Notre modèle propose que le facteur X soit un inducteur de la fission mitochondriale. Son inactivation, par exemple à l'aide d'une délétion, devrait donc entrainer un phénotype de mitochondries en forme de filet.

Le domaine C-terminal de Rpn11 a donc deux fonctions principales : il aiderait au maintien du lid protéasome par la formation d'une « pince » entre Rpn8 et Rpn11 et il est impliqué dans la morphologie mitochondriale par le moyen d'une interaction avec une cible, encore inconnue, impliquée dans la régulation de cette morphologie mitochondriale. La complémentation du défaut mitochondrial de la souche *rpn11-m1* par le domaine C-terminal de 45 acides aminés se fait donc très probablement de façon indépendante de la complémentation du défaut d'assemblage de protéasome.

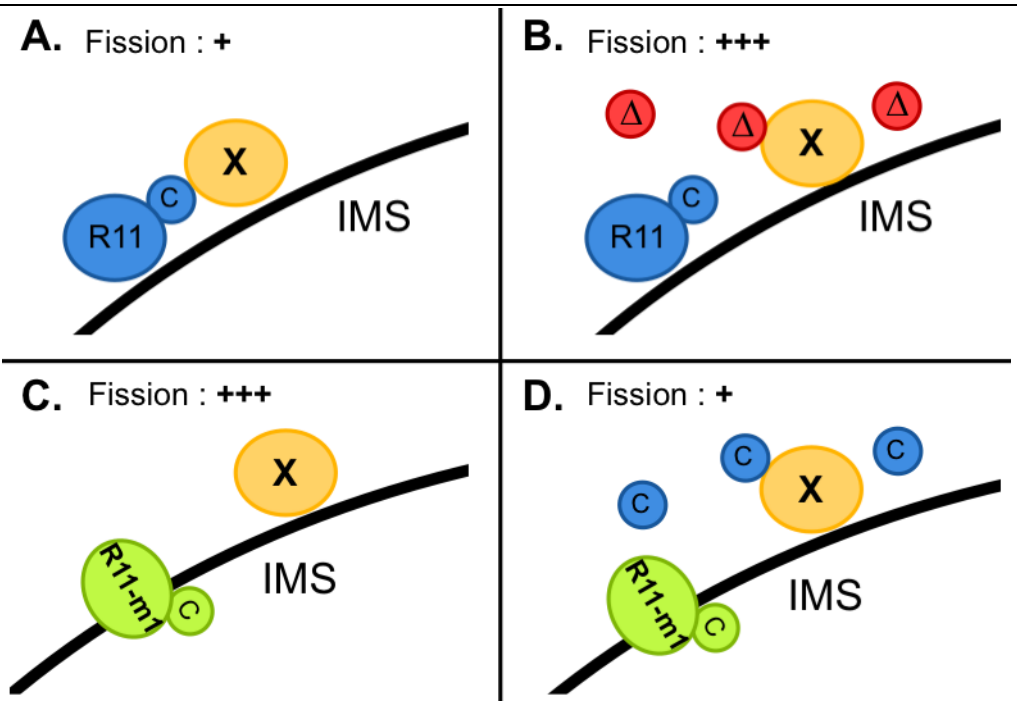

Figure 99 : Rpn11 agirait comme un inhibiteur de fission.

A. Rpn11 régulerait la fission mitochondriale *via* un partenaire X chargé de promouvoir la fission. **B.** Lors de la surexpression du domaine C-terminal Δcoil dans une souche sauvage, le domaine C-terminal entrainerait une impossibilité de régulation pour Rpn11 par titration du partenaire X provoquant le phénotype de fragmentation mitochondriale dans la souche sauvage.
C. Dans une souche *rpn11-m1*, l'affinité pour la membrane de Rpn11-m1 entrainerait une mauvaise localisation du domaine C-terminal, empêchant l'interaction avec le partenaire X, provoquant la fragmentation du réseau mitochondrial.
D. Dans une souche *rpn11-m1*, la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 permettrait de palier à l'impossibilité d'interaction avec le partenaire X permettant au réseau mitochondrial d'obtenir une forme sauvage dans une telle souche.
R11 = Rpn11, R11-m1 = Rpn11-m1, C = domaine C-terminal Rpn11 (bleu) ou Rpn11-m1 (vert), Δ = domaine C-terminal Δcoil (rouge), IMS = espace intermembranaire.

V. Rpn11 et la « chronological lifespan ».

La souche *rpn11-m1* présente un protéasome mal assemblé et n'est pas capable de former des PSG. J'ai pu montrer que la souche *rpn11-m1* possède une longévité en phase stationnaire diminuée de moitié. La formation des PSG semble donc nécessaire pour une longévité normale. La possibilité de complémenter le défaut de longévité ainsi que le problème de formation des PSG par la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 dans la souche *rpn11-m1* permet de conforter cette idée. Dans la souche *rpn11-m1*, le défaut de longévité corrèle aussi à une fragmentation mitochondriale. Toutefois, les souches *RevA5* et *Δcoil* présentent aussi cette fragmentation mitochondriale mais possèdent un protéasome bien assemblé ; sont capables de former des PSG et montrent une longévité normale comparée à la souche sauvage. Le défaut de longévité de *rpn11-m1* corrèle donc avec la non-formation des

PSG et l'assemblage du protéasome mais pas avec l'état de fragmentation du réseau mitochondrial. Il est donc possible qu'il y ait un lien entre la formation de PSG, qui est reliée à l'assemblage du protéasome, et la longévité en phase stationnaire. La souche *rpn11-m1* étant capable d'atteindre la phase stationnaire et pouvant entrer en quiescence, il serait donc probable que la formation des PSG soit nécessaire après l'entrée en quiescence pour une longévité normale.

L'état du réseau mitochondrial affecte la capacité respiratoire et peut être responsable d'une augmentation de la production de ROS. La production de ROS est soupçonnée d'être à l'origine de problèmes de longévité. Des études ont montré que la « chronological lifespan » de souches Δ*fzo1*, Δ*sod1* ou Δ*vms1* qui présentent une altération du réseau mitochondrial, une baisse de la capacité respiratoire et une augmentation de la quantité de ROS produite (Burtner *et al.*, 2011; Feser *et al.*, 2010; Heo *et al.*, 2010) était diminuée. Cependant, la formation de PSG est possible dans les souches Δ*fzo1*, Δ*sod1* ou Δ*vms1* (données obtenues au laboratoire). Ceci conforte l'hypothèse selon laquelle la « chronological lifespan » serait multifactorielle et ne pourrait pas s'expliquer uniquement par la formation des PSG, un réseau mitochondrial anormal, une augmentation de la production de ROS ou une capacité respiratoire amoindrie.

Il est intéressant de noter que la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 est capable d'augmenter légèrement la longévité d'une souche sauvage et de complémenter le défaut de longévité de la souche *rpn11-m1*. Cette observation est concordante avec une étude effectuée sur *Drosophila melanogaster* (Tonoki *et al.*, 2009). D'après cette étude, une augmentation de l'expression de Rpn11 est capable d'augmenter l'espérance de vie des drosophiles. Cette augmentation passe par le maintien de l'activité du protéasome 26S au cours de la vie de la drosophile. Cette étude a aussi montré qu'une diminution de cette activité par une perte de fonction de Rpn11 diminue l'activité du protéasome 26S et l'espérance de vie de la drosophile. Ces études pointent vers un rôle très important de Rpn11 dans la longévité cellulaire.

VI. Conclusions.

La complémentation des défauts de croissance à haute température et de morphologie mitochondriale à température permissive du mutant *rpn11-m1* par la surexpression du domaine C-terminal de Rpn11 se fait très probablement par deux moyens d'action. La complémentation des défauts de croissance corrélée à l'assemblage du protéasome passe probablement d'abord par un assemblage correct du protéasome permettant une croissance à

haute température. Cet assemblage serait permis probablement parce que le domaine C-terminal pourrait y être intégré et suppléer à la fonction de la partie « manquante » de la protéine Rpn11-m1. Concernant les mitochondries, cette complémentation se ferait par un autre mécanisme. Dans ce cas, je pense qu'il existe une titration d'un facteur requis pour réguler la fission mitochondriale par le domaine C-terminal. Cette interaction serait plus forte pour ce facteur avec les domaines C-terminaux Rpn11, Δcoil et RevA5 que Rpn11-m1. Le domaine C-terminal Δcoil aurait une affinité égale ou plus forte que le domaine C-terminal de Rpn11 car sa surexpression provoque un phénotype de mutant dominant négatif.

Nous avons vu que la présence du domaine C-terminal dans un espace cellulaire autre que le seul noyau était nécessaire pour permettre la complémentation du défaut de croissance de la souche *rpn11-m1*. L'existence d'un clivage des épitopes HA au sein d'une souche *rpn11-m1-HA* semble indiquer que la présence dans le cytosol de la protéine Rpn11-m1 est critique puisque la protéine qui ne possède plus ces épitopes est retrouvée en très grande majorité dans le cytosol. Cette présence cytosolique est surement due à la nécessité d'intégration de Rpn11-m1 dans le protéasome, même de façon très instable, pour permettre la survie cellulaire. Une fraction des protéines Rpn11-m1-HA n'est pas clivée d'au moins ses épitopes HA et cette fraction est uniquement mitochondriale. Ceci suggère qu'au sein de la mitochondrie, la protéine Rpn11-m1-HA est protégée du clivage d'au moins ses épitopes. Il est intéressant de noter que nous n'avons pas pu mettre en évidence un clivage de la protéine Rpn11-HA. J'ai pu montrer que Rpn11-m1 sans tag était aussi retrouvée à la mitochondrie, ce qui suggère qu'avec ou sans tag la protéine mutée pourrait être retrouvée au sein de la mitochondrie.

Concernant la localisation de Rpn11, deux hypothèses me semblent les plus probables :

- Soit il existe un assemblage/désassemblage dynamique du protéasome et une fois la protéine Rpn11 libérée de ses partenaires du protéasome, elle pourrait être importée dans la mitochondrie. Ceci pourrait aussi se faire pour Rpt3. Il pourrait donc exister une communication entre la mitochondrie et le cytosol pour Rpn11 et Rpt3 permettant la transmission d'une information.
- Soit il existe deux types de protéines Rpn11 qui sont différenciées par un moyen inconnu. Un de ces types serait intégré au protéasome et effectuerait uniquement les rôles qui lui sont attribués au protéasome. L'autre type serait importé à la mitochondrie et effectuerait un rôle indépendant du protéasome. Ce serait ce second type qui serait impliqué dans le défaut de morphologie mitochondriale. Cette seconde

hypothèse n'excluant pas la possibilité de l'assemblage/désassemblage dynamique de la première hypothèse.

Cependant, aucun suppresseur extragénique du défaut de la fonction mitochondriale de *rpn11-m1* n'a pu être isolé sans corriger au préalable le défaut d'assemblage de protéasome (cas des révertants *ru* et *ry*, (Rinaldi *et al.*, 2002)). Cette observation supporte ainsi plutôt la première hypothèse.

À l'heure actuelle, personne ne connait par quel moyen est régulé l'équilibre entre les évènements de fission et de fusion de la mitochondrie. Ces évènements sont régulés car un évènement de fusion déclenche un évènement de fission mais un évènement de fission n'a aucun effet sur le temps moyen de la prochaine fusion (Twig *et al.*, 2008). L'existence d'un appareil de tubulation reliant les mitochondries et le RE chez la levure et qui permet, par enroulement du RE autour des mitochondries, l'ajustement du diamètre d'un tubule mitochondrial à une taille permettant aux anneaux de Dnm1 de se former autour. Cet enroulement du RE marque la plupart des sites de fission mitochondriale (Friedman *et al.*, 2011) et pourrait laisser à penser que cet appareil régule aussi les évènements de fission mitochondriale. Nous avons pu observer que Rpn11 n'agit probablement pas uniquement sur l'appareil de fission mitochondrial mais pourrait aussi agir sur le complexe de tubulation. Le système ubiquitine/protéasome/Rpn11 pourrait donc être un « super régulateur » de la dynamique mitochondriale (Fig. 100)

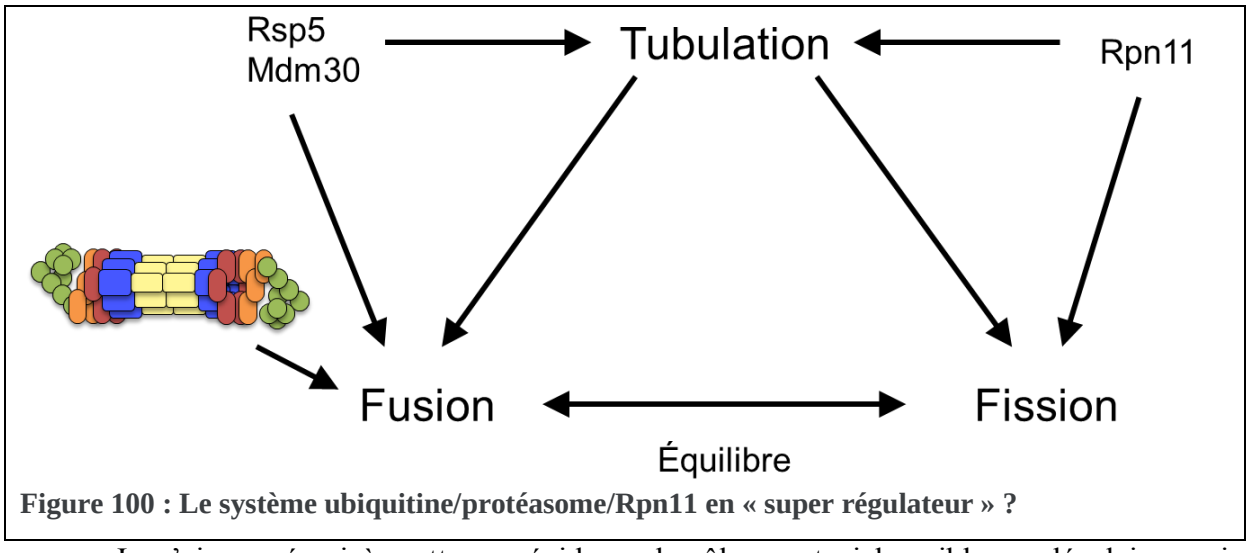

Figure 100 : Le système ubiquitine/protéasome/Rpn11 en « super régulateur » ?

Je n'ai pas réussi à mettre en évidence le rôle exact ni les cibles moléculaires qui permettent à Rpn11 de promouvoir la fission des mitochondries mais de nombreuses pistes sont à explorer avec les interactants obtenus lors du crible double hybride. Toutefois, j'ai pu montrer que les mutants de Rpn11 présentent des phénotypes très particuliers. En plus de la fragmentation mitochondriale de la souche *rpn11-m1* qui était déjà connue, j'ai pu montrer

que la souche *rpn11-m1* possédait une « chronological lifespan » réduite par rapport à une souche sauvage et n'était pas capable de former de PSG. Avec les mutants *RevA5* et Δ*coil*, j'ai pu confirmer qu'un assemblage défectueux du protéasome n'avait pas de lien avec la fragmentation mitochondriale observée. De plus, le mutant *RevA5* (qui a une différence de seulement 7 acides aminés par rapport à Rpn11) présente une incapacité à conserver les plasmides avec une origine de réplication 2µ à température permissive. Ces observations montrent que Rpn11 a un effet extrêmement pléiotrope dans la cellule et qu'il reste encore de nouvelles pistes à explorer pour comprendre le rôle moléculaire de Rpn11 en dehors du protéasome.

Matériels et méthodes

Matériels et méthodes

I. Techniques de microbiologie.

A. Souches de levure.

Souches	Génotypes	Références
W303-1B	*MATα leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15*	
BY4741	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0*	
CMY960	*MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3*	(Le Tallec *et al.*, 2007)
Y187	*MATα ura3-52 his3-200 ade2-101 trp1-901 leu2-3,112 gal4Δmet- gal80ΔURA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ*	(Fromont-Racine *et al.*, 1997)
Y190	*MATa ura3-52 his3-200 lys2-801 ade2-101 trp1-901 leu2-3 gal4Δ gal80Δcyhr2 LYS2::GAL1UAS-HIS3TATA-HIS3 URA3::GAL1UAS-GAL1TATA-lacZ*	(Fromont-Racine *et al.*, 1997)
CMY960 hsm3Δ	*MATa his3-11,15 leu2-3,112 ura3 hsm3::HPHMX4*	(Le Tallec *et al.*, 2009)
BY4741 rpn10Δ	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpn10::KANMX4*	EUROSCARF
BY4741 fis1Δ	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 fis1::KANMX4*	EUROSCARF
BY4741 dnm1Δ	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 dnm1::KANMX4*	EUROSCARF
BY4741 caf4Δ	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 caf4::KANMX4*	EUROSCARF
BY4741 mdv1Δ	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 mdv1::KANMX4*	EUROSCARF
BY4741 mmm1Δ	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 mmm1::KANMX4*	EUROSCARF
BY4741 mmm2Δ	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 mmm2::KANMX4*	EUROSCARF
BY4741 mdm10Δ	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 mdm10::KANMX4*	EUROSCARF
BY4741 mdm12Δ	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 mdm12::KANMX4*	EUROSCARF
BY4741 vms1Δ	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 vms1::KANMX4*	EUROSCARF
BY4741 nup42Δ	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 nup2::KANMX4*	EUROSCARF
BY4741 DUF1-GFP	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 DUF1:GFP-HIS3MX6*	INVITROGEN
BY4741 PHB2-GFP	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PHB2:GFP-HIS3MX6*	INVITROGEN
BY4741 BEM2-GFP	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 BEM2:GFP-HIS3MX6*	INVITROGEN

Souches	Génotypes	Références
BY4741 MPA43-GFP	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 MPA43:GFP-HIS3MX6*	INVITROGEN
BY4741 PRE6-GFP	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 PRE6:GFP-HIS3MX6*	INVITROGEN
BY4741 RPT6-GFP	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RPT6:GFP-HIS3MX6*	INVITROGEN
BY4741 RPT3-GFP	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RPT3:GFP-HIS3MX6*	INVITROGEN
BY4741 RPN1-GFP	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RPN1:GFP-HIS3MX6*	INVITROGEN
W303 RPN5-GFP	*MATα leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 RPN5:GFP(S65T)-TRP1*	Ce travail.
W303 RPN8-GFP	*MATα leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 RPN8:GFP(S65T)-TRP1*	Ce travail.
W303 DNM1-GFP	*MATα leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 DNM1:GFP(S65T)-TRP1*	Ce travail.
W303 MDV1-GFP	*MATα leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 MDV1:GFP(S65T)-TRP1*	Ce travail.
W303 CAF4-GFP	*MATα leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 CAF4:GFP(S65T)-TRP1*	Ce travail.
W303 MMM2-GFP	*MATα leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 MMM2:GFP(S65T)-TRP1*	Ce travail.
W303 RPN11-HA	*MATα leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 RPN11:3HA-KANMX6*	Ce travail.
W303 rpn11-m1-HA	*MATα leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 rpn11-m1:3HA-KANMX6*	Ce travail.
W303 RevA5-HA	*MATα leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 RPN11-RevA5:3HA-KANMX6*	Ce travail.
W303 Δcoil-HA	*MATα leu2-3,112 trp1-1 can1-100 ura3-1 ade2-1 his3-11,15 RPN11-Δcoil:3HA-KANMX6*	Ce travail.
BY4741 RPN11-HA	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RPN11:3HA-KANMX6*	Ce travail.
BY4741 rpn11-m1-HA	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 rpn11-m1:3HA-KANMX6*	Ce travail.
BY4741 RevA5-HA	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RPN11-RevA5:3HA-KANMX6*	Ce travail.
BY4741 Δcoil-HA	*MATa his3Δ1 leu2Δ0 met15Δ0 ura3Δ0 RPN11-Δcoil:3HA-KANMX6*	Ce travail.

Les souches issues de croisement et utilisées dans ce manuscrit n'ont pas été caractérisées ni pour leurs auxotrophies ni pour le signe sexuel. Le génotype n'est donc pas présenté. La méthode pour introduire les épitopes au locus chromosomique est décrite dans la publication suivante : (Longtine *et al.*, 1998).

B. Souches bactériennes.

Je n'ai utilisé qu'une seule souche de bactérie pour la production des plasmides. Il s'agit de la souche DH5α dont le génotype est : *fhuA2 Δ(argF-lacZ)U169 phoA glnV44 Φ80 Δ(lacZ)M15 gyrA96 recA1 relA1 endA1 thi-1 hsdR17*.

C. Milieux de culture.

Les cellules de levures sont cultivées sur trois types de milieux :

- Les milieux riches, qui contiennent 2 % de bactopeptone (p/v) (Difco), 1 % d'extrait de levures (p/v) (Difco) et enfin une source de carbone qui peut-être le glucose (2 % p/v), le galactose (2 % p/v) ou le glycérol (3 % p/v). Les milieux de cultures solides sont additionnés de bacto-agar (2 % p/v) et ils sont coulés dans des boîtes de Petri.
- Le milieu sélectif, appelé W0, qui contient 0,67% de Yeast Nitrogen w/o aminoacids (p/v) et 2% de glucose (p/v). Ce milieu est supplémenté avec 20mg/l de chaque acide aminé nécessaire pour la sélection. Les milieux de cultures solides sont additionnés de bacto-agar (2 % p/v) et ils sont coulés dans des boîtes de Petri.
- Le milieu oléate qui contient 0,67% de Yeast Nitrogen w/o aminoacids (p/v), 0,1% de glucose (p/v), 0,1% d'oléate, 0,05% de Tween 40 et 0,1% d'extrait de levure, le pH est ajusté à 6. Ce milieu est supplémenté avec 20mg/l de chaque acide aminé nécessaire pour la sélection.

Les levures sont cultivées en milieux liquides à 28°C sauf mention d'une autre température et sous agitation. Le suivi de la croissance cellulaire se fait en mesurant l'absorption de la suspension cellulaire à 600 nm, après dilution des cellules dans un milieu de croissance identique de manière à mesurer une densité optique toujours inférieure à 1.

Les tests de croissance en gouttes sur milieu solide ont été réalisés comme suit : des cellules de levure cultivées en milieu liquide sont prélevées pendant la phase exponentielle de croissance (ou en phase stationnaire pour les expériences le nécessitant). Elles sont diluées à la concentration de 2.10^7 cellules/ml et des dilutions successives au dixième sont réalisées jusqu'à 2.10^4 cellules/ml. Des gouttes de 2,5 µl sont alors déposées sur les boîtes de Petri et l'ensemble est incubé à 28°C sauf mention d'une autre température. Pour une souche de levure haploïde, on estime que l'unité d'absorption correspond à 2.10^7 cellules/ml.

Toutes les souches de levure, prélevées à partir de colonies isolées sur boite de Petri, sont conservées à -80°C dans un milieu avec 1% de bactopeptone (p/v), 1% d'extrait de levure (p/v), 2% de glucose (p/v) et 25% de glycérol (v/v).

Les cellules bactériennes sont cultivées dans du milieu LB (1% bacto-tryptone (p/v), 0,5% d'extrait de levure (p/v) et 0,5% NaCl (p/v) ajusté à pH 7,5 avant la stérilisation) supplémenté ou non par 0,001% d'ampicilline (p/v) ou kanamycine après stérilisation. Les milieux de cultures solides sont additionnés de bacto-agar (2% p/v) et ils sont coulés dans des boîtes de Petri.

Les cultures bactériennes en milieux liquides sont réalisées à 37°C sous une agitation de 200 tours/min. Les cultures sur milieux solides sont incubées dans une étuve thermostatée à 37°C.

Toutes les souches de bactéries, prélevées à partir d'une culture en phase exponentielle de croissance, sont conservées à -80°C dans 50% glycérol (v/v).

II. Techniques de biologie moléculaire.

A. Préparation d'ADN plasmidique à partir d'une culture de bactéries.

La préparation d'ADN plasmidique à partir d'une culture de bactéries est basée sur le principe de la lyse alcaline en présence de SDS. J'ai employé le kit de purification Nucleospin Plasmid de Macherey-Nagel. Brièvement, les cellules sont lysées en présence de SDS en milieu alcalin. La neutralisation du lysat obtenu, par l'ajout d'acétate de potassium, conduit à la précipitation des débris cellulaires et de l'ADN chromosomique. Après centrifugation, l'ADN plasmidique, qui n'a pas précipité, est fixé sur une colonne échangeuse d'anions dans un milieu de faible force ionique puis élué à force ionique élevée. La quantité d'ADN préparé est ensuite évaluée par la mesure de la densité optique à 260 nm sachant qu'une unité de DO correspond à environ 50 µg/ml d'ADN double brin.

B. Transformation des cellules bactériennes compétentes par choc thermique.

100µl des cellules DH5α sont mises en présence de 5µl de mélange de ligature ou des plasmides extraits des souches de levure à la suite du crible double hybride. Les bactéries sont ensuite laissées 20 minutes dans la glace puis mises 1 minute à 42°C. 0,5ml de LB est ajouté puis le tout est laissé une heure à 37°C. Les cellules sont ensuite centrifugées puis suspendues dans 50µl d'eau et étalées sur milieu sélectif à 37°C.

C. Transformation des cellules de levure par de l'ADN plasmidique.

La méthode de transformation des levures utilisée au cours de ces travaux est basée sur l'emploi d'AcLi. Brièvement, la souche de levure à transformer est cultivée une nuit à 28°C

dans du milieu YPD. La culture est alors diluée et poursuivie de manière à ce que les cellules se développent pendant environ 2 générations avant d'être en phase exponentielle (environ DO_{600}= 0,2 à 0,4). Les cellules sont collectées par centrifugation et lavées par de l'eau distillée stérile, puis par un tampon constitué de 100 mM AcLi, 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8. Les cellules sont de nouveau centrifugées et reprises dans le même tampon. 100 µl de cette suspension de cellules est mélangé à 1 µg d'ADN transformant et à 50 µg d'ADN entraîneur (ADN dénaturé de sperme de saumon). Le mélange est laissé 10 minutes à température ambiante puis sont ensuite ajoutés 600 µl de PEG à 40 % (p/v) dans le tampon 100 mM LiCl, 10 mM Tris pH 7,5, 1 mM EDTA pH 8. Ce mélange est incubé 30 min à 45°C. Enfin, les cellules sont culottées puis reprises dans 100 µl d'eau et étalées sur un milieu sélectif solide.

Les techniques de clonage telles que la PCR, la digestion d'ADN par des enzymes de restrictions ou les ligatures avec une ligase utilisées lors de ma thèse sont extrêmement classiques et sont décrites dans ce livre : (Sambrook and Russell, 2001).

III. Techniques de biochimie.

A. Extraits protéiques de levure dénaturés.

Les souches de levure sont ensemencées dans des tubes de culture contenant 3 ml de milieu approprié puis incubées pendant la nuit à 27°C avec agitation. La DO_{600} d'une dilution au 1/10 des cultures de la nuit est mesurée. Un volume correspondant à un total de 10 unités de DO_{600} de chaque culture est centrifugé pendant 5 min à 3 000 g. Le culot est suspendu dans 500 µl de tampon TCA (20 mM Tris pH 8, 50mM NH_4Ac, 2 mM EDTA et 50 µl/ml de « protease cocktail inhibitor » (Roche)). Les cellules sont centrifugées 5 min à 3 000 g puis le culot est suspendu dans 250 µl de tampon TCA. Ensuite les tubes Eppendorf sont mis dans la glace et 100 µl de billes de verre ainsi que 250 µl de TCA 20% (p/v) sont ajoutés. Les tubes sont ensuite mis dans un vortex pendant 1 minute et laissés dans la glace pendant une minute. Ce cycle est répété quatre fois. Le surnageant est ensuite transféré dans un autre tube Eppendorf. Les billes toujours contenues dans les premiers tubes sont lavées avec 250 µl de TCA 20% et 250 µl de tampon TCA. Les tubes sont ensuite mis dans un vortex pendant 1 minute et laissés dans la glace pendant une minute. Ce cycle est répété deux fois. Le surnageant est ensuite transféré dans le tube Eppendorf qui a servi à récupérer le premier surnageant. Les tubes sont centrifugés pendant 10 min à 15 000 g à 4°C. Le surnageant est éliminé puis le culot est repris dans du tampon Laëmmli (62,5 mM Tris pH 6,8, 4% SDS (v/v), 1% β-mercaptoéthanol (v/v), 20% glycérol (v/v), 0,05% bleu de bromophénol (p/v)). 10 µl d'extraits sont déposés sur gel.

B. Extraits protéiques de levure non dénaturés.

Les souches de levures sont mises en préculture dans 10 ml de YPD pendant la nuit à 27°C avec agitation. Cette préculture est ensuite diluée dans 190 ml de YPD. La culture est arrêtée lorsque la DO_{600} est de 0,8-1. Les cellules sont centrifugées pendant 5 min à 3 000 g puis le culot sec peut être placé à -80°C. Le culot est ensuite suspendu dans 1 ml de tampon Eaton (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% glycérol (v/v), 2 mM ATP, 1 mM DTT, 10 mM $MgCl_2$). La suspension est placée dans un cylindre puis le piston est inséré. Cylindre et pistons ont été préalablement refroidis à -80°C. Le tout est pressé à la presse de Eaton. L'extrait total est récupéré puis centrifugé à 10 minutes à 13 000 g et à 4°C. Le surnageant est récupéré puis les protéines sont dosées par le réactif de Bradford. Les protéines sont ensuite déposées sur un gel d'acrylamide non dénaturant à raison de 100 µg maximum avec un tampon de charge 1x (tampon 5x = 75% glycérol, 0,1% xylène cyanol).

C. Analyse des protéines par électrophorèse sur gel d'acrylamide non dénaturant.

Les protéines préalablement extraites sont analysées par électrophorèse sur gel d'acrylamide. Nous utilisons des gels d'acrylamide de 1,5 mm d'épaisseur constitués d'un gel de séparation contenant 3,8% d'acrylamide. Le gel est fait avec 0,18 M de Tris-borate pH 8,3, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 1 mM DTT, 3,8% d'acrylamide (v/v à partir d'une solution d'acrylamide/bis-acrylamide 37,5/1 à 30%), TEMED, APS. La séparation est effectuée sous un ampérage de 90 mA / 180 V pendant 1h30 à 4°C en présence du tampon de migration composé de 0,18 M de Tris-borate pH 8,3, 5 mM $MgCl_2$, 1 mM ATP, 1 mM DTT. Les gels ainsi sont ensuite incubés sous agitation à l'abri de la lumière dans du tampon G (50 mM Tris pH 7,5, 150 mM NaCl, 10% glycérol (v/v), 1 mM ATP, 1 mM DTT et 0,1mM de Suc-LLVY-AMC) pendant 10 minutes. Les protéines sont révélées une première fois sous UV à 380 nm. Les gels sont ensuite réincubés dans le même tampon en présence de 0,05% SDS puis les protéines sont de nouveaux révélées à 380 nm.

D. Analyse des protéines par électrophorèse sur gel d'acrylamide (SDS-PAGE).

Les protéines préalablement extraites et précipitées au TCA sont analysées par électrophorèse sur gel d'acrylamide. Nous utilisons des gels d'acrylamide de 0,75 mm d'épaisseur constitués d'un gel de concentration et d'un gel de séparation contenant respectivement 5 % et 12 % d'acrylamide (v/v à partir d'une solution d'acrylamide/bis-acrylamide 37,5/1 à 30%). La séparation est effectuée sous un ampérage de 26 mA par gel en présence du tampon de migration composé de 0,75 M glycine pH 8,3, 25 mM Tris et 0,1 % SDS (p/v). Les protéines

ainsi séparées ont été analysées soit par coloration du gel au bleu de Coomassie soit par immunodétection après électrotransfert sur membrane de nitrocellulose.

E. Coloration au bleu de Coomassie.

Après migration, la présence des protéines peut-être révélée par coloration à l'aide d'une solution de bleu de Coomassie R250 à 0,25 % (p/v) dans 10 % d'acide acétique (v/v) et 45 % d'éthanol (v/v). Le gel est ensuite décoloré par incubation sous agitation dans une solution de décolorant composée de 7 % acide acétique (v/v) et de 5 % éthanol (v/v).

F. Immunodétection ou « western blot ».

Après séparation sur gel de polyacrylamide les protéines sont électrotransférées sur une membrane de nitrocellulose. Le gel est placé contre la membrane de nitrocellulose entre 6 feuilles de papier Wattman et 2 mousses le tout maintenu dans une cassette de transfert. Le « sandwich » ainsi formé est placé entre deux électrodes dans le tampon de transfert composé de 20% d'éthanol (v/v), 2,9% de glycine (p/v), 5,8% de Tris (p/v) et 0,37% de SDS (p/v). Le transfert est effectué sous un voltage constant de 50V pendant 1h30. Une fois les protéines transférées sur la membrane de nitrocellulose, celle-ci est saturée par incubation pendant 1 heure sous agitation dans une solution de lait écrémé à 5% (p/v) dans du tampon TBS-T (150 mM NaCl, 10 mM Tris pH 7,6 et 0,05 % Tween 20 (p/v)). Après 3 lavages de 5 minutes dans du TBS-Tween sous agitation, la membrane est incubée pendant 1 heure sous agitation en présence des anticorps choisis. Après 5 lavages par le tampon TBS-T la membrane est incubée 1 heure sous agitation en présence des anticorps secondaires couplés à la « horseradish peroxydase » (HRP) dilués au 1/10000ème. Après 5 lavages de 5 minutes par du TBS-Tween la présence de la HRP est révélée à l'aide du Kit ECL de détection de l'activité de la peroxydase (GE Healthcare).

G. Préparation des mitochondries.

Les cellules sont mises en préculture en YPD. Elles sont ensuite lavées avec de l'eau puis sont mises en culture à DO_{600} = 0.025 dans 200 ml de YPGal à 27°C sous agitation sur une nuit. Les cultures sont récupérées à DO_{600} = 3-4. Les cellules sont culottées puis le culot sec est pesé. Les cellules sont suspendues dans 5 ml de tampon A (10 mM Tris pH 7.5, 50 mM EDTA, 0.035 M β-mercaptoéthanol). Et incubées 15 min à température ambiante. Les cellules sont centrifugées 5 minutes à 3000 g puis le culot est lavé avec 5 ml de tampon B (1.2 M Sorbitol, 50 mM Tris pH 7.5, 10 mM EDTA). Les cellules sont centrifugées 5 minutes à 3000 g puis le culot est suspendu dans 10 ml de tampon B + 6 mg/g de Zymolyase 20T. Les cellules sont mises sous agitation à 28°C pendant 1h puis les cellules sont centrifugées 5

minutes à 3000 g. Le culot est lavé 3 fois avec 5 ml de tampon B. Le culot est ensuite repris dans 5 ml de tampon Mito (0.6 M Mannitol, 20 M Hepes pH 7.4, 1 mM EDTA et 0.1 mM PMSF ajouté extemporanément). Les cellules sont incubées 10 minutes dans la glace (toutes les étapes à partir de ce point sont effectuées à 4°C) puis sont placées dans un potter et 15 aller/retour sont effectués. Le potter est rincé avec 5 ml de tampon Mito. L'extrait est centrifugé 5 min à 1500 g. Le surnageant est récupéré et 500 µl est gardé comme extrait total. Le reste de surnageant est centrifugé à 15 000 g pendant 10 minutes. 500 µl du surnageant est conservé comme extrait cytosolique puis le reste est jeté. Le culot est alors lavé avec 5 ml de tampon Mito puis centrifugé à 15 000 g pendant 10 minutes ; cette étape est répétée 2 fois. Ensuite le culot est repris dans 500 µl de tampon Mito, ceci correspond à la fraction enrichie en mitochondries. Les extraits qui ont été conservés sont ensuite précipités au TCA 10% final puis centrifugés pour analyse par western blot.

H. Purification des mitochondries sur gradient de sucrose.

Les fractions enrichies en mitochondries peuvent être purifiées avant précipitation au TCA. 50 µl est conservé pour la fraction brute, le reste est déposé sur gradient de sucrose. Le gradient est effectué extemporanément. 5 solutions avec des concentrations de sucrose différente sont préparées à partir d'une solution mère filtrée à 80% de sucrose (20 mM Hepes pH 7.4, 1 mM EDTA). Les concentrations des solutions sont 15%, 23%, 32%, 50%, 60%. Le gradient est coulé dans des tubes Ultra clear pour rotor SW41 comme suit : 1,5 ml de 60% sucrose, 1,5 ml de 50% sucrose, 4 ml de 32% sucrose, 1,5 ml de 23% sucrose, 1,5 ml de 15% sucrose. Ce gradient est mis à refroidir pour 1h. La fraction enrichie en mitochondries est déposée sur le gradient puis le tout est centrifugé à 100 000 g pendant 1h. Les fractions de 1 ml sont récupérées à partir du haut avec des cônes coupés. Les protéines sont ensuite précipitées au TCA 10% final puis centrifugées pour analyse par western blot.

I. Immunoprécipitation.

20 ml d'une culture en phase exponentielle est lavée dans de l'eau. Les cellules sont culottées puis suspendues dans 250 µl de tampon IP (50 mM Hepes pH 7,5, 150 mM NaCl, 0,5% Triton, 1 mM DTT, 10% glycérol (v/v) et 50 µl/ml de « protease cocktail inhibitor » (Roche) + 1 mM PMSF ajoutés extemporanément) et 250 µl de billes de verre. Les tubes sont ensuite mis dans un vortex pendant 1 minute et laissés dans la glace pendant une minute. Ce cycle est répété quatre fois. Le surnageant est ensuite transféré dans un autre tube Eppendorf. Les billes toujours contenues dans les premiers tubes sont lavées avec 250 µl de tampon IP. Les tubes sont ensuite mis dans un vortex pendant 1 minute et laissés dans la glace pendant une minute. Ce cycle est répété deux fois. Les tubes sont centrifugés pendant 10 min à 15 000 g à 4°C.

100 µl sont conservés comme fraction non immunoprécipitée (puis repris dans 100 µl de tampon Laëmmli 1X final) et 40 µl de protéine G sépharose équilibrées en tampon IP est ajouté à 300 µl de surnageant. Le tout est mis sur un rotator pendant 30 min à 4°C. Les extraits sont centrifugés pendant 5 min à 10 000 g à 4°C et le surnageant est transféré dans un autre tube. 4 µl d'anticorps (2 µg/µl) sont mis en contact avec le surnageant. Le tout est mis sur un rotator pendant 1h à 4°C. 40 µl de protéine G sépharose équilibrées en tampon IP est ajouté et le tout est mis sur un rotator pendant 1h à 4°C. Une centrifugation de 10 secondes est effectuée puis 200 µl de surnageant est conservé puis précipité au TCA 10% final comme fraction de protéines non fixées et repris dans 100 µl de tampon Laëmmli 1X final. Le culot contenant les billes est lavé 3 fois avec 500 µl de tampon IP. Les billes sont ensuite reprises dans 25 µl de tampon Laëmmli 1X final. 10 µl de chaque fraction est déposé sur un gel SDS-PAGE.

J. GST-pulldown.

Un clone d'*E. coli* est mis en préculture dans 1,5 ml de LBA à 37°C sous agitation pendant une nuit. 200 ml de LBA est ensemencé avec 0.2 ml de préculture pendant 6h à 37°C sous agitation puis à DO_{600} = 0.6-0.8. 1 mM d'IPTG est ajouté et la culture est placée à 30°C sous agitation pendant 12h. Les cellules sont culottées à 5000 g pendant 20 minutes puis le culot est suspendu dans 15 ml de tampon G (20 mM Tris pH8, 100 mM NaCl, 1 mM EDTA, 0,5% NP40, 1 mM β-mercaptoéthanol et 50 µl/ml de « protease cocktail inhibitor » (Roche)). La suspension est soniquée 2 fois pendant 50 secondes dans la glace puis centrifugée à 13 000 g pendant 10 minutes à 4°C. Le surnageant est récupéré puis 300 µl de billes glutathion équilibrées en tampon G sont ajoutées. Le tout est mis 30 minutes sur un rotator à 4°C. 5 lavages sont effectués avec 2 ml de tampon G. Les extraits de levures sont ajoutés et le tout est mis 2h à 4°C sur un rotator. 5 lavages sont effectués avec 2 ml de tampon G. Le culot est repris dans 25 µl de tampon Laëmmli 1X final.

Bibliographie

Bibliographie

Alexander, C., M. Votruba, U.E. Pesch, D.L. Thiselton, S. Mayer, A. Moore, M. Rodriguez, U. Kellner, B. Leo-Kottler, G. Auburger, S.S. Bhattacharya, and B. Wissinger. 2000. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet*. 26:211-215.

Altmann, K., and B. Westermann. 2005. Role of essential genes in mitochondrial morphogenesis in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Biol Cell*. 16:5410-5417.

Amici, M., D. Sagratini, A. Pettinari, S. Pucciarelli, M. Angeletti, and A.M. Eleuteri. 2004. 20S proteasome mediated degradation of DHFR: implications in neurodegenerative disorders. *Arch Biochem Biophys*. 422:168-174.

Anton, F., J.M. Fres, A. Schauss, B. Pinson, G.J. Praefcke, T. Langer, and M. Escobar-Henriques. 2011. Ugo1 and Mdm30 act sequentially during Fzo1-mediated mitochondrial outer membrane fusion. *J Cell Sci*. 124:1126-1135.

Baker, A., I.A. Sparkes, L.A. Brown, C. O'Leary-Steele, and S.L. Warriner. 2010. Peroxisome biogenesis and positioning. *Biochem Soc Trans*. 38:807-816.

Beck, F., P. Unverdorben, S. Bohn, A. Schweitzer, G. Pfeifer, E. Sakata, S. Nickell, J.M. Plitzko, E. Villa, W. Baumeister, and F. Forster. 2012. Near-atomic resolution structural model of the yeast 26S proteasome. *Proc Natl Acad Sci U S A*.

Bhar, D., M.A. Karren, M. Babst, and J.M. Shaw. 2006. Dimeric Dnm1-G385D interacts with Mdv1 on mitochondria and can be stimulated to assemble into fission complexes containing Mdv1 and Fis1. *J Biol Chem*. 281:17312-17320.

Bleazard, W., J.M. McCaffery, E.J. King, S. Bale, A. Mozdy, Q. Tieu, J. Nunnari, and J.M. Shaw. 1999. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol*. 1:298-304.

Boldogh, I., N. Vojtov, S. Karmon, and L.A. Pon. 1998. Interaction between mitochondria and the actin cytoskeleton in budding yeast requires two integral mitochondrial outer membrane proteins, Mmm1p and Mdm10p. *J Cell Biol*. 141:1371-1381.

Boldogh, I.R., D.W. Nowakowski, H.C. Yang, H. Chung, S. Karmon, P. Royes, and L.A. Pon. 2003. A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. *Mol Biol Cell*. 14:4618-4627.

Bolender, N., A. Sickmann, R. Wagner, C. Meisinger, and N. Pfanner. 2008. Multiple pathways for sorting mitochondrial precursor proteins. *EMBO Rep*. 9:42-49.

Burtner, C.R., C.J. Murakami, B. Olsen, B.K. Kennedy, and M. Kaeberlein. 2011. A genomic analysis of chronological longevity factors in budding yeast. *Cell Cycle*. 10:1385-1396.

Butler, L.R., R.M. Densham, J. Jia, A.J. Garvin, H.R. Stone, V. Shah, D. Weekes, F. Festy, J. Beesley, and J.R. Morris. 2012. The proteasomal de-ubiquitinating enzyme POH1 promotes the double-strand DNA break response. *EMBO J*.

Campbell, C.L., N. Tanaka, K.H. White, and P.E. Thorsness. 1994. Mitochondrial morphological and functional defects in yeast caused by yme1 are suppressed by mutation of a 26S protease subunit homologue. *Mol Biol Cell*. 5:899-905.

Cerveny, K.L., and R.E. Jensen. 2003. The WD-repeats of Net2p interact with Dnm1p and Fis1p to regulate division of mitochondria. *Mol Biol Cell*. 14:4126-4139.

Cerveny, K.L., J.M. McCaffery, and R.E. Jensen. 2001. Division of mitochondria requires a novel DMN1-interacting protein, Net2p. *Mol Biol Cell*. 12:309-321.

Cerveny, K.L., S.L. Studer, R.E. Jensen, and H. Sesaki. 2007. Yeast mitochondrial division and distribution require the cortical num1 protein. *Dev Cell*. 12:363-375.

Chandra, A., L. Chen, and K. Madura. 2010. Synthetic lethality of rpn11-1 rpn10Delta is linked to altered proteasome assembly and activity. *Curr Genet*. 56:543-557.

Chen, H., S.A. Detmer, A.J. Ewald, E.E. Griffin, S.E. Fraser, and D.C. Chan. 2003. Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol*. 160:189-200.

Chen, X.J., and R.A. Butow. 2005. The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat Rev Genet*. 6:815-825.

Chen, Y.A., and R.H. Scheller. 2001. SNARE-mediated membrane fusion. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:98-106.

Chiron, S., M. Gaisne, E. Guillou, P. Belenguer, G.D. Clark-Walker, and N. Bonnefoy. 2007. Studying mitochondria in an attractive model: Schizosaccharomyces pombe. *Methods Mol Biol*. 372:91-105.

Ciechanover, A., and R. Ben-Saadon. 2004. N-terminal ubiquitination: more protein substrates join in. *Trends Cell Biol*. 14:103-106.

Cipolat, S., O. Martins de Brito, B. Dal Zilio, and L. Scorrano. 2004. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 101:15927-15932.

Claessen, J.H., L. Kundrat, and H.L. Ploegh. 2012. Protein quality control in the ER: balancing the ubiquitin checkbook. *Trends Cell Biol*. 22:22-32.

Cohen, M.M., E.A. Amiott, A.R. Day, G.P. Leboucher, E.N. Pryce, M.H. Glickman, J.M. McCaffery, J.M. Shaw, and A.M. Weissman. 2011. Sequential requirements for the GTPase domain of the mitofusin Fzo1 and the ubiquitin ligase SCFMdm30 in mitochondrial outer membrane fusion. *J Cell Sci*. 124:1403-1410.

Cohen, M.M., G.P. Leboucher, N. Livnat-Levanon, M.H. Glickman, and A.M. Weissman. 2008. Ubiquitin-proteasome-dependent degradation of a mitofusin, a critical regulator of mitochondrial fusion. *Mol Biol Cell*. 19:2457-2464.

Cooper, E.M., C. Cutcliffe, T.Z. Kristiansen, A. Pandey, C.M. Pickart, and R.E. Cohen. 2009. K63-specific deubiquitination by two JAMM/MPN+ complexes: BRISC-associated Brcc36 and proteasomal Poh1. *EMBO J*. 28:621-631.

Costanzo, M., A. Baryshnikova, J. Bellay, Y. Kim, E.D. Spear, C.S. Sevier, H. Ding, J.L. Koh, K. Toufighi, S. Mostafavi, J. Prinz, R.P. St Onge, B. VanderSluis, T. Makhnevych, F.J. Vizeacoumar, S. Alizadeh, S. Bahr, R.L. Brost, Y. Chen, M. Cokol, R. Deshpande, Z. Li, Z.Y. Lin, W. Liang, M. Marback, J. Paw, B.J. San Luis, E. Shuteriqi, A.H. Tong, N. van Dyk, I.M. Wallace, J.A. Whitney, M.T. Weirauch, G. Zhong, H. Zhu, W.A. Houry, M. Brudno, S. Ragibizadeh, B. Papp, C. Pal, F.P. Roth, G. Giaever, C. Nislow, O.G. Troyanskaya, H. Bussey, G.D. Bader, A.C. Gingras, Q.D. Morris, P.M. Kim, C.A. Kaiser, C.L. Myers, B.J. Andrews, and C. Boone. 2010. The genetic landscape of a cell. *Science*. 327:425-431.

Coux, O., H.G. Nothwang, I. Silva Pereira, F. Recillas Targa, F. Bey, and K. Scherrer. 1994. Phylogenic relationships of the amino acid sequences of prosome (proteasome, MCP) subunits. *Mol Gen Genet*. 245:769-780.

Coux, O., K. Tanaka, and A.L. Goldberg. 1996. Structure and functions of the 20S and 26S proteasomes. *Annu Rev Biochem*. 65:801-847.

Daum, G., and J.E. Vance. 1997. Import of lipids into mitochondria. *Prog Lipid Res*. 36:103-130.

Davies, K.J. 2001. Degradation of oxidized proteins by the 20S proteasome. *Biochimie*. 83:301-310.

de Brito, O.M., and L. Scorrano. 2008. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature*. 456:605-610.

De Mot, R., I. Nagy, J. Walz, and W. Baumeister. 1999. Proteasomes and other self-compartmentalizing proteases in prokaryotes. *Trends Microbiol*. 7:88-92.

Delettre, C., J.M. Griffoin, J. Kaplan, H. Dollfus, B. Lorenz, L. Faivre, G. Lenaers, P. Belenguer, and C.P. Hamel. 2001. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet*. 109:584-591.

Delettre, C., G. Lenaers, J.M. Griffoin, N. Gigarel, C. Lorenzo, P. Belenguer, L. Pelloquin, J. Grosgeorge, C. Turc-Carel, E. Perret, C. Astarie-Dequeker, L. Lasquellec, B. Arnaud, B. Ducommun, J. Kaplan, and C.P. Hamel. 2000. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet*. 26:207-210.

Deveraux, Q., V. Ustrell, C. Pickart, and M. Rechsteiner. 1994. A 26 S protease subunit that binds ubiquitin conjugates. *J Biol Chem*. 269:7059-7061.

Dimmer, K.S., S. Fritz, F. Fuchs, M. Messerschmitt, N. Weinbach, W. Neupert, and B. Westermann. 2002. Genetic basis of mitochondrial function and morphology in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Biol Cell*. 13:847-853.

Dimmer, K.S., S. Jakobs, F. Vogel, K. Altmann, and B. Westermann. 2005. Mdm31 and Mdm32 are inner membrane proteins required for maintenance of mitochondrial shape and stability of mitochondrial DNA nucleoids in yeast. *J Cell Biol*. 168:103-115.

Eisenberg, T., S. Buttner, G. Kroemer, and F. Madeo. 2007. The mitochondrial pathway in yeast apoptosis. *Apoptosis*. 12:1011-1023.

Elsasser, S., R.R. Gali, M. Schwickart, C.N. Larsen, D.S. Leggett, B. Muller, M.T. Feng, F. Tubing, G.A. Dittmar, and D. Finley. 2002. Proteasome subunit Rpn1 binds ubiquitin-like protein domains. *Nat Cell Biol*. 4:725-730.

Erales, J., M.A. Hoyt, F. Troll, and P. Coffino. 2012. Functional asymmetries of proteasome translocase pore. *J Biol Chem*. 287:18535-18543.

Esposito, M., S. Piatti, L. Hofmann, L. Frontali, A. Delahodde, and T. Rinaldi. 2011. Analysis of the rpn11-m1 proteasomal mutant reveals connection between cell cycle and mitochondrial biogenesis. *FEMS Yeast Res*. 11:60-71.

Estela, A., D. Pla-Martin, M. Sanchez-Piris, H. Sesaki, and F. Palau. 2011. Charcot-Marie-Tooth-related gene GDAP1 complements cell cycle delay at G2/M phase in Saccharomyces cerevisiae fis1 gene-defective cells. *J Biol Chem*. 286:36777-36786.

Eura, Y., N. Ishihara, S. Yokota, and K. Mihara. 2003. Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J Biochem*. 134:333-344.

Fagarasanu, A., M. Fagarasanu, and R.A. Rachubinski. 2007. Maintaining peroxisome populations: a story of division and inheritance. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 23:321-344.

Fannjiang, Y., W.C. Cheng, S.J. Lee, B. Qi, J. Pevsner, J.M. McCaffery, R.B. Hill, G. Basanez, and J.M. Hardwick. 2004. Mitochondrial fission proteins regulate programmed cell death in yeast. *Genes Dev*. 18:2785-2797.

Farkasovsky, M., and H. Kuntzel. 1995. Yeast Num1p associates with the mother cell cortex during S/G2 phase and affects microtubular functions. *J Cell Biol*. 131:1003-1014.

Feser, J., D. Truong, C. Das, J.J. Carson, J. Kieft, T. Harkness, and J.K. Tyler. 2010. Elevated histone expression promotes life span extension. *Mol Cell*. 39:724-735.

Fisk, H.A., and M.P. Yaffe. 1999. A role for ubiquitination in mitochondrial inheritance in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol*. 145:1199-1208.

Foury, F., T. Roganti, N. Lecrenier, and B. Purnelle. 1998. The complete sequence of the mitochondrial genome of Saccharomyces cerevisiae. *FEBS Lett*. 440:325-331.

Frederick, R.L., J.M. McCaffery, K.W. Cunningham, K. Okamoto, and J.M. Shaw. 2004. Yeast Miro GTPase, Gem1p, regulates mitochondrial morphology via a novel pathway. *J Cell Biol*. 167:87-98.

Frezza, C., S. Cipolat, O. Martins de Brito, M. Micaroni, G.V. Beznoussenko, T. Rudka, D. Bartoli, R.S. Polishuck, N.N. Danial, B. De Strooper, and L. Scorrano. 2006. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell*. 126:177-189.

Friedman, J.R., L.L. Lackner, M. West, J.R. DiBenedetto, J. Nunnari, and G.K. Voeltz. 2011. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science*. 334:358-362.

Fritz, S., N. Weinbach, and B. Westermann. 2003. Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast. *Mol Biol Cell*. 14:2303-2313.

Fromont-Racine, M., J.C. Rain, and P. Legrain. 1997. Toward a functional analysis of the yeast genome through exhaustive two-hybrid screens. *Nat Genet*. 16:277-282.

Fukushima, N.H., E. Brisch, B.R. Keegan, W. Bleazard, and J.M. Shaw. 2001. The GTPase effector domain sequence of the Dnm1p GTPase regulates self-assembly and controls a rate-limiting step in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell*. 12:2756-2766.

Funakoshi, M., R.J. Tomko, Jr., H. Kobayashi, and M. Hochstrasser. 2009. Multiple assembly chaperones govern biogenesis of the proteasome regulatory particle base. *Cell*. 137:887-899.

Gatto, G.J., Jr., B.V. Geisbrecht, S.J. Gould, and J.M. Berg. 2000. Peroxisomal targeting signal-1 recognition by the TPR domains of human PEX5. *Nat Struct Biol*. 7:1091-1095.

Geng, F., and W.P. Tansey. 2012. Similar temporal and spatial recruitment of native 19S and 20S proteasome subunits to transcriptionally active chromatin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:6060-6065.

Gillette, T.G., W. Huang, S.J. Russell, S.H. Reed, S.A. Johnston, and E.C. Friedberg. 2001. The 19S complex of the proteasome regulates nucleotide excision repair in yeast. *Genes Dev*. 15:1528-1539.

Glickman, M.H., D.M. Rubin, O. Coux, I. Wefes, G. Pfeifer, Z. Cjeka, W. Baumeister, V.A. Fried, and D. Finley. 1998a. A subcomplex of the proteasome regulatory particle required for ubiquitin-conjugate degradation and related to the COP9-signalosome and eIF3. *Cell*. 94:615-623.

Glickman, M.H., D.M. Rubin, V.A. Fried, and D. Finley. 1998b. The regulatory particle of the Saccharomyces cerevisiae proteasome. *Mol Cell Biol*. 18:3149-3162.

Gonzalez, F., A. Delahodde, T. Kodadek, and S.A. Johnston. 2002. Recruitment of a 19S proteasome subcomplex to an activated promoter. *Science*. 296:548-550.

Gray, M.W. 1992. The endosymbiont hypothesis revisited. *Int Rev Cytol*. 141:233-357.

Griffin, E.E., and D.C. Chan. 2006. Domain interactions within Fzo1 oligomers are essential for mitochondrial fusion. *J Biol Chem*. 281:16599-16606.

Griffin, E.E., J. Graumann, and D.C. Chan. 2005. The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J Cell Biol*. 170:237-248.

Grimm, S. 2012. The ER-mitochondria interface: the social network of cell death. *Biochim Biophys Acta*. 1823:327-334.

Groettrup, M., C.J. Kirk, and M. Basler. 2010. Proteasomes in immune cells: more than peptide producers? *Nat Rev Immunol*. 10:73-78.

Groll, M., L. Ditzel, J. Lowe, D. Stock, M. Bochtler, H.D. Bartunik, and R. Huber. 1997. Structure of 20S proteasome from yeast at 2.4 A resolution. *Nature*. 386:463-471.

Grosshans, B.L., D. Ortiz, and P. Novick. 2006. Rabs and their effectors: achieving specificity in membrane traffic. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 103:11821-11827.

Grune, T., T. Reinheckel, and K.J. Davies. 1997. Degradation of oxidized proteins in mammalian cells. *FASEB J*. 11:526-534.

Haas, A., D. Scheglmann, T. Lazar, D. Gallwitz, and W. Wickner. 1995. The GTPase Ypt7p of Saccharomyces cerevisiae is required on both partner vacuoles for the homotypic fusion step of vacuole inheritance. *Embo J*. 14:5258-5270.

Halbach, A., C. Landgraf, S. Lorenzen, K. Rosenkranz, R. Volkmer-Engert, R. Erdmann, and H. Rottensteiner. 2006. Targeting of the tail-anchored peroxisomal membrane proteins PEX26 and PEX15 occurs through C-terminal PEX19-binding sites. *J Cell Sci*. 119:2508-2517.

Hales, K.G., and M.T. Fuller. 1997. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*. 90:121-129.

Hammermeister, M., K. Schodel, and B. Westermann. 2010. Mdm36 is a mitochondrial fission-promoting protein in Saccharomyces cerevisiae. *Mol Biol Cell*. 21:2443-2452.

Heiland, I., and R. Erdmann. 2005. Biogenesis of peroxisomes. Topogenesis of the peroxisomal membrane and matrix proteins. *FEBS J*. 272:2362-2372.

Heo, J.M., N. Livnat-Levanon, E.B. Taylor, K.T. Jones, N. Dephoure, J. Ring, J. Xie, J.L. Brodsky, F. Madeo, S.P. Gygi, K. Ashrafi, M.H. Glickman, and J. Rutter. 2010. A stress-responsive system for mitochondrial protein degradation. *Mol Cell*. 40:465-480.

Herlan, M., C. Bornhovd, K. Hell, W. Neupert, and A.S. Reichert. 2004. Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J Cell Biol*. 165:167-173.

Herlan, M., F. Vogel, C. Bornhovd, W. Neupert, and A.S. Reichert. 2003. Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem*. 278:27781-27788.

Hermann, G.J., and J.M. Shaw. 1998. Mitochondrial dynamics in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 14:265-303.

Hermann, G.J., J.W. Thatcher, J.P. Mills, K.G. Hales, M.T. Fuller, J. Nunnari, and J.M. Shaw. 1998. Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol*. 143:359-373.

Herrmann, J., L.O. Lerman, and A. Lerman. 2007. Ubiquitin and ubiquitin-like proteins in protein regulation. *Circ Res*. 100:1276-1291.

Herrmann, J.M., and J. Riemer. 2010. The intermembrane space of mitochondria. *Antioxid Redox Signal*. 13:1341-1358.

Hicke, L. 2001. Protein regulation by monoubiquitin. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:195-201.

Hobbs, A.E., M. Srinivasan, J.M. McCaffery, and R.E. Jensen. 2001. Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. *J Cell Biol*. 152:401-410.

Hoepfner, D., M. van den Berg, P. Philippsen, H.F. Tabak, and E.H. Hettema. 2001. A role for Vps1p, actin, and the Myo2p motor in peroxisome abundance and inheritance in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Biol*. 155:979-990.

Hoffmann, H.P., and C.J. Avers. 1973. Mitochondrion of yeast: ultrastructural evidence for one giant, branched organelle per cell. *Science*. 181:749-751.

Hofmann, L., R. Saunier, R. Cossard, M. Esposito, T. Rinaldi, and A. Delahodde. 2009. A nonproteolytic proteasome activity controls organelle fission in yeast. *J Cell Sci*. 122:3673-3683.

Hoppe, T., K. Matuschewski, M. Rape, S. Schlenker, H.D. Ulrich, and S. Jentsch. 2000. Activation of a membrane-bound transcription factor by regulated ubiquitin/proteasome-dependent processing. *Cell*. 102:577-586.

Hoppins, S., J. Horner, C. Song, J.M. McCaffery, and J. Nunnari. 2009. Mitochondrial outer and inner membrane fusion requires a modified carrier protein. *J Cell Biol*. 184:569-581.

Hoppins, S., L. Lackner, and J. Nunnari. 2007. The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem*. 76:751-780.

Hori, A., M. Yoshida, and F. Ling. 2011. Mitochondrial fusion increases the mitochondrial DNA copy number in budding yeast. *Genes Cells*. 16:527-544.

Hough, R., G. Pratt, and M. Rechsteiner. 1987. Purification of two high molecular weight proteases from rabbit reticulocyte lysate. *J Biol Chem*. 262:8303-8313.

Husnjak, K., S. Elsasser, N. Zhang, X. Chen, L. Randles, Y. Shi, K. Hofmann, K.J. Walters, D. Finley, and I. Dikic. 2008. Proteasome subunit Rpn13 is a novel ubiquitin receptor. *Nature*. 453:481-488.

Ingerman, E., S. Meeusen, R. Devay, and J. Nunnari. 2007. In vitro assays for mitochondrial fusion and division. *Methods Cell Biol*. 80:707-720.

Ingerman, E., E.M. Perkins, M. Marino, J.A. Mears, J.M. McCaffery, J.E. Hinshaw, and J. Nunnari. 2005. Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol*. 170:1021-1027.

James, D.I., P.A. Parone, Y. Mattenberger, and J.C. Martinou. 2003. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem*. 278:36373-36379.

Jariel-Encontre, I., M. Pariat, F. Martin, S. Carillo, C. Salvat, and M. Piechaczyk. 1995. Ubiquitinylation is not an absolute requirement for degradation of c-Jun protein by the 26 S proteasome. *J Biol Chem*. 270:11623-11627.

Jones, B.A., and W.L. Fangman. 1992. Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev*. 6:380-389.

Ju, D., and Y. Xie. 2004. Proteasomal degradation of RPN4 via two distinct mechanisms, ubiquitin-dependent and -independent. *J Biol Chem*. 279:23851-23854.

Jung, T., B. Catalgol, and T. Grune. 2009. The proteasomal system. *Mol Aspects Med*. 30:191-296.

Kanga, S., D. Bernard, A.M. Mager-Heckel, Z. Erpapazoglou, F. Mattiroli, T.K. Sixma, S. Leon, D. Urban-Grimal, I. Tarassov, and R. Haguenauer-Tsapis. 2012. A deubiquitylating complex required for neosynthesis of a yeast mitochondrial ATP synthase subunit. *PLoS One*. 7:e38071.

Kao, A., A. Randall, Y. Yang, V.R. Patel, W. Kandur, S. Guan, S.D. Rychnovsky, P. Baldi, and L. Huang. 2012. Mapping the structural topology of the yeast 19S proteasomal regulatory particle using chemical cross-linking and probabilistic modeling. *Mol Cell Proteomics*.

Kennedy, E.P., and A.L. Lehninger. 1949. Oxidation of fatty acids and tricarboxylic acid cycle intermediates by isolated rat liver mitochondria. *J Biol Chem*. 179:957-972.

Kiel, J.A., M. Veenhuis, and I.J. van der Klei. 2006. PEX genes in fungal genomes: common, rare or redundant. *Traffic*. 7:1291-1303.

Kleijnen, M.F., D.S. Kirkpatrick, and S.P. Gygi. 2007. The ubiquitin-proteasome system regulates membrane fusion of yeast vacuoles. *Embo J*. 26:275-287.

Koegl, M., T. Hoppe, S. Schlenker, H.D. Ulrich, T.U. Mayer, and S. Jentsch. 1999. A novel ubiquitination factor, E4, is involved in multiubiquitin chain assembly. *Cell*. 96:635-644.

Kohler, A., P. Cascio, D.S. Leggett, K.M. Woo, A.L. Goldberg, and D. Finley. 2001. The axial channel of the proteasome core particle is gated by the Rpt2 ATPase and controls both substrate entry and product release. *Mol Cell*. 7:1143-1152.

Komander, D. 2009. The emerging complexity of protein ubiquitination. *Biochem Soc Trans*. 37:937-953.

Kondo-Okamoto, N., K. Ohkuni, K. Kitagawa, J.M. McCaffery, J.M. Shaw, and K. Okamoto. 2006. The novel F-box protein Mfb1p regulates mitochondrial connectivity and exhibits asymmetric localization in yeast. *Mol Biol Cell*. 17:3756-3767.

Kondo-Okamoto, N., J.M. Shaw, and K. Okamoto. 2003. Mmm1p spans both the outer and inner mitochondrial membranes and contains distinct domains for targeting and foci formation. *J Biol Chem*. 278:48997-49005.

Kopec, K.O., V. Alva, and A.N. Lupas. 2010. Homology of SMP domains to the TULIP superfamily of lipid-binding proteins provides a structural basis for lipid exchange between ER and mitochondria. *Bioinformatics*. 26:1927-1931.

Kormanec, J., I. Schaaff-Gerstenschlager, F.K. Zimmermann, D. Perecko, and H. Kuntzel. 1991. Nuclear migration in Saccharomyces cerevisiae is controlled by the highly repetitive 313 kDa NUM1 protein. *Mol Gen Genet*. 230:277-287.

Kornmann, B., E. Currie, S.R. Collins, M. Schuldiner, J. Nunnari, J.S. Weissman, and P. Walter. 2009. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science*. 325:477-481.

Kornmann, B., C. Osman, and P. Walter. 2011. The conserved GTPase Gem1 regulates endoplasmic reticulum-mitochondria connections. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:14151-14156.

Kornmann, B., and P. Walter. 2010. ERMES-mediated ER-mitochondria contacts: molecular hubs for the regulation of mitochondrial biology. *J Cell Sci*. 123:1389-1393.

Koshiba, T., S.A. Detmer, J.T. Kaiser, H. Chen, J.M. McCaffery, and D.C. Chan. 2004. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science*. 305:858-862.

Kragt, A., T. Voorn-Brouwer, M. van den Berg, and B. Distel. 2005. Endoplasmic reticulum-directed Pex3p routes to peroxisomes and restores peroxisome formation in a Saccharomyces cerevisiae pex3Delta strain. *J Biol Chem*. 280:34350-34357.

Krogan, N.J., G. Cagney, H. Yu, G. Zhong, X. Guo, A. Ignatchenko, J. Li, S. Pu, N. Datta, A.P. Tikuisis, T. Punna, J.M. Peregrin-Alvarez, M. Shales, X. Zhang, M. Davey, M.D. Robinson, A. Paccanaro, J.E. Bray, A. Sheung, B. Beattie, D.P. Richards, V. Canadien, A. Lalev, F. Mena, P. Wong, A. Starostine, M.M. Canete, J. Vlasblom, S. Wu, C. Orsi, S.R. Collins, S. Chandran, R. Haw, J.J. Rilstone, K. Gandi, N.J. Thompson, G. Musso, P. St Onge, S. Ghanny, M.H. Lam, G. Butland, A.M. Altaf-Ul, S. Kanaya, A. Shilatifard, E. O'Shea, J.S. Weissman, C.J. Ingles, T.R. Hughes, J. Parkinson, M. Gerstein, S.J. Wodak, A. Emili, and J.F. Greenblatt. 2006. Global landscape of protein complexes in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Nature*. 440:637-643.

Kunau, W.H., V. Dommes, and H. Schulz. 1995. beta-oxidation of fatty acids in mitochondria, peroxisomes, and bacteria: a century of continued progress. *Prog Lipid Res*. 34:267-342.

Kunze, M., G. Neuberger, S. Maurer-Stroh, J. Ma, T. Eck, N. Braverman, J.A. Schmid, F. Eisenhaber, and J. Berger. 2011. Structural requirements for interaction of peroxisomal targeting signal 2 and its receptor PEX7. *J Biol Chem*. 286:45048-45062.

Kuravi, K., S. Nagotu, A.M. Krikken, K. Sjollema, M. Deckers, R. Erdmann, M. Veenhuis, and I.J. van der Klei. 2006. Dynamin-related proteins Vps1p and Dnm1p control peroxisome abundance in Saccharomyces cerevisiae. *J Cell Sci*. 119:3994-4001.

Labrousse, A.M., M.D. Zappaterra, D.A. Rube, and A.M. van der Bliek. 1999. C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell*. 4:815-826.

Lam, Y.A., T.G. Lawson, M. Velayutham, J.L. Zweier, and C.M. Pickart. 2002. A proteasomal ATPase subunit recognizes the polyubiquitin degradation signal. *Nature*. 416:763-767.

Lander, G.C., E. Estrin, M.E. Matyskiela, C. Bashore, E. Nogales, and A. Martin. 2012. Complete subunit architecture of the proteasome regulatory particle. *Nature*. 482:186-191.

Lane, N. 2006. Power, sex, suicide : mitochondria and the meaning of life. Oxford University Press, Oxford. xiii, 354 p. pp.

Laporte, D., B. Salin, B. Daignan-Fornier, and I. Sagot. 2008. Reversible cytoplasmic localization of the proteasome in quiescent yeast cells. *J Cell Biol*. 181:737-745.

Lasker, K., F. Forster, S. Bohn, T. Walzthoeni, E. Villa, P. Unverdorben, F. Beck, R. Aebersold, A. Sali, and W. Baumeister. 2012. Molecular architecture of the 26S proteasome holocomplex determined by an integrative approach. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:1380-1387.

Le Tallec, B., M.B. Barrault, R. Courbeyrette, R. Guerois, M.C. Marsolier-Kergoat, and A. Peyroche. 2007. 20S proteasome assembly is orchestrated by two distinct pairs of chaperones in yeast and in mammals. *Mol Cell*. 27:660-674.

Le Tallec, B., M.B. Barrault, R. Guerois, T. Carre, and A. Peyroche. 2009. Hsm3/S5b participates in the assembly pathway of the 19S regulatory particle of the proteasome. *Mol Cell*. 33:389-399.

Lee, I., and W. Hong. 2006. Diverse membrane-associated proteins contain a novel SMP domain. *FASEB J*. 20:202-206.

Legesse-Miller, A., R.H. Massol, and T. Kirchhausen. 2003. Constriction and Dnm1p recruitment are distinct processes in mitochondrial fission. *Mol Biol Cell*. 14:1953-1963.

Lehmann, A., K. Janek, B. Braun, P.M. Kloetzel, and C. Enenkel. 2002. 20 S proteasomes are imported as precursor complexes into the nucleus of yeast. *J Mol Biol*. 317:401-413.

Longtine, M.S., A. McKenzie, 3rd, D.J. Demarini, N.G. Shah, A. Wach, A. Brachat, P. Philippsen, and J.R. Pringle. 1998. Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast*. 14:953-961.

Lowe, J., D. Stock, B. Jap, P. Zwickl, W. Baumeister, and R. Huber. 1995. Crystal structure of the 20S proteasome from the archaeon T. acidophilum at 3.4 A resolution. *Science*. 268:533-539.

Luciani, F., C. Kesmir, M. Mishto, M. Or-Guil, and R.J. de Boer. 2005. A mathematical model of protein degradation by the proteasome. *Biophys J*. 88:2422-2432.

Mast, F.D., A. Fagarasanu, B. Knoblach, and R.A. Rachubinski. 2010. Peroxisome biogenesis: something old, something new, something borrowed. *Physiology (Bethesda)*. 25:347-356.

Maupin-Furlow, J.A., M.A. Humbard, P.A. Kirkland, W. Li, C.J. Reuter, A.J. Wright, and G. Zhou. 2006. Proteasomes from structure to function: perspectives from Archaea. *Curr Top Dev Biol*. 75:125-169.

McQuibban, G.A., S. Saurya, and M. Freeman. 2003. Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature*. 423:537-541.

Mears, J.A., L.L. Lackner, S. Fang, E. Ingerman, J. Nunnari, and J.E. Hinshaw. 2011. Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat Struct Mol Biol*. 18:20-26.

Meeusen, S., R. DeVay, J. Block, A. Cassidy-Stone, S. Wayson, J.M. McCaffery, and J. Nunnari. 2006. Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell*. 127:383-395.

Meeusen, S., J.M. McCaffery, and J. Nunnari. 2004. Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science*. 305:1747-1752.

Meeusen, S., and J. Nunnari. 2003. Evidence for a two membrane-spanning autonomous mitochondrial DNA replisome. *J Cell Biol*. 163:503-510.

Meisinger, C., S. Pfannschmidt, M. Rissler, D. Milenkovic, T. Becker, D. Stojanovski, M.J. Youngman, R.E. Jensen, A. Chacinska, B. Guiard, N. Pfanner, and N. Wiedemann. 2007. The morphology proteins Mdm12/Mmm1 function in the major beta-barrel assembly pathway of mitochondria. *Embo J*. 26:2229-2239.

Meisinger, C., M. Rissler, A. Chacinska, L.K. Szklarz, D. Milenkovic, V. Kozjak, B. Schonfisch, C. Lohaus, H.E. Meyer, M.P. Yaffe, B. Guiard, N. Wiedemann, and N. Pfanner. 2004. The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. *Dev Cell*. 7:61-71.

Messerschmitt, M., S. Jakobs, F. Vogel, S. Fritz, K.S. Dimmer, W. Neupert, and B. Westermann. 2003. The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol*. 160:553-564.

Misko, A., S. Jiang, I. Wegorzewska, J. Milbrandt, and R.H. Baloh. 2010. Mitofusin 2 is necessary for transport of axonal mitochondria and interacts with the Miro/Milton complex. *J Neurosci*. 30:4232-4240.

Mokranjac, D., M. Sichting, W. Neupert, and K. Hell. 2003. Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria. *EMBO J*. 22:4945-4956.

Motley, A.M., G.P. Ward, and E.H. Hettema. 2008. Dnm1p-dependent peroxisome fission requires Caf4p, Mdv1p and Fis1p. *J Cell Sci*. 121:1633-1640.

Mozdy, A.D., J.M. McCaffery, and J.M. Shaw. 2000. Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol*. 151:367-380.

Nakamura, Y., T. Umehara, A. Tanaka, M. Horikoshi, B. Padmanabhan, and S. Yokoyama. 2007. Structural basis for the recognition between the regulatory particles Nas6 and Rpt3 of the yeast 26S proteasome. *Biochem Biophys Res Commun*. 359:503-509.

Naylor, K., E. Ingerman, V. Okreglak, M. Marino, J.E. Hinshaw, and J. Nunnari. 2006. Mdv1 interacts with assembled dnm1 to promote mitochondrial division. *J Biol Chem*. 281:2177-2183.

Nguyen, T.T., A. Lewandowska, J.Y. Choi, D.F. Markgraf, M. Junker, M. Bilgin, C.S. Ejsing, D.R. Voelker, T.A. Rapoport, and J.M. Shaw. 2012. Gem1 and ERMES do not directly affect phosphatidylserine transport from ER to mitochondria or mitochondrial inheritance. *Traffic*. 13:880-890.

Nunnari, J., W.F. Marshall, A. Straight, A. Murray, J.W. Sedat, and P. Walter. 1997. Mitochondrial transmission during mating in Saccharomyces cerevisiae is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell*. 8:1233-1242.

Okamoto, K., and J.M. Shaw. 2005. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu Rev Genet*. 39:503-536.

Opalinski, L., J.A. Kiel, C. Williams, M. Veenhuis, and I.J. van der Klei. 2011. Membrane curvature during peroxisome fission requires Pex11. *EMBO J*. 30:5-16.

Osman, C., M. Haag, C. Potting, J. Rodenfels, P.V. Dip, F.T. Wieland, B. Brugger, B. Westermann, and T. Langer. 2009a. The genetic interactome of prohibitins: coordinated control of cardiolipin and phosphatidylethanolamine by conserved regulators in mitochondria. *J Cell Biol*. 184:583-596.

Osman, C., C. Merkwirth, and T. Langer. 2009b. Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes. *J Cell Sci*. 122:3823-3830.

Ossareh-Nazari, B., M. Cohen, and C. Dargemont. 2010. The Rsp5 ubiquitin ligase and the AAA-ATPase Cdc48 control the ubiquitin-mediated degradation of the COPII component Sec23. *Exp Cell Res*. 316:3351-3357.

Ota, K., K. Kito, S. Okada, and T. Ito. 2008. A proteomic screen reveals the mitochondrial outer membrane protein Mdm34p as an essential target of the F-box protein Mdm30p. *Genes Cells*. 13:1075-1085.

Otsuga, D., B.R. Keegan, E. Brisch, J.W. Thatcher, G.J. Hermann, W. Bleazard, and J.M. Shaw. 1998. The dynamin-related GTPase, Dnm1p, controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol*. 143:333-349.

Palmer, C.S., L.D. Osellame, D. Stojanovski, and M.T. Ryan. 2011. The regulation of mitochondrial morphology: intricate mechanisms and dynamic machinery. *Cell Signal*. 23:1534-1545.

Perkins, G., C. Renken, M.E. Martone, S.J. Young, M. Ellisman, and T. Frey. 1997. Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol*. 119:260-272.

Pfanner, N., N. Wiedemann, C. Meisinger, and T. Lithgow. 2004. Assembling the mitochondrial outer membrane. *Nat Struct Mol Biol*. 11:1044-1048.

Pickart, C.M., and D. Fushman. 2004. Polyubiquitin chains: polymeric protein signals. *Curr Opin Chem Biol*. 8:610-616.

Ramos, P.C., J. Hockendorff, E.S. Johnson, A. Varshavsky, and R.J. Dohmen. 1998. Ump1p is required for proper maturation of the 20S proteasome and becomes its substrate upon completion of the assembly. *Cell*. 92:489-499.

Rapaport, D., M. Brunner, W. Neupert, and B. Westermann. 1998. Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem*. 273:20150-20155.

Rinaldi, T., S. Francisci, E. Zennaro, L. Frontali, and M. Bolotin-Fukuhara. 1994. Suppression of a mitochondrial point mutation in a tRNA gene can cast light on the mechanisms of 3' end-processing. *Curr Genet*. 25:451-455.

Rinaldi, T., L. Hofmann, A. Gambadoro, R. Cossard, N. Livnat-Levanon, M.H. Glickman, L. Frontali, and A. Delahodde. 2008. Dissection of the carboxyl-terminal domain of the proteasomal subunit Rpn11 in maintenance of mitochondrial structure and function. *Mol Biol Cell*. 19:1022-1031.

Rinaldi, T., E. Pick, A. Gambadoro, S. Zilli, V. Maytal-Kivity, L. Frontali, and M.H. Glickman. 2004. Participation of the proteasomal lid subunit Rpn11 in mitochondrial morphology and function is mapped to a distinct C-terminal domain. *Biochem J*. 381:275-285.

Rinaldi, T., C. Ricci, D. Porro, M. Bolotin-Fukuhara, and L. Frontali. 1998. A mutation in a novel yeast proteasomal gene, RPN11/MPR1, produces a cell cycle arrest, overreplication of nuclear and mitochondrial DNA, and an altered mitochondrial morphology. *Mol Biol Cell*. 9:2917-2931.

Rinaldi, T., R. Ricordy, M. Bolotin-Fukuhara, and L. Frontali. 2002. Mitochondrial effects of the pleiotropic proteasomal mutation mpr1/rpn11: uncoupling from cell cycle defects in extragenic revertants. *Gene*. 286:43-51.

Rizzuto, R., M. Brini, M. Murgia, and T. Pozzan. 1993. Microdomains with high Ca2+ close to IP3-sensitive channels that are sensed by neighboring mitochondria. *Science*. 262:744-747.

Rock, K.L., C. Gramm, L. Rothstein, K. Clark, R. Stein, L. Dick, D. Hwang, and A.L. Goldberg. 1994. Inhibitors of the proteasome block the degradation of most cell proteins and the generation of peptides presented on MHC class I molecules. *Cell*. 78:761-771.

Roelofs, J., S. Park, W. Haas, G. Tian, F.E. McAllister, Y. Huo, B.H. Lee, F. Zhang, Y. Shi, S.P. Gygi, and D. Finley. 2009. Chaperone-mediated pathway of proteasome regulatory particle assembly. *Nature*. 459:861-865.

Rottensteiner, H., K. Stein, E. Sonnenhol, and R. Erdmann. 2003. Conserved function of pex11p and the novel pex25p and pex27p in peroxisome biogenesis. *Mol Biol Cell*. 14:4316-4328.

Rubin, D.M., M.H. Glickman, C.N. Larsen, S. Dhruvakumar, and D. Finley. 1998. Active site mutants in the six regulatory particle ATPases reveal multiple roles for ATP in the proteasome. *Embo J*. 17:4909-4919.

Rucktaschel, R., A. Halbach, W. Girzalsky, H. Rottensteiner, and R. Erdmann. 2010. De novo synthesis of peroxisomes upon mitochondrial targeting of Pex3p. *Eur J Cell Biol*. 89:947-954.

Rusinol, A.E., Z. Cui, M.H. Chen, and J.E. Vance. 1994. A unique mitochondria-associated membrane fraction from rat liver has a high capacity for lipid synthesis and contains pre-Golgi secretory proteins including nascent lipoproteins. *J Biol Chem*. 269:27494-27502.

Russell, S.J., S.H. Reed, W. Huang, E.C. Friedberg, and S.A. Johnston. 1999a. The 19S regulatory complex of the proteasome functions independently of proteolysis in nucleotide excision repair. *Mol Cell*. 3:687-695.

Russell, S.J., K.A. Steger, and S.A. Johnston. 1999b. Subcellular localization, stoichiometry, and protein levels of 26 S proteasome subunits in yeast. *J Biol Chem*. 274:21943-21952.

Saeki, Y., T. Kudo, T. Sone, Y. Kikuchi, H. Yokosawa, A. Toh-e, and K. Tanaka. 2009a. Lysine 63-linked polyubiquitin chain may serve as a targeting signal for the 26S proteasome. *EMBO J*. 28:359-371.

Saeki, Y., and K. Tanaka. 2012. Assembly and function of the proteasome. *Methods Mol Biol*. 832:315-337.

Saeki, Y., E.A. Toh, T. Kudo, H. Kawamura, and K. Tanaka. 2009b. Multiple proteasome-interacting proteins assist the assembly of the yeast 19S regulatory particle. *Cell*. 137:900-913.

Sagot, I., B. Pinson, B. Salin, and B. Daignan-Fornier. 2006. Actin bodies in yeast quiescent cells: an immediately available actin reserve? *Mol Biol Cell*. 17:4645-4655.

Sambrook, J., and D.W. Russell. 2001. Molecular cloning : a laboratory manual. Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y.

Schapira, A.H. 2012. Mitochondrial diseases. *Lancet*. 379:1825-1834.

Schauss, A.C., and H.M. McBride. 2007. Mitochondrial fission: a non-nuclear role for Num1p. *Curr Biol*. 17:R467-470.

Scheffler, I.E. 2008. Mitochondria. Wiley-Liss, Hoboken, N.J. xviii, 462 p., 412 p. of plates pp.

Schrader, M. 2006. Shared components of mitochondrial and peroxisomal division. *Biochim Biophys Acta*. 1763:531-541.

Schrader, M., and H.D. Fahimi. 2006. Growth and division of peroxisomes. *Int Rev Cytol*. 255:237-290.

Schuller, H.J. 2003. Transcriptional control of nonfermentative metabolism in the yeast Saccharomyces cerevisiae. *Curr Genet*. 43:139-160.

Sell, H., Y. Deshaies, and D. Richard. 2004. The brown adipocyte: update on its metabolic role. *Int J Biochem Cell Biol*. 36:2098-2104.

Sesaki, H., C.D. Dunn, M. Iijima, K.A. Shepard, M.P. Yaffe, C.E. Machamer, and R.E. Jensen. 2006. Ups1p, a conserved intermembrane space protein, regulates mitochondrial shape and alternative topogenesis of Mgm1p. *J Cell Biol*. 173:651-658.

Sesaki, H., and R.E. Jensen. 1999. Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J Cell Biol*. 147:699-706.

Sesaki, H., and R.E. Jensen. 2001. UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J Cell Biol*. 152:1123-1134.

Sesaki, H., and R.E. Jensen. 2004. Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J Biol Chem*. 279:28298-28303.

Sesaki, H., S.M. Southard, M.P. Yaffe, and R.E. Jensen. 2003. Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell*. 14:2342-2356.

Smirnova, E., L. Griparic, D.L. Shurland, and A.M. van der Bliek. 2001. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 12:2245-2256.

Smith, M.H., H.L. Ploegh, and J.S. Weissman. 2011. Road to ruin: targeting proteins for degradation in the endoplasmic reticulum. *Science*. 334:1086-1090.

Sogo, L.F., and M.P. Yaffe. 1994. Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol*. 126:1361-1373.

Sorokin, A.V., E.R. Kim, and L.P. Ovchinnikov. 2009. Proteasome system of protein degradation and processing. *Biochemistry (Mosc)*. 74:1411-1442.

Stadtmueller, B.M., and C.P. Hill. 2011. Proteasome activators. *Mol Cell*. 41:8-19.

Stojanovski, D., O.S. Koutsopoulos, K. Okamoto, and M.T. Ryan. 2004. Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J Cell Sci*. 117:1201-1210.

Stroud, D.A., S. Oeljeklaus, S. Wiese, M. Bohnert, U. Lewandrowski, A. Sickmann, B. Guiard, M. van der Laan, B. Warscheid, and N. Wiedemann. 2011. Composition and topology of the endoplasmic reticulum-mitochondria encounter structure. *J Mol Biol*. 413:743-750.

Subramani, S. 1993. Protein import into peroxisomes and biogenesis of the organelle. *Annu Rev Cell Biol*. 9:445-478.

Sun, L., S.A. Johnston, and T. Kodadek. 2002. Physical association of the APIS complex and general transcription factors. *Biochem Biophys Res Commun*. 296:991-999.

Sutovsky, P., R.D. Moreno, J. Ramalho-Santos, T. Dominko, C. Simerly, and G. Schatten. 1999. Ubiquitin tag for sperm mitochondria. *Nature*. 402:371-372.

Tam, Y.Y., A. Fagarasanu, M. Fagarasanu, and R.A. Rachubinski. 2005. Pex3p initiates the formation of a preperoxisomal compartment from a subdomain of the endoplasmic reticulum in Saccharomyces cerevisiae. *J Biol Chem*. 280:34933-34939.

Tamura, T., I. Nagy, A. Lupas, F. Lottspeich, Z. Cejka, G. Schoofs, K. Tanaka, R. De Mot, and W. Baumeister. 1995. The first characterization of a eubacterial proteasome: the 20S complex of Rhodococcus. *Curr Biol*. 5:766-774.

Tamura, Y., O. Onguka, A.E. Hobbs, R.E. Jensen, M. Iijima, S.M. Claypool, and H. Sesaki. 2012. Role for two conserved intermembrane space proteins, Ups1p and Up2p, in intra-mitochondrial phospholipid trafficking. *J Biol Chem*. 287:15205-15218.

Tanaka, K. 2009. The proteasome: overview of structure and functions. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 85:12-36.

Thoms, S., and R. Erdmann. 2005. Dynamin-related proteins and Pex11 proteins in peroxisome division and proliferation. *FEBS J*. 272:5169-5181.

Tian, G., S. Park, M.J. Lee, B. Huck, F. McAllister, C.P. Hill, S.P. Gygi, and D. Finley. 2011. An asymmetric interface between the regulatory and core particles of the proteasome. *Nat Struct Mol Biol*. 18:1259-1267.

Tieu, Q., and J. Nunnari. 2000. Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J Cell Biol*. 151:353-366.

Tieu, Q., V. Okreglak, K. Naylor, and J. Nunnari. 2002. The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J Cell Biol*. 158:445-452.

Tonoki, A., E. Kuranaga, T. Tomioka, J. Hamazaki, S. Murata, K. Tanaka, and M. Miura. 2009. Genetic evidence linking age-dependent attenuation of the 26S proteasome with the aging process. *Mol Cell Biol*. 29:1095-1106.

Tsolou, A., G. Nelson, V. Trachana, N. Chondrogianni, G. Saretzki, T. von Zglinicki, and E.S. Gonos. 2012. The 19S proteasome subunit Rpn7 stabilizes DNA damage foci upon genotoxic insult. *IUBMB Life*. 64:432-442.

Twig, G., A. Elorza, A.J. Molina, H. Mohamed, J.D. Wikstrom, G. Walzer, L. Stiles, S.E. Haigh, S. Katz, G. Las, J. Alroy, M. Wu, B.F. Py, J. Yuan, J.T. Deeney, B.E. Corkey, and O.S. Shirihai. 2008. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J*. 27:433-446.

Unno, M., T. Mizushima, Y. Morimoto, Y. Tomisugi, K. Tanaka, N. Yasuoka, and T. Tsukihara. 2002. The structure of the mammalian 20S proteasome at 2.75 A resolution. *Structure*. 10:609-618.

Vance, J.E. 1990. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem*. 265:7248-7256.

Vater, C.A., C.K. Raymond, K. Ekena, I. Howald-Stevenson, and T.H. Stevens. 1992. The VPS1 protein, a homolog of dynamin required for vacuolar protein sorting in Saccharomyces cerevisiae, is a GTPase with two functionally separable domains. *J Cell Biol*. 119:773-786.

Veenhuis, M., M. Mateblowski, W.H. Kunau, and W. Harder. 1987. Proliferation of microbodies in Saccharomyces cerevisiae. *Yeast*. 3:77-84.

Verma, R., L. Aravind, R. Oania, W.H. McDonald, J.R. Yates, 3rd, E.V. Koonin, and R.J. Deshaies. 2002. Role of Rpn11 metalloprotease in deubiquitination and degradation by the 26S proteasome. *Science*. 298:611-615.

Visser, W., E.A. van Spronsen, N. Nanninga, J.T. Pronk, J. Gijs Kuenen, and J.P. van Dijken. 1995. Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in Saccharomyces cerevisiae. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 67:243-253.

Voges, D., P. Zwickl, and W. Baumeister. 1999. The 26S proteasome: a molecular machine designed for controlled proteolysis. *Annu Rev Biochem*. 68:1015-1068.

Wallace, D.C. 2005. A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*. 39:359-407.

Wanders, R.J. 2004. Peroxisomes, lipid metabolism, and peroxisomal disorders. *Mol Genet Metab*. 83:16-27.

Wang, X., and T.L. Schwarz. 2009. The mechanism of Ca2+ -dependent regulation of kinesin-mediated mitochondrial motility. *Cell*. 136:163-174.

Waterham, H.R., and M.S. Ebberink. 2012. Genetics and molecular basis of human peroxisome biogenesis disorders. *Biochim Biophys Acta*. 1822:1430-1441.

Waterham, H.R., J. Koster, C.W. van Roermund, P.A. Mooyer, R.J. Wanders, and J.V. Leonard. 2007. A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N Engl J Med*. 356:1736-1741.

Waxman, L., J.M. Fagan, and A.L. Goldberg. 1987. Demonstration of two distinct high molecular weight proteases in rabbit reticulocytes, one of which degrades ubiquitin conjugates. *J Biol Chem*. 262:2451-2457.

Weber, T., B.V. Zemelman, J.A. McNew, B. Westermann, M. Gmachl, F. Parlati, T.H. Sollner, and J.E. Rothman. 1998. SNAREpins: minimal machinery for membrane fusion. *Cell*. 92:759-772.

Weissman, A.M. 2001. Themes and variations on ubiquitylation. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2:169-178.

Wendler, P., A. Lehmann, K. Janek, S. Baumgart, and C. Enenkel. 2004. The bipartite nuclear localization sequence of Rpn2 is required for nuclear import of proteasomal base complexes via karyopherin alphabeta and proteasome functions. *J Biol Chem*. 279:37751-37762.

Westermann, B. 2012. Bioenergetic role of mitochondrial fusion and fission. *Biochim Biophys Acta*.

Wilkinson, K.A., and J.M. Henley. 2010. Mechanisms, regulation and consequences of protein SUMOylation. *Biochem J*. 428:133-145.

Wilmes, G.M., M. Bergkessel, S. Bandyopadhyay, M. Shales, H. Braberg, G. Cagney, S.R. Collins, G.B. Whitworth, T.L. Kress, J.S. Weissman, T. Ideker, C. Guthrie, and N.J. Krogan. 2008. A genetic interaction map of RNA-processing factors reveals links between Sem1/Dss1-containing complexes and mRNA export and splicing. *Mol Cell*. 32:735-746.

Wong, E.D., J.A. Wagner, S.V. Scott, V. Okreglak, T.J. Holewinske, A. Cassidy-Stone, and J. Nunnari. 2003. The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J Cell Biol*. 160:303-311.

Wurm, C.A., and S. Jakobs. 2006. Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast. *FEBS Lett*. 580:5628-5634.

Yao, T., and R.E. Cohen. 2002. A cryptic protease couples deubiquitination and degradation by the proteasome. *Nature*. 419:403-407.

Yoon, Y., E.W. Krueger, B.J. Oswald, and M.A. McNiven. 2003. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol*. 23:5409-5420.

Yoshimura, T., K. Kameyama, T. Takagi, A. Ikai, F. Tokunaga, T. Koide, N. Tanahashi, T. Tamura, Z. Cejka, W. Baumeister, and *et al.* 1993. Molecular characterization of the "26S" proteasome complex from rat liver. *J Struct Biol*. 111:200-211.

Youngman, M.J., A.E. Hobbs, S.M. Burgess, M. Srinivasan, and R.E. Jensen. 2004. Mmm2p, a mitochondrial outer membrane protein required for yeast mitochondrial shape and maintenance of mtDNA nucleoids. *J Cell Biol*. 164:677-688.

Zhao, J., U. Lendahl, and M. Nister. 2012. Regulation of mitochondrial dynamics: convergences and divergences between yeast and vertebrates. *Cell Mol Life Sci*.

Zhao, J., T. Liu, S. Jin, X. Wang, M. Qu, P. Uhlen, N. Tomilin, O. Shupliakov, U. Lendahl, and M. Nister. 2011. Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission. *EMBO J*. 30:2762-2778.

Zuchner, S., I.V. Mersiyanova, M. Muglia, N. Bissar-Tadmouri, J. Rochelle, E.L. Dadali, M. Zappia, E. Nelis, A. Patitucci, J. Senderek, Y. Parman, O. Evgrafov, P.D. Jonghe, Y. Takahashi, S. Tsuji, M.A. Pericak-Vance, A. Quattrone, E. Battaloglu, A.V. Polyakov, V. Timmerman, J.M. Schroder, and J.M. Vance. 2004. Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet*. 36:449-451.

Zuchner, S., M. Noureddine, M. Kennerson, K. Verhoeven, K. Claeys, P. De Jonghe, J. Merory, S.A. Oliveira, M.C. Speer, J.E. Stenger, G. Walizada, D. Zhu, M.A. Pericak-Vance, G. Nicholson, V. Timmerman, and J.M. Vance. 2005. Mutations in the pleckstrin homology domain of dynamin 2 cause dominant intermediate Charcot-Marie-Tooth disease. *Nat Genet*. 37:289-294.

Annexes

Annexes

Annexe I : Liste des interactants avec les domaines C-terminaux de Rpn11 et Rpn11-m1 retrouvés lors du crible double hybride effectué au laboratoire.

La première colonne donne le nom systématique du gène, la deuxième colonne indique le nom standard du gène. La colonne interactant indique avec quel domaine C-terminal la protéine a été retrouvée lors du crible. La colonne de droite donne une brève description de la fonction de la protéine.

Protéine		Interactant	Fonction
YAR015W	ADE1	Rpn11	N-succinyl-5-aminoimidazole-4-carboxamide ribotide (SAICAR) synthetase, required for 'de novo' purine nucleotide biosynthesis
YPL259C	APM1	Rpn11	Mu1-like medium subunit of the clathrin-associated protein complex (AP-1); binds clathrin; involved in clathrin-dependent Golgi protein sorting
YMR041C	ARA2	Rpn11	NAD-dependent arabinose dehydrogenase, involved in biosynthesis of dehydro-D-arabinono-1,4-lactone;
YLR085C	ARP6	Rpn11-m1	Actin-related protein that binds nucleosomes; a component of the SWR1 complex, which exchanges histone variant H2AZ (Htz1p) for chromatin-bound histone H2A
YER155C	BEM2	Rpn11/Rpn11-m1	Rho GTPase activating protein (RhoGAP) involved in the control of cytoskeleton organization and cellular morphogenesis; required for bud emergence
YML111W	BUL2	Rpn11-m1	Component of the Rsp5p E3-ubiquitin ligase complex, involved in intracellular amino acid permease sorting, functions in heat shock element mediated gene expression, essential for growth in stress conditions, functional homolog of BUL1
YLR433C	CNA1	Rpn11	Calcineurin A; one isoform (the other is CMP2) of the catalytic subunit of calcineurin, a Ca++/calmodulin-regulated protein phosphatase which regulates Crz1p (a stress-response transcription factor), the other calcineurin subunit is CNB1
YJR084W	CSN12	Rpn11	Protein that forms a complex with Thp3p; may have a role in transcription elongation and/or mRNA splicing; identified as a COP9 signalosome component but phenotype and interactions suggest it may not be involved with the signalosome
YOL087C	DUF1	Rpn11	Ubiquitin-binding protein of unknown function; contains one WD40 repeat in a beta-propeller fold; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the cytoplasm; homolog of human WDR48/UAF1,
YBL101C	ECM21	Rpn11-m1	Protein involved in regulating the endocytosis of plasma membrane proteins; identified as a substrate for ubiquitination by Rsp5p and deubiquitination by Ubp2p; promoter contains several Gcn4p binding elements
YIL005W	EPS1	Rpn11-m1	ER protein with chaperone and co-chaperone activity, involved in retention of resident ER proteins; has a role in recognizing proteins targeted for ER-associated degradation (ERAD),
YPR184W	GDB1	Rpn11-m1	Glycogen debranching enzyme containing glucanotranferase and alpha-1,6-amyloglucosidase activities, required for glycogen degradation; phosphorylated in mitochondria; activity is inhibited by Igd1p
YDR517W	GRH1	Rpn11-m1	Acetylated, cis-golgi localized protein involved in ER to Golgi transport; homolog of human GRASP65; forms a complex with the coiled-coil protein Bug1p; mutants are compromised for the fusion of ER-derived vesicles with Golgi membranes
YLL060C	GTT2	Rpn11	Glutathione S-transferase capable of homodimerization; functional overlap with Gtt2p, Grx1p, and Grx2p

Protéine		Interactant	Fonction
YLR095C	IOC2	Rpn11	Member of a complex (Isw1b) with Isw1p and Ioc4p that exhibits nucleosome-stimulated ATPase activity and acts within coding regions to coordinate transcription elongation with termination and processing, contains a PHD finger motif
YCL024W	KCC4	Rpn11	Protein kinase of the bud neck involved in the septin checkpoint; associates with septin proteins, negatively regulates Swe1p by phosphorylation, shows structural homology to bud neck kinases Gin4p and Hsl1p; KCC4 has a paralog, GIN4, that arose from the whole genome duplication
YIL125W	KGD1	Rpn11	Component of the mitochondrial alpha-ketoglutarate dehydrogenase complex, which catalyzes a key step in the tricarboxylic acid (TCA) cycle, the oxidative decarboxylation of alpha-ketoglutarate to form succinyl-CoA
YDR005C	MAF1	Rpn11	Highly conserved negative regulator of RNA polymerase III; binds to the N-terminal domain of the Rpc160p subunit of Pol III to prevent closed-complex formation; localization and activity are regulated by phosphorylation, mediated by TORC1, protein kinase A, and Sch9p; localizes to cytoplasm during vegetative growth and translocates to the nucleus and nucleolus under stress conditions
YBL091C	MAP2	Rpn11-m1	Methionine aminopeptidase, catalyzes the cotranslational removal of N-terminal methionine from nascent polypeptides; function is partially redundant with that of Map1p
YNL249C	MPA43	Rpn11/Rpn11-m1	Putative protein of unknown function; the authentic, non-tagged protein is detected in highly purified mitochondria in high-throughput studies
YDR322W	MRPL35	Rpn11	Mitochondrial ribosomal protein of the large subunit
YPL013C	MRPS16	Rpn11	Mitochondrial ribosomal protein of the small subunit
YDR192C	NUP42	Rpn11	FG-nucleoporin component of central core of the nuclear pore complex (NPC); also part of the NPC cytoplasmic filaments; contributes directly to nucleocytoplasmic transport and maintenance of the NPC permeability barrier and is involved in gene tethering at the nuclear periphery; interacts with Gle1p
YBR186W	PCH2	Rpn11	Nucleolar component of the pachytene checkpoint, which prevents chromosome segregation when recombination and chromosome synapsis are defective; also represses meiotic interhomolog recombination in the rDNA; required for meiotic double-stranded break formation
YGR087C	PDC6	Rpn11-m1	Minor isoform of pyruvate decarboxylase, decarboxylates pyruvate to acetaldehyde, involved in amino acid catabolism; transcription is glucose- and ethanol-dependent, and is strongly induced during sulfur limitation
YOR122C	PFY1	Rpn11	Profilin, binds actin, phosphatidylinositol 4,5-bisphosphate, and polyproline regions; involved in cytoskeleton organization; required for normal timing of actin polymerization in response to thermal stress
YGR231C	PHB2	Rpn11	Subunit of the prohibitin complex (Phb1p-Phb2p), a 1.2 MDa ring-shaped inner mitochondrial membrane chaperone that stabilizes newly synthesized proteins; determinant of replicative life span; involved in mitochondrial segregation
YGR233C	PHO81	Rpn11	Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor, regulates Pho80p-Pho85p and Pcl7p-Pho85p cyclin-CDK complexes in response to phosphate levels; inhibitory activity for Pho80p-Pho85p requires myo-D-inositol heptakisphosphate (IP7) generated by Vip1p

Protéine		Interactant	Fonction
YHR034C	PIH1	Rpn11-m1	Component of the conserved R2TP complex (Rvb1-Rvb2-Tah1-Pih1); R2TP complex interacts with Hsp90 (Hsp82p and Hsc82p) to mediate assembly large protein complexes such as box C/D snoRNPs and RNA polymerase II
YPL144W	POC4	Rpn11	Component of a heterodimeric Poc4p-Irc25p chaperone involved in assembly of alpha subunits into the 20S proteasome; may regulate formation of proteasome isoforms with alternative subunits under different conditions
YNL102W	POL1	Rpn11-m1	Catalytic subunit of the DNA polymerase I alpha-primase complex, required for the initiation of DNA replication during mitotic DNA synthesis and premeiotic DNA synthesis
YDL036C	PUS9	Rpn11-m1	Mitochondrial tRNA:pseudouridine synthase, catalyzes the formation of pseudouridine at position 32 in mitochondrial tRNAs; contains an N-terminal mitochondrial targeting sequence
YBL014C	RRN6	Rpn11-m1	Component of the core factor (CF) rDNA transcription factor complex; CF is required for transcription of 35S rRNA genes by RNA polymerase I and is composed of Rrn6p, Rrn7p, and Rrn11p
YJL025W	RRN7	Rpn11-m1	Component of the core factor (CF) rDNA transcription factor complex; CF is required for transcription of 35S rRNA genes by RNA polymerase I and is composed of Rrn6p, Rrn7p, and Rrn11p
YGR056W	RSC1	Rpn11	Component of the RSC chromatin remodeling complex; required for expression of mid-late sporulation-specific genes; contains two essential bromodomains, a bromo-adjacent homology (BAH) domain, and an AT hook
YGR213C	RTA1	Rpn11	Protein involved in 7-aminocholesterol resistance; has seven potential membrane-spanning regions; expression is induced under both low-heme and low-oxygen conditions; member of the fungal lipid-translocating exporter (LTE) family of protein
YPL183C	RTT10	Rpn11-m1	WD40 domain-containing protein involved in endosomal recycling; forms a complex with Rrt2p that functions in the retromer-mediated pathway for recycling internalized cell-surface proteins; evidence it interacts with Trm7p for 2'-O-methylation of N34 of substrate tRNAs; has a role in regulation of Ty1 transposition; human ortholog is WDR6
YAL027W	SAW1	Rpn11	Protein involved in Rad1p/Rad10p-dependent removal of 3'-nonhomologous tails during double-strand break repair via single-strand annealing; green fluorescent protein (GFP)-fusion protein localizes to the nucleus
YOR035C	SHE4	Rpn11	Protein containing a UCS (UNC-45/CRO1/SHE4) domain, binds to myosin motor domains to regulate myosin function; involved in endocytosis, polarization of the actin cytoskeleton, and asymmetric mRNA localization
YIL036W	SHF1	Rpn11-m1	Basic leucine zipper (bZIP) transcription factor, in ATF/CREB family; mediates transcriptional activation of NCE103 (encoding carbonic anhydrase) in response to low CO2 levels such as in the ambient air; proposed to be a regulator of oleate responsive genes; involved in utilization of non-optimal carbon sources and chromosome stability
YOR060C	SLD7	Rpn11/Rpn11-m1	Protein with a role in chromosomal DNA replication; interacts with Sld3p and reduces its affinity for Cdc45p; deletion mutant has aberrant mitochondria
YDR425W	SNX41	Rpn11-m1	Sorting nexin, involved in the retrieval of late-Golgi SNAREs from the post-Golgi endosome to the trans-Golgi network; interacts with Snx4p
YCR073W-A	SOL2	Rpn11-m1	Protein with a possible role in tRNA export; shows similarity to 6-phosphogluconolactonase non-catalytic domains but does not exhibit this enzymatic activity; homologous to Sol1p, Sol3p, and Sol4p

Protéine		Interactant	Fonction
YER022W	SRB4	Rpn11	Subunit of the RNA polymerase II mediator complex; associates with core polymerase subunits to form the RNA polymerase II holoenzyme; essential for transcriptional regulation; homozygosity of the human MED17 L371P mutation is associated with infantile cerebral and cerebellar atrophy with poor myelination
YLR369W	SSQ1	Rpn11	Mitochondrial hsp70-type molecular chaperone, required for assembly of iron/sulfur clusters into proteins at a step after cluster synthesis, and for maturation of Yfh1p, which is a homolog of human frataxin implicated in Friedreich's ataxia
YDR407C	TRS120	Rpn11	One of 10 subunits of the transport protein particle (TRAPP) complex of the cis-Golgi which mediates vesicle docking and fusion; involved in endoplasmic reticulum (ER) to Golgi membrane traffic
YCR084C	TUP1	Rpn11-m1	General repressor of transcription, forms complex with Cyc8p, involved in the establishment of repressive chromatin structure through interactions with histones H3 and H4, appears to enhance expression of some genes
YDL122W	UBP1	Rpn11-m1	Ubiquitin-specific protease that removes ubiquitin from ubiquitinated proteins; cleaves at the C terminus of ubiquitin fusions irrespective of their size; capable of cleaving polyubiquitin chains
YDR213W	UPC2	Rpn11	Sterol regulatory element binding protein, induces transcription of sterol biosynthetic genes and of DAN/TIR gene products; Ecm22p homolog; relocates from intracellular membranes to perinuclear foci on sterol depletion
YIL056W	VHR1	Rpn11	Transcriptional activator, required for the vitamin H-responsive element (VHRE) mediated induction of VHT1 (Vitamin H transporter) and BIO5 (biotin biosynthesis intermediate transporter) in response to low biotin concentrations
YJR102C	VPS25	Rpn11	Component of the ESCRT-II complex, which is involved in ubiquitin-dependent sorting of proteins into the endosome
YMR106C	YKU80	Rpn11-m1	Subunit of the telomeric Ku complex (Yku70p-Yku80p), involved in telomere length maintenance, structure and telomere position effect; relocates to sites of double-strand cleavage to promote nonhomologous end joining during DSB repair
YIR026C	YVH1	Rpn11	Protein phosphatase involved in vegetative growth at low temperatures, sporulation, and glycogen accumulation; mutants are defective in 60S ribosome assembly; member of the dual-specificity family of protein phosphatases
YGR211W	ZPR1	Rpn11	Essential protein with two zinc fingers, present in the nucleus of growing cells but relocates to the cytoplasm in starved cells via a process mediated by Cpr1p; binds to translation elongation factor eEF-1 (Tef1p)
YDR374C		Rpn11-m1	Putative protein of unknown function
YNR071C		Rpn11-m1	Putative protein of unknown function
YPL216W		Rpn11-m1	Putative protein of unknown function; YPL216W is not an essential gene