



Université
de Toulouse

THESE

En vue de l'obtention du

DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier
Discipline ou spécialité : Gènes, Cellules et Développement

Présentée et soutenue par *KHOSROBAKSH Farnoosh*
Le 9 Juillet 2010

Titre : *Caractérisation de Msp1, un acteur de la dynamique mitochondriale,
chez la levure à fission*

JURY

Mme Nathalie Bonnefoy, Directeur de Recherche CNRS- CGM, Gif-sur-Yvette
Mme Anne Devin, Chargée de Recherche, CNRS-IBGC, Bordeaux
Mr Guy Lenaers, Directeur de Recherche, INSERM-INM, Montpellier
Mme Pascale Belenguer, Professeur d'Université, CNRS-MPM, Toulouse

Rapporteur
Rapporteur
Examineur
Directrice de thèse

Ecole doctorale : *Biologie Santé Biotechnologie de Toulouse*
Unité de recherche : *UMR5241*
Directrice de Thèse : *Mme Pascale Belenguer*

Je tiens à remercier les membres de jury, Mme Devin, Mme Bonnefoy et Mr Lenaers d'avoir consacré une partie de leur temps à lire et à juger ce travail.

Merci d'abord à Pascale pour m'avoir accueillie dans son équipe et pour m'avoir encadrée. Pascale, vous m'avez transmis votre exigence du travail bien fait avec une telle patience et une telle disponibilité. C'est difficile de trouver des mots pour vous remercier très profondément, des mots pour décrire une superbe aventure scientifique, mais avant tout une aventure humaine, car, comme vous l'avez si bien dit le jour de la consécration, c'est un sentiment d'amitié qui nous uni, une amitié qui rend les départs difficiles, mais qui rendra les retrouvailles si fortes.

Je te remercie Laetitia pour ton merveilleux sourire, ton écoute, tes conseils, ta joie à toute épreuve qui m'ont permis de passer ces années de bonheur au laboratoire.

Je te remercie Marlène chaleureusement pour les aides concrètes à la paillasse et les bons moments partagés dans le bureau.

Je vous remercie Laurent pour vos conseils de manips et votre rigueur scientifique.

Je remercie tous les autres membres d'équipe anciens et actuels, Ingrid, Thomas, Alan, Ambre, Valérie, Marie-Christine, Noélie, Aurélie et Stéphanie.

Merci aux membres du Laboratoire MPM, en particulière ceux qui m'ont aidée pour les manips d'oxygraphe.

Je remercie chaleureusement mes parents, ma belle mère, mes frères et ma famille pour leur soutien, surtout pendant les 2 derniers années de ma thèse. Je remercie très tendrement mes deux amours, Morad et Saeid, pour leur soutien et leur aide durant mes années d'études en France et tout particulièrement pendant ces 2 derniers années.

A. Introduction	13
I. Les mitochondries	15
1. Histoire de la mitochondrie	15
2. Biogenèse de la mitochondrie	19
2.1. La contribution mitochondriale	19
2.2. La contribution nucléaire	21
3. Les principales fonctions des mitochondries	23
3.1. La phosphorylation oxydative	23
3.1.1. La chaîne respiratoire	25
3.1.2. L'ATP synthase (complexe V)	29
3.2. La production mitochondriale des espèces réactives de l'oxygène	31
3.2.1. Les sites de production de ROS mitochondriaux	31
3.2.2. Système de gestion des ROS mitochondriales	33
3.2.3. L'homéostasie redox	33
3.3. Les voies métaboliques	35
3.4. L'apoptose	37
4. Structure des mitochondries	39
4.1. Morphologie des mitochondries	39
4.1.1. Morphologie des mitochondries	39
4.2. Mobilité et la distribution des mitochondries	41
4.2.1. Mobilité et distribution des mitochondries chez les mammifères	43
4.2.2. Mobilité et distribution des mitochondries chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	45
4.2.3. Distribution des mitochondries chez la levure <i>S. pombe</i>	47
4.3. Ultrastructure des mitochondries	47
II. La dynamique mitochondriale	51
1. Techniques d'observation de la dynamique mitochondriale	51
2. La fission des mitochondries	57
2.1. Les acteurs de la fission mitochondriale	57
2.1.1. Dnm1/DRP1/DLP1	57
2.1.2. Fis1	65
2.1.3. Mdv1	69
2.1.4. Caf4	71
2.2. Modèle proposé pour le complexe de fission mitochondriale	71
2.3. Autres acteurs ou régulateurs de la fission mitochondriale	73
2.3.1. MTP18	73
2.3.2. Mdm33	75
2.3.3. GDAP1	75
2.3.4. Endophiline B1	77
3. La fusion des mitochondries	77
3.1. Les acteurs de la fusion mitochondriale	79
3.1.1. Fzo1p/Mitofusines	79
a. FZO1 chez la Drosophile	79
b. Fzo1p chez la levure	79
c. Les mitofusines chez les mammifères	81
3.1.2. Mgm1p/Msp1p/OPA1	85
a. Mgm1 chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	85
b. Msp1p chez la levure <i>S. pombe</i>	91
c. OPA1 chez les mammifères	91
3.1.3. Ugo1	101
3.2. Modèle proposé pour le complexe de fusion mitochondriale	103
3.3. Autres acteurs ou régulateurs de la fusion mitochondriale	103
4. Les fonctions de la dynamique mitochondriale	107
4.1. Pertinence fonctionnelle	107

4.2. Transmission des mitochondries au cours de la division cellulaire	107
4.3. Maintien des fonctions mitochondriales	109
4.4. Distribution des mitochondries	111
4.5. Apoptose	111
4.6. Mitophagie	113
B. Résultats	115
1. Objectifs de la thèse	117
2. La levure à fission <i>Schizosaccharomyces pombe</i>	117
3. La dynamine <i>Msp1</i> chez la levure <i>S. pombe</i>	121
4. Maturation protéolytique de <i>Msp1</i> et de son homologue <i>OPA1</i> chez <i>S. pombe</i>	123
4.1. Maturation protéolytique de <i>Msp1p</i> chez <i>S. pombe</i>	125
4.1.1. Publication : « Processing of the dynamin <i>Msp1p</i> in <i>S. pombe</i> reveals an evolutionary switch between its orthologs <i>Mgm1p</i> in <i>S. cerevisiae</i> and <i>OPA1</i> in mammals »	125
4.1.2. Données supplémentaires bibliographiques	133
4.1.3. Données supplémentaires expérimentales	143
4.2. Étude de la maturation protéolytique d'<i>OPA1</i> dans la levure <i>S. pombe</i>	151
4.2.1. Expression d' <i>OPA1</i> dans une levure sauvage	153
4.2.2. Protéases impliquées dans le clivage d' <i>OPA1</i> chez <i>S. pombe</i>	157
4.2.3. Clivage inductible d' <i>OPA1</i> dans la levure <i>S. pombe</i>	157
4.3. Discussion et perspective	157
5. Recherche de partenaires génétiques de <i>msp1</i>⁺	163
5.1. Obtention d'un mutant thermosensible de <i>Msp1</i>	167
5.2. Caractérisation d'un mutant thermosensible <i>Msp1P300S</i>	173
5.2.1. Effet de la mutation <i>Msp1P300S</i> sur la morphologie du réseau mitochondrial	173
5.2.2. Effet de la mutation <i>P300S</i> sur la croissance dans différents milieux	181
5.2.3. Effet de la mutation <i>P300S</i> sur la respiration mitochondriale	183
5.2.4. Effet de la mutation <i>P300S</i> sur la production de ROS	187
5.2.5. Effet de l'osmolarité sur la croissance du mutant <i>Msp1P300S</i>	191
5.2.6. Sensibilité de la souche <i>Msp1 P300S</i> au stress oxydatif	191
5.2.7. Sensibilité de la souche <i>Msp1 P300S</i> au stress thermique	193
5.3. Mise au point des conditions de criblage de suppresseurs de la létalité induite par la perte de <i>msp1</i>⁺	193
5.4. Conclusion et perspectives	195
C. Spéculations	209
D. Matériels et Méthodes	215
I. Méthodes spécifiques à <i>S. pombe</i>	217
A. Maintien et croissance des souches	217
1. Milieux	217
2. Conservation et culture des souches	219
3. Test en goutte	219
B. Evaluation de la respiration mitochondriale	219
C. Mesure du taux de ROS	220
D. Transformation	221
1. Vecteurs utilisés	221
2. Transformation par électroporation	221
3. Recombinaison homologue	222

E. PCR sur colonies	223
F. Observations en microscopie à fluorescence	224
II. Techniques relative à l'ADN	224
A. Préparation d'ADN plasmidique	224
B. Digestion enzymatique	224
C. Extraction d'ADN génomique chez <i>S.pombe</i>	224
D. Southern Blot	226
1. Digestion de l'ADN génomique et préparation de la sonde	226
2. Séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose et transfert sur filtre	226
3. Transfert des fragments d'ADN sur membrane de nylon	226
4. Marquage des sondes	227
5. Hybridation	228
III. Techniques relatives aux protéines	229
A. Lyse cellulaire	229
B. Electrophorèse et immunodétection	230
IV. Liste des anticorps utilisés	230
V. Liste des souches <i>S. pombe</i> utilisées	231
E. Bibliographie	237
F. Annexes	259

Liste des Figures et Tableaux

Figure n°1 : (A) Représentation schématique et (B) photo de microscopie électronique d'une mitochondrie.....	14
Figure n°2 : Organisation de l'ADN mitochondrial humain.....	18
Figure n°3 : Organisation de l'ADN mitochondrial de <i>S. pombe</i>	20
Figure n°4 : Les différentes voies d'import mitochondrial.....	20
Figure n°5 : Les différents complexes assurant la phosphorylation oxydative.....	24
Figure n°6 : Production de ROS par la chaîne respiratoire.....	30
Figure n°7 : Schéma simplifié du fonctionnement mitochondrial.....	32
Figure n°8 : Le Cycle de Krebs.....	34
Figure n°9 : Les mécanismes moléculaires de perméabilisation de la membrane externe. Les modèles proposés qui aboutissent au relargage du cytochrome c sont présentés.....	36
Figure n°10 : Morphologie des mitochondries dans différents types cellulaires révélée par microscopie à fluorescence.....	38
Figure n°11 : Transport des mitochondries sur le cytosquelette de microtubule.....	42
Figure n°12 : Modèle de mouvement antérograde et rétrograde chez la levure <i>S. cerevisiae</i>	44
Figure n°13 : Représentations schématiques des différents modèles de la structure interne des mitochondries.....	46
Figure n°14 : Reconstructions tomographiques de mitochondries.....	48
Figure n°15 : La dynamique des membranes mitochondriales.....	50
Figure n°16 : Test de fusion mitochondriale au PEG.....	52
Figure n°17 : Test de fusion mitochondriale avec la mito-PAGFP.....	53
Figure n°18 : Test de fusion de mitochondries de levure <i>in vitro</i>	54
Figure n°19 : Dnm1 chez <i>S. cerevisiae</i>	56
Figure n°20 : Effets de la déplétion en Drp1 dans des cellules HeLa.....	56
Figure n°21 : Auto-assemblage sous forme de spirales de Dnm1p.....	58
Figure n°22 : Modèle de régulation de DRP1 par phosphorylation.....	62
Figure n°23 : Trafic dynamique de DRP1 sur les sites de fission mitochondriale.....	62
Figure n°24 : Fis1 chez <i>S. cerevisiae</i>	64
Figure n°25 : Modèle en étape pour l'assemblage des complexes de fission sur les mitochondries.....	70
Figure n°26 : Représentation schématique de la fusion mitochondriale.....	76
Figure n°27 : Fzo1p chez <i>S. cerevisiae</i>	78
Figure n°28 : Fzo1p est nécessaire pour la fusion mitochondriale au cours de conjugaison...	80
Figure n°29 : Les Mitofusines chez les mammifères.....	82
Figure n°30 : Mgm1 chez <i>S. cerevisiae</i>	86
Figure n°31 : Modèle d'import et de maturation de Mgm1p chez <i>S. cerevisiae</i>	86
Figure n°32 : Représentation schématique de la protéine OPA1.....	90
Figure n°33 : Représentation schématique des 8 variants d'épissage humaines de la protéine OPA1.....	90
Figure n°34 : Les différentes isoformes protéique d'OPA1.....	92
Figure n°35 : Modèle du clivage protéolytique OPA1.....	92
Figure n°36 : Effet de la surexpression et de l'extinction d'OPA1 sur la morphologie des mitochondries.....	94
Figure n°37 : La fusion mitochondriale.....	96
Figure n°38 : Réponse cellulaire à des différentes doses de stress.....	96
Figure n°39 : Ugo1p chez <i>S. cerevisiae</i>	100
Figure n°40 : Modèle du mécanisme de la fusion mitochondriale.....	102
Figure n°41 : Représentation schématique des différents domaines de Msp1.....	120

Figure n°42 : Msp1p est impliquée dans le maintien du génome mitochondrial.....	122
Figure n°43 : Msp1p est impliquée dans la fusion des mitochondries.	122
Tableau n°1 : Les protéases intra-mitochondriales.....	132
Figure n°44 : Mécanismes protéolytiques mitochondriaux chez <i>S. cerevisiae</i>	134
Figure n°45 : Les AAA-protéases mitochondriales.....	136
Figure n°46 : Différentes fonctions des AAA protéases dans la mitochondrie.....	136
Figure n°47 : Représentation schématique de la construction de la cassette de recombinaison homologue contenant le gène résistance à l'antibiotique (R) par PCR.....	142
Figure n°48 : Vérification des délétions des gènes <i>rh1</i> ⁺ , <i>rh2</i> ⁺ , <i>m-AAA</i> ⁺ et <i>yme1</i> ⁺	142
Figure n°49 : Construction des souches délétées pour <i>rh1</i> ⁺	144
Figure n°50 : Construction des souches délétées pour <i>rh2</i> ⁺	145
Figure n°51 : Construction des souches délétées pour <i>m-AAA</i> ⁺ protéase.....	146
Figure n°52 : Construction des souches délétées pour <i>yme1</i> ⁺	147
Figure n°53 : Vérification de la délétion du gène <i>omal</i> ⁺ par PCR.	148
Figure n°54 : Détection de Msp1p dans les souches délétées pour <i>omal</i> ⁺	149
Figure n°55 : Expression ectopique des 8 variants d'épissage d'OPA1 dans la levure <i>S. pombe</i> ou dans les MEF OPA1 ^{-/-}	152
Tableau n°2 : Tableau récapitulatif des poids moléculaires apparents des différents formes d'OPA1 détectées chez la levure en figure 55A et des poids moléculaires théoriques pour toutes les isoformes issues du clivage protéolytique des variants d'OPA1.....	154
Figure n°56 : Expression d'OPA1 dans des levures délétées pour les gènes <i>rh1</i> ⁺ , <i>m-AAA</i> ⁺ et <i>yme1</i> ⁺	155
Figure n°57 : Expression d'OPA1 dans des levures traitées au CCCP.....	156
Figure n°58 : Position des mutations P300S et G462D sur la dynamine Msp1p et alignement de séquences de dynamines.....	164
Figure n°59 : Stratégie d'obtention des mutants Msp1P300S et Msp1G462D.....	165
Figure n°60 : Criblage des clones recombinants par PCR.....	166
Figure n°61 : Criblage de l'intégration des mutations P300S et G462D dans le cadre de lecture de <i>msp1</i> ⁺	168
Figure n°62 : Schéma représentatif des résultats de Southern blot attendus.....	169
Figure n°63 : Résultats des Southern blot réalisés avec la sonde Msp1 (A) et la sonde Ura4 (B).....	172
Figure n°64 : Observation des mitochondries en microscopie à fluorescence de levures sauvages (Msp1WT) ou mutées (P300S) pour Msp1p à température permissive et restrictive.	174
Figure n°65 : Expression de Msp1p sauvage (WT) ou mutée (P300S) à température permissive et restrictive en milieu glucose.....	175
Figure n°66 : Croissance des levures WT, Msp1WT et Msp1P300S en milieu glucose.....	178
Figure n°67 : Croissance des levures WT, Msp1WT et Msp1P300S en milieu éthanol/glycérol.....	179
Figure n°68 : Croissance des levures WT, Msp1WT et Msp1P300S en milieu galactose....	180
Figure n°69 : Croissance des levures WT, Msp1WT et Msp1P300S en milieu pauvre en adénine.....	182
Figure n°70 : Respiration basale ou modulée de levures sauvages.	184
Figure n°71 : Respiration des levures en présence d'antimycine A à 37°C.....	185
Figure n°72 : Respiration basale des levures sauvages (Msp1WT) et mutées (Msp1P300S).	185
Figure n°73 : Production de ROS dans une levure sauvage en présence de ménadione.	186
Figure n°74 : Production de ROS des levures sauvages (Msp1WT) et mutées (Msp1P300S) à température restrictive.....	186

Figure n°75 : Croissance des levures WT, Msp1WT et Msp1P300S en milieu glucose plus ou moins sorbitol à température restrictive.	188
Figure n°76 : Croissance des souches WT, Msp1WT et Msp1P300S en milieu galactose plus ou moins sorbitol à température restrictive.	189
Figure n°77 : Croissance des levures WT, Msp1WT et Msp1P300S en milieu éthanol/glycérol ou glucose pauvre en adénine plus ou moins sorbitol à température restrictive.....	190
Figure n°78 : Viabilité des levures WT, Msp1WT et Msp1P300S en présence d'H ₂ O ₂ à température restrictive.....	192
Figure n°79 : Sensibilité de la souche Msp1P300S à un stress thermique.....	192
Figure n°80 : Nombres de transformants obtenus sur milieu galactose.....	194
Figure n°81 : Voie de la MAP Kinase Sty1 chez la levure à fission <i>S. pombe</i>	202

A. Introduction

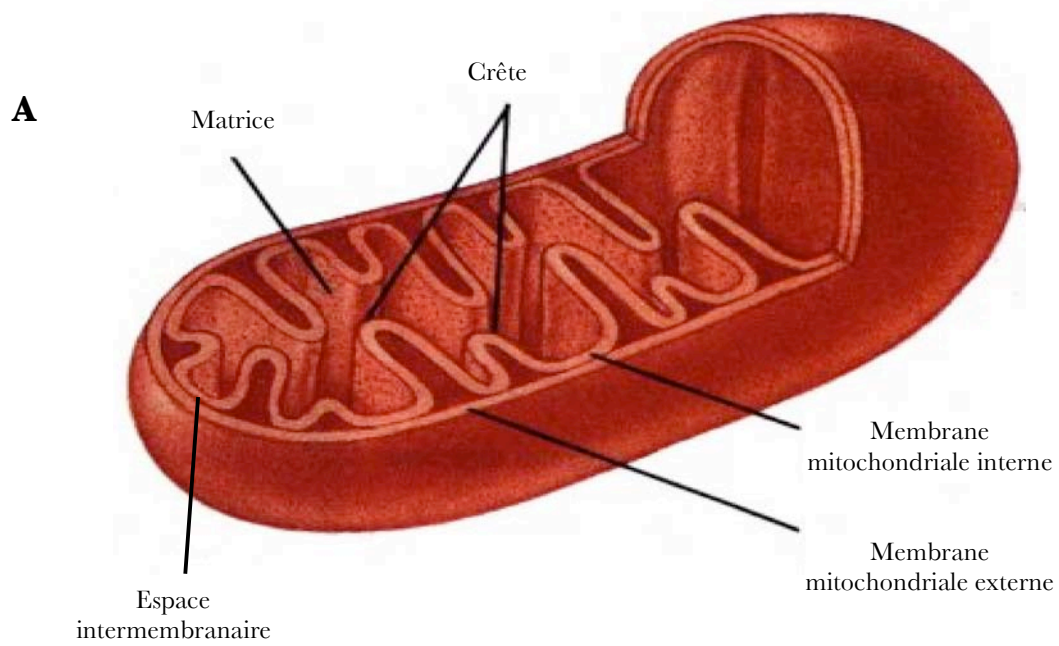


Figure n°1 : (A) Représentation schématique et (B) photo de microscopie électronique d'une mitochondrie.

I. Les mitochondries

1. Histoire de la mitochondrie

Les mitochondries ont été décrites pour la première fois en 1857, par R. Kölliker, comme des compartiments cytoplasmiques granulaires (« chondros » en grec) possédant leur propre membrane. À la fin du 19^{ème} siècle, les progrès réalisés dans les techniques de coloration en microscopie par R. Altmann ont permis de montrer que ces structures pouvaient également apparaître comme des filaments (en grec « mitos »). Ces observations ont conduit à la naissance du terme « mitochondrie » proposé dès 1898 par C. Benda. Au tout début du 20^{ème} siècle, la mise au point de cultures de cellules de poulet et leur observation en microscopie en champ clair a permis, pour la première fois, d'observer des changements de forme dynamique des mitochondries dans les cellules vivantes. Dès 1931, il a été démontré que cette dynamique était régulée au cours de développement dans le foie. Toutefois, peu d'attention a été alors accordée à cette caractéristique mitochondriale en raison de la découverte des fonctions biochimiques autonomes de la mitochondrie.

À cette époque, les nouvelles techniques de biochimie (centrifugation, filtration ...) révolutionnent, en effet, la biologie cellulaire et permettent, au début des années 1940, à l'équipe de A. Claude d'isoler des mitochondries de cellules hépatiques par fractionnement cellulaire. La purification est améliorée en 1948 par G.H. Hogeboom, W.C. Schneider et G. Palade grâce à l'utilisation de sucrose qui préserve l'intégrité des mitochondries et de leurs morphologies. Ceci permettra à G. Palade d'observer en microscope électronique et de décrire la structure interne de la mitochondrie qui fera référence sous le nom de « modèle de Palade » (*figure n°1*), ce modèle décrit la mitochondrie comme un organite isolé à deux membranes : une externe (ME) et une interne (MI), la dernière présentant des invaginations appelées « crêtes ». L'espace matriciel est délimité par la membrane interne et l'espace inter-membranaire est situé entre les deux membranes.

Les années 1950 ont été également marquées par la mise en évidence de plusieurs fonctions métaboliques de la mitochondrie. Outre son rôle dans le cycle de Krebs ou la β -oxydation des acides gras respectivement découverts par H. Krebs, A.L. Lehninger et E.P.

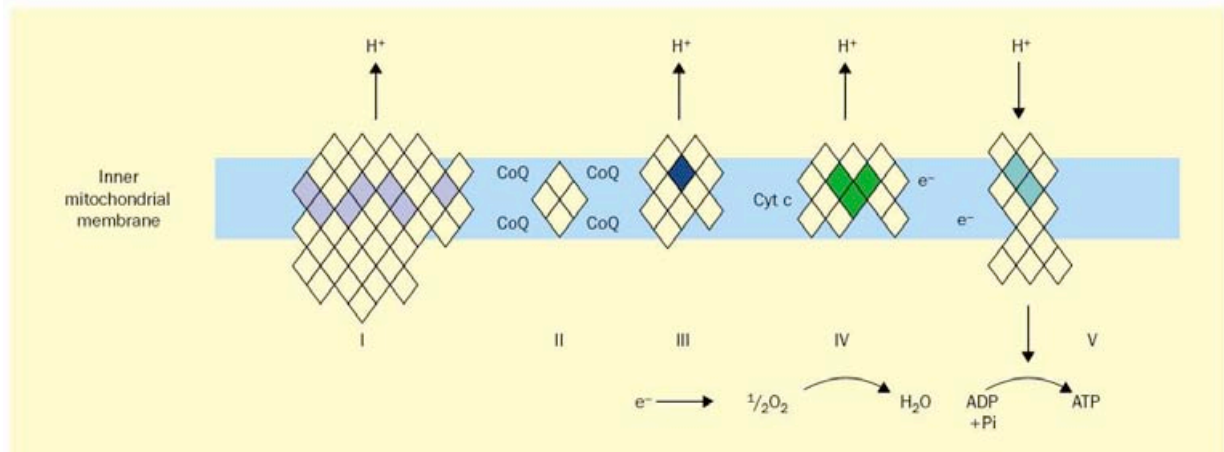
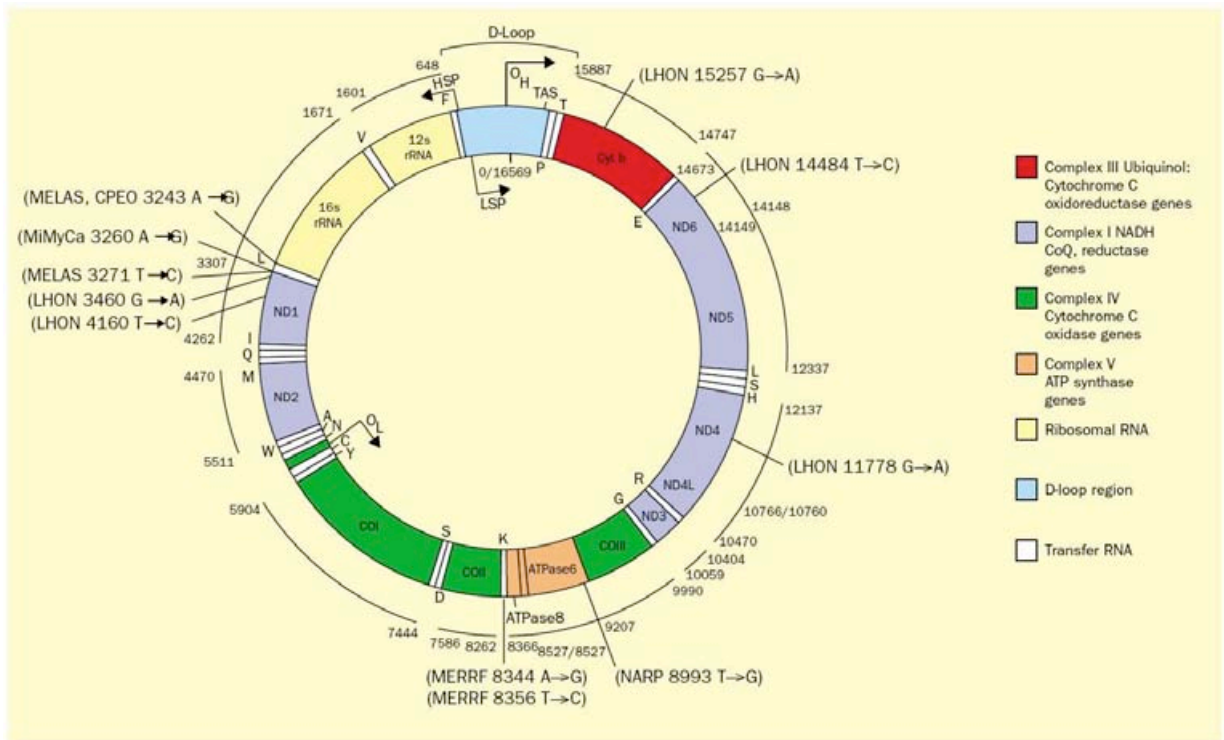
Kennedy, la mitochondrie est dès lors apparue comme le premier fournisseur d'énergie à la cellule via la phosphorylation oxydative. Les années qui suivirent ont été rythmées par l'identification et la caractérisation, aussi bien fonctionnelle que structurale, des différents complexes de la chaîne respiratoire qui ont conduit au décernement de deux prix Nobel : l'un à P. Mitchell en 1978 pour sa contribution à l'explication du transfert de l'énergie biologique par la formulation de la théorie chimiosmotique, et l'autre à J. Walker et P. Boyer en 1997 pour la détermination de la structure et du fonctionnement de la sous-unité F_1 de l'ATP synthase.

Un autre tournant important de l'histoire de la mitochondrie est survenu lors de la mise en évidence de la présence d'ADN au sein de cette organelle en 1963 par S. Nass, et du séquençage complet de l'ADN mitochondrial bovin au tout début des années 1980. L'ADNmt ne codant que pour 13 protéines, il était donc évident que la quasi-totalité des protéines mitochondriales provenait de l'expression du génome nucléaire. À cette époque, les premières mutations de l'ADNmt responsables de pathologies dites mitochondriales chez l'homme ont également été décrites soulevant des questions encore non résolues, relatives par exemple à l'hétéroplasmie, définie par la cohabitation de différentes séquences d'ADNmt (sauvages et mutées) chez un même individu, à la difficulté d'établir des corrélations entre génotype et phénotype, ou aux raisons de leur spécificité tissulaire.

En 1996, la mitochondrie source de vie montra un visage tout à fait inattendu lorsqu'une protéine indispensable à la phosphorylation oxydative, le cytochrome c, apparut également impliqué dans le contrôle d'un processus de mort cellulaire essentiel pour le développement normal des organismes multicellulaires, l'apoptose. Ce domaine de recherche a par la suite été profondément étudié et a finalement permis de reconstituer une succession d'évènements dont certains abrités par la mitochondrie constituant la voie intrinsèque apoptotique.

Enfin, dans les années 1990, la notion de dynamique mitochondriale commença à émerger. La mise en évidence d'interactions entre les mitochondries et le cytosquelette (évènements dits extrinsèques) et des processus de fusion et de fission des membranes mitochondriales (évènements dits intrinsèques) a, dès lors, permis de ne plus considérer les mitochondries comme des entités séparées au sein de la cellule mais comme un réseau de membranes interconnectées.

Pour revue, voir (Schatz, 2007; Scheffler, 1999; Scheffler, 2001).



Leonard 2000 The Lancet

Figure n°2 : Organisation de l'ADN mitochondrial humain.

La carte indique les différents gènes codés par le génome mitochondrial humain et certaines mutations pathogènes. Les sous-unités des complexes OXPHO sont indiquées par des losanges, colorés si la sous unité est codée par l'ADNmt, ou pas si elle est d'origine nucléaire.

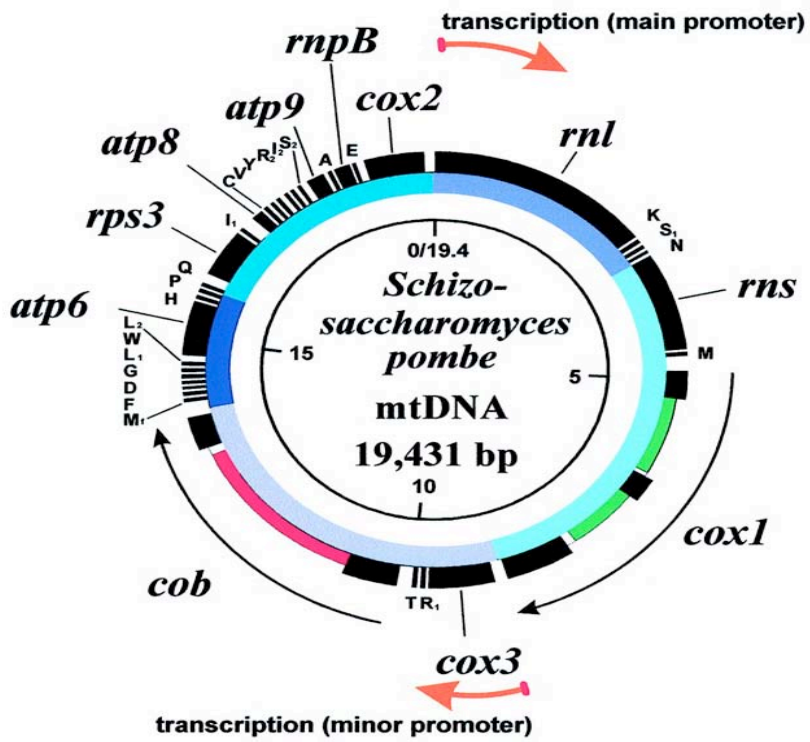
2. Biogenèse de la mitochondrie

2.1. La contribution mitochondriale

L'ADN mitochondrial (ADNmt) humain a été séquencé en 1981. Depuis de nombreux génomes mitochondriaux d'organismes modèles, que ce soit chez les animaux, les plantes ou les champignons ont à leur tour été séquencés. Dans la majorité des cas, cet ADN est circulaire, mais plusieurs exceptions existent, comme chez *Saccharomyces cerevisiae*, où le génome mitochondrial est linéaire.

L'ADNmt humain (*figure n°2*) sera ici pris comme exemple pour illustrer l'organisation de l'information génétique (Leonard & Schapira, 2000). Il contient 16,569 pb et code pour 2 ARN ribosomiques, 22 ARN de transfert et 13 ARN messagers mitochondriaux. La majorité des cadres ouverts de lecture des ARNm et des ARNr sont séparés par des ARNt. Le mécanisme de réplication de l'ADNmt est largement méconnu, mais fait intervenir la polymérase γ et une hélicase appelées *Twinkle*. La transcription s'effectue à partir des deux brins par l'ARN polymérase mitochondriale assistée de plusieurs facteurs de transcription (TFAM, TFB1M, TFB2M et MTERF) pour générer des ARN polycistroniques, qui sont par la suite épissés. Les ARNm n'ont quasiment pas de séquences 3' et 5' non codantes (3'UTR et 5'UTR) et dans certains cas les deux premiers A de la polyadénylation complètent le U terminal pour donner le codon stop. La traduction des 13 ARNm permet d'obtenir les protéines : ND1 à 6 et ND4L du complexe I, le cytochrome b du complexe III, les cytochromes oxydases : COX I, II et III du complexe IV et les sous-unités 6 et 8 du complexe V. Toutes ces protéines sont impliquées dans les complexes assurant la phosphorylation oxydative (voir ci-dessous). Elles sont adressées et pour certaines ancrées à la membrane interne mitochondriale, directement après leur traduction dans la matrice mitochondriale.

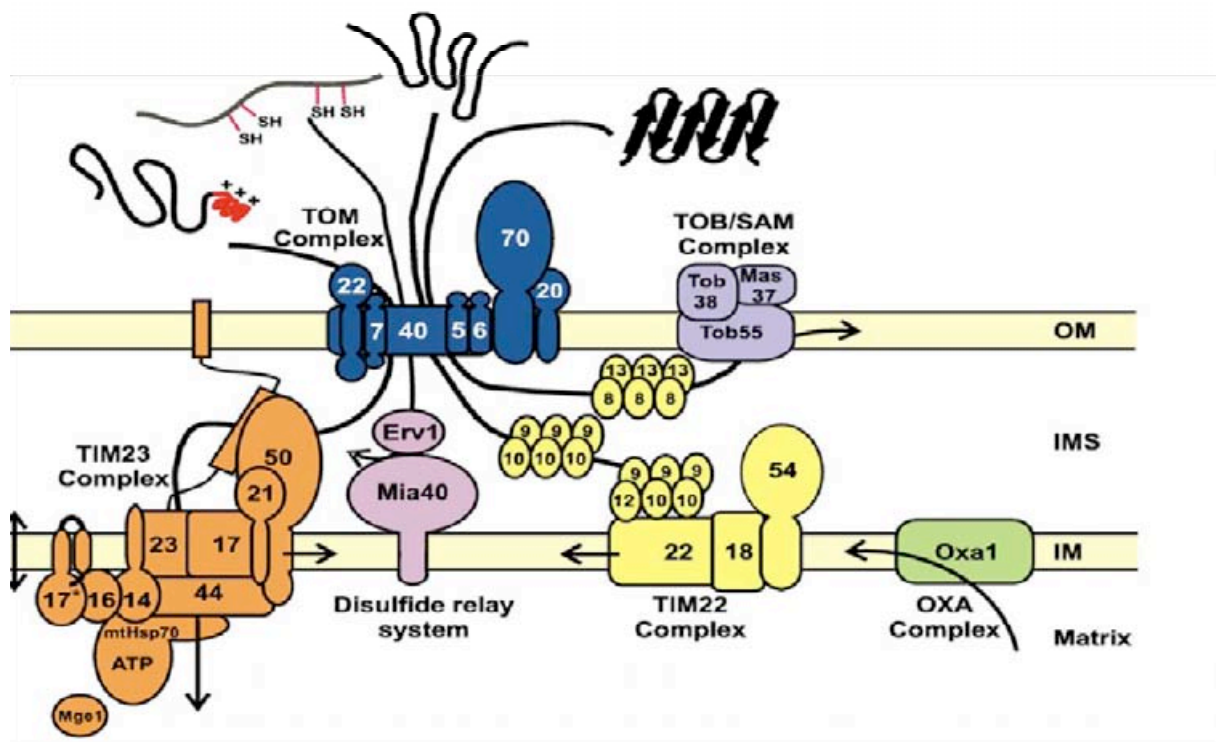
Dans le cas des levures, on observe une grande variabilité de taille avec un génome mitochondrial de 40 à 60 kb en moyenne et des valeurs extrêmes de 19,431 kb pour *Schizosaccharomyces pombe* (Bullerwell et al, 2003) (*figure n°3*), 75 kb pour *S. cerevisiae* et 170 kb pour *Agaricus bitorquis*. *S. pombe* considérée jusqu'alors comme le second modèle de levure après la levure bourgeonnante *S. cerevisiae*, possède cependant de plus nombreuses similarités avec les eucaryotes supérieurs. Ainsi, comme chez l'homme, on retrouve une compaction importante des gènes dans la molécule d'ADN. Ces gènes codent pour 25 ARNt, le petit et le grand ARN



Bullerwell 2003 *Nuc Ac Research*

Figure n°3 : Organisation de l'ADN mitochondrial de S. pombe.

Le cercle interne donne l'échelle en pb. Sur le cercle externe sont indiqués les gènes, avec leur exons (noir) et leurs introns (blanc), et les cadres de lecture introniques (groupe I en vert et groupe II en magenta).



Mokranjac 2008 *BBA*

Figure n°4 : Les différentes voies d'import mitochondrial.

Voir le texte pour les détails.

ribosomiques (respectivement *rns* et *rnl*), l'ARN composant la RNase P (*rnpB*), la sous-unité ribosomique mitochondriale 3 (*rps3*), les sous-unités 1, 2 et 3 de la cytochrome oxydase (*cox1*, *cox2* et *cox3*), l'apocytochrome b (*cob*) et les sous-unités 6, 8 et 9 de l'ATP synthase (*atp6*, *atp8* et *atp9*). Ces gènes sont transcrits à partir du même brin d'ADN. Dans les génomes de *S. pombe* et humain, les séquences intergéniques sont réduites au minimum voir absentes comme dans le cas des gènes *ATP6/8* et *COX3* chez l'homme. De plus, le génome mitochondrial humain ne possède pas d'intron, et l'ADNmt de *S. pombe* ne contient que trois introns codants. Contrairement à *S. cerevisiae* où les ARNt sont plutôt regroupés en cluster, chez *S. pombe* et chez l'homme, ils sont répartis dans tout le génome et ponctuent les différents gènes mitochondriaux. De plus, deux unités de transcription sont répertoriées chez l'homme, comme chez *S. pombe*, alors qu'il en existe onze chez *S. cerevisiae*.

2.2. La contribution nucléaire

Sur la totalité du protéome mitochondrial, seules quelques protéines sont codées par l'ADNmt : 13 chez l'homme, 9 chez *S. cerevisiae* et 7 chez *S. pombe*. La majorité des protéines mitochondriales est donc codée par le génome nucléaire et puis adressée à la mitochondrie. Les mécanismes d'import mitochondrial ont été identifiés chez *S. cerevisiae* et semblent majoritairement conservés chez les mammifères (Mokranjac & Neupert, 2008; Mokranjac & Neupert, 2009). Suivant les localisations sous-mitochondriales de la protéine, il existe plusieurs voies d'import possibles (*figure n°4*).

Les protéines matricielles sont synthétisées, dans le cytoplasme, sous la forme de précurseurs comportant, le plus souvent en N-terminal, une séquence d'adressage à la mitochondrie. Deux complexes de translocation agissent ensuite de concert : les complexes TOM (Translocase of the Outer Membrane) et TIM (Translocase of the Inner Membrane). Tom70p, Tom22p et Tom20p reconnaissent le précurseur protéique; Tom40p, Tom5p, Tom6p et Tom7p forment des pores à travers la membrane externe permettant le passage du précurseur. Ce dernier est ensuite pris en charge par Tim50p, Tim23p, Tim21p et Tim17p puis transloqué, de manière dépendante de l'ATP et du potentiel de membrane, par Tim44p, Tim16 (PAM16), Tim14 (PAM18), Mge1p et Hsp70p mitochondriale.

Les protéines de la membrane interne comportant sept domaines trans-membranaires sont synthétisées avec une pré-séquence et sont importées à la matrice par les complexes TOM et TIM. Elles sont, dans un second temps, après clivage de la pré-séquence, relocalisées

à la membrane interne par la protéine Oxa1p. Les protéines ne contenant qu'un seul domaine trans-membranaire sont importées à travers le complexe TOM puis, lors de leur passage au niveau du complexe TIM, sont transférées latéralement et intégrées à la membrane interne où la séquence d'adressage est clivée. Les protéines « carrier », très hydrophobes, sont importées par le complexe TOM, puis sont interceptées par Tim9p, Tim10p et Tim12p dans l'espace inter-membranaire et transférées au complexe TIM22 qui insère ces protéines au sein de la membrane interne grâce au potentiel de membrane.

Les protéines de la membrane externe possédant un domaine trans-membranaire sont insérées directement à la membrane grâce au complexe TOM. Les protéines comportant une structure en tonneau β utilisent le complexe TOM pour passer la membrane externe et sont transférées dans un second temps au complexe TOB (Translocase of Outer membrane β -Barrel proteins) ou SAM (Sorting and Assembly Machinery) qui permettent leur insertion à la membrane.

Plusieurs protéines de l'espace inter-membranaire sont adressées à la membrane interne et sont ensuite libérées dans l'espace inter-membranaire par protéolyse. D'autres sont libérées après leur passage à travers le complexe TOM et sont prises en charge par les protéines Mia40p et Erv1p qui assurent leur repliement.

3. Les principales fonctions des mitochondries

La mitochondrie occupe une place primordiale dans le métabolisme énergétique cellulaire : elle est le siège des oxydations phosphorylantes, participe à la ré-oxydation des intermédiaires réduits lors du catabolisme et assure la dégradation des lipides (Scheffler, 1999). Elle intervient également dans de nombreux autres processus biologiques, comme l'apoptose, l'homéostasie calcique, le métabolisme des acides aminés, la synthèse lipidique et la production d'espèces actives de l'oxygène.

3.1. La phosphorylation oxydative

C'est P. Mitchell qui, dans sa théorie chimio-osmotique, proposa le modèle des oxydations phosphorylantes. Les principaux acteurs de ce mécanisme sont la chaîne

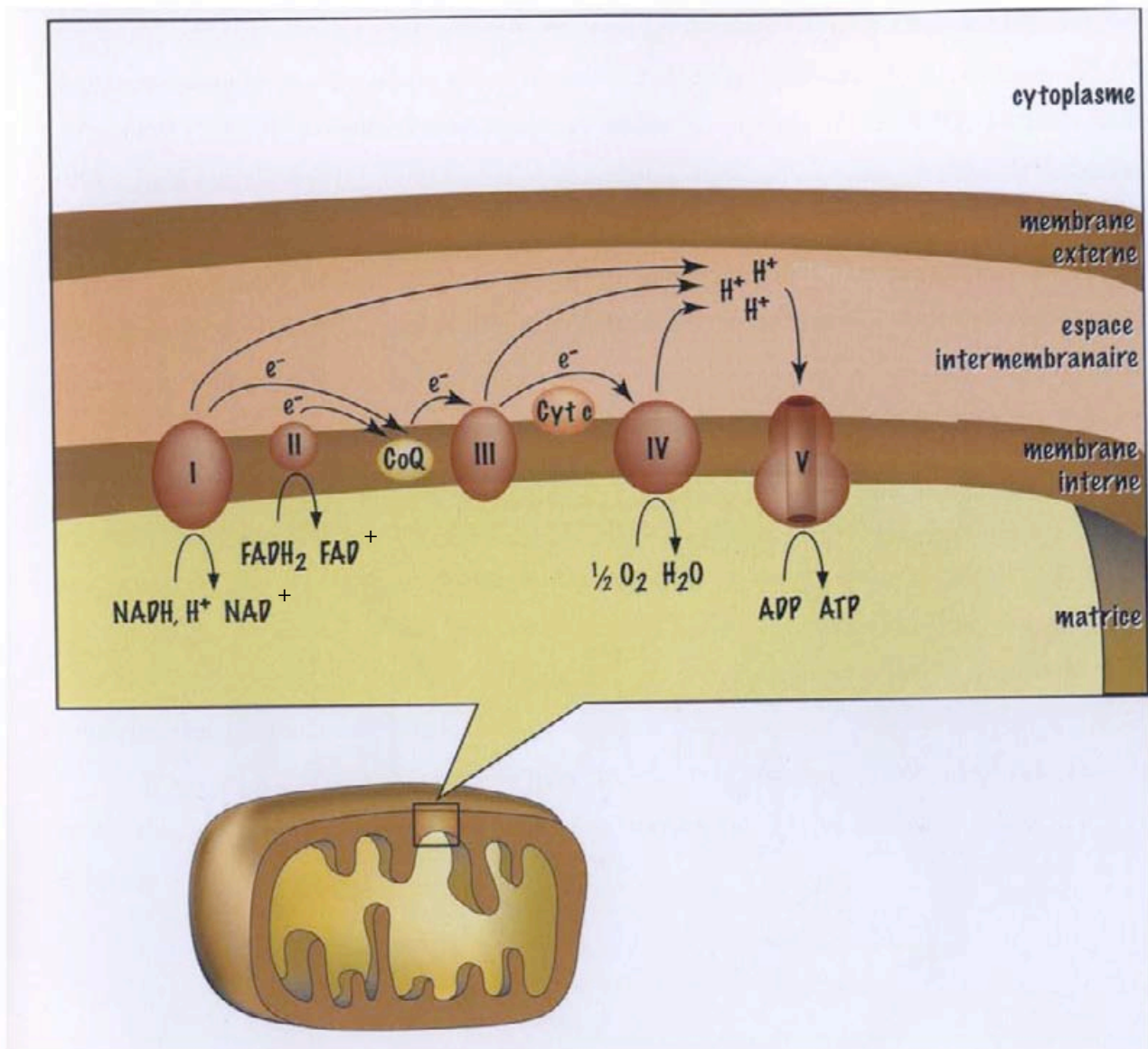


Figure n°5 : Les différents complexes assurant la phosphorylation oxydative.

Les substrats NADH et FADH₂ fournissent des électrons au complexe I (NADH coenzyme Q réductase ou NADH déshydrogénase) et au complexe II (succinate coenzyme Q réductase ou succinate déshydrogénase) respectivement. Les électrons transitent via le coenzyme Q (ou ubiquinone) au complexe III (coenzyme Q cytochrome réductase) puis jusqu'au cytochrome c et au complexe IV (cytochrome oxydase). La cytochrome oxydase réduit complètement l'oxygène en eau. Le gradient de proton créé par les complexes I, III et IV est dissipé au niveau du complexe V (ATP synthase) pour la formation d'ATP.

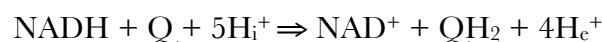
respiratoire et l'ATP synthase, toutes deux localisées dans la membrane interne mitochondriale (*figure n°5*) (Scheffler, 1999).

Le fonctionnement et la composition des chaînes respiratoires sont remarquablement conservées chez les eucaryotes, à quelques exceptions près. Cette chaîne de transport d'électrons est constituée de quatre complexes I, II, III et IV auxquels s'ajoutent des transporteurs mobiles : le coenzyme Q (ubiquinone) et le cytochrome c (*figure n°5*). Une grande partie de l'énergie produite dans les voies cataboliques se retrouve contenue dans le NADH et le FADH₂. Ces coenzymes réduits cèdent leurs électrons à la chaîne respiratoire qui, par une cascade de réactions d'oxydo-réduction, amène ces électrons jusqu'à l'accepteur final, l'oxygène moléculaire. Au cours de ce transfert électronique, rendu possible du fait du potentiel redox croissant, certains complexes pompent les protons H⁺ de la matrice mitochondriale vers l'espace inter-membranaire. Il y a alors formation d'un gradient de protons, gradient électro-chimique générant la différence de potentiel de la membrane interne. Le retour des protons vers la matrice va se faire grâce au complexe V, l'ATP synthase en produisant de l'ATP (*figure n°5*). La respiration et la phosphorylation sont donc couplées via ce gradient de protons.

3.1.1. La chaîne respiratoire

Le complexe I

Le NADH généré par le cycle de Krebs transfère des électrons au complexe I ou NADH déshydrogénase, qui les transmet aux quinones.



NAD = Nicotinamide Adénine Dinucléotide NADH : réduit NAD⁺ : oxydé

Q = ubiquinone oxydée QH₂ = ubiquinone réduite

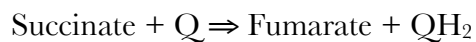
Cette réaction s'accompagne d'un transfert de 4 protons de l'intérieur de la matrice (H_i⁺) vers l'extérieur (H_e⁺). Chez l'homme, le complexe I est composé d'une quarantaine de sous-unités dont une flavine mononucléotide, 7 à 8 centres Fer/Souffre et trois molécules de quinol liées. La flavoprotéine contient une molécule FMN qui reçoit les électrons et les protons venant du NADH, H⁺. Chez les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe*, le complexe I est remplacé par respectivement trois et probablement deux NADH déshydrogénases localisées sur les faces externes et internes de la membrane interne, ce qui explique l'absence de

sensibilité à la roténone un inhibiteur spécifique du complexe I. Contrairement à la situation observée chez les mammifères, leurs activités ne sont pas liées à une extrusion de protons dans l'espace inter-membranaire.

Le complexe II

Le complexe II ou succinate déshydrogénase est composé de 4 protéines. Les deux plus grandes forment la portion périphérique du complexe et assurent la fonction de la succinate déshydrogénase dans le cycle de Krebs. Elles sont associées à la membrane par l'intermédiaire de deux autres protéines qui y sont insérées et qui lient le cytochrome b et l'ubiquinone. Des co-facteurs et des centres Fer/Souffre s'ajoutent à cette base. Une flavine est liée à la plus grande protéine formant la flavoprotéine, elle-même intimement associée à une protéine contenant trois centres Fer-Souffre. Chacun de ces centres a un potentiel redox spécifique qui permet à l'ensemble de transporter des électrons à travers la sous-unité, sans transfert de protons vers l'espace inter-membranaire.

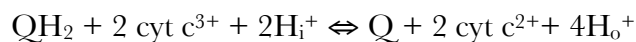
La réaction catalysée par ce complexe est :



Les électrons issus de l'oxydation du succinate en fumarate sont amenés à travers ce complexe à l'ubiquinone. Le complexe II lie donc directement la chaîne respiratoire au cycle de Krebs. Le plus connu des inhibiteurs de l'activité de ce complexe est le malonate qui lie de manière compétitive et spécifique le site actif de la flavoprotéine.

Le complexe III

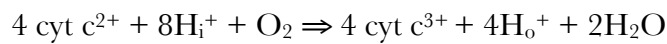
Le complexe III ou cytochrome c oxydoréductase catalyse la réaction suivante :



Comme dans le cas du complexe I, l'oxydation du substrat (QH_2) et le transfert d'électrons vers le transporteur (cyt c) sont couplés au transfert de protons à travers la membrane. Le complexe III est composé de 11 et 10 sous-unités protéiques insérées ou liées à la membrane interne mitochondriale chez les mammifères et chez la levure *S. cerevisiae* dont les plus importantes sont les cytochromes b et c_1 et une protéine Fer/Souffre de type Rieske. Elles participent au transfert d'électrons et à la translocation des protons. Différents inhibiteurs sont utilisés pour étudier le complexe III notamment l'antimycine A qui interfère lors du transfert d'électrons de l'hème du cytochrome b vers l'ubiquinone.

Le complexe IV

Le complexe IV ou « cytochrome oxydase » est constitué de 13 sous unités chez les mammifères et de 9 chez la levure. Des centres contenant des ions métalliques (Fe, Cu, Mg et Zn) s'ajoutent à cette base protéique. Dans tous les organismes, les trois plus grandes sous unités I, II et III formant le cœur de l'enzyme sont codées par le génome mitochondrial, alors que les autres sont d'origine nucléaire. Le complexe catalyse la réaction suivante :

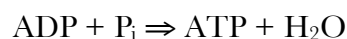


Le cytochrome c est une hème-protéine soluble qui va se déplacer sur la membrane interne (côté IMS) pour transporter les électrons au complexe IV. Les centres Fer/Cuivre sont utilisés pour réduire la molécule d'oxygène, l'accepteur terminal d'électrons, en 2 molécules d'eau. Aux protons nécessaires à la réaction s'ajoutent 4 protons eux aussi pompés dans la matrice par le complexe et libérés dans l'IMS. Le cyanure et le monoxyde d'azote sont les deux inhibiteurs du complexe IV.

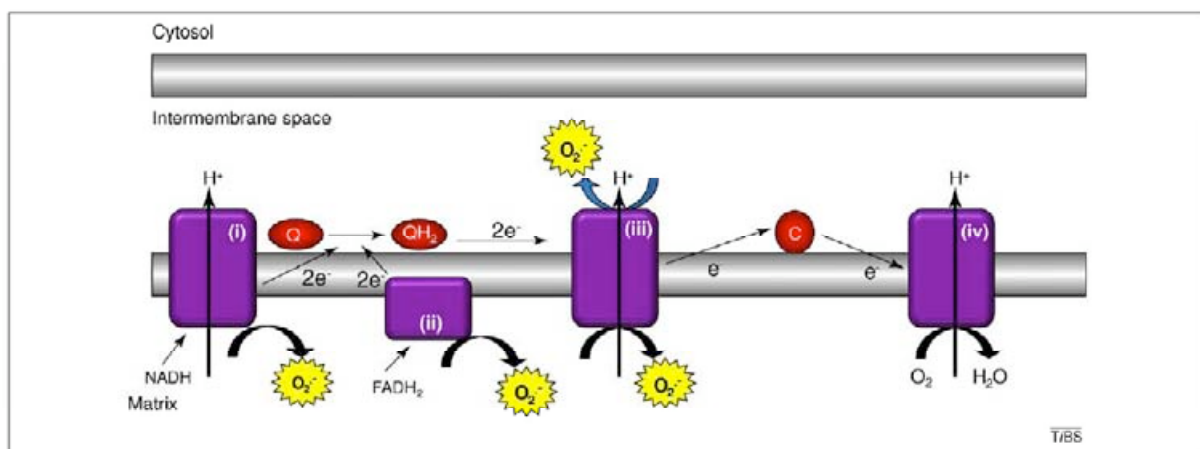
3.1.2. L'ATP synthase (complexe V)

Le complexe V, ou ATP synthase, localisé dans la membrane interne mitochondriale est responsable de la phosphorylation de l'ADP en ATP. L'ATP synthase est une enzyme fonctionnellement réversible puisqu'elle est capable de synthétiser l'ATP en utilisant la force proto-motrice et d'hydrolyser l'ATP pour pomper les protons contre le gradient électrochimique. L'ATP synthase mitochondriale bovine est une protéine complexe constituée de 16 sous-unités différentes atteignant une masse totale supérieure à 500 kDa. Elle est composée de 2 domaines : le domaine membranaire F_0 , qui est un canal à protons et le domaine catalytique F_1 attaché à la membrane interne grâce à F_0 . Le domaine F_1 , hydrophile comprend 5 polypeptides (sous-unités α , β , δ , γ , ϵ). Le domaine F_0 est composé de 3 sous-unités a, b et c. Les sous-unités a, b, δ , α et β constituent le stator, les sous-unités c, γ et ϵ constituent le rotor dont la rotation transfère l'énergie du flux de protons à la synthèse de l'ATP.

Le complexe V catalyse la réaction de synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique :



Cette réaction simple nécessite un apport d'énergie. Ce n'est pas la formation de l'ATP qui consomme le plus d'énergie mais la liaison du substrat et la libération de l'ATP par



Hamanaka 2010 Trends Biochemical Sciences

Figure n°6 : Production de ROS par la chaîne respiratoire.

Les complexes I et II réduisent le coenzyme Q en utilisant les électrons donnés par le NADH et le FADH₂. Le coenzyme Q transfère ces électrons au complexe III qui les transfère au cytochrome c. Le complexe IV utilise les électrons venant du cytochrome c pour réduire l'oxygène en eau. Les complexes I, II et III produisent l'anion superoxyde à travers une réduction incomplète d'oxygène. Les complexes I et II produisent l'anion superoxyde dans la matrice et le complexe III dans la matrice et l'espace inter-membranaire.

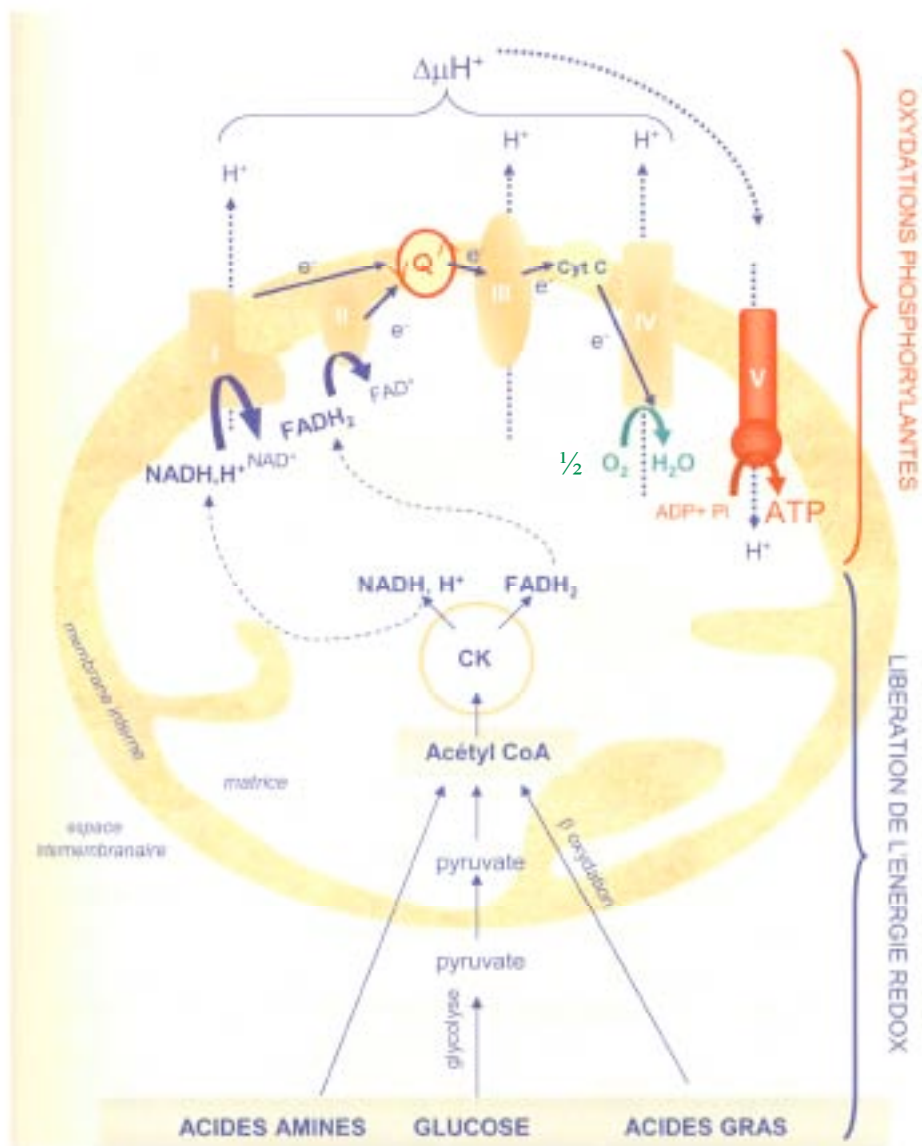
l'enzyme. La structure cristallographique de la F₁ ATP synthase bovine a révélé l'asymétrie de l'enzyme et suggéré son action rotative durant la catalyse aujourd'hui démontrée. La force proto-motrice dégagée lors du transport des protons par F₀ permet la rotation de la tête catalytique F₁ qui synthétise l'ATP.

3.2. La production mitochondriale des espèces réactives de l'oxygène

3.2.1. Les sites de production de ROS mitochondriaux

Une proportion significative de l'oxygène (2 à 6 %) échappe à la réduction complète en molécule d'eau et subit une réduction monoélectronique au niveau des complexes I, II et III de la chaîne respiratoire pour donner naissance à l'anion superoxyde (O₂^{•-}) (Hamanaka & Chandel; Kowaltowski et al, 2009; Murphy, 2009). 70 à 80 % de l'anion superoxyde cellulaire est produit au niveau de la chaîne respiratoire mitochondriale faisant de cette dernière le site majeur de production O₂^{•-} dans la cellule (*figure n°6*). Le radical superoxyde (O₂^{•-}) peut être transformé en peroxyde d'hydrogène (H₂O₂) puis en radical hydroxyle (OH[•]). Ces produits, dérivés de l'oxygène, sont appelés « espèces réactives de l'oxygène ou ROS (Reactive Oxygen Species) ». Les ROS sont généralement instables et peuvent réagir rapidement avec d'autres molécules chimiques environnantes du fait de leur électron célibataire. Ils peuvent soit « arracher » (oxydant) soit céder un électron (réducteur).

En ce qui concerne la fuite d'électrons de la chaîne respiratoire au niveau du complexe I, deux théories se confrontent. La première énonce qu'un centre Fer/Souffre serait la source de l'addition directe d'un électron à l'oxygène ou indirecte via la réduction de quinones exogènes hydrophiles. Ces quinones alors sous la forme semiquinone sont très instables et peuvent réduire l'oxygène en O₂^{•-}. L'autre théorie propose que ce soit le groupement FMN qui soit responsable de la production O₂^{•-}. Au niveau du complexe III, le coenzyme Q sous sa forme ubisemiquinone QH[•], est responsable de la production d' O₂^{•-}. La contribution relative des différents complexes de la chaîne respiratoire à la production totale d'O₂^{•-} mitochondriale dépend du tissu examiné. Alors qu'il avait été proposé que le complexe III était le site prépondérant de génération d'O₂^{•-}, le rôle majeur du complexe I a clairement été mis en évidence dans le cerveau notamment dans plusieurs situations physiopathologiques comme le vieillissement ou les maladies neurodégénératives. Chez la levure *S. cerevisiae* la production des



Carriere-Pazat 2005 thèse

Figure n°7 : Schéma simplifié du fonctionnement mitochondrial.

L'énergie redox contenue dans les nutriments (glucose, acides aminés et acides gras) est libérée sous la forme d'équivalents réduits NADH, H⁺ et FADH₂ utilisés comme donneurs d'électrons pour la chaîne respiratoire.

ROS a lieu au niveau du complexe III et des NADH déhydrogénases externes (Herrero et al, 2008).

3.2.2. Système de gestion des ROS mitochondriales

Pour prendre en charge les ROS, les cellules sont équipées de divers systèmes antioxydants de nature enzymatique ou non. Les antioxydants sont des « substances qui, présentes à faibles concentrations par rapport à un substrat oxydable, retardent significativement ou inhibent l'oxydation de ce substrat » (Halliwell et al, 1995).

Plusieurs enzymes dégradent directement les ROS. L'une de ces enzymes est la superoxyde dismutase (SOD) qui assure la dismutation d' $O_2^{\cdot-}$ en H_2O_2 et O_2 . H_2O_2 sera par la suite pris en charge par la catalase pour former de l'eau. Chez l'homme, trois isoformes de SOD sont présentes dont la SOD2 qui est localisée dans la matrice mitochondriale. Une seconde enzyme, la glutathion peroxydase (GPx1), décompose H_2O_2 et les hydroperoxydes ROOH en eau et alcool respectivement. GPx1 joue un rôle majeur dans la plupart des tissus et est présente dans le cytosol comme dans la matrice mitochondriale.

Divers piègeurs non enzymatiques peuvent également prendre en charge la détoxification des radicaux libres. Les principaux systèmes de protection peuvent être soit lipophiles (vitamine E, coenzyme Q ou ubiquinone et caroténoïde) soit hydrophiles (vitamine C, glutathion). Sous leur forme réduite, ces molécules sont capables de piéger, de manière plus ou moins efficace, les radicaux libres. La metallothionéine, induite notamment lors d'une production des ROS mitochondriales, est un excellent chélateur de métaux divalents et piègeur d' $O_2^{\cdot-}$ et de $OH\cdot$.

3.2.3. L'homéostasie redox

La concentration de ROS résulte de la balance entre les systèmes producteurs de radicaux libres et les systèmes antioxydants. Le maintien de cette balance à un état d'équilibre constitue l'homéostasie redox. Une production relativement modérée de ROS par les systèmes générateurs associée à des systèmes de gestion efficaces peut conduire à une augmentation physiologique aigue et transitoire de la concentration de ROS. Si les systèmes de gestion de base sont suffisamment présents et si la production est relativement

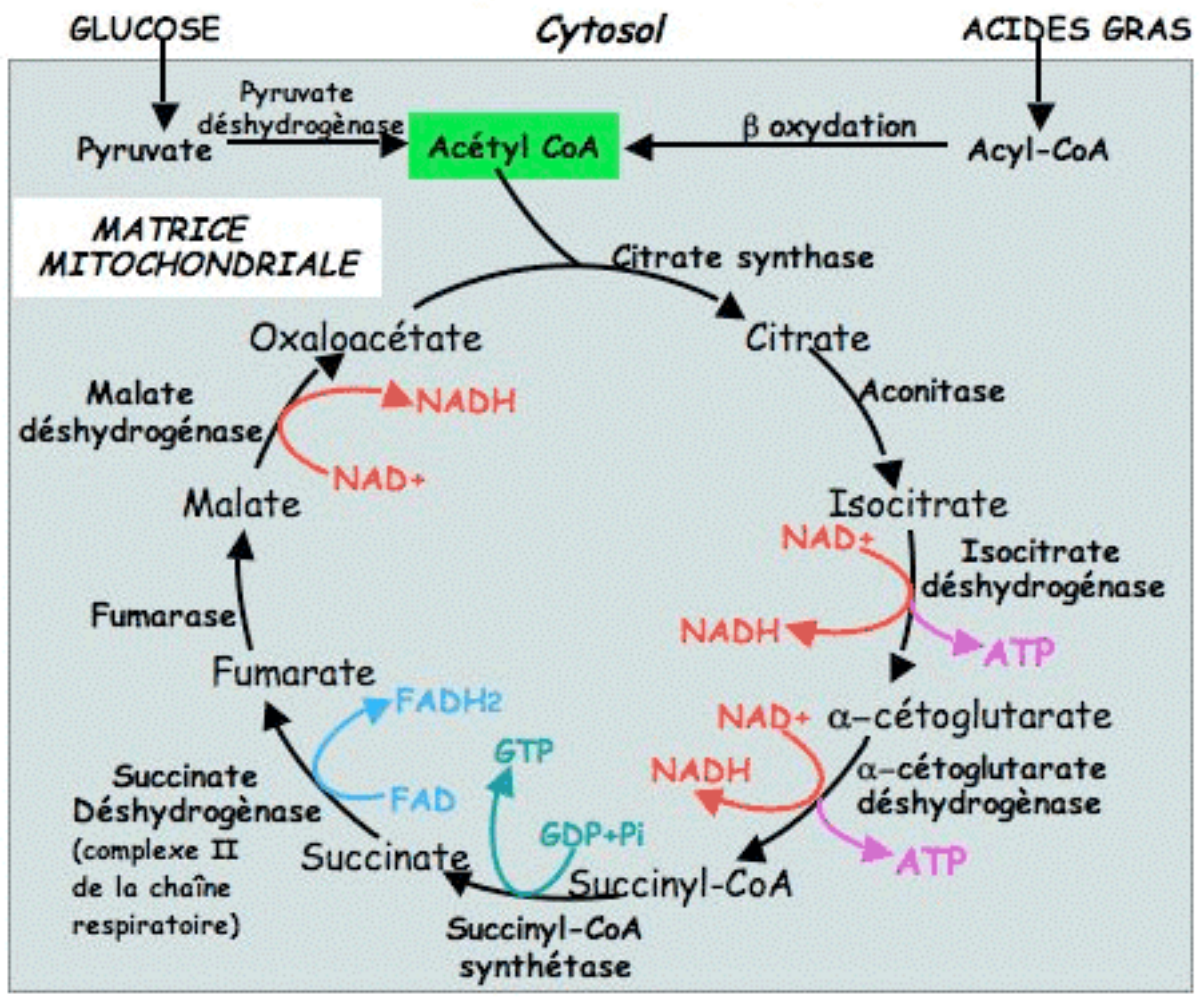


Figure n°8 : Le Cycle de Krebs.

faible, l'exposition aux ROS peut être neutre pour la cellule. Cependant, lorsque la concentration dépasse un certain seuil, les ROS peuvent modifier certaines molécules environnantes de manière réversible et/ou irréversible et agissent en tant que molécules « signal » (Hamanaka & Chandel). Le terme de signalisation redox est utilisé et regroupe les modifications des molécules sous l'action des ROS. C'est ainsi que les ROS peuvent déclencher des systèmes d'adaptations de la cellule afin de maintenir la balance à un équilibre. Lorsque les systèmes de gestion des ROS sont dépassés (excès de production de ROS et/ou diminution des systèmes antioxydants), il y a ce que l'on appelle un stress oxydant. Ce stress oxydant résulte d'une concentration élevée et persistante dans le temps de ROS. Les modifications des molécules environnantes sont non spécifiques et irréversibles. C'est dans cette situation que les ROS à l'origine d'un stress oxydant massif interviennent dans la toxicité et la physiopathologie.

3.3. Les voies métaboliques

Les voies métaboliques associées aux différents nutriments, glycolyse, catabolisme des acides aminés et β oxydation des acides gras, convergent vers un produit carrefour : l'Acétyl CoA (*figure n°7*). Celui-ci est pris en charge par le cycle de Krebs. Le cycle de Krebs libère très peu d'énergie sous forme de liaison phosphate (un seul GTP libéré) mais permet l'oxydation très complète de l'Acétyl CoA. Le cycle de Krebs est décomposable en huit réactions (*figure n°8*) et l'énergie libérée est transférée sous forme d'équivalents réduits, NADH, H⁺ et FADH₂. L'oxydation des acides gras débute par leur transformation en acyl-CoA au niveau de la membrane externe puis ils s'associent à la carnitine en formant l'acyl carnitine pour être transportés jusqu'à la matrice. L'acyl-CoA régénéré va alors être oxydé par des cycles répétés qui fournissent des co-enzymes réduits et de l'acétyl-CoA utilisable dans le cycle de Krebs.

D'autres voies métaboliques, comme la biosynthèse de l'hème ou du co-enzyme Q, indispensables à la chaîne respiratoire, ou encore la biosynthèse du cardiolipide (lipide spécifique de la membrane mitochondriale interne) et le cycle de l'Urée se déroulent en partie dans la mitochondrie (Scheffler, 1999).

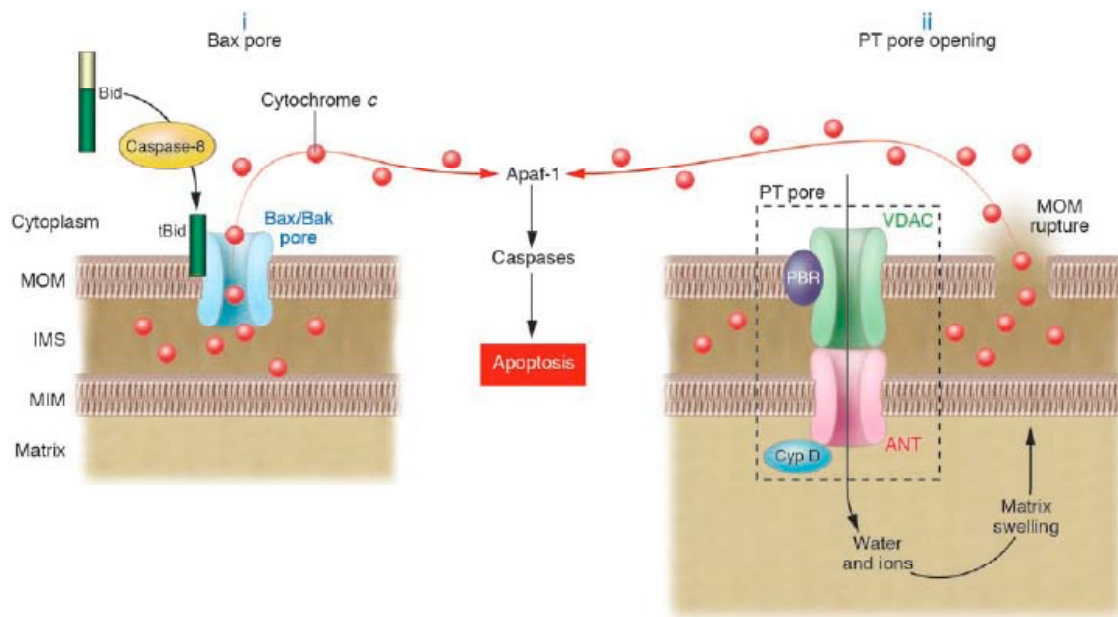


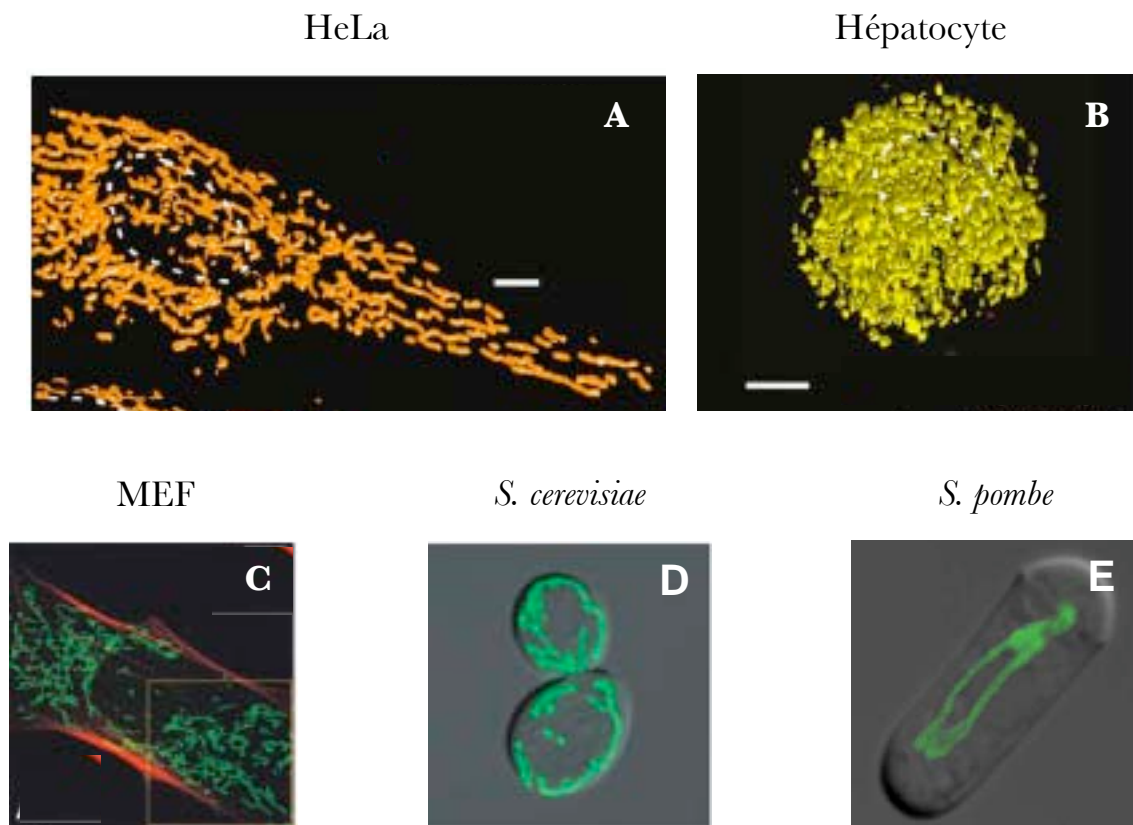
Figure n°9 : Les mécanismes moléculaires de perméabilisation de la membrane externe. Les modèles proposés qui aboutissent au relargage du cytochrome c sont présentés.

(i) Bax et Bak forment un pore dans la membrane externe après activation par des protéines BH3-only comme Bid, pour lequel vont libérer différents apoptogènes. (ii) L'ouverture du pore de transition de perméabilité (pore PT) permet un afflux d'eau et d'ions dans la matrice, provoquant la dilatation ce qui conduit à la rupture de la membrane externe en libérant des protéines de l'espace inter-membranaire telles que cytochrome c. (MIM : membrane interne mitochondriale, MOM : membrane externe mitochondriale, IMS : espace inter-membranaire)

3.4. L'apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire actif génétiquement programmé qui concerne les eucaryotes supérieurs. Ce processus d'élimination cellulaire a de nombreuses finalités dans l'organisme et elle joue un rôle prépondérant dans le développement embryonnaire et la morphogenèse chez les vertébrés (Meier et al, 2000). Plusieurs critères morphologiques permettent de détecter une cellule apoptotique. Elle est généralement arrondie, et présente une réduction du volume cellulaire, une condensation de la chromatine, une fragmentation nucléaire et un bourgeonnement de la membrane plasmique. Les molécules essentielles à l'apparition de ces caractéristiques et donc au démantèlement de la cellule apoptotique sont des cystéines protéases appelées caspases, capables de cliver spécifiquement plusieurs substrats cruciaux pour la vie de la cellule (Riedl & Salvesen, 2007). On distingue deux voies apoptotiques, d'une part une voie extrinsèque, ou voie des récepteurs de mort, et d'autre part une voie intrinsèque ou voie mitochondriale. La voie intrinsèque consiste en la perméabilisation de la membrane externe mitochondriale qui permet la libération, vers le cytosol, de plusieurs facteurs apoptogènes, dont le cytochrome c, situés initialement dans l'espace inter-membranaire, capables d'initier et de réguler l'activation des caspases. Le cytochrome c libéré de la mitochondrie s'associe dans le cytosol en présence de dATP avec une protéine cytoplasmique, Apaf-1 (Apoptosis protease-activating factor-1), pour constituer le cœur d'un complexe multimoléculaire appelé apoptosome, qui va activer des caspases effectrices et conduire à la phase d'exécution de l'apoptose.

Deux modèles ont été proposés pour la perméabilisation de la membrane externe de la mitochondrie au cours de l'apoptose : l'ouverture d'un canal, le pore de transition de perméabilité (PTP) qui permet la dilatation de la matrice et la rupture de la membrane externe et la formation d'un pore au niveau de la membrane externe par des protéines de la famille de Bcl-2 (Antignani & Youle, 2006; Grimm & Brdiczka, 2007) (*figure n°9*).



Collins 2002 Embo J.

Chen 2003 JCB

Okamoto 2005 Ann. Rev. Genet.

Guillou 2005 FEBS Letters

Figure n°10 : Morphologie des mitochondries dans différents types cellulaires révélée par microscopie à fluorescence.

(A) Les mitochondries d'une cellule HeLa sont visualisées, grâce à la protéine DsRed1 adressée à la mitochondrie, par microscopie confocale, déconvolution et reconstruction tri-dimensionnelle. (B) Les mitochondries d'un hépatocyte sont visualisées, grâce à la calcéine par microscopie confocale, déconvolution et reconstruction tri-dimensionnelle. Les mitochondries de (C) fibroblastes embryonnaires de souris (D), de *S.cerevisiae* (E) et de *S. pombe* sont visualisées grâce à une GFP adressée à la mitochondrie par microscopie confocale.

4. Structure des mitochondries

4.1. Morphologie des mitochondries

4.1.1. Morphologie des mitochondries

Dans les années 1990, la mise au point de marqueurs vitaux fluorescents des mitochondries comme la rhodamine 123 et le MitoTracker, ainsi que l'utilisation de la GFP (Green Fluorescent Protein) adressée à la mitochondrie vont contribuer à raviver l'intérêt des biologistes pour la morphologie des mitochondries.

Les mitochondries peuvent apparaître suivant le type cellulaire comme un réseau formé de filaments plus ou moins continus ou interconnectés (cellules HeLa, cardiomyocytes, *S. cerevisiae* et *S. pombe*) ou de petites sous unités sphériques indépendantes (fibroblastes embryonnaires murins et hépatocytes) (*figure n°10*) ou un réseau mixte (ostéosarcome) (Kuznetsov et al, 2009; Margineantu et al, 2002). Quelques exemples typiques de morphologie mitochondriale sont présentés en figure 10, démontrant une grande diversité de formes des mitochondries dans les différents types cellulaires.

La morphologie des mitochondries est contrôlée par deux composantes. La première dite intrinsèque car propre aux mitochondries correspond à des événements de fission et de fusion des membranes mitochondriales. Il s'agit de la dynamique mitochondriale. Lorsque la fusion prédomine le réseau mitochondrial apparaît filamenteux, alors que lorsque la fission est prépondérante, les mitochondries apparaissent sous forme de points isolés. Mais cet équilibre est dynamique : les mitochondries fissionnent et fusionnent constamment quelles que soient leurs formes filaments ou points isolés. Les mécanismes moléculaires de la dynamique mitochondriale seront exposés en partie II. La seconde composante qui contrôle la morphologie des mitochondries est dite extrinsèque car elle repose sur des interactions mises en jeu entre les mitochondries et le cytosquelette cellulaire. Cette composante va contrôler la mobilité et la distribution de l'organelle (voir 4.2.)

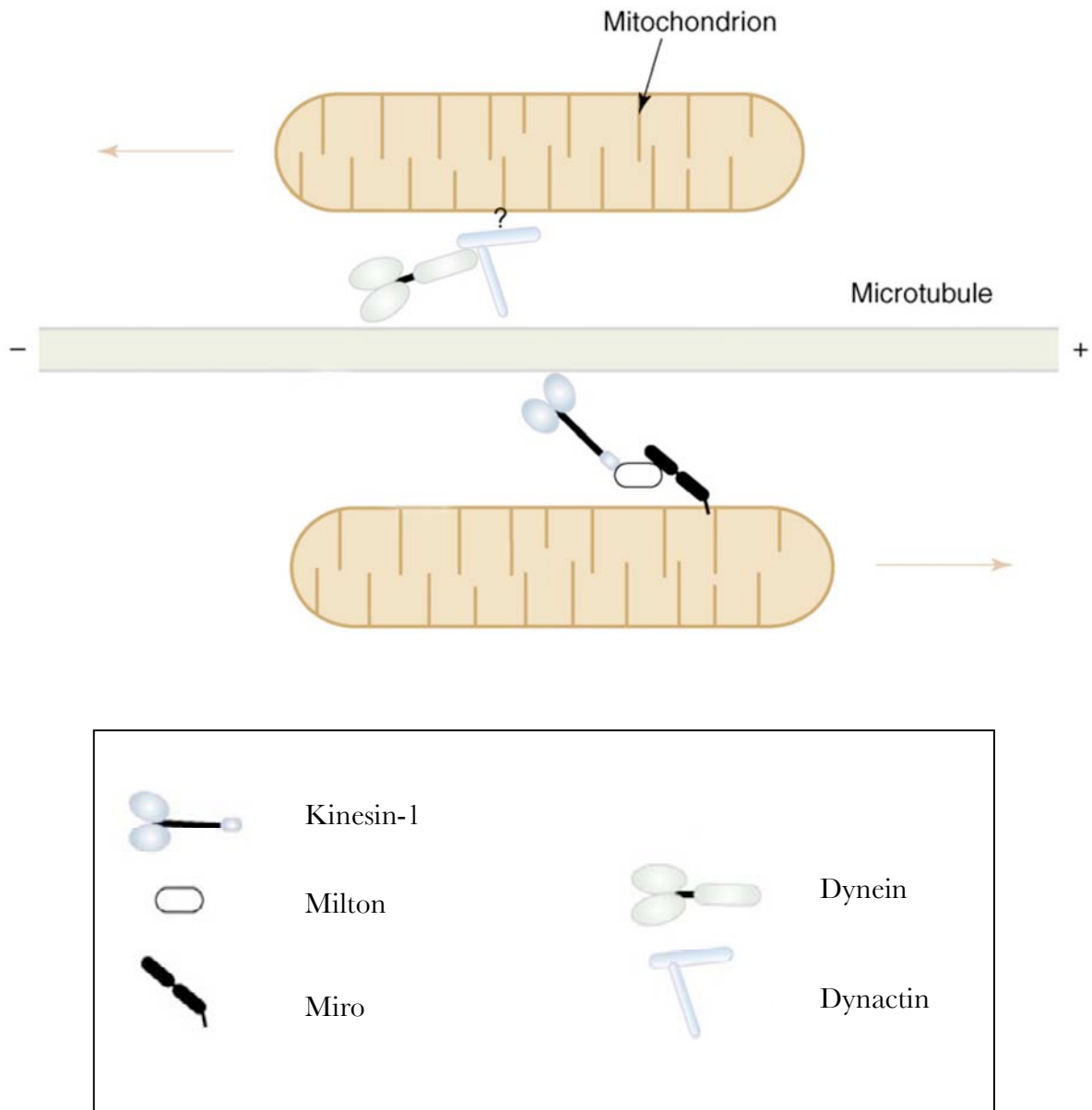
La morphologie des mitochondries variable, suivant les types cellulaires, est également modifiée pour un type cellulaire donné dans différentes situations comme l'état de prolifération, de différenciation ou dans différentes conditions comme la nature du milieu

nutritif. Ainsi une fragmentation des mitochondries qui permettrait une répartition équitable de l'organelle au cours de la mitose a été décrite (Taguchi et al, 2007). Au cours de la différenciation des spermatozoïdes chez la drosophile, les mitochondries fusionnent pour former deux structures géantes qui s'entourent l'une autour de l'autre pour former le « Nebenkern » (Hales & Fuller, 1997). Chez les levures, le réseau mitochondrial qui apparaît sous forme de filaments en phase exponentielle de croissance se fragmente en petites mitochondries rondes en phase stationnaire. De plus, une augmentation de l'état de filamentation est observée quand les levures sont cultivées en milieu respiratoire par rapport à un milieu fermentescible (Jakobs et al, 2003).

Des expériences de FRAP (Fluorescence Recovery After Photobleaching) menées sur des cellules HeLa exprimant une GFP adressée à la mitochondrie ont conduit à proposer que dans les cellules HeLa, les mitochondries formaient un large réseau continu constitué de filaments interconnectés (Rizzuto et al, 1998). Cependant des expériences menées sur le même type cellulaire, et sur d'autres cellules, en utilisant une DsRed adressée à la mitochondrie et du TMRE (tetramethylrhodamine ethyl ester perchlorate), une sonde fluorescence qui s'accumule dans les mitochondries en fonction du potentiel de membrane, ont révélé l'existence de mitochondries morphologiquement et fonctionnellement indépendantes dans une même cellule (Collins et al, 2002).

4.2. Mobilité et la distribution des mitochondries

Le cytosquelette joue un rôle majeur dans le contrôle de la distribution et de la mobilité des mitochondries. Les mitochondries utilisent les protéines du cytosquelette comme des traces pour leur mouvement directionnel (Boldogh & Pon, 2007; Frederick & Shaw, 2007). Ces dernières peuvent être associées, suivant les organismes et les types cellulaires, avec les trois principales structures cytosquelettique : les microfilaments d'actine, les microtubules et les filaments intermédiaires. Ainsi grâce à cette association avec le cytosquelette les mitochondries vont pouvoir être mobilisées, puis distribuées au niveau de zones cellulaires particulières où la demande en énergie est très forte, ou transmises de façon équitable lors de la division cellulaire.



Boldogh, 2007 Trends in Cell Biology,

Figure n°11 : Transport des mitochondries sur le cytosquelette de microtubule.

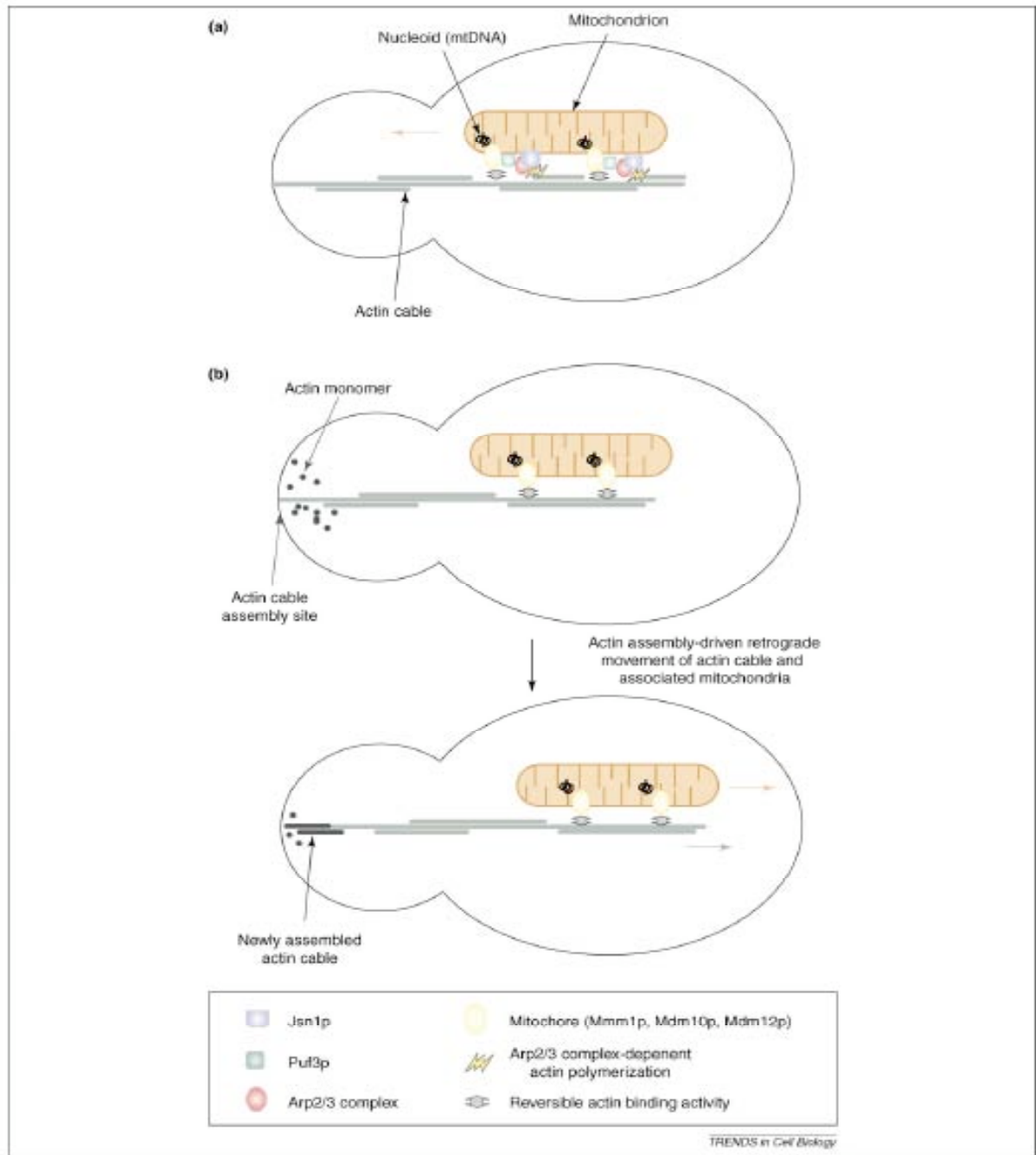
Les moteurs dynéine et kinésine dirigent le mouvement des mitochondries respectivement vers l'extrémité - et l'extrémité + des microtubules. Plusieurs adaptateurs moléculaires impliqués dans la liaison des protéines motrices aux mitochondries tels que Milton, Miro ou la dynactine ont été identifiés.

4.2.1. Mobilité et distribution des mitochondries chez les mammifères

Le transport des mitochondries, chez les mammifères, s'effectue grâce au réseau de microtubules. Le transport des mitochondries dans les axones des neurones, réalisé très rapidement sur de longues distances, a fait l'objet de nombreuses études et a ainsi permis de mieux appréhender ce processus (Boldogh & Pon, 2007; Cai & Sheng, 2009; Hollenbeck & Saxton, 2005). L'enrichissement de mitochondries sur leur lieu d'utilisation, en particulier au niveau des synapses, des cônes de croissance ou des nœuds de Ranvier, fait appel à un mouvement dit antérograde qui a lieu depuis le soma vers les régions distales (extrémité + des microtubules). Le mouvement rétrograde s'effectue au contraire en sens inverse, des zones distales vers le soma (extrémité - des microtubules). Les mitochondries sont associées, par l'intermédiaire de protéines adaptatrices spécifiques, à des moteurs qui, par hydrolyse de l'ATP, fournissent les forces nécessaires aux mouvements le long des microtubules (*figure n°11*). Dans les neurones, les kinésines 1 (KIF5B) et 3 (KIF1B) assurent le transport antérograde des mitochondries, alors que le transport rétrograde est médié par la dynéine. Les protéines adaptatrices MILTON et MIRO lient la kinésine 1 à la mitochondrie lors du transport antérograde. MILTON interagit avec la partie carboxy-terminale de la chaîne lourde de la kinésine 1 et avec MIRO, une GTPase Rho-like intégrale à la membrane externe mitochondriale. Concernant le transport rétrograde, un complexe multi-protéique, appelé Dynactine, lie la Dynéine à la surface des mitochondries.

Plusieurs études menées sur des neurones suggèrent également l'intervention du cytosquelette d'actine dans le transport des mitochondries via l'utilisation des myosines, en particulier dans le cadre de déplacements plus courts et plus lents, dans les zones présynaptiques et les épines dendritiques riches en microfilaments.

Une large proportion de mitochondries (environ 2/3) dans les neurones sont stationnaires. Leur rétention, au niveau de sites où la demande en énergie et en calcium est élevée, est hautement contrôlée. La syntabuline en s'associant aux mitochondries constitue un récepteur impliqué dans la rétention des mitochondries au niveau des axones grâce au cytosquelette de microtubules. D'autres travaux suggèrent l'implication des microfilaments d'actine.



Boldogh, 2007 Trends in Cell Biology,

Figure n°12 : Modèle de mouvement antérograde et rétrograde chez la levure *S. cerevisiae*.

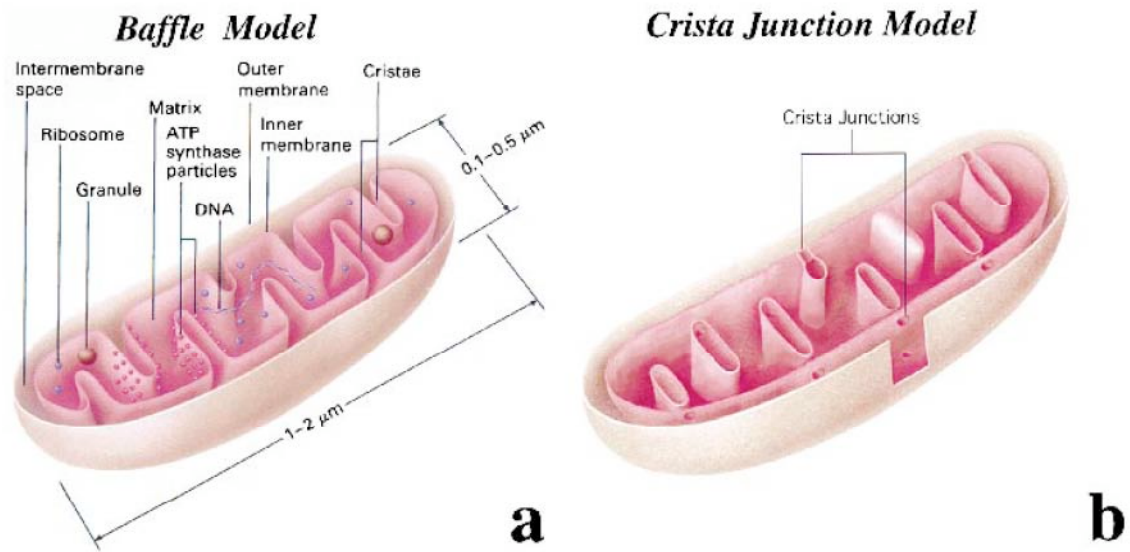
Les mitochondres sont impliqués dans la liaison des mitochondries et de l'ADNmt aux filaments d'actine pour les mouvements rétrogrades et antérogrades. (a) Le mouvement antérograde des mitochondries vers le bourgeon utilise la force générée au cours de la polymérisation de l'actine par le complexe Arp2/3p. Ce complexe est recruté sur la mitochondrie par Jsn1p/Puf1p. Puf3p lie le mitochondre au complexe Arp2/3p, associé à la mitochondrie. (b) Le mouvement rétrograde des mitochondries vers la cellule mère est conduit par le flux rétrograde des filaments d'actine.

4.2.2. Mobilité et distribution des mitochondries chez la levure *S. cerevisiae*

Des études génétiques et biochimiques ont montré que les mitochondries sont liées au cytosquelette d'actine chez la levure bourgeonnante *S. cerevisiae*, ce qui régule leur mobilité et leur distribution. Les mutants thermosensibles létaux du gène d'actine montrent à température non permissive une distribution anormale des mitochondries et un déficit de leur mouvement essentiel pour la transmission des mitochondries au cours de la division cellulaire (Fehrenbacher et al, 2004; Simon et al, 1997). Les mouvements antérogrades, vers le bourgeon en formation, et rétrogrades, vers la cellule mère, sont bloqués par un traitement à la Latrunculin-A (Boldogh et al, 1998).

L'association de la mitochondrie au cytosquelette d'actine est assurée par trois protéines intégrales de la membrane externe mitochondriale, Mmm1p (maintenance of mitochondrial morphology), Mdm10p et Mdm12p (mitochondrial distribution and morphology) (Berger et al, 1997; Burgess et al, 1994; Sogo & Yaffé, 1994). La délétion des gènes codant ces protéines induit l'inhibition de la mobilité des mitochondries, des défauts de morphologie mitochondriale. Le complexe formé par ces trois protéines a été baptisé « mitochore » (Boldogh et al, 1998; Boldogh & Pon, 2006), en référence au rôle joué par le kinétochore lors de la mitose. Ce complexe grâce à ses interactions avec le cytosquelette d'actine permettrait d'assurer non seulement la transmission des mitochondries mais également du mtDNA (Okamoto & Shaw, 2005). En effet, des mutants *MDM10*, *MDM12* et *MMM1* perdent leur génome mitochondrial et *MMM1* est localisée à la mitochondrie au niveau de foci adjacents aux nucléoïdes mitochondriaux (Hobbs et al, 2001). Plus récemment ces protéines ont été également impliquées dans l'import des protéines « β -barrels » à la membrane externe (Meisinger et al, 2007) et dans l'attachement des mitochondries au réticulum endoplasmique (Kornmann et al, 2009).

La protéine motrice myosine n'est pas impliquée dans le mouvement des mitochondries chez la levure *S. cerevisiae* mais leurs mouvements antérogrades utilisent la polymérisation d'actine par le complexe Arp2/3p (*figure n°12*) (Boldogh & Pon, 2007). Les deux protéines périphériques de la membrane mitochondriale Jsn1p/Puf1p et Puf3p sont des partenaires de Arp2/3p respectivement impliquées dans le recrutement du complexe à la mitochondrie et son association au mitochore (Boldogh & Pon, 2007)(*figure n°12*).



Perkins 2000

Figure n°13 : Représentations schématiques des différents modèles de la structure interne des mitochondries.

(a) Modèle de « Baffle » décrit par Palade et al., en 1952-53. (b) Modèle des jonctions des crêtes décrit par Perkins et Frey en 2000.

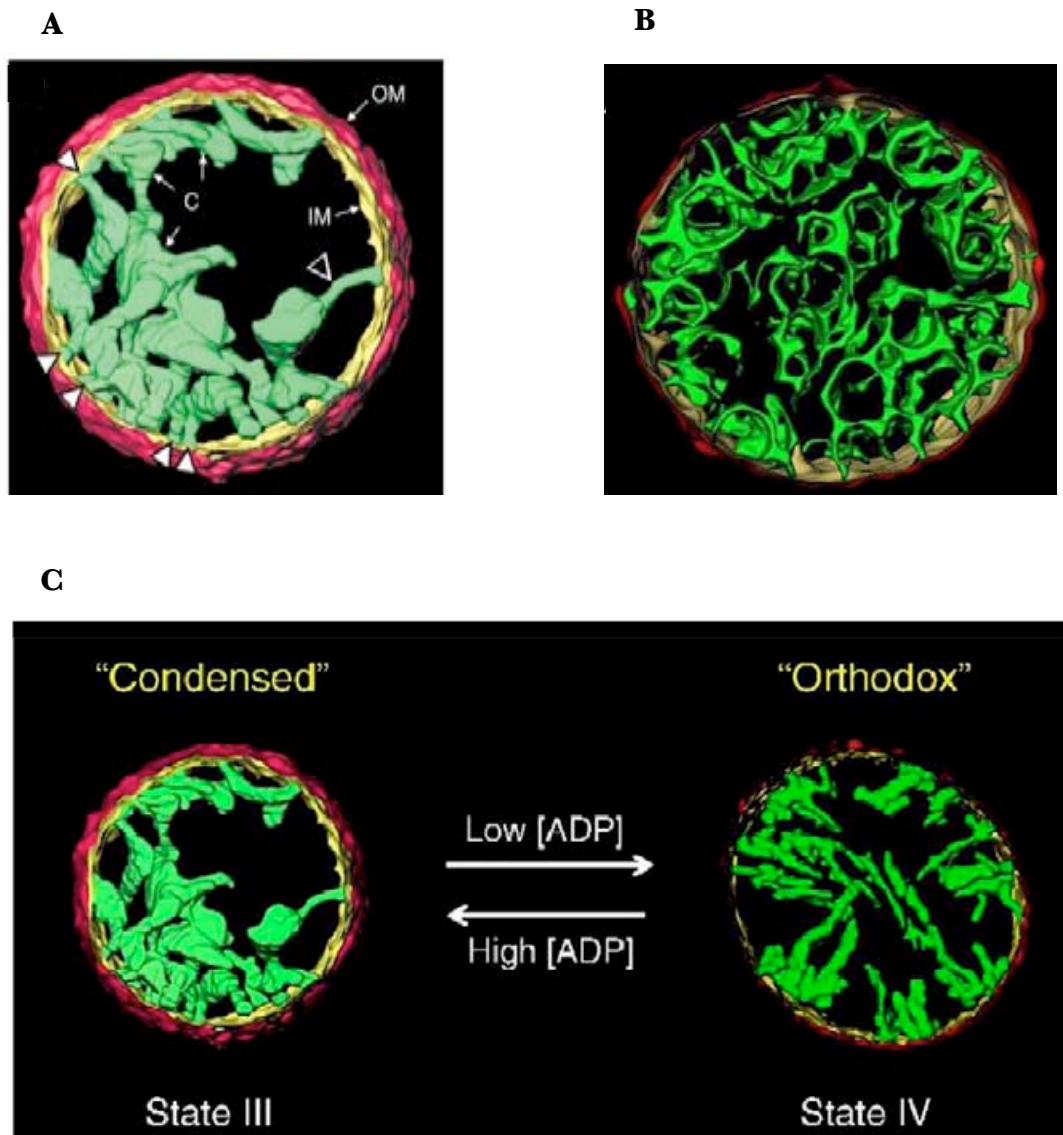
L'ancrage des mitochondries dans les cellules filles, est contrôlé par la protéine Myo2p (une myosine de type V) et par Ypt11p et Mmr1p, deux protéines associées à Myo2p chez la levure *S. cerevisiae* (Boldogh & Pon, 2007).

4.2.3. Distribution des mitochondries chez la levure *S. pombe*

La distribution des mitochondries dans la levure à fission *S. pombe* repose sur le réseau de microtubules. Des mutations dans les gènes codant les tubulines α ou β , ou des drogues qui perturbent le réseau de microtubules comme le nocodazole ou la vinblastine, altèrent la distribution des mitochondries (Yaffe et al, 1996). Cependant la délétion de l'homologue de la kinésine, Klp3p, n'a pas d'effet sur la distribution des mitochondries (Brazer et al, 2000), suggérant que la mobilité des mitochondries n'est pas prise en charge par ces protéines motrices. En accord avec cette hypothèse, une étude récente menée en microscopie électronique de type tomographie n'a pas permis de révéler l'existence de ponts correspondant aux moteurs entre les microtubules et les mitochondries (Hoog et al, 2007). De plus, il a été montré que les mitochondries sont associées à l'extrémité plus des microtubules et une inhibition de la dynamique des microtubules inhibe le mouvement des mitochondries (Yaffe et al, 2003). Néanmoins, des travaux récents suggèrent que la mobilité des mitochondries est indépendante des microtubules (Jourdain et al, 2009). Deux gènes *mmd1* et *mdm4* ont été identifiés dans un crible génétique visant à isoler des gènes impliqués dans le contrôle de la morphologie et de la distribution des mitochondries chez *S. pombe*. Dans ces mutants les mitochondries sont agrégées à l'extrémité des cellules. Mmd1p a été impliquée dans l'association des mitochondries aux microtubules (Weir & Yaffe, 2004). *mdm4*⁺ correspond au gène *peg1*⁺ qui code une protéine capable de s'associer à l'extrémité plus des microtubules et aux mitochondries.

4.3. Ultrastructure des mitochondries

La visualisation tridimensionnelle de la structure interne des mitochondries, grâce à l'avènement de la tomographie électronique, a conduit à proposer un modèle alternatif au « baffle model » proposé par Palade qui décrivait que de larges ouvertures connectaient l'espace intra-crêtes à l'espace inter-membranaire (*figure n°13*). Dans ce modèle dit de « jonction des crêtes », admis dans les années 2000, d'étroites ouvertures tubulaires



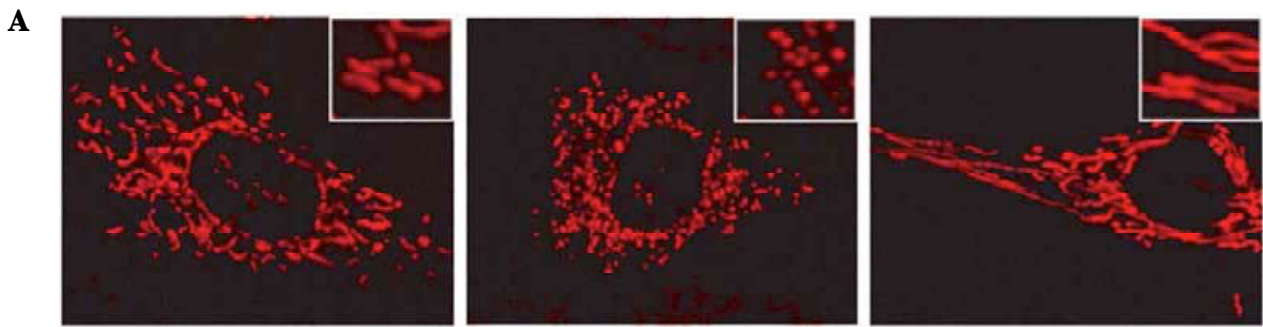
Frey 2000 Trends in Biochemical Sciences
Mannella, 2006 CA. BBA

Figure n°14 : Reconstructions tomographiques de mitochondries.

Reconstruction en trois dimensions d’une mitochondrie de foie de rat non traitée (A) ou traitée (B) par t.Bid. La membrane externe est en rouge, la membrane interne en jaune et les crêtes en vert. C : crête, IM : membrane interne, OM : membrane externe. Les flèches pointent les jonctions des crêtes qui connectent les crêtes à la membrane interne. (C) Changements de topologie de la membrane interne mitochondriale lors de la transition orthodoxe-condensée. Reconstructions tomographiques de mitochondries de foie de souris observées en état III et IV de la respiration. Les membranes externes et internes sous-jacentes sont représentées respectivement en rouge et jaune. Les crêtes mitochondriales sont colorées en vert.

connectent ces deux espaces (Perkins & Frey, 2000). Ces jonctions contrôleraient la diffusion de métabolites, comme l'ADP, ou de protéines comme le cytochrome c (Mannella, 2006; Perkins et al, 1997). La plupart des crêtes possède plusieurs jonctions qui peuvent se trouver du même côté de la membrane interne sous-jacente à la membrane externe, ou sur des côtés opposés si la crête s'étend complètement en travers de la matrice (*figure n°14A*). Des morphologies extrêmes de crêtes mitochondriales, qui peuvent être le reflet d'une spécialisation cellulaire, ont été décrites. Par exemple, les crêtes des cellules de Leydig adoptent une organisation originale avec la juxtaposition d'une zone lamellaire et d'une zone de tubules anastomosés (Prince, 1999), les crêtes des astrocytes de l'hypothalamus de hamster sont triangulaires et prismatiques et les crêtes des cellules corticales de la glande surrénale humaine sont en forme de doigt fin terminé par une vésicule (Zick et al, 2009b). Cette diversité de morphologies démontre une grande plasticité des crêtes.

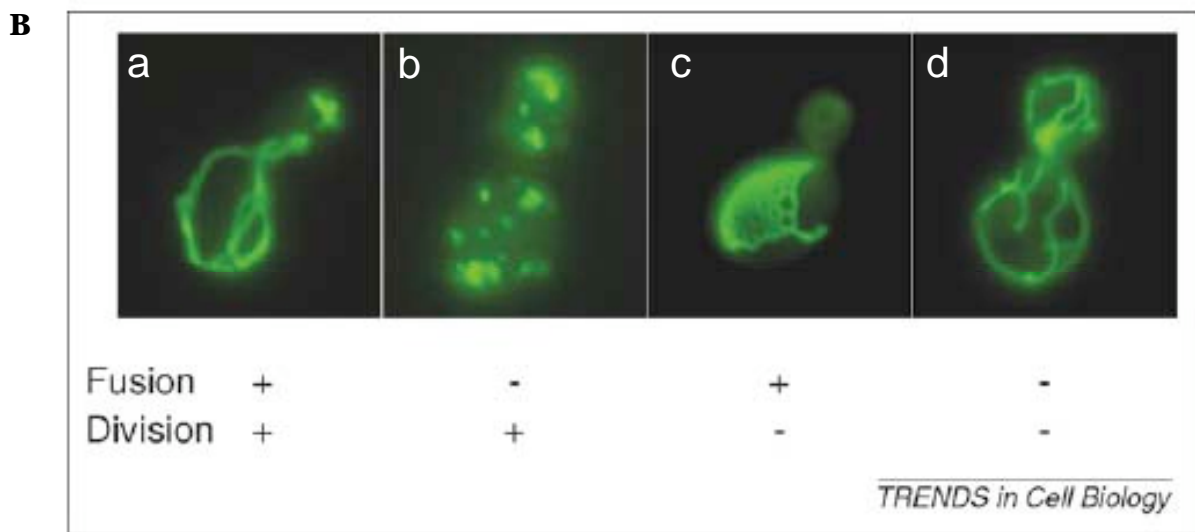
La membrane interne adapte sa forme dans le volume matriciel en réponse à des variations osmotiques, aux besoins énergétiques ou lors d'un processus apoptotique (Mannella, 2006) (*figure n°14B*). Des travaux menés par Hackenbrock dans les années 1960 ont permis à partir de mitochondries isolées de foie de souris, de définir deux états morphologiques (*figure n°14C*) (Hackenbrock, 1966). L'état orthodoxe est caractérisé par des crêtes mitochondriales fines et tubulaires, reliées à la membrane interne par une à deux jonctions de crête, et par une matrice expansée. À l'inverse, les mitochondries condensées ont une matrice de volume beaucoup plus réduit et présentent des crêtes assimilables à des citernes interconnectées présentant de multiples jonctions de crêtes. Le passage d'un état à l'autre serait contrôlé par des événements de fusion et de fission (Mannella et al, 2001). La condensation de la matrice serait accomplie par la fusion des crêtes tubulaires en compartiments plus larges alors que l'expansion de la matrice impliquerait la fission des larges citernes en crêtes tubulaires individualisées. La diffusion de métabolites et de protéines entre les différents compartiments mitochondriaux pourrait être modifiée par les remaniements de cette membrane. Des simulations informatiques indiquent qu'une déplétion en ADP pourrait avoir lieu au sein d'espaces intra-crêtes volumineux observés dans les mitochondries condensées (Mannella et al, 2001). Le passage d'un état condensé à un état orthodoxe permettrait alors de rétablir la concentration en ADP et par conséquent la production d'ATP. En accord avec cette hypothèse, ce changement de morphologie est observé au cours du passage de l'état respiratoire III à l'état IV, état où la concentration en ADP limite le taux de respiration (Hackenbrock, 1966).



Sauvage

Fusion

Fission



Lee 2004 Mol. Cell. Biol

Cervený 2007 Trends in Cell Biology

Figure n°15 : La dynamique des membranes mitochondriales. (

A) Images obtenues par microscopie confocale à fluorescence après incubation avec du Mitotracker d'une cellule HeLa sauvage (réseau mitochondrial filamenteux, panel de gauche), ou déficiente pour la fusion (mitochondries fragmentées, panel du milieu) ou pour la fission des membranes mitochondriales (réseau mitochondrial hyper-filamenteux, panel de droite). (B) Observation du réseau mitochondrial chez *S. cerevisiae* au microscope à fluorescence grâce à l'expression d'une GFP adressée à la mitochondrie. (a) Une levure sauvage présente un réseau mitochondrial tubulaire avec des ramifications occasionnelles. (b) Un mutant de fusion présente des mitochondries fragmentées, conséquence d'un déplacement de l'équilibre vers la fission. (c) Un mutant de fission présente une mitochondrie unique composée de tubules interconnectés, conséquence d'un déplacement de l'équilibre vers la fusion. (d) Dans les cellules où fusion et fission mitochondriales sont inactivées les mitochondries sont similaires à celles observées chez le sauvage.

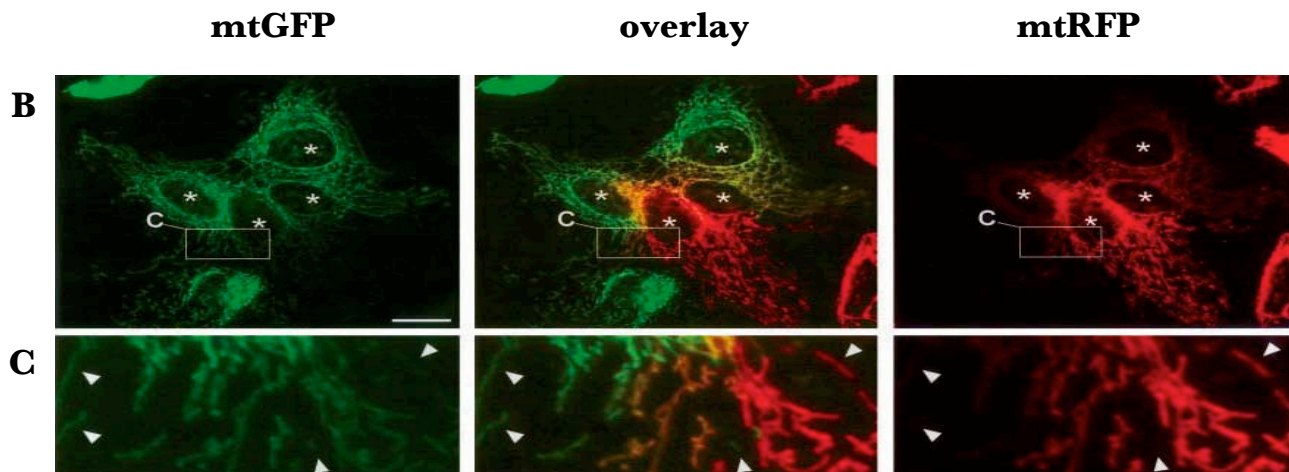
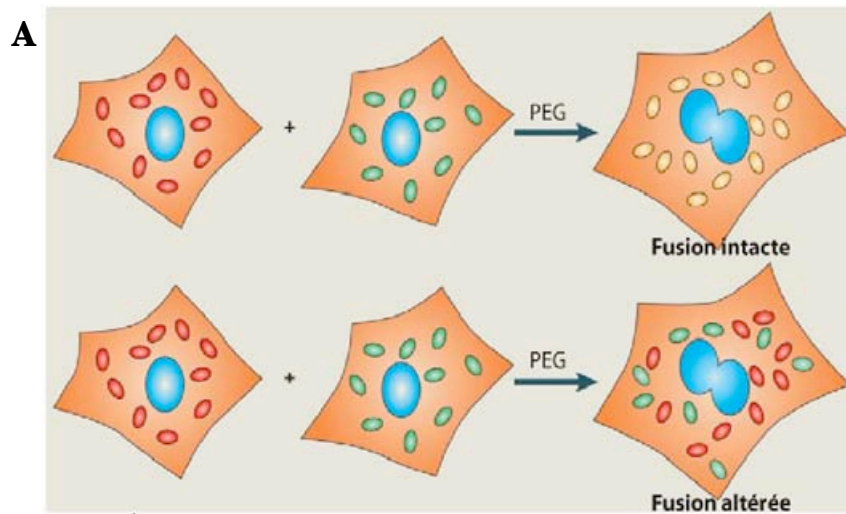
II. La dynamique mitochondriale

La morphologie des mitochondries est contrôlée par la mise en place d'un équilibre entre deux forces antagonistes de fusion et de fission qui s'exercent sur les membranes mitochondriales. Les mitochondries de cellules présentant un taux de fusion plus élevé que le taux de fission apparaissent sous forme d'un réseau de filaments plus ou moins longs et interconnectés. À l'inverse, les cellules présentant un taux de fission supérieur à celui de fusion possèdent des mitochondries de petites tailles ponctiformes (*figure n°10*). Lorsque cet équilibre fusion/fission, nommé dynamique mitochondriale, est perturbé, des changements spectaculaires de morphologie mitochondriale sont observés (*figure n°15*).

Vers la fin des années 1990, des cribles génétiques réalisés chez la levure *S. cerevisiae* ont permis d'identifier les premiers protagonistes de la dynamique mitochondriale. Il s'agit pour la plupart de grandes GTPases de la famille des dynamines conservées chez les eucaryotes au cours de l'évolution.

1. Techniques d'observation de la dynamique mitochondriale

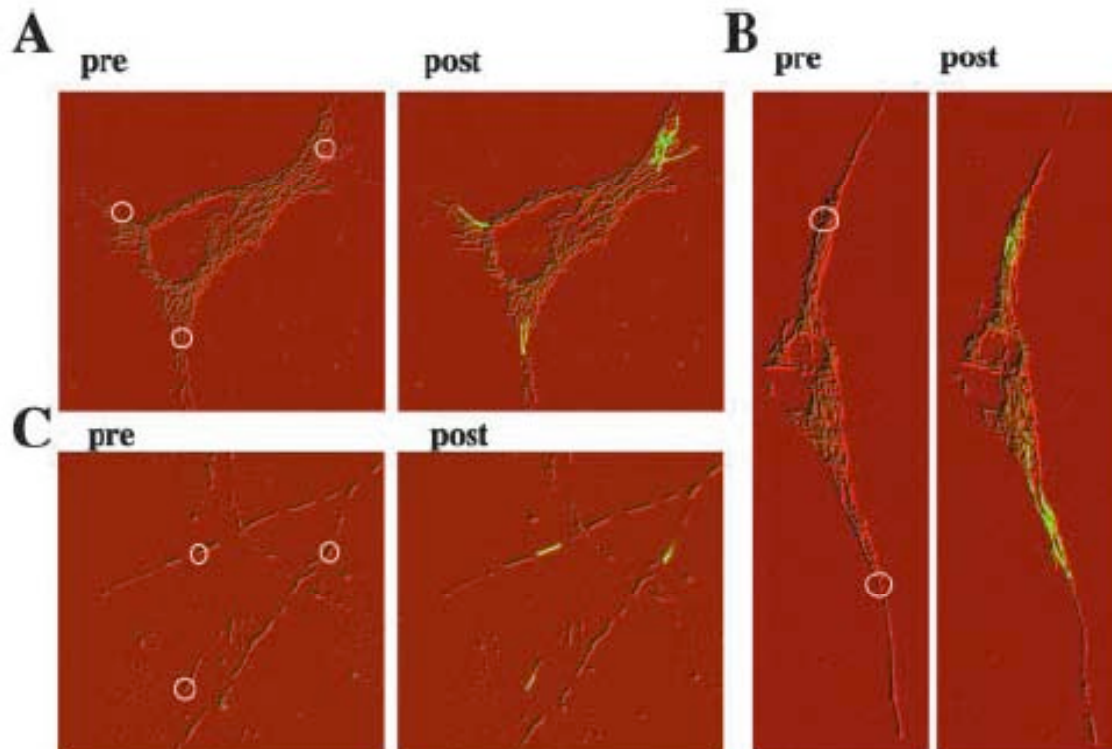
Des changements de morphologie des mitochondries ont été largement interprétés comme une preuve de la modification de l'activité de fusion et/ou fission mitochondriale. Toutefois, des conclusions précises concernant les taux de ces deux processus ne peuvent pas être établies seulement sur cette base. Par exemple, une connectivité accrue des mitochondries peut être causée par une augmentation de la fusion ou une inhibition de la fission. Différents tests de mesure directe de la fusion des mitochondries ont été mis au point. Le premier consiste à étudier la fusion des mitochondries après fusion cellulaire naturelle chez la levure (conjugaison) ou artificielle chez les cellules eucaryotes supérieurs (traitement au PEG, polyéthylène glycol) (Legros et al, 2002; Nunnari et al, 1997). Chez la levure, la conjugaison est un mécanisme naturel pendant lequel les mitochondries fusionnent. L'utilisation de fluorochromes différents pour marquer les mitochondries des deux levures parentales permet d'apprécier l'efficacité de la fusion mitochondriale en microscopie à fluorescence par la



Legros 2002 Molecular Biology of the Cell

Figure n°16 : Test de fusion mitochondriale au PEG.

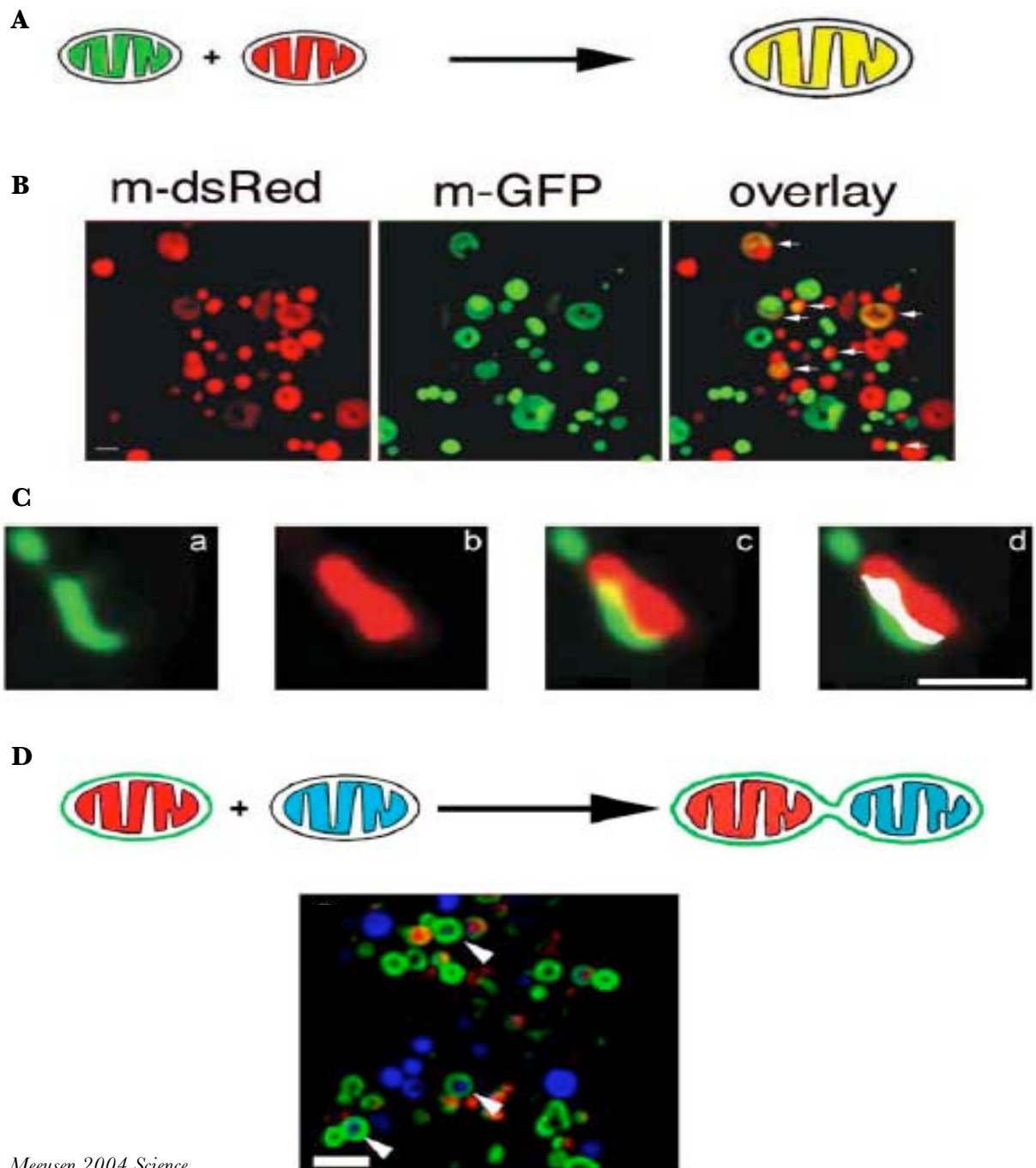
(A) Représentation schématique du test de fusion après fusion cellulaire au polyéthylène glycol (PEG). (B) Des cellules HeLa exprimant soit une GFP adressée à la mitochondrie soit une RFP adressée à la mitochondrie ont été mélangées et fusionnées avec du PEG puis fixées après 2 h et observées au microscope à fluorescence. (C) Élargissement des zones encadrées dans B. Les astérisques indiquent la position des noyaux hétéro-polycaryons et les flèches indiquent la position des mitochondries exprimant un seul marqueur. La présence des mitochondries possédant un double marquage (jaune) montre l'échange des protéines fluorescentes matricielles par la fusion.



Karbowski 2004 The Journal of Cell Biology

Figure n°17 : Test de fusion mitochondriale avec la mito-PAGFP.

Des cellules HeLa (A), des myocytes primaires (B), et des neurones primaires d'hippocampe (C) ont été co-transfectées par un vecteur permettant d'exprimer une DsRed2 adressée à la mitochondrie (rouge) et une GFP photoactivable (PAGFP) adressée à la mitochondrie (vert). Pour photoactiver la PAGFP, les régions marquées par des cercles blancs (pre) ont été irradiées à 413 nm. Les images ont été acquises sous excitation à 488-nm avant (pre) et 30 secondes après la photoactivation (post).



Meeusen 2004 Science

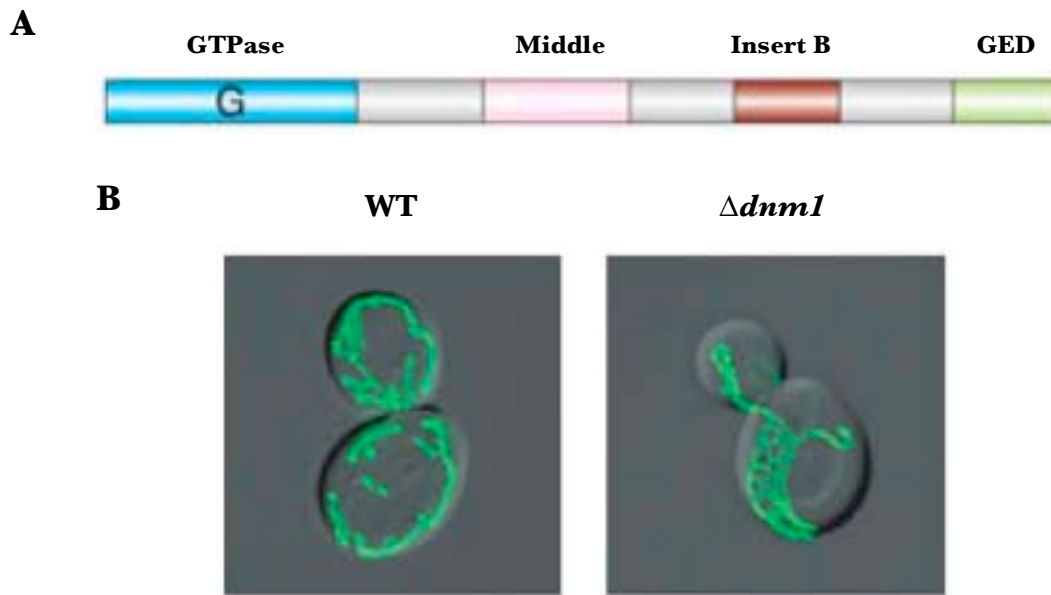
Figure n°18 : Test de fusion de mitochondries de levure *in vitro*.

(A) Schéma du test de fusion mitochondrial *in vitro*. (B) Des mitochondries exprimant soit une GFP mitochondriale (m-GFP) soit une DsRed mitochondriale (m-DsRed) ont été mélangées et incubées en présence d'ATP et de GTP. Les flèches indiquent les mitochondries fusionnées. En (C) des images montrant des structures intermédiaires de fusion mitochondriale sont présentées. L'image correspond à la fluorescence verte (a), rouge (b) et à la superposition (c). La région blanche en (d) montre la juxtaposition des fluorophores rouge et vert. (D) Schéma du test de fusion de la membrane externe mitochondriale *in vitro*. Des mitochondries exprimant une protéine fluorescence verte ciblée à la membrane externe (om-GFP) et une protéine fluorescence rouge ciblée à la matrice (m-DsRed) ou une protéine fluorescence bleu ciblée à la matrice (m-BFP) ont été mélangées (étape 1). Les flèches indiquent les mitochondries qui ont fusionnées leur membrane externe.

présence de mitochondries abritant les deux fluorescences. En revanche, une absence de co-localisation des deux fluorophores indique une altération de ce processus. Le test de fusion cellulaire chez les eucaryotes supérieurs consiste à mélanger et à fusionner, par du PEG, deux lignées cellulaires aux mitochondries préalablement marquées par deux fluorochromes différents par exemple une RFP et une GFP matricielles (*figure n°16*). Une fois la fusion cellulaire effectuée, les mitochondries de chacune des cellules constituant l'hétéropolycaryon sont redistribuées et fusionnent, ou non, entre elles à leur tour.

Le développement de protéines fluorescentes photoactivables ciblées à la matrice mitochondriale (mito-PAGFP) a permis de mettre au point chez les eucaryotes supérieurs des tests quantitatifs de fusion mitochondriale sans fusion cellulaire (*figure n°17*) (Karbowski et al, 2004a). Ce test fait appel à un variant photoactivable de la GFP qui présente une substitution d'un acide aminé permettant, après photoactivation par une illumination laser, une augmentation de plus de 100 fois de la fluorescence. Suite à l'adressage de cette protéine à la mitochondrie, puis à la photoactivation d'une zone restreinte de la cellule, un suivi du taux de dilution de fluorescence est réalisé. Cette dilution est la conséquence de la transmission de la fluorescence à d'autres mitochondries voisines situées dans des zones non photoactivées permise par la fusion mitochondriale. Une dilution de la fluorescence est ainsi attribuée à des événements de fusion des mitochondries, alors que la fluorescence reste stable au cours du temps si les mitochondries ne fusionnent plus.

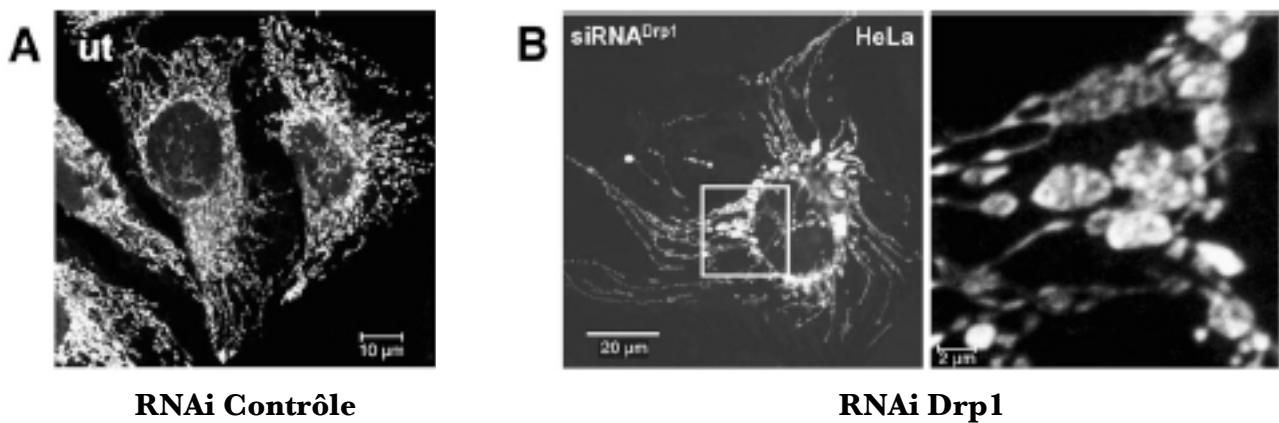
Récemment, des tests de fusion des mitochondries *in vitro* ont été mis au point chez la levure (Meeusen et al, 2006; Meeusen et al, 2004). Ils ont permis de mieux comprendre le mécanisme moléculaire de certains acteurs de la dynamique mitochondriale et de montrer que les fusions des membranes externes et internes sont séparables et mécaniquement distinctes même elles nécessitent toutes deux l'hydrolyse du GTP. Des mitochondries isolées contenant une protéine fluorescente soit verte (m-GFP) soit rouge (m-DsRed) ciblée à la matrice sont mélangées, concentrées par centrifugation (étape 1), et remises en suspension en présence d'ATP, de GTP (étape 2). La fusion des membranes interne et externe est mise en évidence par le mélange du contenu des matrices reflété par la co-localisation de m-GFP et m-DsRed dans des structures individuelles (*figure n°18A et B*). Lorsque les mitochondries sont mélangées et incubées en absence d'énergie, une forme intermédiaire de fusion qui correspond à des structures déformées où se juxtaposent les deux fluorochromes m-DsRed et m-GFP est accumulée (*figure n°18C*). Cet intermédiaire correspond à l'accolement de deux mitochondries au niveau de leur membrane externe. L'addition d'ATP aboutit à la fusion des membranes externe et interne. Ce type de test a également été réalisé en utilisant deux



Okamoto 2005 Annu Rev Genet

Figure n°19 : Dnm1 chez *S. cerevisiae*.

(A) Structure protéique de Dnm1. Le domaine GTPase est affiché en bleu, le domaine Middle en blanc, le domaine nommé Insert B de fonction inconnue en brun et la région GED en vert clair. (B) Effet de la délétion de *DNM1* sur le réseau mitochondrial visualisé grâce à une GFP adressée à la mitochondrie. WT : *S. cerevisiae* sauvage, $\Delta dnm1$: *S. cerevisiae* déléetée pour le gène *DNM1*.



Möpert 2009 Exp Cell Res

Figure n°20 : Effets de la déplétion en Drp1 dans des cellules HeLa.

Réseau mitochondrial, visualisé par immunofluorescence à l'aide anticorps dirigé contre la cytochrome c de cellules transfectées par un siRNA contrôle (A) ou un siRNA dirigés contre *DRP1* (siRNA Drp1) (B). À droite de B la zone entourée par le carré est agrandie pour montrer une structure typique semblable à un ballon.

populations mitochondriales marquées avec des protéines fluorescences verte ou rouge ciblées à la membrane externe (om-GFP) ou à la matrice (m-DsRed), et une protéine fluorescente bleue (m-BFP) ciblée à la matrice (*figure n°18D*).

2. La fission des mitochondries

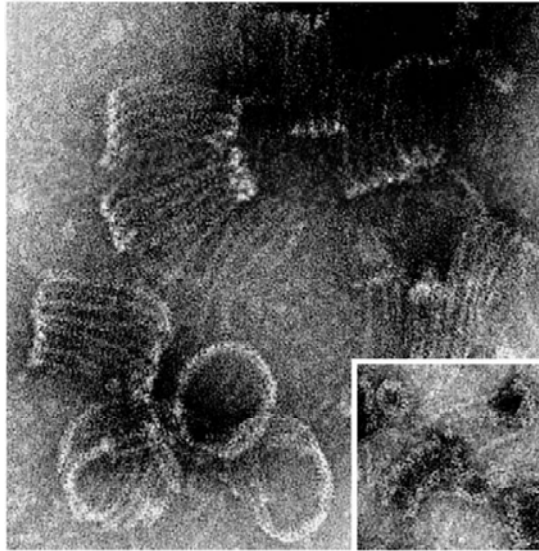
2.1. Les acteurs de la fission mitochondriale

Le premier acteur de la fission des mitochondries à avoir été découvert a été identifié d'abord chez la levure (Dnm1p), puis chez les eucaryotes supérieurs (DRP1). Une seconde protéine conservée de la levure à l'homme impliquée dans la fission, Fis1p, a ensuite été identifiée. Mdv1p et Caf4p découverts ultérieurement chez la levure comme des acteurs de la fission des mitochondries n'ont pas d'homologues chez les eucaryotes supérieurs. L'ensemble de ces protéines contrôle la fission de la membrane externe, alors que peu d'acteurs sont connus pour la fission de la membrane interne.

2.1.1. Dnm1/DRP1/DLP1

La fission des mitochondries nécessite la dynamine Dnm1p (dynamin related 1) chez *S. cerevisiae* (Bleazard et al, 1999), DRP-1 chez *C. elegans* (Labrousse et al, 1999) et DRP1 (ou Dlp1/DVLP/Dymple) chez les mammifères (Pitts et al, 1999). Cette protéine présente la structure classique des dynamines, un domaine GTPase N-terminal, un domaine Middle, et un domaine GED (*figure n°19*) (Praefcke & McMahon, 2004). La délétion du gène *DNM1*⁺ chez la levure, la diminution de l'expression du gène *DRP1* par interférence à l'ARN et la surexpression de mutants dominants négatifs chez les mammifères, induisent une filamentation et une connectivité excessive des mitochondries (*figure n°19 et n°20*) (Lee et al, 2004; Sesaki & Jensen, 1999).

La protéine Dnm1p/DRP1 est cytoplasmique et est recrutée transitoirement à la membrane externe mitochondriale au niveau de structures ponctiformes qui correspondent aux futurs sites de fission. Juste après la fission, la protéine est détectée à l'une ou aux deux extrémités libérées (Smirnova et al, 2001). Le recrutement de Dnm1p à la membrane



Ingerman 2005 E. JCB

Figure n°21 : Auto-assemblage sous forme de spirales de Dnm1p.

Structures formées en présence d'un analogue non hydrolysable du GTP (GMP-PCP) ou de GDP (en bas, à droite) et visualisées par microscopie électronique après coloration négative.

mitochondriale implique Fis1p (James et al, 2003; Yoon et al, 2003). En effet, dans les levures *Δfis1*, Dnm1p n'est pas localisée à la mitochondrie (Cervený & Jensen, 2003). Chez les mammifères, le rôle de FIS1 dans le recrutement de DRP1 est plus obscur. Des expériences de FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) et de co-immunoprécipitation ont montré que FIS1 interagit avec DRP1. Cependant, dans des cellules traitées par un siRNA ciblant FIS1, DRP1 est toujours recrutée à la membrane externe (Lee et al, 2004). De plus, il a été montré qu'en condition basale le recrutement de DRP1 implique le cytosquelette de microtubule et le moteur rétrograde dynéine/dynactine (Varadi et al, 2004). Au contraire en condition de fission induite par les inhibiteurs de la chaîne respiratoire ou de l'ATP synthase le cytosquelette d'actine a été impliquée (De Vos et al, 2005). Au cours de la fission induite par l'apoptose, DRP1 se transloque à la mitochondrie au niveau des futurs sites de fission grâce aux protéines p20-BAP31 et DDP/TMM8a (Arnoult et al, 2005b; Karbowski et al, 2002). À noter, DRP1 a également été détectée dans les peroxysomes, où cette protéine contrôle la fission de cet organite (Koch et al, 2003).

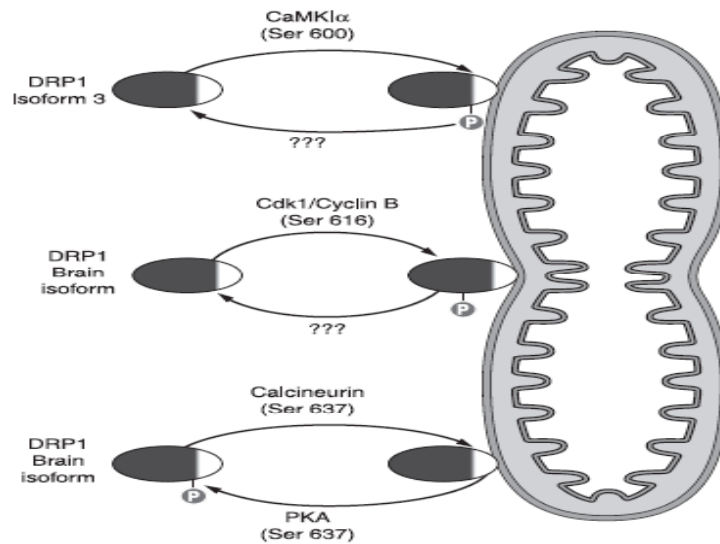
La caractérisation biochimique de Dnm1p chez la levure *S. cerevisiae* indique un mode d'action de cette protéine dans la fission mitochondriale proche de celui des dynamines conventionnelles dans l'endocytose. *In vitro*, en présence de GTP ou d'un analogue non hydrolysable du GTP, Dnm1p oligomérisse sous forme de grandes spirales (Fukushima et al, 2001; Ingerman et al, 2005; Naylor et al, 2006) qui présentent un diamètre largement supérieur à celui des spirales formées par les dynamines classiques (environ 109 nm versus 50 nm) (Chen et al, 2004; Hinshaw & Schmid, 1995; Ingerman et al, 2005; Zhang & Hinshaw, 2001) correspondant au diamètre moyen des sites de constriction des mitochondries (*figure n°21*). Une réduction du diamètre de ces spirales consécutive à l'hydrolyse du GTP permettrait la scission des membranes mitochondriales. En effet, le mutant *Dnm1K41A*, qui fixe le GTP mais ne l'hydrolyse pas, est capable de s'autoassembler *in vitro* sous forme de spirales, est recruté à la mitochondrie lorsqu'il est surexprimé chez la levure, mais est incapable de fissionner les mitochondries entraînant un réseau mitochondrial hyperfilamenteux (Naylor et al, 2006). La fixation du GTP semble donc suffisante pour l'auto-assemblage de la protéine et son adressage à la mitochondrie alors que son hydrolyse semble essentielle pour achever la division mitochondriale en effectuant la fission des membranes. Les caractéristiques biochimiques de DRP1 chez les mammifères sont beaucoup moins documentées. DRP1 oligomérisse *in vitro* sous forme d'anneaux présentant un diamètre plus réduit que les structures formées par Dnm1p et similaire à celui des dynamines (environ 50

nm) (Smirnova et al, 2001; Yoon et al, 2001). Cette différence entre DRP1 et Dnm1p pourrait signifier la nécessité de l'intervention de facteurs supplémentaires dans l'auto-assemblage de DRP1 *in vivo* pour la formation de structures de diamètre adéquat pouvant générer la constriction des mitochondries.

Dans plusieurs types cellulaires, une fragmentation du réseau mitochondrial dépendante de DRP1 au cours de l'apoptose a été décrite (Arnoult et al, 2005b; Breckenridge et al, 2003; Frank et al, 2001; Lee et al, 2004; Sugioka et al, 2004). De plus, la perte de fonction de la dynamine retarde l'apoptose induite par différents stimuli en inhibant partiellement mais spécifiquement la libération du cytochrome c (Arnoult et al, 2005b; Barsoum et al, 2006; Estaquier & Arnoult, 2007; Frank et al, 2001; Parone et al, 2006). Ces données ont, dans un premier temps, été interprétées comme une preuve du rôle essentiel de la dynamique mitochondriale au cours de l'apoptose. Néanmoins, des études récentes ont montré que DRP1 exerce ce rôle indépendamment de son activité dans la fission mitochondriale (Arnoult et al, 2005b; Breckenridge et al, 2008; Cassidy-Stone et al, 2008; Skulachev et al, 2004). Le rôle de DRP1 dans l'apoptose pourrait passer par son influence sur le remodelage des crêtes et la mobilisation du cytochrome c de l'espace intra-crête vers l'espace inter-membranaire précédant sa libération dans le cytosol (Germain et al, 2005).

DRP1 est essentielle pour le développement embryonnaire chez la souris. En effet, les souris invalidées pour le gène *Drp1* meurent à mi-gestation et présentent un développement anormal du cervelet, du tube neural et du prosencéphale (Ishihara et al, 2009; Wakabayashi et al, 2009). Des cultures neuronales primaires du prosencéphale de souris *DRP1*^{-/-} montrent une diminution du nombre de neurites et une altération de la fonction des synapses. En accord avec ces données, la surexpression de DRP1 dans des neurones corticaux augmente le nombre de dendrites et l'inhibition de la fission mitochondriale induite par la surexpression du mutant dominant négatif de DRP1 (K38A) les diminue (Li et al, 2004). De plus, H.R. Waterham et ses collaborateurs ont récemment identifié une mutation létale de *Drp1* chez un nouveau-né qui présentait une microcéphalie, une acidose lactique et une atrophie optique (Waterham et al, 2007).

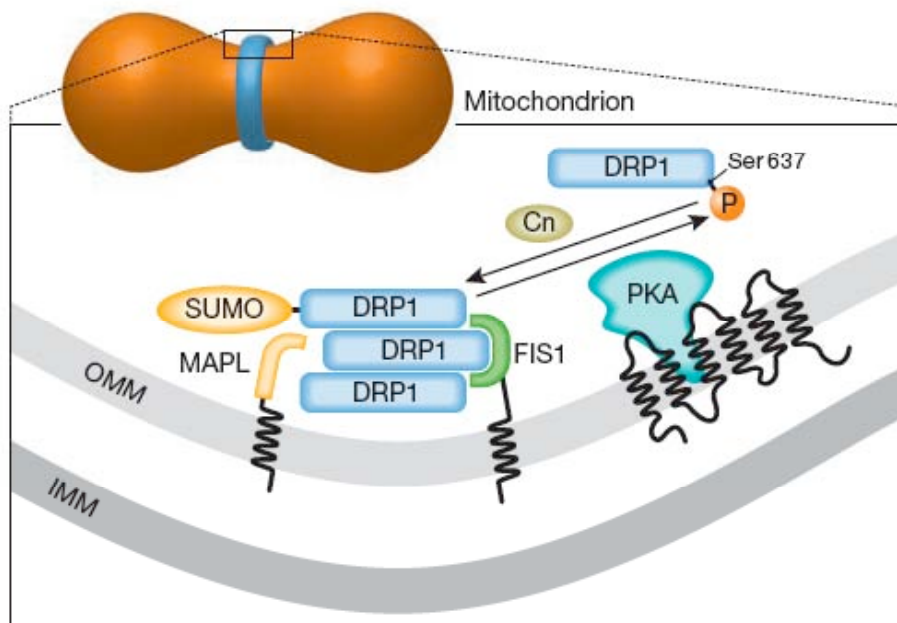
DRP1 est exprimée dans tous les tissus, toutefois, une isoforme spécifique (isoforme 1), générée par épissage alternatif, est exprimée dans le cerveau. Le cerveau, les muscles squelettiques et les cellules cardiaques présentent des niveaux élevés d'expression de DRP1 alors que des niveaux plus faibles sont détectés dans les testicules, les reins et le pancréas et des niveaux très faibles dans le foie (Smirnova et al, 1998)(Yoon et al, 1998).



Liesa 2009 *Physiological Reviews*

Figure n°22 : Modèle de régulation de DRP1 par phosphorylation.

DRP1 est phosphorylée par les trois kinases Cdk1/Cycline B, PKA et CaMKI α . La phosphorylation de DRP1 par Cdk1/Cycline B et CaMKI α augmente la fission mitochondriale alors que la phosphorylation par PKA réduit la fission mitochondriale. Jusqu'à présent une seule phosphatase (Calcineurine) qui active la fission des mitochondries a été identifiée.



Scorrano 2009 *EMBO reports*

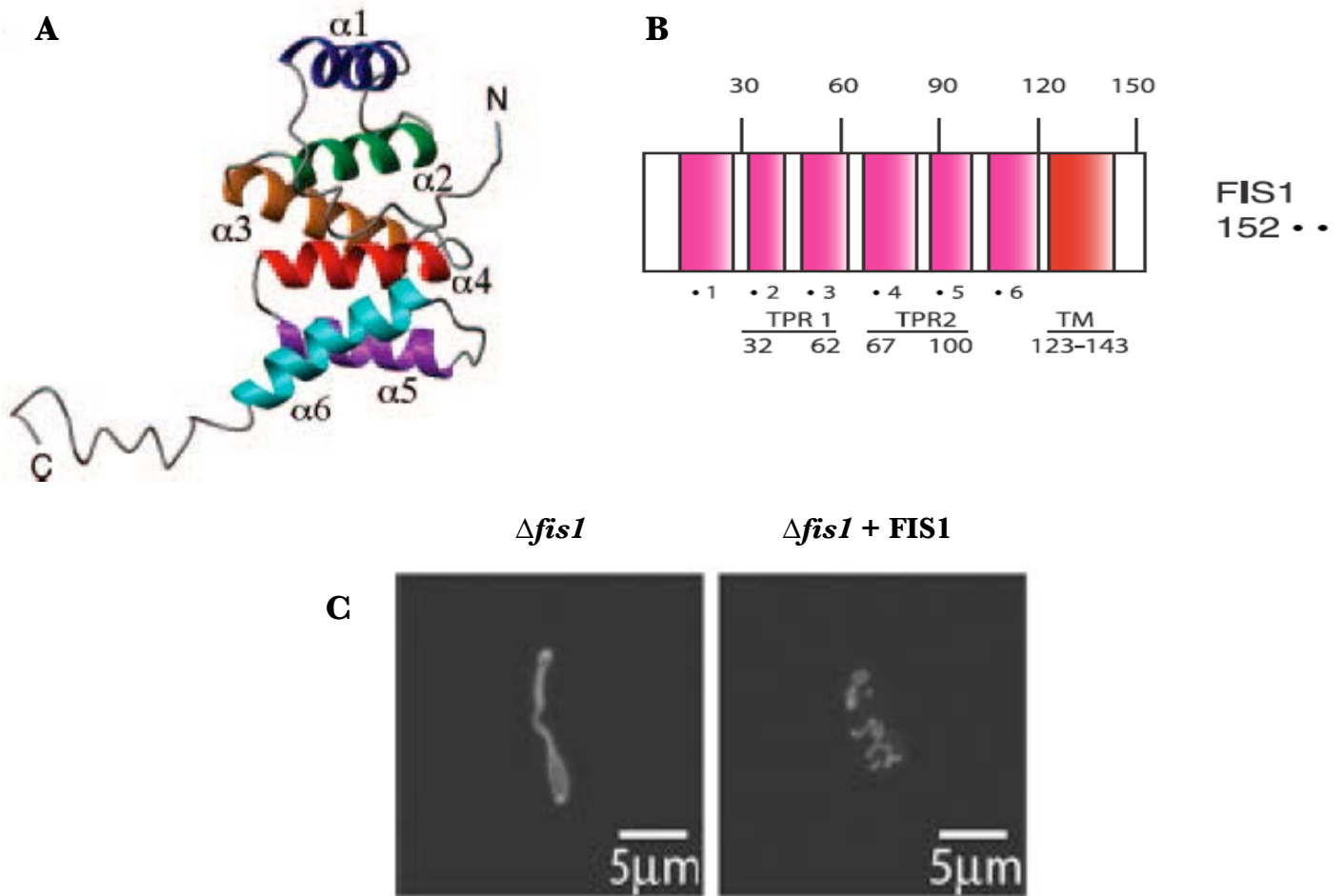
Figure n°23 : Trafic dynamique de DRP1 sur les sites de fission mitochondriale.

Le site de la fission mitochondriale est élargie dans le domaine encadré. La déphosphorylation de la sérine 637 par la calcinurine transloque DRP1 sur la mitochondrie. La phosphorylation du même résidu par PKA pourrait libérer DRP1 de la mitochondrie. La sumoylation par MAPL stabiliserait DRP1 sur la mitochondrie et empêcherait de sa re-translocation.

Plusieurs types de modifications post-traductionnelles de DRP1, phosphorylation, ubiquitinylation, sumoylation, nitrosylation, ont été récemment décrites (*figure n°22 et 23*).

Au cours de la mitose, le complexe Cdk1/Cycline B (Cyclic dependent kinase 1) phosphoryle l'isoforme 1 humaine de DRP1 sur la serine 616 (ou serine 585 chez le rat) localisée au niveau du GED. Cette phosphorylation augmente la fission mitochondriale, ce qui pourrait aider à une meilleure répartition de l'organelle lors de la division cellulaire (Taguchi et al, 2007). Cette phosphorylation n'ayant aucun effet sur l'activité GTPase de DRP1, elle pourrait influencer l'interaction de la dynamine avec des partenaires. La protéine kinase A (PKA) dépendante de l'AMP cyclique est impliquée dans la phosphorylation de l'isoforme 1 de DRP1 au niveau de la serine 637 chez l'homme (ou de la serine 656 chez le rat) située dans le domaine GED (Chang & Blackstone, 2007; Cribbs & Strack, 2007). La phosphorylation de la sérine 637 bloque les interactions intra-moléculaires entre les domaines GED, GTPase et middle et réduit l'activité GTPase de DRP1 (Chang & Blackstone, 2007). Toutefois, les études menées sur orthologue de rat n'ont montré aucun changement dans l'activité GTPase de DRP1 phosphorylée sur la sérine 656 (Cribbs & Strack, 2007). Néanmoins, l'ensemble des travaux menés montre que cette phosphorylation réduit la fission mitochondriale (Cereghetti et al, 2008; Chang & Blackstone, 2007; Cribbs & Strack, 2007). Dans ce sens, des cellules exprimant *DRP1* portant une mutation phosphomimétique (Ser637Asp) présentent des mitochondries anormalement longues ainsi que des structures anormales des crêtes et une diminution de la sensibilité à l'apoptose (Cribbs & Strack, 2007). La phosphorylation de DRP1 par la PKA est réversible. Suite à une augmentation de la concentration cytosolique en calcium ou à une dépolarisation mitochondriale, la calcineurine déphosphoryle la serine 637 ce qui active la fission des mitochondries (Cereghetti et al, 2008; Cribbs & Strack, 2007). L'isoforme 3 de DRP1 est phosphorylée sur le résidu sérine 600 par la protéine kinase I α dépendante de la calmoduline (CaMKI α) en réponse à l'activation de canaux calciques voltage-dépendant (VDCCs) (Han et al, 2008). Cette phosphorylation augmente l'affinité pour FIS1 et la translocation de la protéine à la mitochondrie, stimulant la fission des membranes mitochondriales.

DRP1 est également mono-sumoylée avec SUMO-1 (Small Ubiquitin-Like Modifier 1) suite à l'intervention de l'enzyme de conjugaison E2 Ubc9 (Ubiquitin-conjugating enzyme 9) et de la SUMO E3 ligase MAPL (Mitochondrial-Anchored Protein Ligase). Cette modification, observée au cours de l'apoptose, contribue à l'activation de la fission mitochondriale en stabilisant l'association de DRP1 à la mitochondrie (Braschi et al, 2009; Harder et al, 2004; Wasiak et al, 2007; Zunino et al, 2007). SENP5, une sentrin/SUMO



Suzuki 2005 JBC

Liesa 2009 Physiological Reviews

Figure n°24 : Fis1 chez *S. cerevisiae*.

(A) Structure de Fis1p obtenue par RMN. Les hélices α (colorées) composent le domaine TPR de la protéine. (B) Représentation schématique de la structure protéique de Fis1p. Les 6 α -hélices (en rose) dont quatre forment les deux motifs TPR et le domaine transmembranaire (en rouge) sont représentés. (C) Effet de la délétion de *FIS1* sur le réseau mitochondrial chez la levure *S. cerevisiae* visualisé grâce à une GFP adressée à la mitochondrie.

protéase est capable de dé-sumoyler DRP1 et de restaurer une morphologie mitochondriale sauvage (Zunino et al, 2007).

L'E3 ubiquitine ligase mitochondriale MARCH V, aussi appelée MITOL, dont la perte de fonction conduit à des défauts de fission mitochondriale, interagit avec DRP1 et régule son recrutement au niveau des sites de fission sans toutefois affecter la stabilité de la protéine (Karbowski et al, 2007).

DRP1 est nitrosylée sur la cystéine 644, dans des neurones corticaux en culture, en réponse à l'oxyde nitrique (Cho et al, 2009). Cette modification post-traductionnelle dans le domaine GED conduit à une augmentation de l'activité GTPase de la protéine et à la fission des mitochondries entraînant une diminution du nombre d'épines dendritiques.

2.1.2. Fis1

Fis1p (ou Mdv2p) chez la levure *S. cerevisiae*, ou FIS1 chez l'Homme (James et al, 2003; Stojanovski et al, 2004; Yoon et al, 2003) est ancrée dans la membrane externe mitochondriale par son domaine C-terminal, la majeure partie de la protéine étant cytoplasmique (James et al, 2003; Mozdy et al, 2000; Yoon et al, 2003). Contrairement à Dnm1p/DRP1, Fis1p/FIS1 se localise de manière homogène sur l'ensemble de la membrane externe (James et al, 2003; Stojanovski et al, 2004; Yoon et al, 2003). Des levures délétées pour le gène *FIS1* présentent un réseau mitochondrial très interconnecté, « en filet », similaire à celui observé dans un mutant $\Delta dnm1$ (figure n°24C). La surexpression de FIS1 entraîne une fragmentation des mitochondries, alors qu'une diminution de son expression par interférence à l'ARN conduit à la formation de longs filaments mitochondriaux très interconnectés (James et al, 2003; Lee et al, 2004; Yoon et al, 2003). Fis1p chez le rat est exprimée de façon ubiquitaire et ne montre pas de grandes différences de niveau d'expression entre les différents tissus analysés (Jofuku et al, 2005; Stojanovski et al, 2004). FIS1, comme DRP1, est également détectée chez les mammifères dans les peroxysomes et est impliquée dans la fission de cet organite (Koch et al, 2005).

Fis1p chez *S. cerevisiae* est une petite protéine de 17 kDa qui contient 152 acides aminés. L'analyse tri-dimensionnelle de la protéine, par cristallographie à rayon X (Dohm et al, 2004) et par résonance magnétique nucléaire (Suzuki et al, 2003; Suzuki et al, 2005), révèle que FIS1 présente un large domaine, conservé chez la levure, structuré en 6 hélices α organisées en motifs de type « TPR » (tetratricopeptide repeat) (figure n°24A)

(Suzuki et al, 2005). Les 5 premières hélices sont exposées vers le cytoplasme. (Dohm et al, 2004; Suzuki et al, 2003). La première est cruciale pour l'activité de fission de FIS1 et a un rôle essentiel dans son oligomérisation (Jofuku et al, 2005). Les 4 suivantes sont impliquées dans des interactions protéine-protéine et ne sont pas nécessaires pour l'oligomérisation de FIS1. Chez la levure, les motifs TPR sont responsables de l'interaction de Fis1p avec les adaptateurs Mdv1p et Caf4p (Zhang & Chan, 2007). La partie C-terminale de FIS1 qui contient un domaine transmembranaire mitochondrial et 4 résidus localisés dans l'espace inter-membranaire est responsable de la localisation de la protéine sur la membrane externe (James et al, 2003; Jofuku et al, 2005; Stojanovski et al, 2004; Yoon et al, 2003).

Chez les mammifères, la surexpression de FIS1 provoque, en plus de la fragmentation des mitochondries, la libération du cytochrome c dépendante (James et al, 2003; Lee et al, 2004). La diminution de l'expression de FIS1 induit au contraire un mécanisme de résistance à l'apoptose, confirmant son rôle dans la mort cellulaire (Lee et al, 2004). Cependant la fission mitochondriale induite par la surexpression de FIS1 peut être découplée de l'apoptose. En effet, l'expression du mutant *DRP1K38A*, inhibe la fission provoquée par la surexpression de FIS1, mais n'empêche pas la stimulation de la mort cellulaire. De même, un mutant de la région trans-membranaire de FIS1 induit la fission, mais pas la mort des cellules (James et al, 2003; Lee et al, 2004). De plus, dans les cellules invalidées pour BAX et BAK, protéines pro-apoptotiques de la famille Bcl-2, la surexpression de FIS1 provoque la fragmentation mitochondriale mais pas d'apoptose. En outre, la capacité de FIS1 à induire l'apoptose dans ces cellules est restaurée quand les niveaux de calcium du réticulum endoplasmique (RE) sont rétablis (Alirol et al, 2006), suggérant que le programme d'apoptose induit par FIS1 est contrôlé par la voie de la mort cellulaire calcium-dépendante dirigée par RE. FIS1 est donc une protéine bi-fonctionnelle qui régule de manière indépendante la fragmentation mitochondriale et l'apoptose induite par le réticulum endoplasmique.

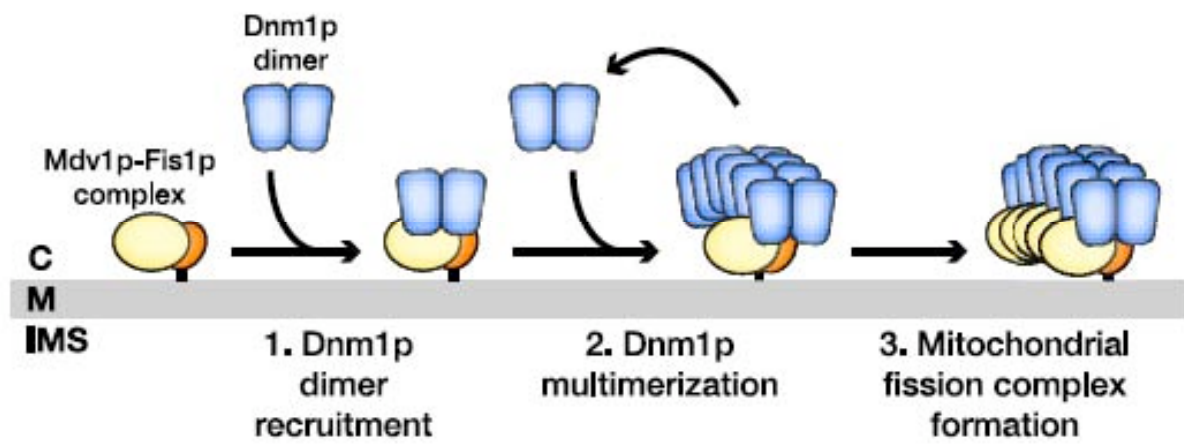
Une réduction de l'expression FIS1 associée à la formation de mitochondries très allongées dans les cellules dont le vieillissement a été induit chimiquement a été décrit (Yoon et al, 2006). Dans ces cellules, la surexpression de FIS1 inhibe le vieillissement et restaure un phénotype mitochondrial normal. De plus, l'induction d'un allongement des mitochondries par inactivation de *fis1* est suffisant pour induire le vieillissement (Lee et al, 2007; Yoon et al, 2006). L'ensemble de ces travaux suggèrent que FIS1 à travers de son rôle dans la fission interviendrait dans le contrôle négatif de la sénescence. L'observation d'une baisse du

potentiel de membrane mitochondriale et d'une augmentation de la production de ROS et de dommages à ADN dans les cellules délétées pour FIS1 suggère que l'altération de la fonction mitochondriale peut être un facteur responsable du déclenchement du vieillissement (Lee et al, 2007).

2.1.3. Mdv1

Différents cribles génétiques menés chez la levure *S. cerevisiae* pour identifier de nouveaux acteurs de la fission ont identifié la même protéine que chacun a baptisé différemment : Mdv1p (mitochondrial division) (Tieu & Nunnari, 2000), Gag3p (glycerol adapted growth) (Fekkes et al, 2000) ou Net2p (mitochondrial net) (Cervený et al, 2001). La majorité des levures délétées pour le gène *MDV1* ($\Delta mdv1$) présente un réseau mitochondrial très interconnecté qui caractérise la perte de la fission mitochondriale (Tieu & Nunnari, 2000) (Cervený et al, 2001; Fekkes et al, 2000).

MDV1 code pour une protéine périphérique de la membrane externe qui contient un motif central coiled-coil et 7 répétitions WD40 C-terminale, tous deux dans des interactions protéine-protéine (Tieu & Nunnari, 2000). La protéine Mdv1p établit un lien physique entre Dnm1p et Fis1p. Elle interagit avec Dnm1p grâce au domaine WD40 et avec Fis1p grâce à sa région N-terminale (Cervený & Jensen, 2003; Cervený et al, 2001; Tieu & Nunnari, 2000; Tieu et al, 2002). Les régions N-terminales, WD40 et coiled-coil sont requises pour la fission (Tieu et al, 2002). Mdv1p présente une localisation punctiforme similaire à celle de Dnm1p (Cervený et al, 2001; Fekkes et al, 2000; Tieu & Nunnari, 2000). L'intégrité du domaine GTPase de Dnm1p semble nécessaire à l'interaction puisque l'expression de mutants *DNM1S42N* et *DNM1T62F* empêche, comme la délétion du gène, la distribution ponctuée de Mdv1p sur la mitochondrie (Cervený & Jensen, 2003). Contrairement à Fis1p, Mdv1p n'est pas nécessaire pour l'assemblage de Dnm1p à la membrane. Cependant, les complexes punctiformes contenant Dnm1p sans Mdv1p ne sont pas capables de réaliser la division mitochondriale complète. Récemment, il a été montré que Mdv1p interagit avec Dnm1p sous forme GTP liée, et permet son co-assemblage spécifique en structures hélicoïdales qui dirigent la fission mitochondriale (Lackner et al, 2009). Mdv1p n'est pas conservée chez les eucaryotes supérieurs et aucun homologue fonctionnel n'a été jusqu'à présent identifié.



Bhar 2006 The Journal of Biological Chemistry

Figure n°25: Modèle en étape pour l'assemblage des complexes de fission sur les mitochondries.

C : cytoplasme, M : membrane externe, IMS : espace inter-membranaire.

2.1.4. Caf4

E.E. Griffin et ses collègues en recherchant des partenaires de Fis1p par des approches de protéomique ont identifié Caf4p, un nouveau membre de la machinerie de fission chez la levure *S. cerevisiae* (Griffin et al, 2005). Caf4p présente une organisation voisine de Mdv1p, une région N-terminale sans domaine identifié, un domaine coiled-coil central et 7 domaines WD40 C-terminaux. Caf4, interagit avec Fis1p et Mdv1p grâce à sa partie N-terminale et avec Dnm1p grâce à son domaine WD40 (Griffin et al, 2005). Elle est localisée à la membrane externe de la mitochondrie et elle agit de la même manière que Mdv1p dans la fission mitochondriale. La délétion de *MDV1* agit comme un faible suppresseur du défaut de croissance en milieu glycérol des cellules délétées pour le gène *FZO1* codant un acteur de la fusion mitochondriale alors que ce phénotype est supprimé beaucoup plus efficacement en présence de la double délétion $\Delta mdv1\Delta caf4$ (Griffin et al, 2005). L'observation d'une activité de fission résiduelle dans les levures $\Delta mdv1$ explique que ces cellules ont un défaut moins grave par rapport des levures délétées pour *FIS1* ou *DNM1*. En revanche, le phénotype des cellules $\Delta mdv1\Delta caf4$ est identique à celui observé dans les levures $\Delta fis1$ ou $\Delta dnm1$. Comme Mdv1p, chez les eucaryotes supérieurs, aucun homologue fonctionnel de Caf4 n'a pour l'instant été identifié.

2.2. Modèle proposé pour le complexe de fission mitochondriale

L'ensemble des données permet de proposer qu'il existe chez la levure, sur la membrane externe un complexe composé de Dnm1p, Mdv1p, Caf4p et Fis1p responsable de la fission (Osteryoung & Nunnari, 2003; Shaw & Nunnari, 2002; Tieu et al, 2002). Fis1p et Mdv1p et/ou Caf4p seraient associées sur la membrane externe, au niveau de futurs sites de fission. Dnm1p présente dans le cytoplasme sous forme de dimère serait alors recrutée à la mitochondrie par interaction avec Fis1p (Okamoto & Shaw, 2005) (étape 1). Ces dimères mitochondriaux, qui sont en équilibre dynamique avec le pool cytoplasmique de dimères de Dnm1p, s'assembleraient pour former des complexes multimériques (étape 2). La multimérisation de Dnm1p provoquerait ensuite la redistribution de Mdv1p dans les complexes ponctués de la fission (étape 3) et leur activation conduirait à la division mitochondriale (*figure n°25*) (Bhar et al, 2006). L'activité GTPase de Dnm1p serait alors

stimulée afin de promouvoir la fission des membranes, peut-être grâce à sa liaison à Mdv1p (Cervený & Jensen, 2003).

2.3. Autres acteurs ou régulateurs de la fission mitochondriale

Les principaux acteurs de la fission des mitochondries sont localisés sur la membrane externe et contrôleraient la dynamique de cette membrane. L'existence d'une machinerie qui contrôle la fission de la membrane interne reste à établir définitivement. Cependant deux protéines pourraient intervenir dans ce processus, Mdm33 chez la levure et MTP18 chez les eucaryotes supérieurs.

2.3.1 MTP18

MTP18 (Mitochondrial Protein de 18 kDa) a été identifiée dans les cellules de mammifères, comme une cible de la voie de signalisation de la phosphatidylinositol 3 kinase et ne possède pas d'orthologue chez la levure. MTP18 montre des niveaux élevés d'expression dans le cœur et le muscle squelettique, mais est également détectée dans d'autres tissus. MTP18 est une protéine intra-mitochondriale ancrée aux membranes mitochondriales et exposée dans l'espace inter-membranaire. La surexpression de MTP18 provoque la fragmentation du réseau mitochondrial et à l'inverse, l'absence de MTP18, générée par interférence à l'ARN, provoque la fusion des mitochondries qui apparaissent sous forme d'un réseau très interconnecté (Tondera et al, 2005; Tondera et al, 2004) montrant que MTP18 active la fission mitochondriale. La fragmentation mitochondriale induite par la surexpression de MTP18 est bloquée dans les cellules co-exprimant un mutant inactif de *DRP1* ou la protéine fusogène MFN1. MTP18 contrôle la distribution de *DRP1* sur les mitochondries et la fission induite par *FIS1*. L'extinction de MTP18 induit non seulement la filamentation des mitochondries mais également la libération du cytochrome c et l'apoptose, montrant de façon originale que l'allongement mitochondrial peut également favoriser la libération du cytochrome c et l'apoptose (Tondera et al, 2005; Tondera et al, 2004).

2.3.2. Mdm33

Mdm33 isolée chez *S. cerevisiae* (Messerschmitt et al, 2003), est une protéine de 54kDa ancrée à la membrane interne grâce à un domaine trans-membranaire avec une orientation NH₂ matrice / COOH IMS. Elle est capable de former des interactions homotypiques *in vitro*, et appartient à un complexe de haut poids moléculaire (≈300 kDa) *in vivo*. Dans une levure délétée du gène *MDM33*, le réseau mitochondrial adopte une forme originale, organisée en anneaux ou sphères creuses reliés par des filaments. La surexpression de Mdm33p conduit à l'agrégation du réseau mitochondrial et à l'arrêt de croissance. Dans ces mitochondries les crêtes sont rares, désorganisées et forment quelquefois un septum matriciel (Messerschmitt et al, 2003). La perte ou le gain de fonction de Mdm33p entraîne donc des variations morphologiques, difficiles à relier avec les événements de fission et de fusion des membranes, en accord avec la mise en évidence lors d'un test de fusion par conjugaison des levures $\Delta mdm33$ que ce mécanisme n'est pas altéré.

2.3.3. GDAP1

GDAP1 (Ganglioside-induced Differentiation Activated Protein 1) est une protéine mitochondriale ancrée à la membrane externe, qui est exprimée principalement dans les tissus nerveux. Le domaine C-terminal est nécessaire et suffisant pour adresser la protéine à la mitochondrie. La diminution de l'expression de GDAP1 provoque un allongement des tubules mitochondriaux. La surexpression de GDAP1 conduit à une fragmentation des mitochondries, qui peut être reversée par la surexpression de Drp1K38A ou la surexpression des Mitofusines, protéines fusogènes (Niemann et al, 2005; Pedrola et al, 2005). La surexpression de GDAP1 n'affecte pas la capacité de fusion des mitochondries suggérant que GDAP1 est un facteur de fission (Niemann et al, 2005), et il a été montré que son rôle est dépendant de DRP1 et FIS1 (Niemann et al, 2009). Les mutations au sein du gène *GDAP1* entraînent une neuropathie périphérique héréditaire, la maladie de (Charcot-Marie-Tooth) 4A (CMT 4A) (Cuesta et al, 2002). Il s'agit d'une forme démyélinisante autosomique récessive de la maladie (Liu et al, 1999; Niemann et al, 2005; Pedrola et al, 2008; Pedrola et al, 2005). Les mutations de GDAP1 retrouvées dans les formes récessives de CMT 4A sont associées à une diminution de fission. Des mutations dominantes de GDAP1 ont également été



Detmer 2007 Nat Rev Mol Cell Biol

Figure n°26 : Représentation schématique de la fusion mitochondriale.

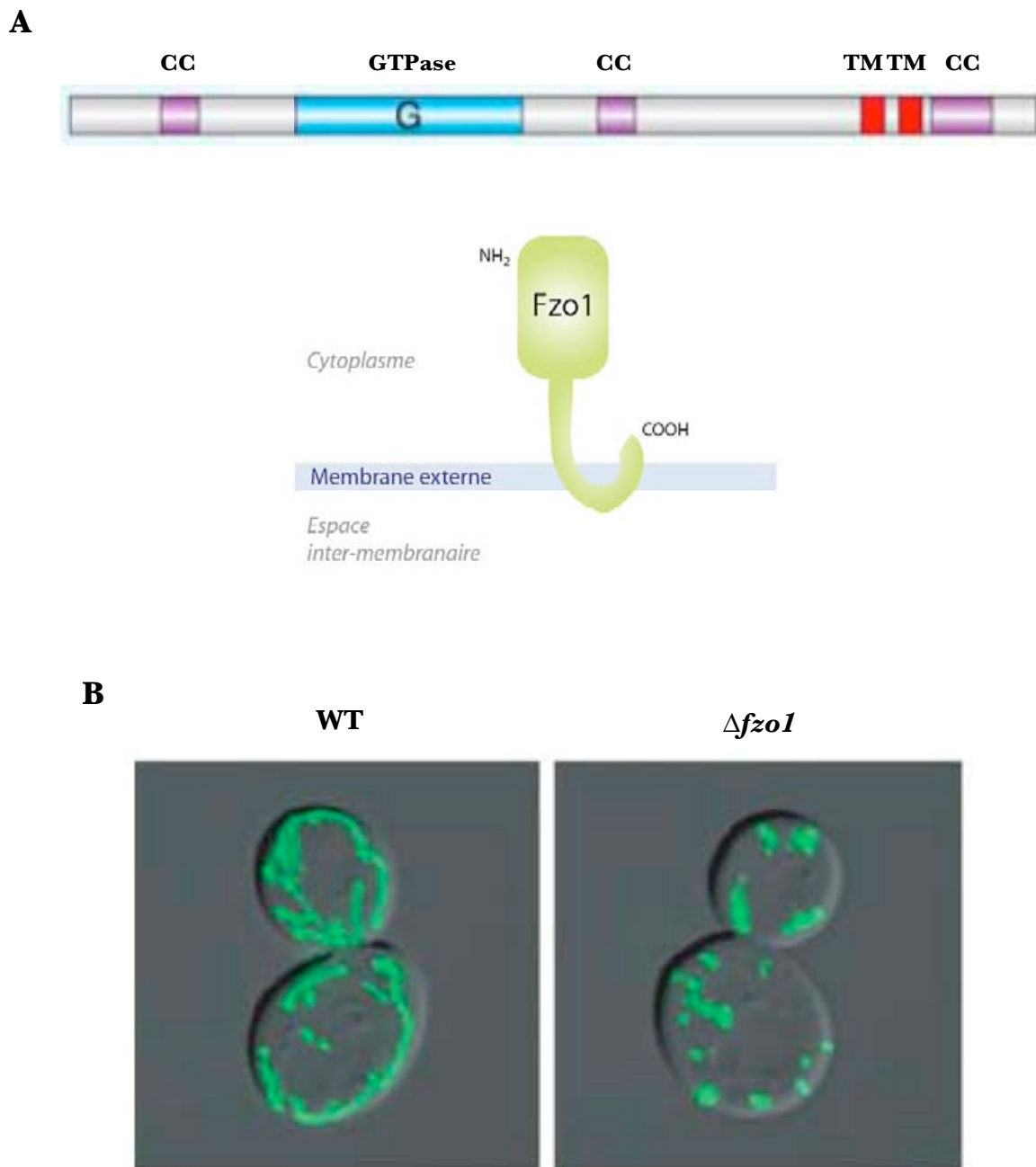
retrouvées et affectent la fusion mitochondriale (Niemann et al, 2009). De plus, ni la surexpression, ni l'extinction de cette protéine n'affecte la sensibilité des cellules aux stimulations apoptotiques (Niemann et al, 2009). Cette protéine contient deux domaines GST (glutathion-S-transférase) localisés en C-terminal avant le domaine hydrophobe bipartite (Niemann et al, 2005) mais elle ne présente d'activité glutathione transférase (Pedrola et al, 2005).

2.3.4. Endophiline B1

L'Endophiline B1/Bif1 (Bax interacting factor 1) appartient à la famille des endophilines, protéines capables de modifier les phospholipides et ainsi de changer la courbure des membranes (Cuddeback et al, 2001; Gallop et al, 2006; Pierrat et al, 2001). La diminution d'expression de l'Endophiline B1 affecte sélectivement la fission de la membrane externe (Karbowski et al, 2002). En effet, l'extinction de la protéine par interférence à l'ARN, ou la surexpression d'une forme délétée de son domaine N-terminal impliqué dans sa relation avec les lipides, provoque la formation de vésicules et de tubules à partir de la membrane externe. La double extinction de l'Endophiline B1 et de DRP1 conduit à un phénotype mitochondrial identique à celle de DRP1 seule, suggérant que DRP1 agit en amont de l'Endophiline B1 (Karbowski et al, 2004b). L'Endophiline B1 pourrait donc en modifiant la composition lipidique de la membrane externe mitochondriale (Karbowski et al, 2004b) contribuer à un nouveau mécanisme contrôlant sa fission.

3. La fusion des mitochondries

Les acteurs principaux de la fusion mitochondriale qui constituent le cœur de la machinerie de fusion sont au nombre de trois, Fzo1p/MFN1-2 et Ugo1p qui agissent sur la membrane externe et Mgm1p/Msp1p/OPA1 qui agit sur la membrane interne. Ces deux machineries sont en étroite collaboration pour assurer la coordination des fusions des deux membranes et pour maintenir l'intégrité et la fonctionnalité des deux bicouches lipidiques ainsi que des compartiments qu'elles délimitent (*Figure n°26*).



Okamoto 2005 *Annu Rev Genet*

Guillou 2005 *Thèse*

Figure n°27 : Fzo1p chez *S. cerevisiae*.

(A) Représentation schématique de la structure et de la topologie de Fzo1. TM : domaine trans-membranaire, CC : coiled-coil. (B) Visualisation du réseau mitochondrial, dans une levure sauvage (WT) et délétée du gène $FZO1^+$ ($\Delta fzo1$), grâce à l'expression d'une GFP adressée à la mitochondrie.

3.1. Les acteurs de la fusion mitochondriale

3.1.1. Fzo1p/Mitofusines

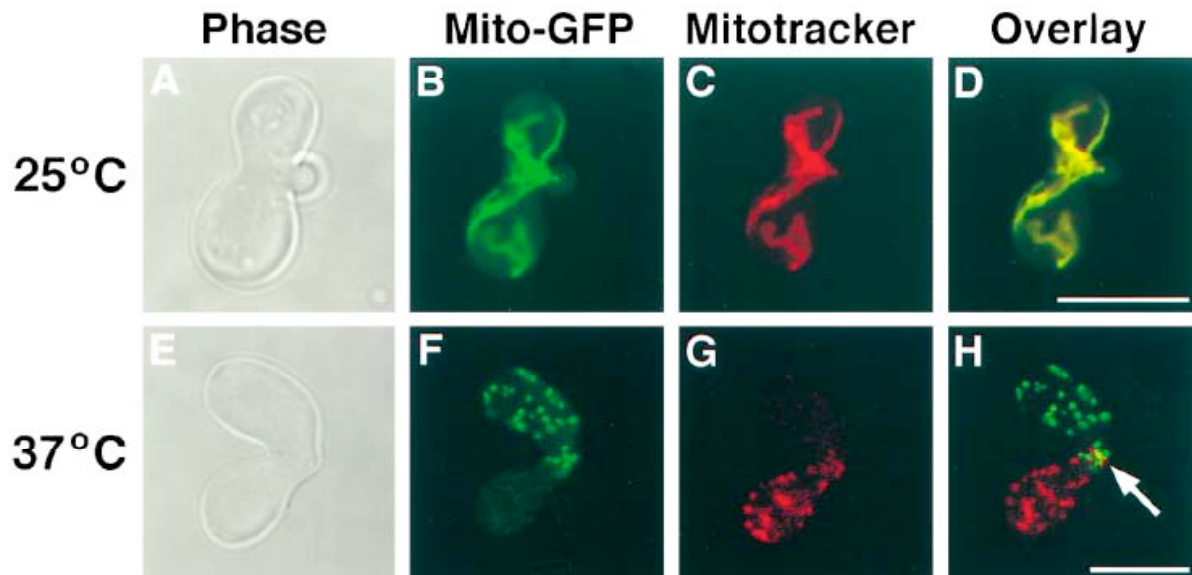
a. FZO1 chez la Drosophile

Au cours de la spermatogenèse chez *Drosophila melanogaster*, les mitochondries des spermatides post-méiotiques s'agrègent, fusionnent, et forment deux organelles géants allongés le long du flagelle. Ce stade du développement des spermatides est appelé "onion stage" car les mitochondries observées en microscopie électronique ont un aspect de tranche d'oignon. L'étude de mutants de ce processus a permis d'identifier la première protéine impliquée dans la fusion des mitochondries, *fuzzy onions* ou *fzo*, dont l'inactivation du gène inhibe l'étape de fusion des mitochondries et conduit à une stérilité mâle (Hales & Fuller, 1997). Le gène *fuzzy onions* s'exprime uniquement dans la lignée germinale mâle (Hwa et al, 2002). Plus tard, un gène homologue à *fzo*, *dmfn* (drosophila mitofusine) dont l'expression est ubiquitaire a été identifié. La protéine MFN de drosophile présente un degré d'homologie plus élevé avec les mitofusines humaines (45% d'identité) qu'avec Fzo (32% d'identité).

b. Fzo1p chez la levure

FZO1 a été identifié chez la levure *S. cerevisiae* par homologie de séquence avec le gène *fzo* chez *Drosophila melanogaster*. Fzo1p possède un domaine coiled-coil en N-terminal, suivi par un domaine GTPase, un second domaine coiled-coil, deux domaines trans-membranaires et enfin un troisième domaine coiled-coil C-terminal (Fritz et al, 2001; Rapaport et al, 1998). La protéine se localise uniformément sur la membrane externe de la mitochondrie (Hermann et al, 1998) qu'elle traverse deux fois grâce à ses deux domaines trans-membranaires reliés par une courte boucle émergeant dans l'espace inter-membranaire. Les deux extrémités NH₂ et COOH de la protéine sont cytoplasmiques, comme la majeure partie de la protéine (*figure n°27A*) (Fritz et al, 2001).

Des levures délétées pour le gène *FZO1* ($\Delta fzo1$), ou exprimant un mutant thermosensible, présentent un réseau mitochondrial fragmenté (*figure n°27B*) et perdent leur ADNmt. Ces levures ne sont plus capables de pousser en milieu respiratoire (Hermann et al, 1998; Rapaport et al, 1998), mais prolifèrent en présence d'une source de carbone



Hermann 1998 *The Journal of Cell Biology*

Figure n°28 : Fzo1p est nécessaire pour la fusion mitochondriale au cours de la conjugaison.

Deux populations de levures portant une mutation thermosensible sur le gène *FZO1* et exprimant une GFP adressée à la mitochondrie (mito-GFP) ou incubées en présence Mito-tracker rouge ont été mélangées à 25°C, (A-D) et à 37°C (E-H). La morphologie des zygotes obtenus est visualisée par microscopie en contraste de phase (A et E). La distribution de la mito-GFP (vert, B et F) et du MitoTracker (rouge, C et G) a été visualisée par microscopie à fluorescence confocale. D et H : images superposées.

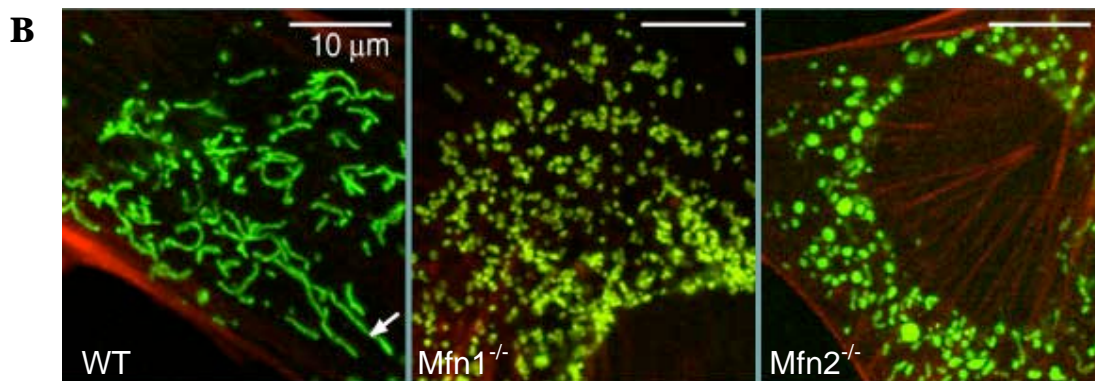
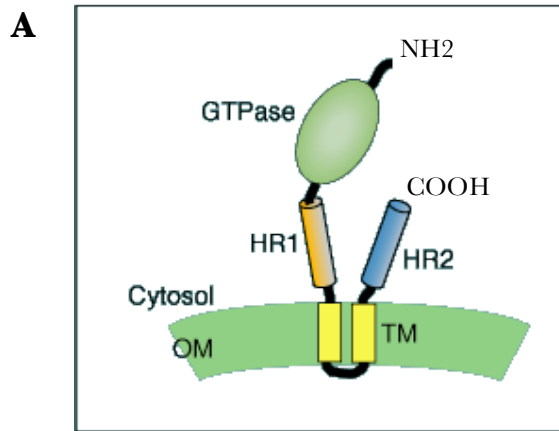
fermentable. Les levures $\Delta fzo1$ sont incapables de fusionner *in vivo* leurs mitochondries après la conjugaison (*figure n°28*) (Hermann et al, 1998). Des tests de fusion réalisés *in vitro* sur des mitochondries isolées, montrent que Fzo1p est nécessaire « en trans », sur les deux mitochondries, pour permettre la fusion de leurs membranes externes (Meeusen et al, 2004). La fonction de Fzo1p dépend de son activité GTPase puisque des mutants de ce domaine ne complémentent ni le déficit de croissance sur milieu respiratoire ni le défaut de morphologie mitochondriale de la levure $\Delta fzo1$ (Hermann et al, 1998). De même, les mutations de la région localisée dans l'espace inter-membranaire entre les deux domaines trans-membranaires provoquent la perte de fonction de la protéine *in vivo* (Fritz et al, 2001). La délétion du gène *DNMI* dans les levures délétées ou mutées pour le gène *FZO1* supprime la fragmentation mitochondriale et la perte d'ADNmt (Bleazard et al, 1999; Sesaki & Jensen, 1999).

Le turn-over de Fzo1p est contrôlé par sa dégradation dépendante de la protéine Mdm30p mais indépendante du protéasome et joue un rôle essentiel pour contrôler la fusion des mitochondries au cours de la croissance végétative des levures. Dans des levures arrêtées en phase G1 par la phéromone α , Fzo1p est dégradée par un processus impliquant son ubiquitinylation et le protéasome 26S ce qui conduit à la fragmentation des mitochondries (Escobar-Henriques et al, 2006; Fritz et al, 2003; Neutzner & Youle, 2005).

c. Les mitofusines chez les mammifères

Il existe chez les mammifères deux homologues de Fzo1p de levure : les mitofusines 1 (MFN1) et 2 (MFN2) (Rojo et al, 2002; Santel et al, 2003). Les deux protéines montrent suivant les espèces 62 à 66% d'identité entre elles. Elles présentent 12% d'identité avec Fzo1p chez la levure et leur expression ne complémente pas la délétion de *FZO1* chez la levure, suggérant l'existence de divergences évolutives (Santel et al, 2003).

MFN1 et MFN2 sont des GTPases, de 741 et 757 résidus respectivement chez l'homme, ancrées à la membrane externe mitochondriale grâce à deux domaines trans-membranaires localisés en partie C-terminale de la protéine (Rojo et al, 2002; Santel & Fuller, 2001). Une grande région amino-terminale de la protéine comprenant le domaine GTPase et un motif coiled-coil (HR1 pour Hepta peptide Repeat), ainsi qu'une courte région carboxy-terminale comprenant un second motif coiled-coil (HR2) sont localisées dans le cytosol (*figure n° 29A*) (Rojo et al, 2002).



Chen 2003 JCB

Figure n°29 : Les Mitofusines chez les mammifères.

(A) Représentation schématique de la structure et de la topologie des Mitofusines. (B) Le réseau mitochondrial de fibroblastes sauvages (WT), *Mfn1*^{-/-} ou *Mfn2*^{-/-} est visualisé grâce à une EYFP (en vert) adressée à la mitochondrie. Le cytosquelette d'actine est marqué en rouge grâce à la phalloïdine couplée à la rhodamine.

Les fibroblastes embryonnaires de souris délétées pour les gènes *Mfn1* et *Mfn2* (MEFs *Mfn1*^{-/-} et *Mfn2*^{-/-}) perdent totalement l'activité de fusion mitochondriale, ce qui aboutit à une morphologie mitochondriale extrêmement fragmentée, réduit la capacité respiratoire des cellules et ralentit leur croissance (Chen et al, 2005). Le taux de fusion mitochondriale de cellules *Mfn1*^{-/-} *Mfn2*^{-/-} avec des cellules sauvages est également nul révélant la nécessité pour la fusion de la présence d'au moins une mitofusine sur chacune des mitochondries adjacentes. En accord avec cela, les mitofusines sont capables d'interagir en trans de manière homotypique (MFN1-MFN1, MFN2-MFN2) et hétérotypique (MFN1-MFN2) grâce à leur domaine HR2 (Koshiba et al, 2004). Cette dimérisation permet l'accolement des mitochondries, étape clé qui précède la fusion des bicouches lipidiques (Chen et al, 2005; Detmer & Chan, 2007a). L'activité GTPase des Mitofusines est cruciale pour leur activité fusogène (Chen et al, 2003; Eura et al, 2003; Ishihara et al, 2004; Santel et al, 2003). L'expression d'un mutant dominant négatif du domaine GTPase de MFN1 provoque la fission des mitochondries par l'inhibition de la fusion (Chen et al, 2003; Santel et al, 2003).

Un taux réduit de fusion est maintenu dans les MEFs *Mfn1*^{-/-} ou *Mfn2*^{-/-} (Chen et al, 2005; Chen et al, 2003). La surexpression de MFN1 ou de MFN2 respectivement dans des MEFs *Mfn2*^{-/-} ou *Mfn1*^{-/-} permet de restaurer une morphologie mitochondriale tubulaire. Ces observations laissent supposer un certain degré de redondance entre les deux protéines. Cependant plusieurs différences sont observées. L'invalidation des gènes *Mfn1* et *Mfn2* n'a pas la même conséquence. Les patrons d'expression des deux mitofusines sont différents ; alors que la protéine MFN1 est détectée à des niveaux comparables dans différents tissus, MFN2 est présente en quantité supérieure dans le cœur, les muscles squelettiques et le cerveau (Santel et al, 2003). L'extinction de *MFN1* conduit à la formation de mitochondries sphériques, libres dans le cytosol, de taille homogène correspondant au diamètre des tubules, alors que l'extinction de MFN2 conduit à des mitochondries sphériques, associées au cytosquelette, de taille très hétérogène (*figure n° 29B*) (Chen et al, 2003). La protéine recombinante MFN1 hydrolyse très rapidement le GTP et présente une très faible affinité pour le GTP, alors que MFN2 présente une activité GTPase très faible mais une très grande affinité pour ce nucléotide (Ishihara et al, 2004). *In vitro*, MFN1 semble jouer un rôle plus important que MFN2 dans la juxtaposition des mitochondries, une étape GTP dépendante (Ishihara et al, 2004). Enfin, une petite fraction de MFN2 (environ 7% de la quantité totale), et non de MFN1, est localisée au réticulum endoplasmique et joue un rôle essentiel dans l'interaction physique entre cet organelle et les mitochondries (de Brito & Scorrano, 2008). L'absence de MFN2 abolit les contacts réticulum endoplasmique-mitochondries, perturbe l'homéostasie

calcique et induit la fragmentation du réticulum endoplasmique. Enfin, contrairement à MFN1, MFN2 a été également impliquée dans le métabolisme oxydatif (Bach et al, 2003; Pich et al, 2005) et l'apoptose (Sugioka et al, 2004).

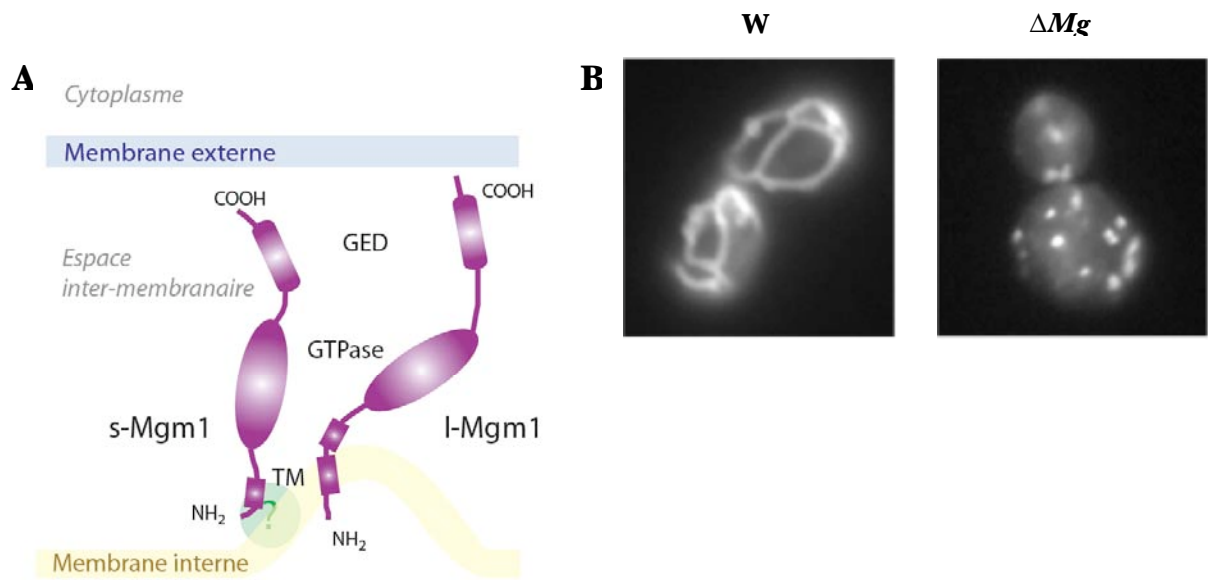
Les Mitofusines sont importantes pour le développement embryonnaire précoce chez la souris ; leur perte provoque une létalité embryonnaire à mi-gestation (Chen et al, 2003) Les souris *Mfn2*^{-/-} contrairement aux souris *Mfn1*^{-/-} présentent un défaut du placenta (Chen et al, 2003). Cependant, l'ablation conditionnelle de *Mfn1* dans l'intégralité de l'embryon, à l'exception des cellules placentaires, empêche la létalité embryonnaire et ces souris restent viables et fertiles, pendant au moins un an. Dans ces conditions, l'ablation conditionnelle de *Mfn2* induit des défauts de mouvement et de développement cérébral, et une altération majeure des cellules de Purkinje; 33% des nouveau-nés meurent 1 jour après la naissance et le reste environ 17 jours après (Chen et al, 2007). L'ablation conditionnelle de *Mfn1* dans le cervelet induit une réduction dramatique du nombre d'épines dendritiques des cellules Purkinje et de la taille du cervelet due à la dégénérescence ultérieure de ces cellules (Chen et al, 2007).

Une soixantaine de mutations du gène codant pour la Mitofusine 2 sont responsables d'une forme axonale (forme 2A) à transmission autosomique dominante de la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT), une des maladies neurologiques héréditaires les plus courantes (1 personne sur 2 500) (Cartoni & Martinou, 2009; Zuchner et al, 2004). Elle est caractérisée par une atteinte évolutive des nerfs périphériques transmettant les influx nerveux de la moelle épinière aux muscles, entraînant une amyotrophie distale généralement plus prononcée aux jambes et parfois associée à des troubles sensitifs.

3.1.2. Mgm1p/Msp1p/OPA1

a. Mgm1 chez la levure *S. cerevisiae*

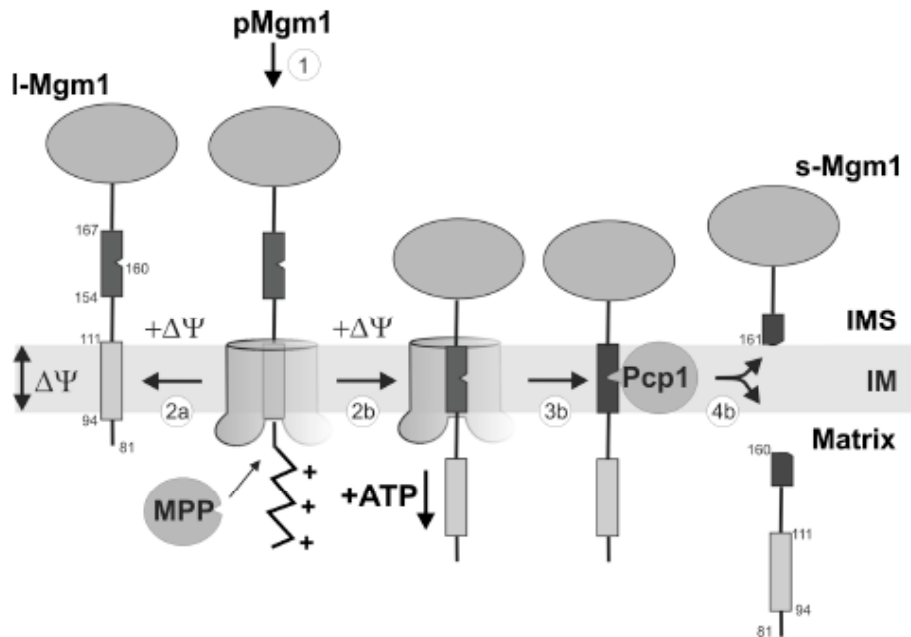
Mgm1 (mitochondrial genome maintenance) est une dynamine apparentée identifiée chez la levure *S. cerevisiae* dans deux cribles génétiques visant à identifier de nouveaux acteurs impliqués dans le maintien de l'ADNmt (Jones & Fangman, 1992) ou dans la transmission et la morphologie des mitochondries (Berger & Yaffe, 1996). La protéine Mgm1p (902 résidus) possède, en N-terminal, une séquence d'adressage à la mitochondrie (MIS) suivie de deux



Matrice
Guillou 2005 Thèse, Sesaki 2003 Mol Biol Cell

Figure n°30 : Mgm1p chez *S. cerevisiae*.

(A) La topologie des différentes isoformes de Mgm1p est schématisée. s-Mgm1p et l-Mgm1p sont respectivement, associée et ancrée dans la membrane interne. TM : domaine trans-membranaire, GED : GTPase Effector Domain. (B) La fragmentation du réseau mitochondrial, dans une levure $\Delta mgm1$ est visualisée grâce à une GFP adressée à la mitochondrie (droite) en comparaison à la levure sauvage (gauche).



Herlan 2004 JBC

Figure n°31 : Modèle d'import et de maturation de Mgm1p chez *S. cerevisiae*.

La translocase Tim23p est dessinée en gris. Les domaines trans-membranaires sont schématisés par un rectangle gris (TM1) et noir (TM2). Les nombres indiquent l'ordre des évènements. IMS : espace inter-membranaire, IM : membrane interne, $\Delta\Psi$: potentiel de membrane, MPP : mitochondrial processing peptidase, pMgm1 : précurseur de Mgm1p, l-Mgm1 et s-Mgm1, respectivement, forme longue et forme courte de Mgm1p.

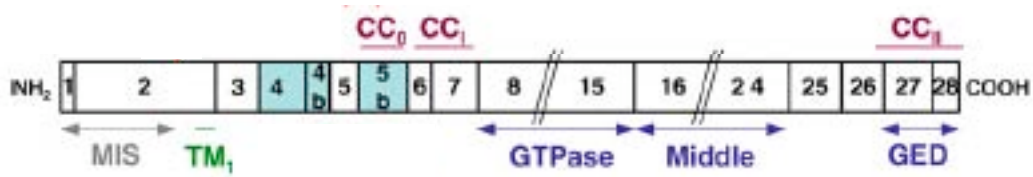
domaines trans-membranaires, un domaine GTPase, un domaine middle et un domaine GED (GTPase Effector Domain) C-terminal.

Mgm1p se présente dans la levure sous 2 formes localisées dans l'espace inter-membranaire et associées à la membrane interne (Herlan et al, 2003; Sesaki et al, 2003b; Wong et al, 2000; Wong et al, 2003) (*figure n°30A*). Ces deux isoformes sont produites de façon indépendante par clivage protéolytique intra-mitochondrial (Herlan et al, 2003) (*figure n°31*). Le précurseur de la protéine Mgm1p (p-Mgm1p) est importé dans la mitochondrie grâce à son signal d'import N-terminal (MIS). Il traverse la membrane externe grâce à la translocase TOM, puis la membrane interne grâce à la translocase Tim23p. Dans la matrice, le MIS est clivé par la peptidase matricielle MPP (Mitochondrial Processing Peptidase). Le transfert vers la matrice est « stoppé » par le premier segment trans-membranaire, selon le modèle du « stop-transfert » (Neupert & Brunner, 2002), et la protéine est alors transférée latéralement dans la membrane interne où elle est ancrée (Herlan et al, 2004) générant la forme longue de Mgm1p (l-Mgm1p) (Herlan et al, 2003). La forme courte de Mgm1p (s-Mgm1p) est elle générée par le clivage successif du précurseur par la MPP puis par la protéase Pcp1p (Herlan et al, 2003; McQuibban et al, 2003; Sesaki et al, 2003a; van der Blik & Koehler, 2003) de la famille Rhomboïde au niveau du second domaine trans-membranaire. Au cours de la translocation de p-Mgm1p à travers la membrane interne, le complexe PAM en présence d'ATP tirerait la protéine vers la matrice, qui serait alors arrêtée au niveau du second domaine trans-membranaire exposant le site de clivage de Pcp1p dans la membrane interne et permettant le clivage qui génère s-Mgm1p (Herlan et al, 2004). La petite forme serait au final associée à la membrane interne faisant face à l'espace inter-membranaire. L'étude de la distribution des isoformes de Mgm1p en microscopie électronique a révélé que l-Mgm1p serait préférentiellement accumulée au niveau des crêtes et s-Mgm1p au niveau de la membrane interne sous-jacente à la membrane externe (Zick et al, 2009a). Contrairement à la délétion du gène *PCP1*⁺ qui provoque la disparition de la forme courte de Mgm1p, la délétion des protéases, Prd1p, Hsp78p, Yta6p, Yta10p, Yta12p, Pim1p, Imp1p, Imp2p, Mip1p, Yme1p, Ynl123wp et Ypl246cp, n'affecte pas le clivage de la dynamine. La composition en phospholipides de la membrane mitochondriale est cruciale pour le clivage de Mgm1p dans la membrane interne (Osman et al, 2009). En effet, la délétion des gènes *GEPI*⁺ et *UPSI*⁺, qui régulent de façon coordonnée les niveaux de cardiolipine (CL) et de phosphatidylethanolamine (PE) dans les membranes mitochondriales, diminue la quantité de forme courte de Mgm1p (Herlan et al, 2003; Voelker, 2005). De même, la délétion des gènes *PSDI*⁺ (phosphatidylserine [PS] decarboxylase) et à moindre mesure *CRDI*⁺ (CL synthase)

affecte le clivage de Mgm1p. Il faut noter que l'influence de Ups1p sur le clivage de Mgm1p n'a lieu qu'en milieu respiratoire (Sesaki et al, 2006).

La délétion de *MGMI*, ou sa mutation, chez la levure *S. cerevisiae* entraîne la fragmentation des mitochondries, la perte de l'ADNmt (Jones & Fangman, 1992; Meeusen et al, 2006; Sesaki et al, 2003b; Shepard & Yaffe, 1999; Wong et al, 2000; Wong et al, 2003), ainsi qu'une déstructuration des crêtes qui apparaissent rares longues et déformées (Wong et al, 2000). L'ensemble de ces phénotypes est reversé par la délétion du gène *DNMI*⁺ codant pour un acteur de fission (Sesaki et al, 2003b) (Wong et al, 2003). Le taux de fusion des mitochondries des levures *mgm1* thermosensibles à température restrictive ou des levures Δ *mgm1* est nul (Sesaki et al, 2003b; Wong et al, 2000; Wong et al, 2003) et n'est pas rétabli par l'expression de mutant des domaines GTPase et GED contrairement à l'expression d'une protéine sauvage (Shepard & Yaffe, 1999; Wong et al, 2003). Au contraire, l'expression conjointe des deux mutants permet de compléter la délétion du gène *MGMI* suggérant que Mgm1p peut oligomériser comme les dynamines conventionnelles (Wong et al, 2003). Cette hypothèse a été vérifiée grâce à des expériences de co-immunoprécipitation qui ont révélé l'existence de complexes homotypiques et hétérotypiques entre les isoformes longue et courte de Mgm1p (Zick et al, 2009a). L'oligomérisation en trans de deux protéines Mgm1p localisées sur des mitochondries adjacentes, ayant préalablement fusionnées leur membrane externe, est requise pour rapprocher les deux membrane internes et induire leur fusion (Meeusen et al, 2006).

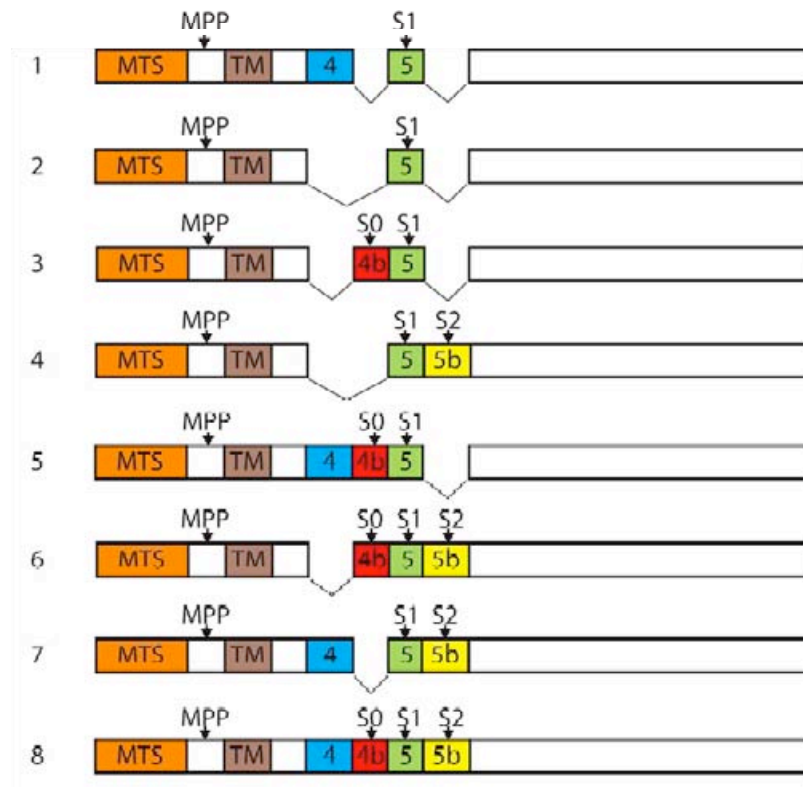
La complémentation des effets de la délétion du gène *MGMI*⁺ sur la morphologie des mitochondries et le maintien du génome mitochondrial nécessite l'expression des deux isoformes l- et s- de Mgm1p (Herlan et al, 2003; Zick et al, 2009a). Cependant l'activité GTPase de la forme courte, et pas celle de la forme longue, est requise (Zick et al, 2009a). En accord avec ces résultats, seule la forme courte recombinante purifiée présente une activité GTPase quand elle est associée à des liposomes; la présence de forme l-Mgm1p pouvant stimuler cette activité GTPase (DeVay et al, 2009). Dans un modèle récemment proposé, l'hétérodimère l- et s-Mgm1p constitue une unité fonctionnelle pour la fusion des membranes au sein de laquelle le rôle de l-Mgm1p ancrée à la membrane interne est d'amener la forme courte à la membrane pour qu'elle y exerce son rôle sur la fusion de membrane GTP-dépendante (DeVay et al, 2009).



Landes 2010 Sem Cell & Dev Biol

Figure n°32 : Représentation schématique de la protéine OPA1.

Trois domaines, GTPase, Middle et GED (coiled-coil II, CC_{II}) sont communs aux différents membres de la famille dynamine. Une séquence d'adressage à la mitochondries (MIS) suivie par un domaine trans-membranaire (TM₁) situés en partie N-terminale sont spécifiques de OPA1. Deux domaines coiled-coil supplémentaires, CC₀, CC_I sont respectivement localisés dans les exons 5b et les exons 6 et 7.



Song 2007 JCB

Figure n°33 : Représentation schématique des 8 variants d'épissage humaines de la protéine OPA1.

Les 8 variants d'épissage diffèrent par la présence ou non des exons 4, 4b et 5b. Le clivage du signal d'import à la mitochondrie (MTS) localisé en amont du domaine trans-membranaire (TM) par la peptidase matricielle (MPP) génère les isoformes longues de OPA1. Les clivages au niveau des sites S0, S1 et S2 mènent aux isoformes courtes.

b. Msp1p chez la levure *S. pombe*

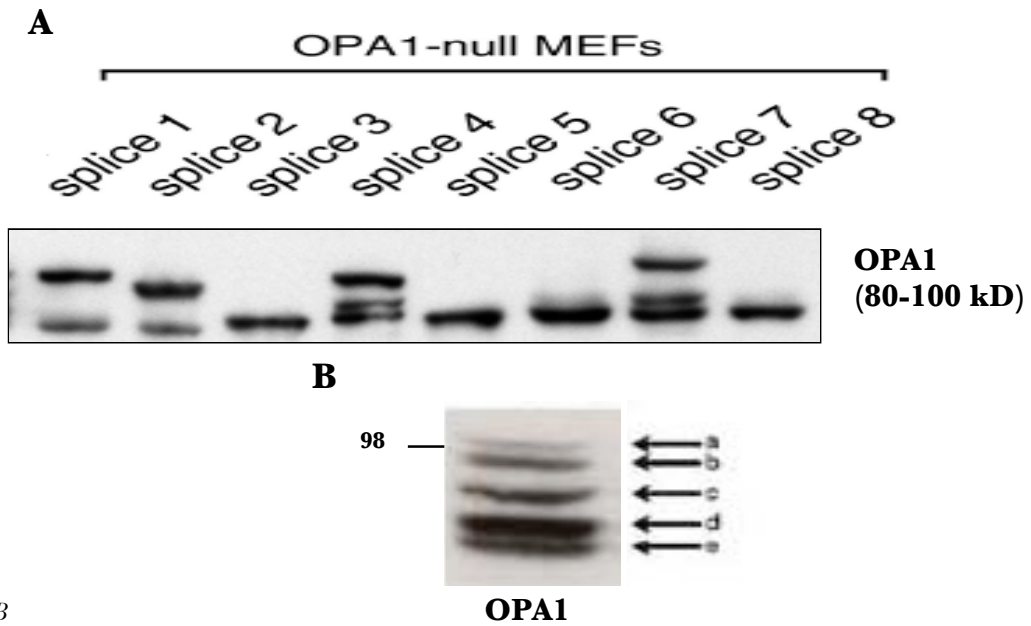
L'homologue de Mgm1p chez la levure *S. pombe*, Msp1p, a été découvert au laboratoire. Ses caractéristiques sont décrits dans la section résultat (voir paragraphe 3)

c. OPA1 chez les mammifères

Le gène OPA1 (Optic atrophy 1) codant pour l'homologue humain de Mgm1p/Msp1p a été identifié au laboratoire (Delettre et al, 2000). La fonction de cette protéine a été conservée au cours de l'évolution puisque malgré seulement 19% d'identité, l'expression du gène *OPA1*, restaure la viabilité d'une levure *S. pombe* délétée du gène *msp1⁺* (Lenaers et al, 2002; Olichon et al, 2007). Les mutations de OPA1 sont responsables d'une neuropathie optique : l'atrophie optique dominante de type 1 (Alexander et al, 2000; Delettre et al, 2000). Cette pathologie est liée à la dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine qui forment le nerf optique. L'organisation de la protéine humaine est assez proche de celle de la levure, puisqu'elle présente trois domaines conservés : un domaine GTPase central, un domaine middle et un domaine coiled-coil carboxy-terminal (CC-II) considéré comme le domaine effecteur de GTPase (GED) (*figure n°32*). En partie N-terminale un signal d'import mitochondrial (MIS) est suivi par un domaine hydrophobe potentiellement trans-membranaire (TM1) et par un domaine coiled-coil (CC-I) (Griparic et al, 2004; Misaka et al, 2002; Olichon et al, 2002). Ce dernier domaine est situé en aval d'exons alternativement épissés (voir ci-dessous). Les deux domaines CC-I et CC-II pourraient être responsables de la formation de complexes homotypiques d'OPA1 (Akepati et al, 2008).

La protéine OPA1 se localise dans l'espace inter-membranaire, ancrée à la membrane interne mitochondriale (Griparic et al, 2004; Ishihara et al, 2006; Misaka et al, 2002; Olichon et al, 2002; Satoh et al, 2003). En microscopie électronique, l'immuno-détection de la protéine montre qu'elle est enrichie au niveau des crêtes mitochondriales (Griparic et al, 2004; Olichon et al, 2002). Elle a également été retrouvée associée à la membrane externe mitochondriale (Satoh et al, 2003).

Le gène *OPA1* humain comprend 31 exons, dont 3 (exons 4, 4b et 5b) sont alternativement épissés (Delettre et al, 2001) générant 8 ARN messagers différents (*figure n°33*). Ces transcrits sont ubiquitairement exprimés, et des variations de leur abondance ont été décrites suivant les tissus (Alexander et al, 2000; Delettre et al, 2000; Misaka et al, 2002).

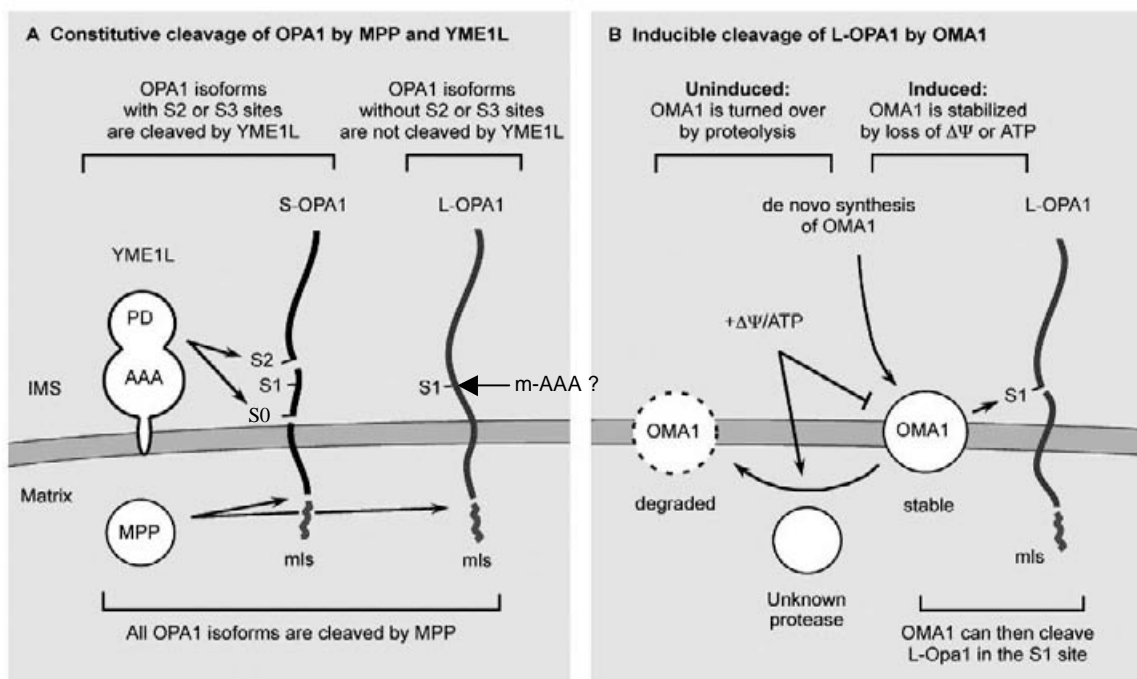


Song 2007 JCB

Olichon 2007 Cell Death and Differentiation

Figure n°34 : Les différentes isoformes protéique d'OPA1.

A) Immuno-détection d'OPA1 dans les MEFs invalidés pour OPA1 et transfectés par chacun des 8 variants d'épissage. (B) Immuno-détection d'OPA1 à partir d'un extrait protéique total de cellules HeLa.



Head 2009 JCB

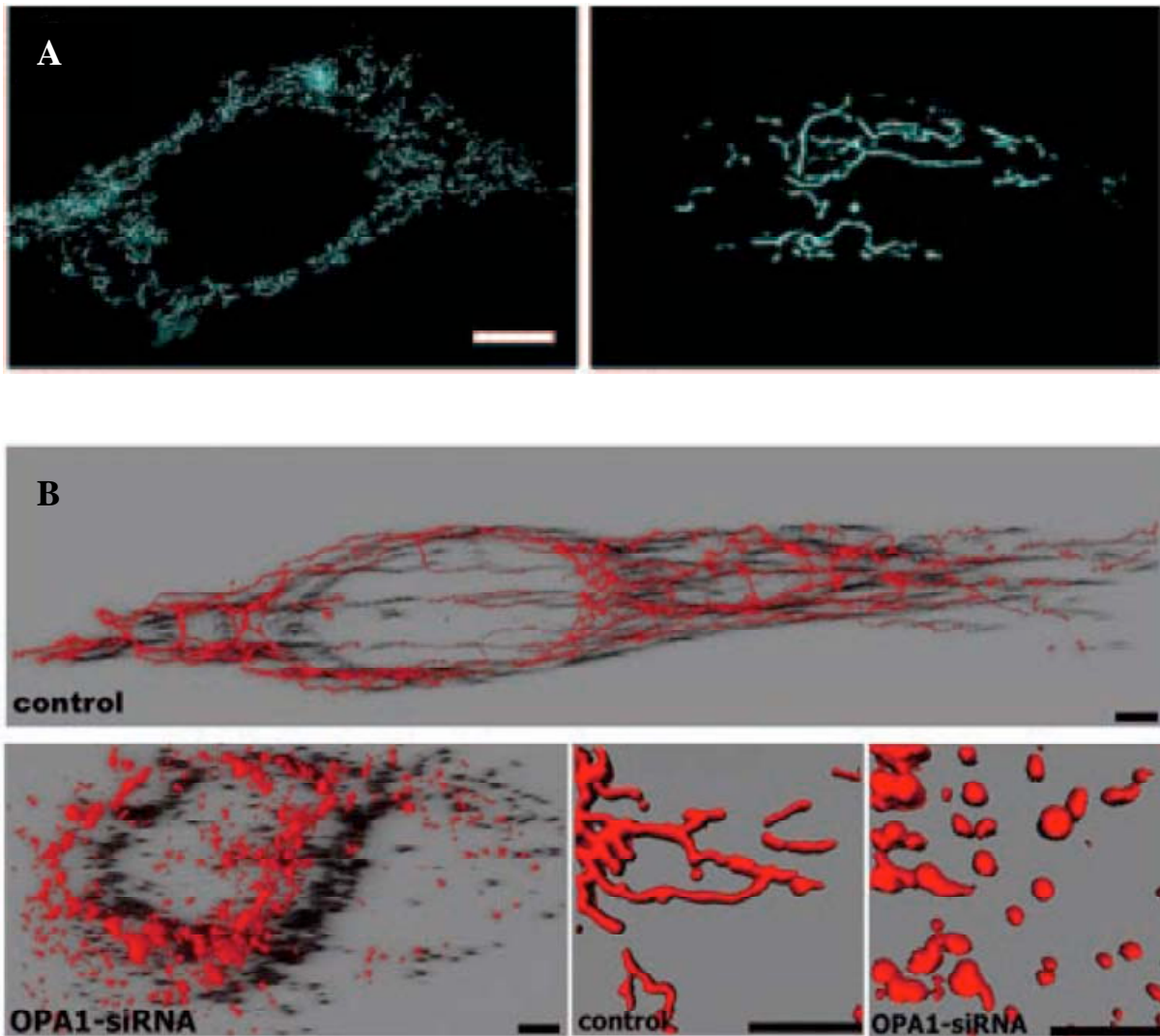
Figure n°35 : Modèle du clivage protéolytique OPA1.

Après le clivage au niveau de la séquence MIS par la protéase MPP, les variants d'OPA1 portant l'exon 4b ou 5b contenant respectivement les sites de clivages S0 ou S2 sont constitutivement clivés par la protéase YME1 (A). Alors qu'il existe un certain degré de clivage constitutif au niveau du site S1 commun à tous les variants, ce site est la cible du clivage par OMA1 induit par la perte du $\Delta\Psi$, la diminution de quantité d'ATP ou l'apoptose. Dans ces situations, toutes les formes longues d'OPA1 seront clivées par la protéase OMA1.

Chacun des 8 variants d'épissage génère 1 à 3 isoformes protéiques (Song et al, 2007) (*figure n°34A*). Dans les cellules HeLa, les variants 1 et 7 sont majoritairement exprimés et cinq isoformes protéiques d'OPA1, deux longues (isoformes a et b) et trois courtes (isoformes c, d et e), sont détectées par Western-blot en condition physiologique (*figure n°34B*). L'analyse des 5 bandes d'OPA1 par spectrométrie de masse a révélé que les deux isoformes a et b correspondent respectivement aux formes longues des variants 1 et 7 clivées en position N87/F88, alors que les isoformes c, d et e résultent d'un clivage protéolytique additionnel (Akepati et al, 2008; Ishihara et al, 2006). Trois sites de clivage ont été proposés : S1 situé dans l'exon 5 (R194/A195), S2 dans l'exon 5b (autour des positions ²¹⁷LQQQIQE²²³) (Ishihara et al, 2006) et S0 présent dans l'exon 4b (*figure n°33*) (Griparic et al, 2007; Song et al, 2007). La présence du site S0 empêche le clivage dans l'exon 5 (Olichon et al, 2007; Song et al, 2007).

Quatre types de protéases ont été impliquées dans le clivage d'OPA1 : les m-AAA et i-AAA protéases et les protéases PARL (Presenilin-Associated Rhomboid-Like protease) et OMA1 (*figure n°35*). Les m-AAA protéases sont des métalloprotéases ATP-dépendantes ancrées à la membrane interne de la mitochondrie et qui exposent leurs sites actifs vers la matrice mitochondriale (Langer et al, 2001). Chez les mammifères, il existe 3 types de m-AAA protéases, la Paraplégine, AFG3L1 et AFG3L2 qui forment des homo- ou hétéro-oligomères. La surexpression de la Paraplégine augmente le clivage d'OPA1 au niveau de S1, alors qu'une diminution de son expression par interférence à l'ARN ou la délétion de son gène, *Spg7*, dans des fibroblastes de souris ne modifie pas le patron de la protéine OPA1 (Duvezin-Caubet et al, 2007; Guillery et al, 2008; Ishihara et al, 2006). Chez *S. cerevisiae*, la délétion des deux homologues de la Paraplégine, *Δyta10* ou *Δyta12*, inhibe le clivage de la dynamine humaine exprimée de façon ectopique. Ce clivage est restauré en exprimant AFG3L1 et AFG3L2 alors que l'expression ectopique de Paraplégine n'a pas d'effet (Duvezin-Caubet et al, 2007; Ishihara et al, 2006). Récemment il a été montré que la déplétion de AFG3L1 et AFG3L2, affecte l'accumulation des isoformes longues d'OPA1 révélant un rôle pour ces protéases dans la stabilisation de l-OPA1 (Ehses et al, 2009). Les prohibitines, qui régulent l'activité des m-AAA protéases, affectent également le clivage d'OPA1 (Merkwirth & Langer, 2009). En effet, les isoformes courtes de la dynamine s'accumulent au détriment des isoformes longues dans les fibroblastes de souris invalidés pour *PHB2* (Merkwirth et al, 2008).

La deuxième protéase impliquée dans le clivage d'OPA1 est YME1, une i-AAA protéase localisée dans la membrane mitochondriale interne et dont le domaine catalytique fait face à l'espace inter-membranaire (IMS) (Langer et al, 2001; Shah et al, 2000).



Cipolat 2004 PNAS, Olichon 2003 JBC

Figure n°36 : Effet de la surexpression et de l'extinction d'OPA1 sur la morphologie des mitochondries.

(A) Réseau mitochondrial, visualisé par microscopie confocale grâce à une CFP adressée à la mitochondrie, de MEFs sauvage (à gauche) ou surexprimant OPA1 (à droite). Barre de calibration = 15 μ m. (B) Reconstructions tri-dimensionnelle du réseau mitochondrial, visualisé par microscopie confocale grâce à des anticorps dirigés contre HSP60, de cellules HeLa contrôles (control) ou déplétées en OPA1 (OPA1-siRNA). Barres de calibration = 1 μ m.

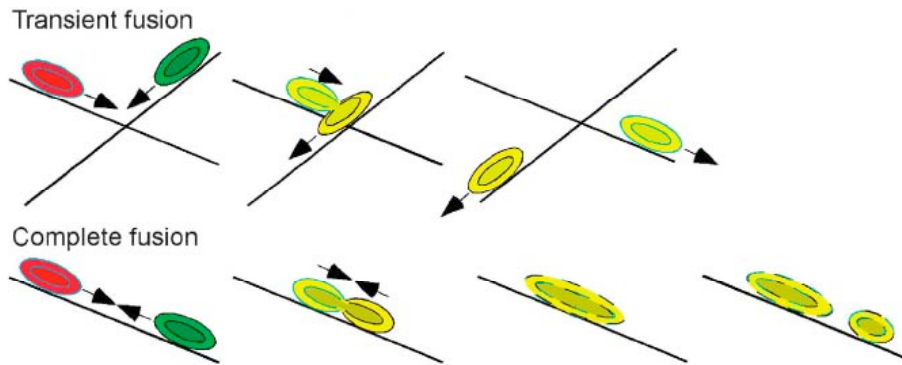
YME1L est impliquée dans le clivage d'OPA1 au niveau des sites S0 et S2 (Griparic et al, 2007; Guillery et al, 2008; Song et al, 2007). Chez *S. cerevisiae*, la délétion du gène *YME1* n'affecte pas le clivage de la dynamine humaine ectopiquement exprimée (Duvezin-Caubet et al, 2007).

L'implication de PARL, l'homologue humain de Pcp1p, dans la maturation de OPA1 a également été proposée. À ce jour, le principal rôle identifié pour PARL est la génération d'une isoforme soluble d'OPA1 dans l'espace inter-membranaire, qui représente moins de 4% de la quantité totale d'OPA1 (Cipolat et al, 2006; Frezza et al, 2006). Cependant, la diminution de l'expression de PARL par interférence à l'ARN, ou la délétion de son gène chez la souris (*Parl^{-/-}*), ne change pas le profil global d'OPA1. Dans une levure surexprimant OPA1, la délétion du gène *PCP1* n'affecte pas ou peu le clivage d'OPA1 (Duvezin-Caubet et al, 2007).

Le clivage d'OPA1 ne se produit pas uniquement à l'état basal, mais est également induit par l'apoptose, une diminution de la quantité d'ATP ou la dissipation du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi$) (Baricault et al, 2007; Griparic et al, 2007; Guillery et al, 2008; Ishihara et al, 2006; Song et al, 2007). Il a été récemment montré que le clivage d'OPA1 induit par la dissipation du $\Delta\Psi$ ou l'apoptose est réalisé par la métalloprotéase ATP-dépendante OMA1 (Ehses et al, 2009; Head et al, 2009). De plus, cette protéase, en absence de m-AAA protéase, augmente le clivage d'OPA1 au niveau de site S1 (*figure n°35*), ce qui pourrait indiquer, contrairement aux données précédentes, que les m-AAA protéases régulent négativement la protéolyse d'OPA1 au site S1.

L'étude du gain et de la perte de fonction d'OPA1 ont mis à jour sa fonction dans la fusion mitochondriale, le remodelage des crêtes et l'apoptose.

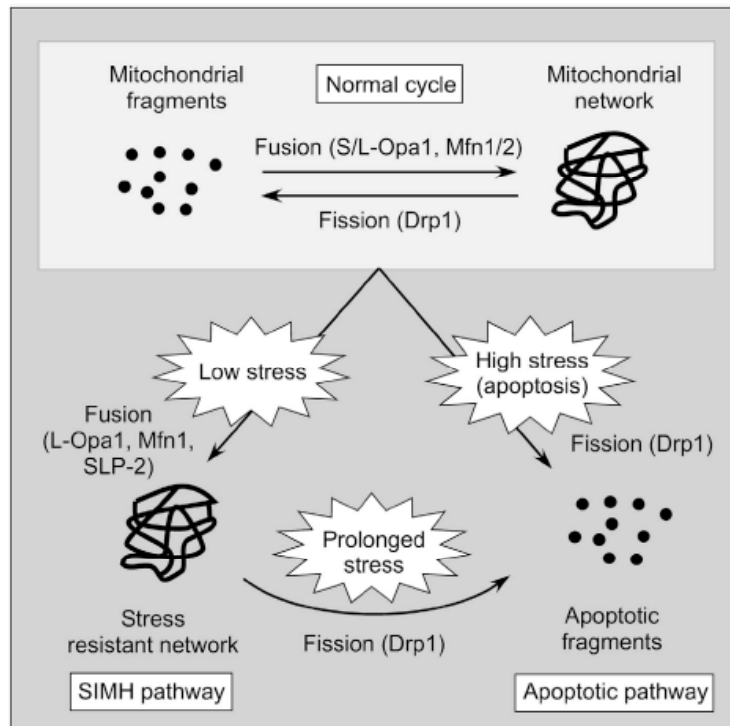
L'extinction de l'expression du gène *OPA1*, par interférence à l'ARN dans des cellules HeLa ou Cos-7, ou la délétion du gène *OPA1* dans les MEFs, provoque la fragmentation du réseau mitochondrial (*figure n°36*) (Griparic et al, 2007; Griparic et al, 2004; Olichon et al, 2003; Song et al, 2007). Au contraire, la surexpression d'OPA1 dans les MEFs ou les NIH3T3, qui présentent des mitochondries ponctiformes, conduit à la formation d'un réseau filamenteux et interconnecté (Cipolat et al, 2004; Olichon et al, 2002). L'ensemble de ces résultats suggère un rôle de la dynamine dans la fusion mitochondriale. Cette hypothèse a été démontrée par la mise en évidence de l'incapacité des mitochondries des cellules privées d'OPA1 à fusionner leurs mitochondries (Arnoult et al, 2005a; Chen et al, 2005; Griparic et al, 2007). La surexpression d'OPA1 dans des cellules présentant les mitochondries tubulaires



Liu 2009 *The EMBO Journal*

Figure n°37 : La fusion mitochondriale.

Deux types de fusion ont été décrites : la fusion transitoire (en haut) et la fusion complète (en bas). Les microtubules sont représentés en gris, les contenus de l'espace inter-membranaire et matriciel sont marqués en vert et rouge et les contenus membranaires sont présentés en noir et bleu pour les mitochondries en interaction. La direction de mouvement des mitochondries est désignée par les



Van der Bliek 2009 *The EMBO Journal*

Figure n°38 : Réponse cellulaire à des différentes doses de stress.

En condition normale, la fission des membranes mitochondriales est médiée par DRP1 et la fusion des membranes mitochondriales par MFN1/2 et les deux isoformes longues et courtes de la dynamine OPA1 (panel de haut). En situation de stress important, les cellules déclenchent la voie d'apoptose et la fission des mitochondries par DRP1 (panel de bas, droite). En condition de faible niveau de stress, les cellules déclenchent la voie SIMH (Stress-induced mitochondrial hyperfusion) grâce à l'action de MFN1, des isoformes longues d'OPA1 et de SLP-2 pour fusionner intensément et générer un réseau mitochondrial hyper-filamenteux (panel de bas, gauche).

entraîne de façon surprenante la fragmentation des mitochondries (Griparic et al, 2004; Misaka et al, 2002) qui n'est néanmoins pas due à une inhibition de la fusion (Chen et al, 2005; Cipolat et al, 2004). Cette fragmentation pourrait être la conséquence d'une activation de la fission provoquée par un excès de fusion ou d'une grande quantité de protéine OPA1 favorisant la fusion dite transitoire. La « fusion dite transitoire » est liée à des interactions latérales entre des mitochondries associées à des microtubules distincts qui vont échanger rapidement et partiellement des éléments solubles sans affecter la morphologie mitochondriale (Liu et al, 2009) (*figure n°37*). Au contraire, la « fusion dite complète », qui a lieu entre des mitochondries qui se déplacent l'une vers l'autre le long d'un même microtubule, permet l'échange de tous les composants mitochondriaux et affecte la morphologie mitochondriale (*figure n°37*). Une diminution de l'expression d'OPA1 ou sa forte surexpression favorise la fusion transitoire au détriment de la fusion complète.

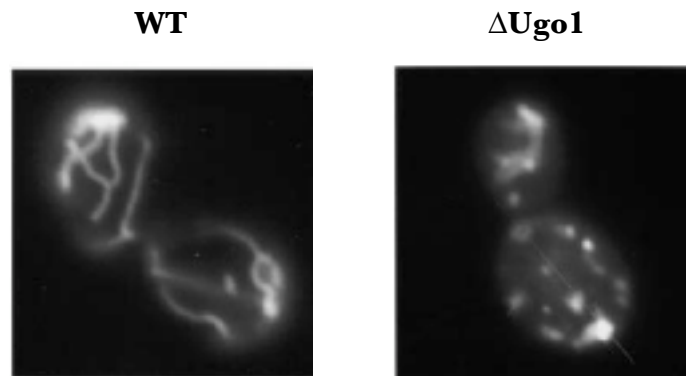
La maturation protéolytique d'OPA1 joue un rôle prépondérant dans la régulation de l'activité fusogène de la protéine. En effet, la disparition des formes longues de la protéine lors d'un traitement par un agent découplant (CCCP) conduit à la fragmentation des mitochondries, suggérant que les formes longues sont essentielles dans le processus de fusion mitochondriale (Guillery et al, 2008). Cependant des travaux menés sur des mutants des sites de clivages S1 et S2 d'OPA1 soulignent également l'importance des formes courtes de la protéine dans le contrôle de la morphologie des mitochondries (Duvezin-Caubet et al, 2006; Griparic et al, 2007; Song et al, 2007). La réintroduction de différents variants pouvant être ou non clivés dans des MEFs invalidées pour le gène *OPA1*, a définitivement montré qu'au moins une forme longue et une forme courte de la dynamine sont nécessaires pour la fusion des mitochondries (Song et al, 2007). Toutefois, contrairement à l'exigence de la présence des deux formes longue et courte dans des conditions normales, l'hyperfusion mitochondriale qui est induite dans certaines conditions de stress, requiert uniquement la présence de l-OPA1 (*figure n°38*) (Tondera et al, 2009).

Il a été récemment proposé qu'OPA1 comme ses orthologues de levure est impliquée dans la stabilité du génome mitochondrial (Amati-Bonneau et al, 2008; Hudson et al, 2008). Certaines mutations non-sens d'OPA1 provoquent l'accumulation de délétions multiples du génome mitochondrial dans le muscle squelettique chez les patients atteints de maladies mitochondriales (syndrome ADOA-1) (Amati-Bonneau et al, 2008; Hudson et al, 2008). Contrairement à la perte d'ADNmt en absence de Mgm1p et Msp1p, aucune déplétion d'ADN n'est observée dans les muscles squelettiques chez les patients atteints du syndrome ADOA-1. Il faut noter que le nombre de copies d'ADNmt est faiblement diminué dans les

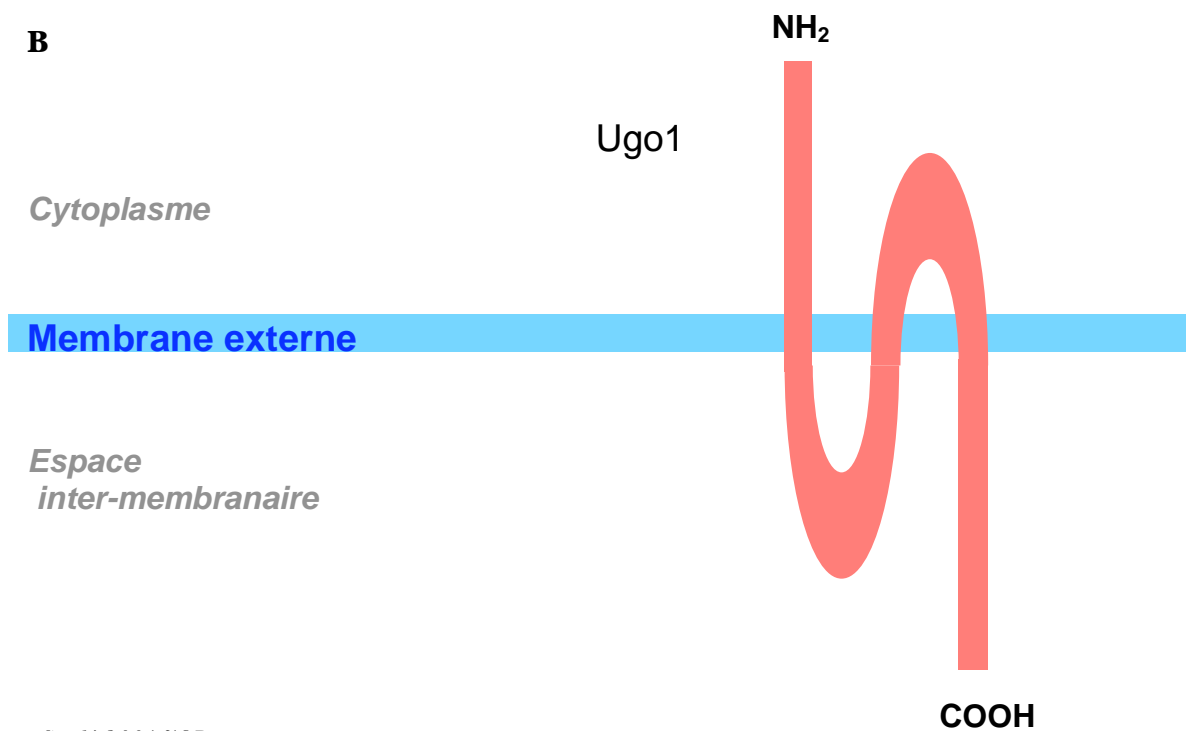
lymphocytes de ces patients (Kim et al, 2005). L'effet d'OPA1 sur l'ADNmt pourrait passer par son rôle sur la structuration des crêtes (Griparic et al, 2004; Olichon et al, 2003). L'inactivation d'OPA1 pourrait affecter l'ancrage d'ADNmt sur la membrane interne et en conséquence sa réplication, réparation et son expression.

L'extinction de l'expression d'OPA1 s'accompagne, sinon d'une mort spontanée des cellules, d'une sensibilité accrue de différentes lignées cellulaires à l'apoptose induite via des stimuli de la voie intrinsèque de l'apoptose (Arnoult et al, 2005a; Lee et al, 2004; Olichon et al, 2003). À l'inverse, la surexpression ectopique de la protéine protège les cellules de l'apoptose (Cipolat et al, 2004). Cet effet anti-apoptotique contrairement à l'effet fusogène sur les mitochondries, s'exerce toujours dans des MEFs invalidées pour le gène *Mfn1* (Cipolat et al, 2004). De plus, l'extinction spécifique des variants d'épissage d'OPA1 contenant l'exon 4 conduit à une inhibition de l'activité fusogène de la protéine sans affecter sa fonction anti-apoptotique (Olichon et al, 2007). Ces deux études démontrent que les deux fonctions de la protéine, fusion des mitochondries et maintien de la conformation des crêtes, sont indépendantes. En effet, des travaux récents montrent que le rôle d'OPA1 dans apoptose passe par sa capacité à structurer les crêtes. L'oligomérisation d'OPA1 contrôle la redistribution du cytochrome c de l'espace intra-crête vers l'espace inter-membranaire en contrôlant la jonction des crêtes (Frezza et al, 2006; Yamaguchi et al, 2008). En réponse à un stimulus apoptotique, les protéines « BH3-only » de la famille de Bcl-2 déstabilisent les oligomères d'OPA1, entraînant l'« ouverture » des jonctions de crêtes et par conséquent la mobilisation du cytochrome c dans l'espace inter-membranaire (Frezza et al, 2006; Yamaguchi et al, 2008). En accord avec l'implication d'OPA1 dans ce processus, une mutation mimant une conformation liée au GTP de la protéine (OPA1Q297V) (Misaka et al, 2002) empêche la dissociation des oligomères lors de l'apoptose, la modification du diamètre des jonctions de crêtes, bloque le relargage du cytochrome c et protège les cellules de l'apoptose (Yamaguchi et al, 2008). L'analyse de la nature de ces oligomères a permis de proposer l'implication dans cette fonction pro-apoptotique d'OPA1 d'une forme minoritaire de la protéine (environ 4% de la quantité totale), soluble dans l'espace inter-membranaire, et issue du clivage par la sérine protéase de la famille rhomboïde, PARL (Cipolat et al, 2006; Frezza et al, 2006). Une étude récente a montré que l'association d'OPA1 avec la cardiolipine, promeut son assemblage dans les oligomères (Ban et al).

A



B



Sesaki 2001 JCB

Hoppins 2009 The Journal of cell Biology

Figure n°39 : Ugo1p chez *S. cerevisiae*.

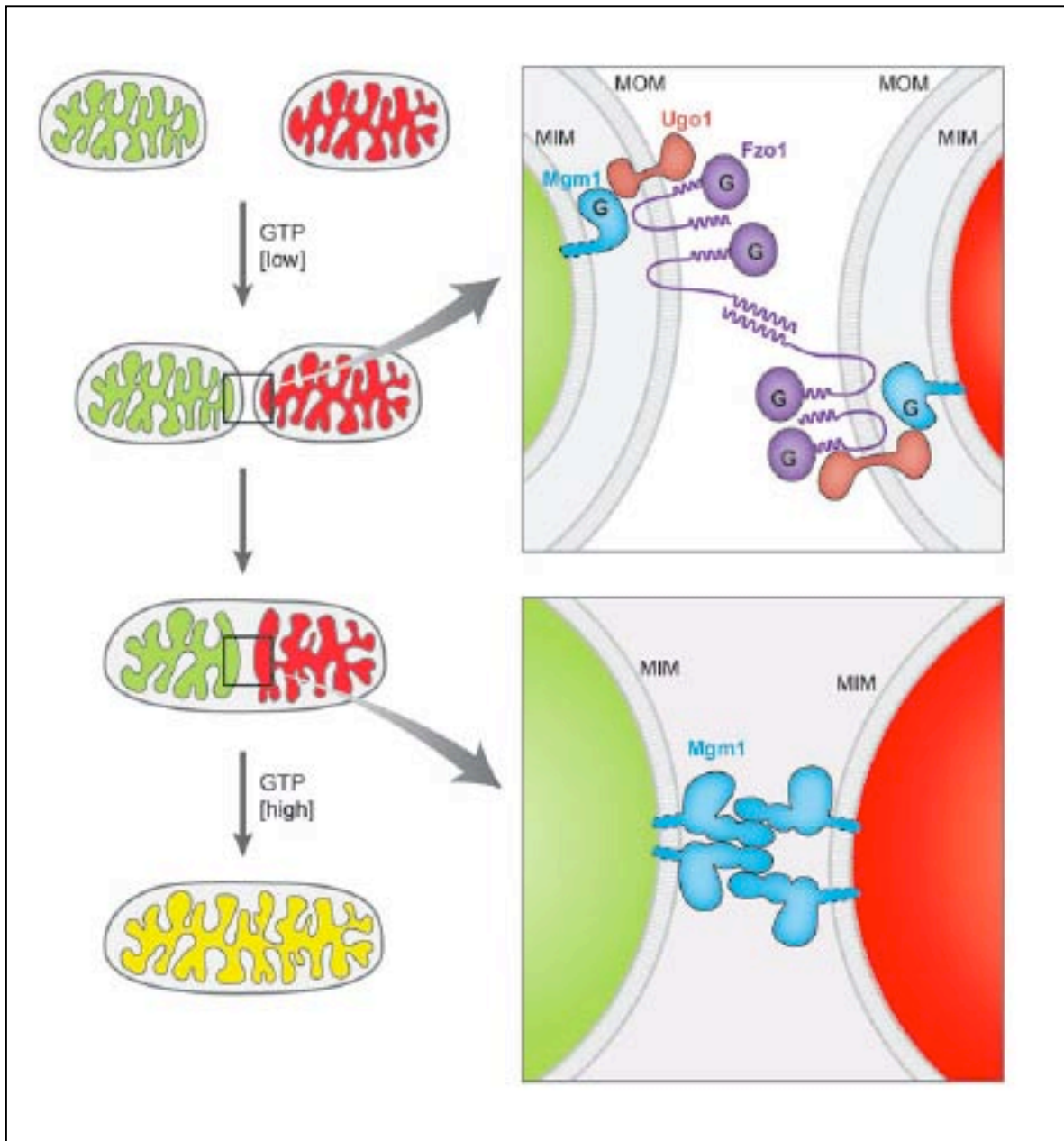
(A) La fragmentation du réseau mitochondrial, dans une levure déletée pour le gène *UGO1* ($\Delta ugo1$) visualisé grâce à une GFP adressée à la mitochondrie (droite) en comparaison à la levure sauvage (gauche). (B) Schéma de la topologie de Ugo1p.

Récemment, deux modèles murins portant une mutation au sein des exons 8 et 10 du gène OPA1, et menant à une réduction de 50% de la quantité de la protéine, ont été décrits (Alavi et al, 2007; Davies et al, 2007). Alors que les souris homozygotes pour cette mutation meurent *in utero* au cours de l'embryogenèse au stade E12,5, les souris hétérozygotes développent une neuropathie optique à évolution progressive et lente, une perte partielle des cellules ganglionnaires de la rétine au bout de 6 mois et une morphologie anormale des axones résiduels du nerf optique avec des défauts de myélinisation à l'âge de neuf mois.

3.1.3. Ugo1

Chez *Saccharomyces cerevisiae*, Ugo1p a été initialement identifiée comme une protéine essentielle à la fusion mitochondriale (Sesaki & Jensen, 2001). Des levures délétées pour le gène *UGO1* présentent un réseau mitochondrial fragmenté, sont incapables de fusionner leurs mitochondries et perdent leur génome mitochondrial (*figure n° 39A*). Ces phénotypes sont restaurés par la délétion du gène *DNMI* (Sesaki & Jensen, 2001). Ugo1p est une protéine ancrée à la membrane externe par trois domaines trans-membranaires (Hoppins et al, 2009) (*figure n° 39B*). Son extrémité N-terminale ainsi que la boucle entre les deuxième et troisième domaines trans-membranaires sont localisées dans le cytosol, alors que la boucle entre les premier et deuxième domaines trans-membranaires et son extrémité C-terminale sont situées dans l'espace inter-membranaire (Hoppins et al, 2009). Ugo1p co-immuno-précipite avec les deux autres acteurs majeurs de la fusion mitochondriale chez la levure, Fzo1p localisée à la membrane externe et Mgm1p à la membrane interne (Sesaki & Jensen, 2004; Sesaki et al, 2003b; Wong et al, 2003). Des expériences d'interaction par GST-pull down montrent que, *in vitro*, le domaine N-terminal cytoplasmique de Ugo1p interagit avec Fzo1p, alors que son domaine C-terminal inter-membranaire interagit avec Mgm1p (Sesaki & Jensen, 2004). Il a donc été proposé que Ugo1p puisse servir à coordonner la fusion des deux membranes mitochondriales. En effet, plusieurs mutants thermosensibles d'Ugo1p présentent des défauts de fusion des membranes externes ou internes mitochondriales (Hoppins et al, 2009). Ugo1p interviendrait dans une étape postérieure à l'étape d'accolement des membranes pour faciliter le mélange lipidique de chaque membrane mitochondriale (Hoppins et al, 2009).

Jusqu'à présent, aucun homologue humain d'Ugo1p n'a été identifié. Des immunoprécipitations, ont montré que les protéines MFN1, MFN2 et OPA1, sont présentes dans un complexe dans les mitochondries de mammifères (Guillery et al, 2008). MFN1 et



Hoppins 2007 *The Annual Review of Biochemistry*

Figure n°40 : Modèle du mécanisme de la fusion mitochondriale.

MFN2 possèdent une très courte boucle dans l'IMS, qui pourrait ne pas être suffisante pour contacter directement OPA1 sur la membrane interne, suggérant l'existence soit d'un homologue fonctionnel de Ugo1p soit d'une structure particulière qui rapproche membrane externe et membrane interne au niveau des sites de fusion.

3.2. Modèle proposé pour le complexe de fusion mitochondriale

La fusion de la membrane interne et celle de la membrane externe peuvent être découplées, bien qu'elle se déroulent la plupart du temps de façon coordonnée afin de garantir l'intégrité des compartiments sous-mitochondriaux (Malka et al, 2005; Meeusen et al, 2004). L'accolement de la membrane externe est effectué par interaction en trans des dynamines Fzo1p de deux mitochondries rapprochées. Une fois que les membranes externes fusionnées dans un processus impliquant l'activité GTPase de la dynamine, les deux membranes internes s'accrochent grâce à l'interaction en trans entre deux Mgm1p (*figure n°40*). La fusion des membranes internes, dépendante de l'activité GTPase de la dynamine, sera alors réalisée.

3.3. Autres acteurs ou régulateurs de la fusion mitochondriale

mitoPLD : L'extinction par interférence à l'ARN de MitoPLD, une phospholipase D mitochondriale, dans des cellules HeLa entraîne la fragmentation du réseau mitochondrial et affecte la fusion des mitochondries. MitoPLD induit, *in vitro* et *in vivo* dans des cellules NIH3T3, une modification du profil des lipides mitochondriaux avec une diminution de la quantité de la cardiolipide au profit de l'acide phosphatidique (Choi et al, 2006). Il est donc proposé que MitoPLD puisse modifier la composition et la courbure des bicouches lipidiques pour les rendre plus propices à la fusion, après juxtaposition des membranes externes de mitochondries voisines par les Mitofusines.

MIB (Mitofusin-binding protein): une nouvelle protéine de la superfamille des deshydrogénases réductases, a été identifiée comme partenaire des Mitofusines (Eura et al, 2006). La surexpression ectopique de cette protéine entraîne une fragmentation des mitochondries dépendante de l'intégrité de son domaine CBD (Coenzyme-Binding Domain)

et son extinction par interférence à l'ARN conduit à l'allongement des mitochondries, phénomène reversé par la déplétion de *MFN1*. MIB, comme MFN1, est largement exprimée dans tous les tissus analysés et contrôlerait la fusion des mitochondries en interagissant et en régulant MFN1 (Eura et al, 2006).

SLP-2 : En réponse à plusieurs stress cellulaires, tels qu'une irradiation aux UV, un traitement à l'actinomycine D ou à la cycloheximide, les mitochondries fusionnent intensément, générant un réseau mitochondrial hyperfilamenteux. Cette hyperfusion mitochondriale induite par le stress (SIMH) permet à la cellule de surmonter un stress transitoire via une augmentation de la production d'ATP (*figure n°38*) (Tondera et al, 2009). SLP-2 (Stomatin-Like Protein2), une protéine située dans l'espace inter-membranaire appartenant à la famille SPFH (Stomatin/Prohibitin/Flotillin/Hflk) joue un rôle essentiel au cours de ce processus en empêchant le clivage des formes longues d'OPA1 et ce indépendamment des Prohibitines 1 et 2 avec lesquelles elle peut interagir (Da Cruz et al, 2008). Il est à noter que SLP-2 avait précédemment été identifiée comme partenaire de MFN2 (Hajek et al, 2007).

Bax et Bak : En conditions physiologiques, BAX et BAK sont nécessaires pour la fusion mitochondriale en permettant l'assemblage de MFN2 en complexes de haut poids moléculaire (Karbowski et al, 2006). En effet, ces complexes sont de taille plus réduite et la fusion est altérée dans des MEFs déficients pour BAX et BAK présentant de ce fait des mitochondries moins longues et inter-connectées que des cellules sauvages. La surexpression de BAX dans des MEFs invalidés pour *bax* et *bak* rétablit la fusion des mitochondries en restaurant l'assemblage de MFN2 en complexes de haut poids moléculaire et sa localisation au niveau des sites de fusion de mitochondries. Paradoxalement, la surexpression de BAX ou de BAK dans des cellules HeLa entraîne la fragmentation des mitochondries et l'apoptose (Karbowski et al, 2004a; Sheridan et al, 2008). Comment ces deux protéines peuvent-elles jouer des rôles opposés dans la dynamique mitochondriale en conditions physiologiques et en apoptose ? Il est possible que les changements de conformation et de localisation subis par BAX et BAK au cours de l'apoptose modulent les interactions des deux protéines avec les acteurs de la dynamique mitochondriale comme les Mitofusines (Brooks et al, 2007). En accord avec cette hypothèse, en conditions physiologiques, BAK interagit avec les Mitofusines 1 et 2 alors que, au cours de l'apoptose, BAK et MFN2 sont dissociés au profit d'une interaction entre BAK et MFN1 (Brooks et al, 2007).

4. Les fonctions de la dynamique mitochondriale

4.1. Pertinence fonctionnelle

La pertinence fonctionnelle de la dynamique mitochondriale a clairement été démontrée par le caractère essentiel des acteurs qui contrôlent ce processus au cours du développement, ainsi que par la mise en évidence de leur implication dans diverses maladies chez l'homme (Detmer & Chan, 2007b). L'invalidation des gènes MFN1 MFN2, DRP1, et la mutation du gène OPA1, chez la souris provoquent une létalité embryonnaire à mi-gestation (Alavi et al, 2007; Chen et al, 2003; Chen et al, 2007; Davies et al, 2007; Ishihara et al, 2009; Wakabayashi et al, 2009). L'ablation conditionnelle de MFN2 et de DRP1, induisant de nombreux défauts au niveau du système nerveux central, a confirmé l'importance de la dynamique mitochondriale pour le tissu nerveux, initialement révélée par l'implication d'OPA1, de MFN2 et de GADP1 dans des maladies neurodégénératives, respectivement l'atrophie optique dominante de type 1 (Delettre et al, 2001), la maladie de Charcot-Marie-Tooth (CMT) 2A (Zuchner et al, 2004) et la CMT4A (Cuesta et al, 2002). De plus, l'implication de la dynamique mitochondriale dans les neurodégénérescences liées à l'âge, comme les maladies de Parkinson et d'Alzheimer, commence à émerger (Chen & Chan, 2009).

4.2. Transmission des mitochondries au cours de la division cellulaire

Un crible génétique visant à isoler des supprimeurs multicopies d'un mutant de DNMI chez *Saccharomyces cerevisiae* a permis d'établir un premier lien entre morphologie mitochondriale et cycle cellulaire à travers la mise en évidence de l'interaction entre Dnm1p et Num1p, une protéine impliquée dans la migration nucléaire au cours de la division cellulaire (Cervený et al, 2007; Farkasovsky & Kuntzel, 1995). La protéine Num1p est localisée à la membrane plasmique mais une fraction de la protéine est également retrouvée à la mitochondrie, où elle participe à la fission des mitochondries en influençant probablement l'ancrage à la mitochondrie de Dnm1p. Dans des levures délétées pour *DNMI*⁺ et *NUM1*⁺, l'intégralité des mitochondries est retrouvée dans le bourgeon avec une forte proportion de

mitochondries hyperfilamenteuses. Chez les mammifères, compte tenu du nombre important de mitochondries dans la plupart des types cellulaires, il a été proposé que la répartition des mitochondries se fasse de manière aléatoire. Néanmoins, des changements de morphologie mitochondriale sont observés durant le cycle cellulaire. Le réseau mitochondrial devient très filamenteux au cours de la phase G1. Ce changement apparaît essentiel pour la progression du cycle cellulaire puisque l'inhiber en dépolarisant les mitochondries provoque un arrêt des cellules au niveau de la transition G1/S et le favoriser en surexprimant un mutant dominant négatif de DRP1 précipite au contraire les cellules en phase G2 (Mitra et al, 2009). De plus, une fragmentation transitoire des mitochondries, dépendante de DRP1, a lieu au cours de la mitose de la prophase à l'anaphase (Taguchi et al, 2007). Cette modification est corrélée à la phosphorylation de DRP1 par le complexe cdk1/cyclineB.

4.3. Maintien des fonctions mitochondriales

L'inactivation des protéines fusogènes OPA1, MFN1 ou MFN2, dans des fibroblastes embryonnaires de souris, entraîne une diminution de l'activité des complexes de la chaîne respiratoire et une grande hétérogénéité dans le potentiel de membrane des mitochondries (Chen et al, 2005). L'abolition de la fusion mitochondriale mène également à l'accumulation de mitochondries dépourvues d'ADNmt, qui pourrait expliquer les dysfonctions mitochondriales observées (Chen et al, 2007). Il a été proposé que la fusion mitochondriale soit un moyen pour les mitochondries de coopérer les unes avec les autres afin de compléter les déficiences fonctionnelles de certaines d'entre elles en restaurant des éléments manquants ou défectueux par échange de leur membrane et de leur contenu. En accord cette hypothèse, la mise en évidence d'une complémentation inter-génique, *ex vivo* et *in vivo*, de mutations différentes au niveau de gènes situés sur l'ADN mitochondrial (Nakada et al, 2001; Ono et al, 2001). Néanmoins, des travaux récents qui montrent que la fusion mitochondriale semble s'effectuer préférentiellement entre des mitochondries fonctionnelles, vont à l'encontre de la théorie énoncée précédemment. En effet, des mitochondries, caractérisées présentant un potentiel de membrane réduit, montre une très faible probabilité de fusionner de nouveau et sont ensuite dégradées par mitophagie (Twig et al, 2008).

4.4. Distribution des mitochondries

La dynamique mitochondriale revêt une importance toute particulière dans les neurones, certainement de par leurs besoins énergétiques élevés mais également de l'importance de la distribution de cet organelle dans ces cellules. La localisation mitochondriale au niveau des terminaisons axonales et des dendrites est en effet influencée par la dynamique mitochondriale. Chez la drosophile, des mutations de DRP1 affectent la distribution des mitochondries, largement absentes des synapses dans la jonction neuromusculaire, inhibent la mobilisation du pool vésiculaire de réserve, un procédé hautement dépendant de l'ATP, et par conséquent inhibent les transmissions synaptiques (Verstreken et al, 2005). De plus, dans des neurones d'hippocampe de rat l'inhibition ex vivo de la fission mitochondriale par surexpression d'un mutant dominant négatif de DRP1 affecte la distribution dendritique des mitochondries et la densité des épines dendritiques (Li et al, 2004). À l'inverse, l'augmentation de la fission mitochondriale, par surexpression de DRP1 sauvage, entraîne une présence accrue des mitochondries au niveau dendritique et résulte en une augmentation du nombre d'épines dendritiques.

La dynamique mitochondriale affecte la distribution des mitochondries dans d'autres types cellulaires notamment dans des cellules du système immunitaire. En effet, au cours de la chimiotaxie lymphocytaire, les mitochondries se concentrent au niveau de l'uropode, étape qui nécessite la fission des mitochondries. L'inhibition de la fission mitochondriale par la surexpression d'un mutant dominant négatif de DRP1, ou l'activation de la fusion, par la surexpression d'OPA1 ou MFN1, empêche la relocalisation des mitochondries et par conséquent la polarisation et la migration des lymphocytes en présence de chimioattractants (Campello et al, 2006).

4.5. Apoptose

Les premiers travaux, menés en particulier sur DRP1 et OPA1, ont montré l'existence de liens entre dynamique mitochondriale et apoptose (Suen et al, 2008). D'une façon générale, un déplacement de l'équilibre vers la fission sensibilise les cellules à l'apoptose, alors qu'un gain de fusion rend les cellules plus résistantes à ce type de mort. Cependant, plus récemment il a

été montré que les rôles d'OPA1 et de DRP1, et probablement de FIS1, dans la dynamique mitochondriale et l'apoptose sont indépendants (Alirol et al, 2006; Breckenridge et al, 2008; Frezza et al, 2006). De façon intéressante, plusieurs protéines pro-apoptotiques et anti-apoptotiques de la famille de Bcl-2, chez les mammifères, influencent la morphologie des mitochondries indépendamment de leur action dans la perméabilisation de la membrane externe (Suen et al, 2008) (suen 2008).

4.6. Mitophagie

L'élimination sélective des mitochondries par autophagie, appelée mitophagie, est induite en réponse à différents stress cellulaires comme des carences en nutriments, des conditions hypoxiques ou apoptotiques, mais également au cours de processus de différenciation cellulaire (Goldman et al). Dernièrement, la mitophagie a été étudiée dans des cellules β -pancréatiques qui présentent une forte accumulation de mitochondries dépolarisées menant à des dommages oxydatifs et au développement de diabète (Twig et al, 2008). Le suivi individualisé du devenir des mitochondries dans ces cellules indique que la fission mitochondriale joue un rôle essentiel au cours de ce processus. Elle permet d'isoler les mitochondries peu actives, présentant un potentiel de membrane réduit et dans certains cas des capacités respiratoires altérées ou une absence de nucléoïdes, des autres organites et d'alimenter la machinerie d'autophagie. L'extinction de l'expression de FIS1 ou la surexpression de mutant dominant négatif de DRP1 réduisent spécifiquement l'autophagie mitochondriale dans ces cellules (Twig et al, 2008), ainsi que dans des neurones exposés à l'oxyde nitrique (Barsoum et al, 2006). Au contraire, la surexpression de DRP1 facilite l'élimination des mitochondries en réponse à différents stimuli apoptotiques (Arnoult et al, 2005b).

B. Résultats

1. Objectifs de la thèse

Les travaux de notre équipe sur la dynamique mitochondriale ont débuté avec l'identification en 1998 de Msp1p chez la levure à fission *Schizosaccharomyces pombe*, suivie de celle de son homologue humain, OPA1 en 2000 (Delettre et al, 2000; Pelloquin et al, 1998; Pelloquin et al, 1999a). Depuis, notre équipe poursuit ses travaux dans les deux modèles, *S. pombe* et les cellules de mammifères en culture, pour comprendre les mécanismes moléculaires qui contrôlent la dynamique mitochondriale, sa pertinence fonctionnelle et ses dysfonctionnements.

Dans ce contexte, durant mes quatre années de thèse, j'ai travaillé sur deux projets, l'étude de la régulation de l'expression de la protéine Msp1p chez la levure *S. pombe* et la recherche de nouveaux partenaires de cette dynamine.

2. La levure à fission *Schizosaccharomyces pombe*

La levure à fission *Schizosaccharomyces pombe* est un modèle eucaryote qui offre une alternative intéressante au modèle plus populaire que constitue la levure bourgeonnante *Saccharomyces cerevisiae* (Chiron et al, 2007; Forsburg, 2003; Yanagida, 2002). Ces deux organismes sont évolutionnairement très distants avec une séparation estimée de 300 à 450 millions d'années. La divergence entre ces deux levures est aussi grande que celle de chacune d'entre-elle avec l'homme.

La levure *S. pombe* est un champignon unicellulaire appartenant à la famille des ascomycètes que l'on qualifie d'archéascomycètes pour la séparer des ascomycètes plus traditionnels comme *S. cerevisiae*. Contrairement aux cellules mère et fille ovoïdes de *S. cerevisiae* qui se forment par bourgeon, *S. pombe* possède une forme en bâtonnet et se divise par fission donnant deux cellules filles identiques. C'est un organisme aérobie quasi-stricte, qui ne réalise que quelques divisions en anaérobiose mais qui possède la capacité de croître par métabolisme fermentaire.

S. pombe découverte en 1893 n'a été utilisée en routine qu'après les années 1960 dans des études portant sur la prolifération et la différenciation cellulaire. Dans les années 1970, Paul Nurse et ses collaborateurs en isolant des mutants du cycle cellulaire ont largement

contribué au développement de ce modèle pour les études sur le cycle cellulaire. L'année 2001 verra l'attribution du prix Nobel de physiologie et médecine à Paul Nurse pour ses travaux et l'achèvement du séquençage du génome de *S. pombe* révélant 4824 ORF pour un génome haploïde de 13.8 Mb reparti sur 3 chromosomes.

Les recherches menées sur les mitochondries ont, elles, pour l'instant, été majoritairement réalisées chez *S. cerevisiae*, malgré de nombreuses évidences qui montrent que la biogenèse et les fonctions mitochondriales de la levure à fission sont plus proches de celles des eucaryotes supérieurs que celles de *S. cerevisiae* (Chiron et al, 2007). Les mitochondries chez *S. pombe* comme chez les mammifères sont essentiellement distribuées sur le réseau de microtubules. À l'inverse, chez *S. cerevisiae*, les mitochondries sont véhiculées par le cytosquelette d'actine. *S. pombe* et l'homme présentent un ADNmt de taille réduite (respectivement 19,43 kDa et 16,57 kDa) avec respectivement peu ou pas d'intron, alors que *S. cerevisiae* possède un large génome mitochondrial (68 à 85 kb) avec de nombreux introns. Chez *S. pombe* les ARN mitochondriaux codant des protéines contiennent des extrémités 5' et 3' non traduites très courtes ce qui rappelle la structure compacte des ARN mitochondriaux humains, suggérant que les mécanismes de traduction sont proches dans les deux organismes. L'existence d'au moins deux facteurs de traduction mitochondriaux, mtEF-Ts et mtEF-IF3 conservés chez la levure à fission et l'homme mais absents chez *S. cerevisiae* (Chiron et al, 2005) confirme cette hypothèse.

Une autre similarité partagée entre *S. pombe* et les eucaryotes supérieurs est l'incapacité à tolérer la perte du génome mitochondrial qui classe *S. pombe* dans la famille des levures petites négatives, contrairement à la levure petite positive *S. cerevisiae*. La létalité liée à la perte de l'ADNmt chez *S. pombe* serait la conséquence selon l'« hypothèse des deux composantes » de perte simultanée des complexes de la chaîne respiratoire et de la partie F₀ de l'ATP synthase provoquant la perte du potentiel de membrane (Chen & Clark-Walker, 2000). Chez *S. pombe*, le potentiel de membrane mitochondrial ne pourrait pas être restauré par la partie F₁ isolée de l'ATP synthase qui serait incapable contrairement à *S. cerevisiae* d'hydrolyser l'ATP en ADP, ce dernier pouvant ensuite être exporté via le transporteur ADP/ATP. Par contre la perte de l'un ou de l'autre des deux composants, chaîne respiratoire ou ATP synthase, est compatible avec la vie de *S. pombe* car le potentiel de membrane mitochondrial peut être maintenu soit par la chaîne respiratoire elle-même, soit par l'hydrolyse de l'ATP en ADP par l'ATP synthase complète et l'export de H⁺ à travers ce complexe. De façon intéressante des mutations nucléaires (*ptp1-1*, *ptp2-1*) rendent *S. pombe* petite positive (Haffter & Fox, 1992). Jusqu'à présent la nature des gènes *ptp1* et *ptp2* est toujours inconnue.

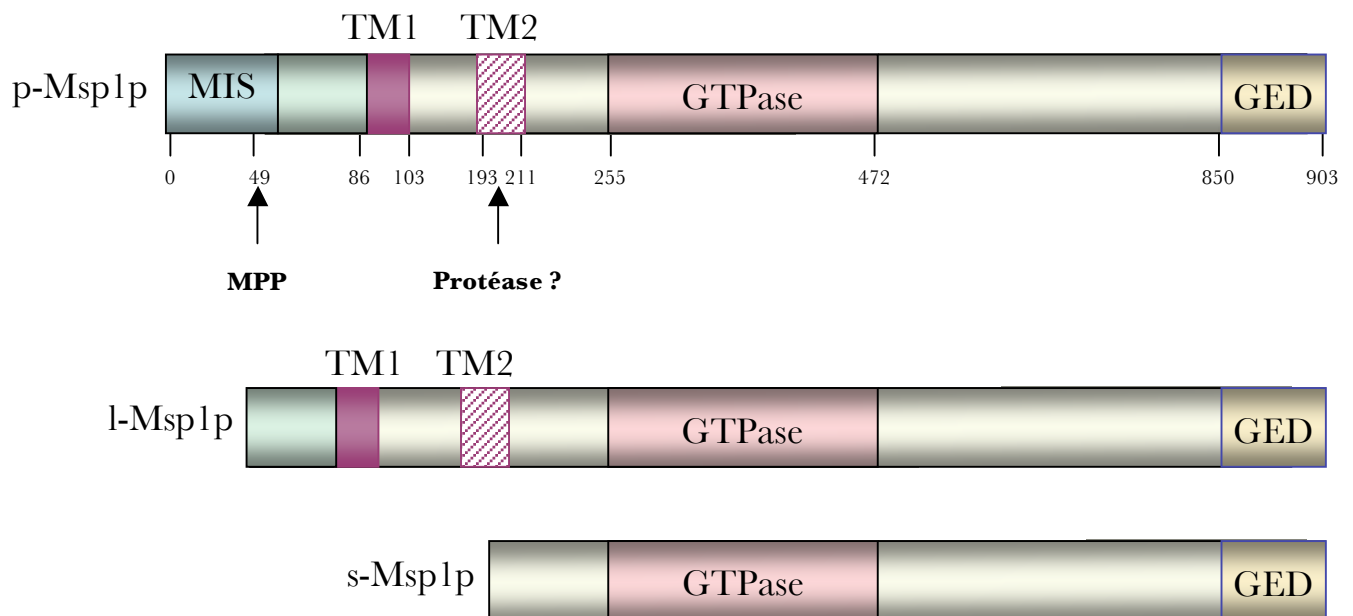


Figure n°41 : Représentation schématique des différents domaines de Msp1.

La forme longue de Msp1p (l-Msp1p) est générée par clivage du précurseur (p-Msp1p) par la MPP alors que la protéase impliquée dans la génération de la forme courte de Msp1p (s-Msp1p) était inconnue quand j'ai débuté ma thèse. MIS = séquence adressage à la mitochondrie, TM1 et TM2 = domaines transmembranaires, GTPase = domaine GTPase, GED = domaine effecteur de l'activité GTPase

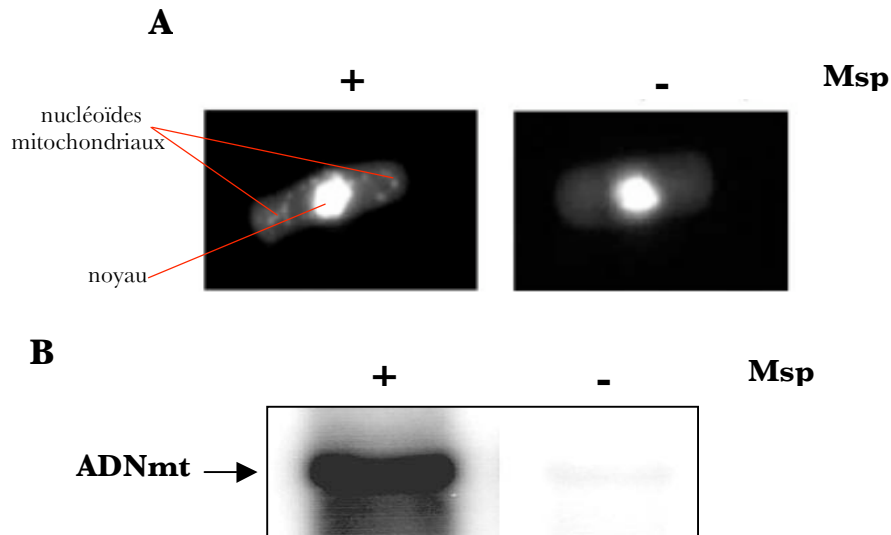
Une autre caractéristique que partage *S. pombe* avec les cellules de mammifères (humaine ou hamster) est l'incapacité à utiliser le galactose lorsqu'elle est déficiente pour le métabolisme respiratoire (Robinson et al, 1992; Soderberg et al, 1979). L'impossibilité d'utiliser le galactose en absence de phosphorylation oxydative chez les mammifères pourrait être liée à la faible efficacité de la voie Leloir qui permet l'entrée du galactose dans la glycolyse (Robinson et al, 1992). La glycolyse serait alors limitée et ne permettrait pas de produire assez d'ATP pour permettre la croissance sans respiration. Il est possible qu'il en soit de même chez *S. pombe*.

Cet ensemble de caractéristiques que partage *S. pombe* avec les cellules de mammifères fait de cette levure un modèle de choix lorsque l'on s'intéresse à la mitochondrie et en particulier aux pathologies associées à cette organelle.

3. La dynamine Msp1 chez la levure *S. pombe*

La dynamine Msp1p de *Schizosaccharomyces pombe* a été identifiée au laboratoire dans un crible double hybride mené pour rechercher des partenaires de la protéine kinase Nim1, un régulateur du cycle cellulaire (Pelloquin et al, 1999b). Elle présente 58% et 26% d'homologie et 38% et 19% de similarité avec Mgm1p de *S. cerevisiae* et OPA1 humain respectivement (Pelloquin et al, 1998). Msp1p (*figure n°41*) présente en N-terminal une séquence d'adressage à la mitochondrie (MIS) riche en acides aminés basiques dépourvue d'acides aminés acides et possédant un site de clivage par la peptidase mitochondriale (MPP, Mitochondrial Processing Peptidase), suivie de 2 domaines transmembranaires (TM1 et TM2) (Diot et al, 2009; Pelloquin et al, 1999a). Cette extension N-terminale précède trois domaines caractéristiques des dynamines : un domaine GTPase central, un domaine middle et un domaine GED carboxy-terminal (Praefcke & McMahon, 2004).

Msp1p est une protéine de la membrane interne mitochondriale (Pelloquin et al, 1999a) localisée dans l'espace inter-membranaire (Guillou et al, 2005), comme ses homologues Mgm1p et OPA1. Deux isoformes de Msp1p, longue (l-Msp1p) et courte (s-Msp1p), sont présentes dans la cellule. La forme longue ancrée à la membrane interne, correspond au produit de clivage par la MPP et contient les deux domaines TM1 et TM2 (Diot et al, 2009). La forme courte, périphérique, est générée par clivage protéolytique à la fin du domaine TM2. Les deux domaines transmembranaires de Msp1p contribuent à l'ancrage de la

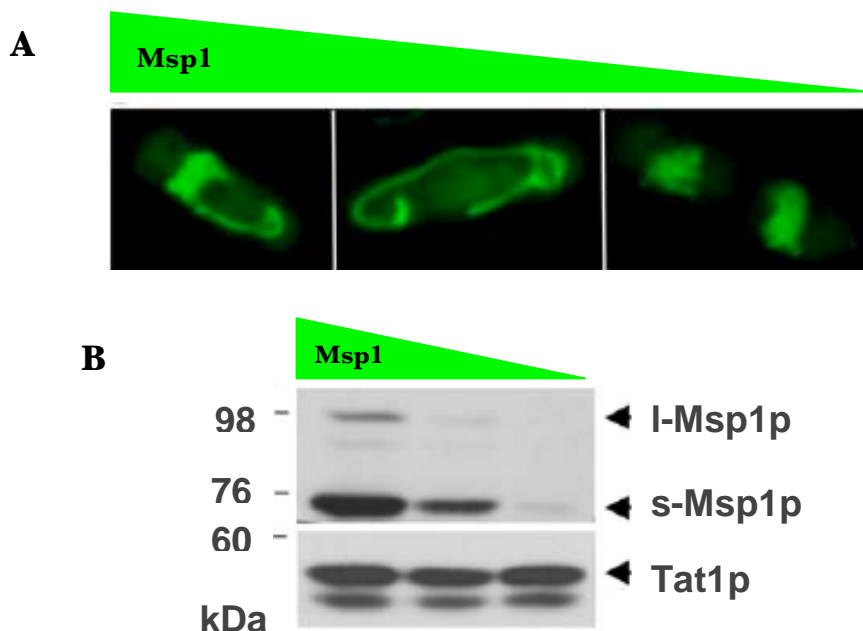


Guillou 2005 FEBS Letters

Pelloquin 1998 Biochemical and Biophysical Research Communications

Figure n°42 : Msp1p est impliquée dans le maintien du génome mitochondrial.

(A) ADNmt de la levure *S. pombe* visualisé par coloration au DAPI en microscopie à fluorescence dans des levures délétées(-) ou non (+) du gène *msp1*. (B) Southern blot, révélant l'ADNmt de levures délétées (-) ou non (+) par le gène *msp1*.



Guillou 2005 FEBS Letters

Figure n°43 : Msp1p est impliquée dans la fusion des mitochondries.

(A) Observation du réseau mitochondrial de levures délétées pour le gène *msp1*⁺ et surexprimant la dynamine de façon ectopique. Le réseau mitochondrial filamenteux est agrégé en présence d'une quantité élevée de Msp1p (gauche), le réseau mitochondrial est filamenteux en présence d'une quantité de protéine Msp1p comparable au niveau endogène (milieu) et les mitochondries sont fragmentées et regroupées sous forme de grappes en absence de protéine Msp1p (droite). Les mitochondries sont visualisées en microscopie à fluorescence grâce à l'expression d'une GFP adressée à la mitochondrie. (B) Des extraits protéiques réalisés à partir des levures décrites en (A) sont analysés par SDS-PAGE et soumis à une immunodétection avec des anticorps dirigés contre Msp1p ou contre la tubuline (Tat1p).

protéine aux membranes, ce qui peut expliquer la différence d'association des deux isoformes à la membrane.

Le gène *msp1⁺* est un gène essentiel. Sa délétion entraîne la perte de l'ADNmt (*figure n°42*) et donc la mort de la levure petite négative *S. pombe* même en milieu fermentescible (Pelloquin et al, 1998). Des expériences de répression conditionnelle ont montré que l'inactivation de Msp1p provoque une fragmentation des mitochondries antérieure à la perte du génome mitochondrial (Guillou et al, 2005). À l'inverse, la surexpression de Msp1p entraîne une agrégation des mitochondries (Pelloquin et al, 1998). Ainsi un gain ou une perte de fonction de Msp1p provoque respectivement une fusion excessive ou une fission des mitochondries (*figure n°43*), impliquant Msp1p comme ses homologues, Mgm1p et OPA1, dans la fusion des mitochondries. Dans ce sens, la délétion du gène *dnm1*, codant une protéine impliquée dans la fission des mitochondries, restaure le défaut de morphologie, mais également la perte d'ADNmt et la viabilité d'une souche délétée du gène *msp1⁺* (Guillou et al, 2005).

Les domaines GTPase, GED, TM1 et TM2 sont essentiels à la fonction de Msp1p dans la mitochondrie. En effet, les mutants de ces domaines sont, comme un mutant du MIS, incapables de compléter la délétion du gène *msp1⁺*. De plus, les mutants de ces domaines exercent un effet dominant négatif quand ils sont exprimés dans une levure sauvage. L'expression des mutants des domaines GTPase, GED, TM1 et TM2 entraîne dans tous les cas la fragmentation du réseau mitochondrial, et à l'exception du mutant du domaine TM1, la perte du génome mitochondrial et la mort de la levure (Diot et al, 2009). L'obtention d'un mutant de Msp1p (du domaine TM1) affecté dans la morphologie des mitochondries et non dans le maintien de l'ADNmt a permis pour la première fois de découpler les deux fonctions de la dynamine et de proposer que le rôle de Msp1p dans le maintien de l'ADNmt est la seule fonction essentielle de la protéine.

4. Maturation protéolytique de Msp1 et de son homologue OPA1 chez *S. pombe*

Les travaux menés sur la contribution des domaines TM1 et TM2 sur la génération des deux formes de Msp1p, ont permis de proposer que, comme pour ses homologues, les formes longue et courte de la dynamine issues de clivages protéolytiques n'ont pas les mêmes

fonctions (DeVay et al, 2009; Diot et al, 2009; Herlan et al, 2003; Song et al, 2007; Zick et al, 2009a). Nous avons donc décidé de poursuivre la caractérisation de la maturation protéolytique de Msp1p en étudiant la ou les protéases impliquées dans ce processus. Ces travaux ont également été motivés par la mise en évidence de la divergence des processus de maturation de Mgm1p et de OPA1, soulignant l'intérêt de poser la question dans un troisième modèle (Cipolat et al, 2006; Duvezin-Caubet et al, 2007; Ehses et al, 2009; Griparic et al, 2007; Guillery et al, 2008; Head et al, 2009; Herlan et al, 2004; Herlan et al, 2003; Ishihara et al, 2006; Song et al, 2007). De plus, des résultats contradictoires ayant été publiés concernant les protéases impliquées dans la maturation d'OPA1, nous avons décidé d'utiliser notre modèle pour mieux comprendre ce processus.

4.1. Maturation protéolytique de Msp1p chez *S. pombe*

4.1.1. Publication : « Processing of the dynamin Msp1p in *S. pombe* reveals an evolutionary switch between its orthologs Mgm1p in *S. cerevisiae* and OPA1 in mammals »



Processing of the dynamin Msp1p in *S. pombe* reveals an evolutionary switch between its orthologs Mgm1p in *S. cerevisiae* and OPA1 in mammals

Ingrid Leroy¹, Farnoosh Khosrobakhsh¹, Alan Diot, Marlène Daloyau, Laetitia Arnauné-Pelloquin, Cindy Cavelier, Laurent J. Emorine, Pascale Belenguer*

Université de Toulouse, UPS CNRS UMR5241, Laboratoire Métabolisme Plasticité Mitochondries, F-31062, France

article info

Article history:

Received 5 March 2010

Revised 18 May 2010

Accepted 28 May 2010

Available online xxx

Edited by Vladimir Skulachev

Keywords:

Mitochondrial dynamics

Mitochondrial proteases

Mitochondria

Msp1p

Mgm1p

OPA1

abstract

Mitochondrial fusion depends on the evolutionary conserved dynamin, OPA1/Mgm1p/Msp1p, whose activity is controlled by proteolytic processing. Since processing diverges between Mgm1p (*Saccharomyces cerevisiae*) and OPA1 (mammals), we explored this process in another model, Msp1p in *Schizosaccharomyces pombe*. Generation of the short isoform of Msp1p neither results from the maturation of the long isoform nor correlates with mitochondrial ATP levels. Msp1p is processed by rhomboid and a protease of the matrix ATPase associated with various cellular activities (m-AAA) family. The former is involved in the generation of short Msp1p and the latter in the stability of long Msp1p. These results reveal that Msp1p processing may represent an evolutionary switch between Mgm1p and OPA1.

© 2010 Federation of European Biochemical Societies. Published by Elsevier B.V. All rights reserved.

1. Introduction

Mitochondrial dynamics, an adaptative process to cells needs, results from a regulated balance between antagonist fusion and fission forces acting on mitochondrial membranes [1]. It specifies the morphology of the organelle that ranges from isolated bead-like to filamentous structures. The core machinery governing mitochondrial dynamics is best understood in *Saccharomyces cerevisiae* where it comprises three main proteins belonging to the dynamin family that are conserved throughout evolution [2]. Dnm1p and Fzo1p, respectively, mediate fission and fusion of the mitochondrial outer membrane and Mgm1p acts on fusion of the mitochondrial inner membrane. The importance of this later protein in mitochondrial functions and cell survival has been highlighted by the discovery that OPA1, the mammalian counterpart of Mgm1p, is mutated in autosomal dominant optic atrophy (ADOA), leading

to retinal ganglion cell death, optic nerve atrophy, and eventually blindness [3].

OPA1 is involved in mitochondrial fusion, maintenance of cristae structure and apoptosis but the extend to which each of these processes contributes to the etiology of ADOA is currently unknown. Understanding the functions and dysfunctions of OPA1 is complicated by the existence of eight alternatively spliced mRNAs, each of them leading to several isoforms generated by proteolysis of the precursor protein [4].

Upon import into mitochondria, the first maturation step of OPA1 is the removal of the mitochondrial import signal by the mitochondrial processing peptidase (MPP), generating long isoforms of the protein (l-OPA1) [5]. Limited proteolysis of l-OPA1 then gives rise to short isoforms (s-OPA1), but the nature of the proteases implicated remains controversial [4,6]. It has been initially proposed that l-OPA1 is processed into s-OPA1 by the rhomboid protease PARL [7], but PARL implication was not subsequently confirmed [8–11]. Matrix ATPase associated with various cellular activities (m-AAA) proteases were shown to be involved in generation of s-OPA1 while the subunit composition of the complex, i.e., paraplegin and/or AFG3L2, remains unclear, probably reflecting the capacity of these proteases to act as homo- or hetero-oligomers [8,10,11]. Furthermore, some studies reported an OPA1 processing by the inter-membrane space ATPase associated with various cellular activities (i-AAA) protease YME1L [4,9,11].

Abbreviations: MPP, mitochondrial processing peptidase; m-AAA, matrix ATPase associated with various cellular activities; i-AAA, inter-membrane space ATPase associated with various cellular activities

* Corresponding author. Address: Belenguer Pascale, MPM-UMR5241, Université Paul Sabatier Bât4R3B1, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 04, France. Fax: +33 561 55 88 94.

E-mail address: pascale.belenguer@cict.fr (P. Belenguer).

¹ The authors contributed equally to this work.

In *S. cerevisiae*, the Mgm1p precursor (p-Mgm1p) is translated from a single mRNA and further processed into two isoforms in the mitochondria following the “alternative topogenesis” model [12,13]. p-Mgm1p is either cleaved by MPP and liberated from the import machinery as a long isoform (l-Mgm1p) or processed by both MPP and Pcp1p, the yeast counterpart of PARL, to generate a short isoform (s-Mgm1p) [12,14,15]. Experiments with the heterologous expression of mammalian OPA1 in *S. cerevisiae* did not enlighten the implication of the rhomboid protease in the dynamin processing since its cleavage was either compromised or unaffected by the deletion of PCP1 [8,10]. Moreover, no implication of m-AAA proteases in Mgm1p processing has been shown, although yeast m-AAA proteases Yta10p and Yta12p can efficiently cleave OPA1 [8].

Since contradictory results have been obtained concerning OPA1 processing in mammalian cells and since it may differ from that of Mgm1p in *S. cerevisiae*, we explored the maturation process of Msp1p in *Schizosaccharomyces pombe*, another yeast model that diverged from *S. cerevisiae* and which mitochondria are more closely related to those of human in several aspects [16]. Unlike *S. cerevisiae*, *S. pombe* are “petite negative” and, as mammalian cells, die when they lose their mtDNA, although nuclear mutations may yield viable rho zero *S. pombe* strains [17,18]. Also, mitochondria associate to microtubules in *S. pombe* and mammals rather than to actin and intermediate filaments in *S. cerevisiae*. Furthermore, since cytokinesis occurs by fission in *S. pombe* and higher eukaryotes, inheritance of mitochondria and of mitochondrial nucleoids

among daughter cells might be more similar in these cells as compared to the budding yeast *S. cerevisiae*.

Similarly to Mgm1p but contrarily to OPA1, we show that generation of s-Msp1p does not result from l-Msp1p maturation. Moreover, we do not find any correlation between s-Msp1p generation and mitochondrial ATP levels as shown for the two other orthologous dynamins [13,19]. Finally, Msp1p is processed by both rhomboid and m-AAA proteases, the former being involved in the generation of the s-Msp1p and the later in the stability of l-Msp1p. Together, our results reveal that the processing of Msp1p may represent an evolutionary switch between Mgm1p and OPA1.

2. Materials and methods

2.1. Yeast strains and cultures

S. pombe strains deleted for the various proteases were obtained by standard techniques for fission yeast molecular genetics [20,21]. Gene deletions were verified by PCR and Southern's blotting. Strains disrupted for *atp1*⁺ (*Datp1*), *atp2*⁺ (*Datp2*), *atp3*⁺ (*Datp3*) and *anc1*⁺ (*Danc1*) were gifts from N. Bonnefoy (IGM, Gif-sur-Yvette, France) and V. Trézeguet (IBGC, Bordeaux, France), respectively. Strains carrying pREP41-Msp1HA plasmid have been described [22].

Deleted and control wild-type strains (Table 1) were exponentially grown ($0.5\text{--}1 \cdot 10^7$ cells/ml) at 25 °C in glucose rich medium (YES) provided by Formedium (Norfolk, UK) or in home-made respiratory medium containing 1% yeast extract, 2% bactopectone, 0.1% glucose, 3% glycerol and 3% ethanol. Cells carrying plasmids with the *nm1*⁺ promoter were grown in glucose minimal medium (EMM, Formedium) complemented with uracil and adenine (both at 225 mg/L) and in the presence of 4 μM thiamine to repress Msp1 expression, which was induced by three washes in H₂O and further growth at 25 °C in the same medium lacking thiamine during 24 h.

2.2. Preparation and analysis of total protein extracts

Protein extraction and Western blot analysis were done as described [22]. Immunodetection was performed with the chemiluminescence detection kit from NEN, using antibodies as follows: anti-HA (1/5000, Boehringer), purified anti-Msp1p (1/100 [23]), anti-Actin (1/1 000, Chemicon), anti-HSP60 (1/400, Sigma), anti-rabbit IgG-HRP and anti-mouse IgG-HRP (1/10 000, AbCam).

Table 1
S. pombe strains constructed or used in this study.

Description	Phenotype
WT	h ⁺ ade6-M210 ura4-D18 leu1-32 arg11 ⁺ ::mCherry
Drh1	h ⁺ ade6-M210 ura4-D18 leu1-32 DSPBC13E7.11::kanMX6 arg11 ⁺ ::mCherry
Drh2	h ⁺ ade6-M216 ura4-D18 leu1-32 DSPBP4H10.10::natMX6 arg11 ⁺ ::mCherry
Dm-AAA	h ⁺ ade6-M210 ura4-D18 leu1-32 DSPBC543.09::kanMX6 arg11 ⁺ ::mCherry
Dyme1	h ⁺ ade6-M210 ura4-D18 leu1-32 DSPCC965.04c::hphMX6 arg11 ⁺ ::mCherry
Datp1	h ⁺ leu1-32 ura4-D18 <i>atp1</i> ::kanMX6
Datp2	h ⁺ leu1-32 ura4-D18 <i>atp2</i> ::kanMX6
Datp3	h ⁺ ade 6-M216 ura 4-D18 leu 1-32 <i>atp3</i> ::kanMX6
Danc1	h ⁺ leu 1-32 <i>anc1</i> ::leu2

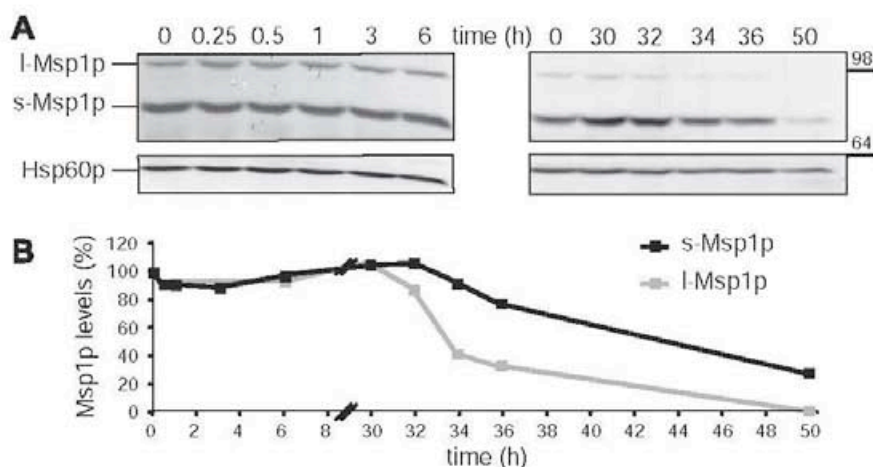


Fig. 1. Generation of s-Msp1p does not result from l-Msp1p maturation. (A) Cells were cultured in YES (t = 0). Cycloheximide (200 μg/ml) was then added to the ongoing culture and aliquots were taken at the indicated period of time for analysis by Western blot with anti-Msp1p and anti-HSP60 antibodies. Panels are representative of three independent experiments. MW (kDa) of protein standards are indicated on the right. (B) Protein expression levels were measured by densitometric analysis and normalized to those of the loading control Hsp60p. Results represent the percentage of l-Msp1p and s-Msp1p levels relative to those before cycloheximide addition.

Quantification of protein expression levels was done using the Image J software. Quantitative experiments were analyzed using Student's *t* test. All *P* values were determined by 2-sided test.

2.3. Cytological observation

S. pombe cells expressing a genome mCherry-tagged *arg11⁺* gene were fixed in 3.7% formaldehyde for 10 min and observed using Nikon Eclipse 80i microscope.

3. Results

3.1. Biosynthesis of l-Msp1p and s-Msp1p; relationships with mitochondrial ATP levels and growth on fermentable or respiratory media

To analyze the biosynthetic process of Msp1p, we used cycloheximide to inhibit protein synthesis that was evidenced by a slowing down of cell growth [24]. l-Msp1p and s-Msp1p were very

stable, with steady cellular amounts for at least 30 h (Fig. 1). No disappearance of l-Msp1p at the profit of s-Msp1p was observed during the time course, showing that no precursor to product relationships exist between the long and short isoforms.

The influence of mitochondrial ATP levels on Msp1p cleavage was evaluated by analyzing the ratio of Msp1p isoforms in strains with individual deletion of the genes coding for the alpha, beta or gamma subunits of the ATP synthase (*Datp1*, *Datp2* and *Datp3*, respectively), or for the ADP/ATP translocase *Anc1p* (*Danc1*). All these strains presented a default in mitochondrial ATP synthesis which features slow or no growth on fermentable and non-fermentable carbon sources, respectively (Fig. 2A). Lowered ATP levels, also suggested by accumulation of Msp1p and Hsp60p precursors, did not induce any variation of total Msp1p amounts (Fig. 2B) nor of the relative levels of long and short isoforms (Fig. 2C). This suggested that s-Msp1p generation does not correlate with mitochondrial ATP levels.

The influence of the carbon source on Msp1p isoforms ratio was then analyzed (Fig. 3). In cells grown on fermentable (3% glucose) medium, l-Msp1p contributed to 23% of total Msp1p as compared to 45% in respiratory media (3% ethanol–glycerol).

3.2. Msp1p is processed by both Rhomboid 1 and Paraplegin

To specify which protease is implicated in Msp1p processing, we constructed *S. pombe* strains bearing deletions of mitochondrial proteases homologous to those implicated in Mgm1p or OPA1 processing.

In cells deleted for the gene coding for Rhomboid 1 (*Drh1*), the *S. pombe* orthologue of Pcp1p and P_{ARL}, the long to short Msp1p isoforms ratio increased significantly; l-Msp1p contributing to 67% of total Msp1p compared to 19% in a control wild-type yeast (WT) (Fig. 4A). When normalized to actin, l-Msp1p levels increased 3-fold in *Drh1* cells as compared to control cells (WT), with a

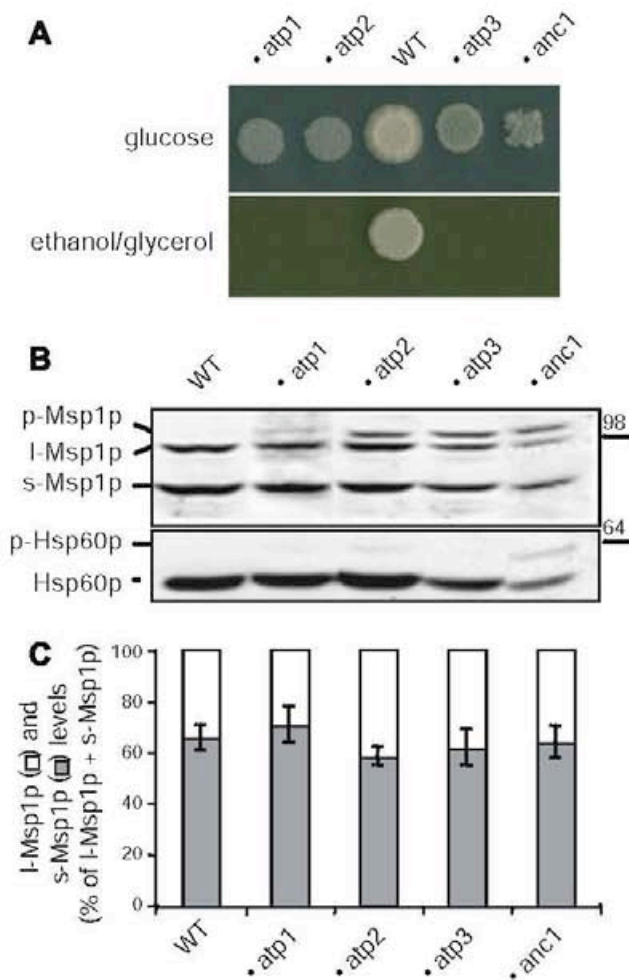


Fig. 2. s-Msp1p generation does not correlate with mitochondrial ATP levels. (A) Cells (4000), of either wild-type (WT) or of strains with a deletion of the genes coding for ATP synthase subunit alpha (*Datp1*), beta (*Datp2*) or gamma (*Datp3*) or for *Anc1p* (*Danc1*) were plated onto solid glucose or ethanol–glycerol containing media and grown for 7 days. (B) Western blot analysis of Msp1p and Hsp60p in WT, *Datp1*, *Datp2*, *Datp3* and *Danc1* strains cultured in YES. MW (kDa) of protein standards are indicated on the right. (C) Levels of l-Msp1p (white bars) and s-Msp1p (grey bars) were measured by densitometric scanning. Results, expressed as the percentage of each isoform to l-Msp1p plus s-Msp1p, are the means \pm S.D. of three independent experiments. No significant differences between each mutant and the control wild-type strain were observed using Student's *t* test ($P > 0.05$).

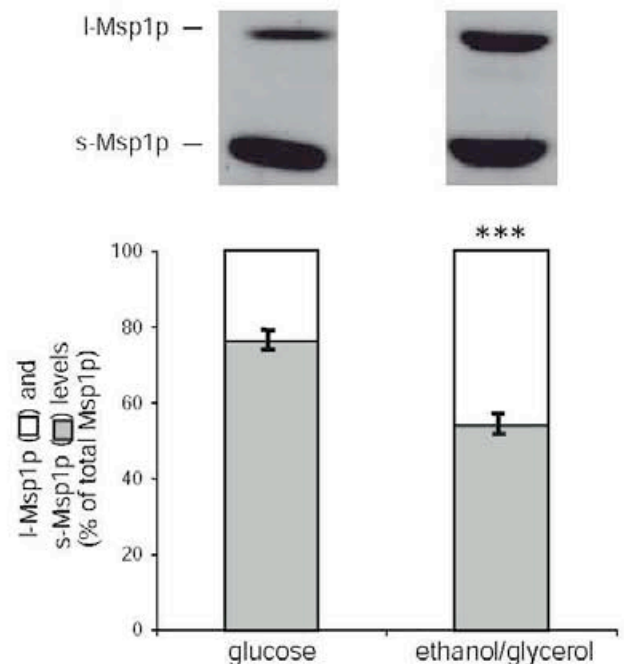


Fig. 3. Variation of l-Msp1p expression levels in adaptation to carbon sources. Msp1p expression levels were analyzed by Western blot using anti-Msp1p antibodies in cells grown in glucose-containing YES medium and shifted to ethanol–glycerol medium for 6 h. Levels of l-Msp1p (white bars) and s-Msp1p (grey bars) were measured by densitometric scanning. Results, expressed as the percentage of each isoform to total Msp1p, are the means \pm S.D. of three independent experiments (** $P < 0.001$ as compared to glucose).

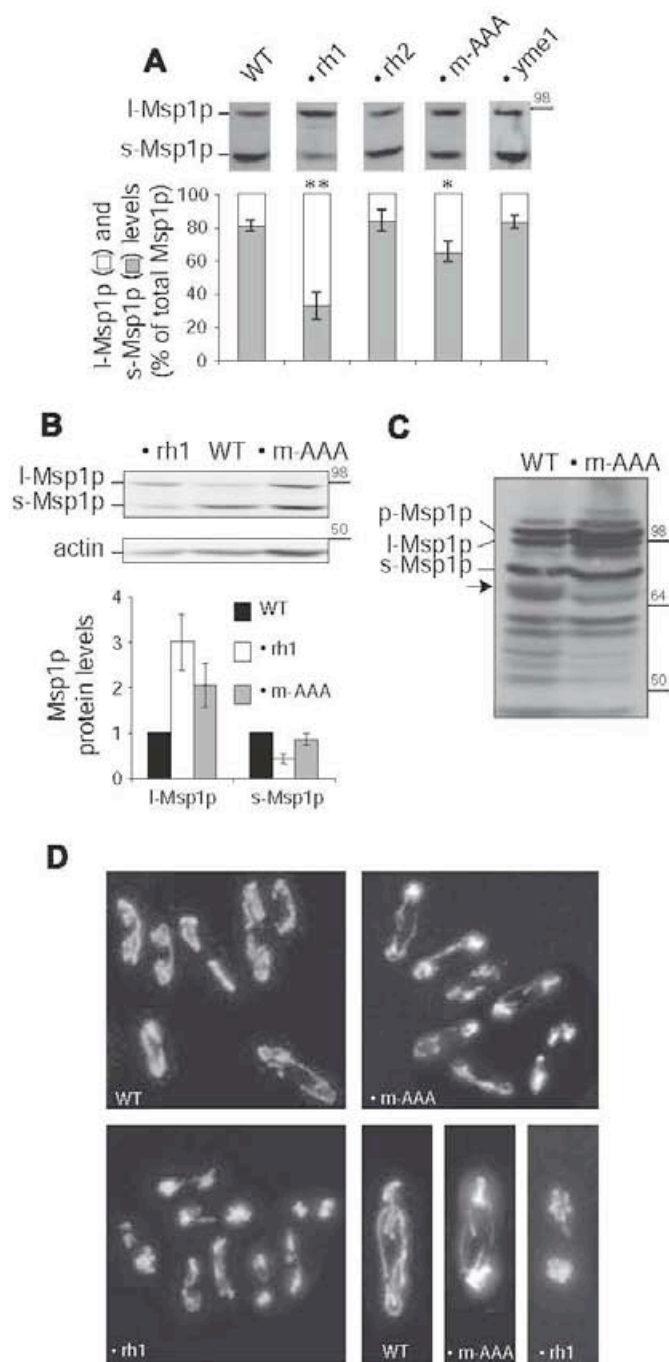


Fig. 4. Msp1p is cleaved by both Rhomboid 1 and the m-AAA protease. (A) Msp1p expression levels were analyzed by Western blot (upper panel) using anti-Msp1p antibody in control wild-type cells (WT) or in cells bearing a deletion of the gene coding for the mitochondrial proteases Rhomboid 1 (Drh1), Rhomboid 2 (Drh2), m-AAA protease (Dm-AAA) and Yme1p (Dyme1) grown in YES medium. Quantification (lower panel) of I-Msp1p (white bars) and s-Msp1p (grey bars) levels was obtained by densitometric analysis. Results, expressed as the percentage of each isoform to total Msp1p, are the means \pm S.D. of three independent experiments ($P < 0.05$ and $P < 0.01$ as compare to WT). (B) Msp1p and actin expression levels in WT, Drh1 or Dm-AAA strains grown in YES medium were analyzed by Western blot (upper panel) using corresponding antibodies. Expression levels of I-Msp1p and s-Msp1p were estimated by densitometric analysis and normalized to actin loading control. Results (lower panel) represent the quantity of each isoform (arbitrary units) and are the means \pm S.D. of three independent experiments. (C) Total protein extracts from WT or Dm-AAA cells over-expressing HA-tagged Msp1p were analyzed by Western blotting using anti-HA antibody. Arrow indicated a 77 kDa-migrating product that accumulated in the WT strain but not in Dm-AAA strain. MW (kDa) of protein standards are indicated on the right. (D) WT, Drh1 or Dm-AAA cells expressing the mitochondrial mCherry-tagged Arg1p were grown on YES medium, fixed and observed by fluorescence microscopy.

concomitant 2-fold decrease in s-Msp1p amounts (Fig. 4B). Thus, Rhomboid 1 is used in *S. pombe* to generate a short isoform of the dynamin. Interestingly, alteration of the relative levels of Msp1p isoforms in Drh1 cells was concomitant with modification of mitochondrial morphology which appeared more fragmented (Fig. 4D). Neither a second Rhomboid protease, present only in *S. pombe* as compared to *S. cerevisiae* and mammals, nor the i-AAA peptidase Yme1p were implicated in the formation of s-Msp1p since deletion of the corresponding genes (Drh2 and Dyme1, respectively) did not modify the ratio or quantities of s-Msp1p and I-Msp1p (Fig. 4A). A modified ratio of Msp1p isoforms was observed in a strain where the only putative *S. pombe* m-AAA peptidase, homologous to Yta10p/Yta12p in budding yeast and to Paraplegin and AFG3L2 in human, was deleted (Dm-AAA, Fig. 4A). This was due to a 2-fold increase of I-Msp1p levels in Dm-AAA cells versus wild-type strain (WT), with no significant modification of s-Msp1p amounts (Fig. 4B). This suggested that the m-AAA peptidase is not implicated in s-Msp1p generation but rather in controlling the levels of I-Msp1p. In Dm-AAA as in control cells (WT), over-production of HA-tagged Msp1p, which was previously shown to be correctly localized and functional [22,25], resulted in accumulation of p-, I- and s-Msp1p and of several degradation products (Fig. 4C), one of which that migrated at 77 kDa (arrow), being however absent in the protease-deleted strain. This suggests that the m-AAA protease might cleave Msp1p at a specific site for a quality/quantity control survey regulating I-Msp1p to s-Msp1p ratio and/or Msp1p cellular levels. Again, alteration of the relative levels of Msp1p isoforms in Dm-AAA cells was accompanied by a modified morphology of mitochondria which became more aggregated (Fig. 4D).

4. Discussion

Mitochondrial fusion depends on the evolutionary conserved dynamin, OPA1/Mgm1p/Msp1p whose activity is controlled by proteolytic processing generating long and short isoforms of the protein. These are not functionally equivalent since both isoforms within a controlled ratio are required to mediate mitochondrial fusion in mammals and yeasts, and to maintain mtDNA in the later [4,12,25]. Furthermore *S. cerevisiae* I-Mgm1p and s-Mgm1p share distinct biochemical properties and localization [26,27]. Since long and short forms of the dynamin do not have identical functions, it is of interest to characterize species divergent processing that may relate to function specialization. By studying biogenesis of I- and s-Msp1p in *S. pombe*, we demonstrated that the two isoforms of Msp1p are independently generated from the same precursor. In this respect, Msp1p behaves like *S. cerevisiae* Mgm1p but diverges from OPA1 in mammals. However, reduced ATP levels in vivo does not modify the formation of s-Msp1p as it does for Mgm1p and OPA1 [13,19]. Fission yeast rapidly adapted to a shift from fermentation to respiration by changing the ratio of I- to s-Msp1p while similar conditions left the ratio of Mgm1p isoforms unaffected in *S. cerevisiae* [28]. Since I-Msp1p is integral to the mitochondrial inner membrane whereas s-Msp1p is peripheral to it, this possibly reflects a specific role of I-Msp1p in the organization of the mitochondrial inner membrane and thus in the activity of respiratory complexes. Such specificity may correlate with different regulation of respiration in "petite negative" (*S. pombe* and mammals) versus "petite positive" (*S. cerevisiae*) cells.

In *S. pombe*, as in *S. cerevisiae*, generation of s-Msp1p implicates Rhomboid 1. Another protease might also be involved in *S. pombe* since s-Msp1p was still significantly present in Drh1 (Fig. 4) and in Drh1/Drh2 strains (not shown). During evolution, processing by Rhomboid might have almost disappeared for the mammalian dynamin, since generation of s-OPA1 by PARL only concerns a few

percents of total OPA1 [7]. Again as in *S. cerevisiae*, Yme1p is not involved in the generation of the short form of Msp1p whereas it is required to process OPA1 [12]. This may relate to the fact that OPA1 exons 4b and 5b that contain the cleavage sites of YME1 have no corresponding sequences in yeast [4,9]. Recent works have involved the metallopeptidase OMA1 in OPA1 cleavage induced by dissipation of mitochondrial membrane potential (mDw) or apoptosis [29,30]. However, changes in Msp1p processing were observed neither upon mDw decrease nor after Oma1⁺ (SPAP14E8.04) deletion (not shown).

The m-AAA protease is not involved in the generation of the short form of the dynamin in both fission and budding yeasts. m-AAA proteases have been implicated in two types of proteolysis: they can act either as processing peptidases, as they do for OPA1 in mammals [8,10] and cytochrome c peroxidase in yeast [31], or as quality-control enzymes degrading non-native polypeptides to peptides [32]. We showed that the m-AAA protease might cleave Msp1p at a specific site(s), generating a second short isoform of 77 kDa (s2-Msp1p) that is not accumulated in basal conditions possibly due to its rapid elimination by oligopeptidases. Processing by m-AAA protease could serve for controlling the abundance of I-Msp1p in mitochondria, but we cannot exclude that s2-Msp1p could accumulate under specific conditions.

Altogether, our results showed that Msp1p processing in fission yeast occurs by two distinct mechanisms, both found in Mgm1p and/or OPA1 maturation. Thus Msp1p cleavage represents a step in the evolutionary switch of proteases involved in the processing of the sole known intramitochondrial dynamin and may thus represent an interesting tool for studying the regulation of Msp1p and OPA1 processing and its involvement in the adaptation of mitochondria to metabolic or other stresses.

Acknowledgments

We thank Dr. N. Bonnefoy and Dr. V. Trézeguet for providing *S. pombe* strains and Dr. K. Sawin and Dr. R. Tsien for the mCherry vector. This work was supported by grants from the CNRS, Université Paul Sabatier, ANR, AFM, Rétina France and AMMi. AD was a recipient of a fellowship from ARC.

References

- [1] Detmer, S.A. and Chan, D.C. (2007) Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 8, 870–879.
- [2] Hoppins, S., Lackner, L. and Nunnari, J. (2007) The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* 76, 751–780.
- [3] Olichon, A. et al. (2006) Mitochondrial dynamics and disease, OPA1. *Biochim. Biophys. Acta* 1763, 500–509.
- [4] Song, Z., Chen, H., Fiket, M., Alexander, C. and Chan, D.C. (2007) OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J. Cell Biol.* 178, 749–755.
- [5] Olichon, A. et al. (2002) The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett.* 523, 171–176.
- [6] Landes, T. et al. (2010) OPA1 (dys)functions. *Semin. Cell Dev. Biol.* doi:10.1016/j.semcdb.2009.12.012.
- [7] Cipolat, S. et al. (2006) Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* 126, 163–175.
- [8] Duvezin-Caubet, S. et al. (2007) OPA1 processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria. *Mol. Biol. Cell* 18, 3582–3590.
- [9] Griparic, L., Kanazawa, T. and van der Bliek, A.M. (2007) Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J. Cell Biol.* 178, 757–764.
- [10] Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T. and Mihara, K. (2006) Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J.* 25, 2966–2977.
- [11] Guillery, O. et al. (2008) Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol. Cell* 100, 315–325.
- [12] Herlan, M., Vogel, F., Bornhøvd, C., Neupert, W. and Reichert, A.S. (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.
- [13] Herlan, M., Bornhøvd, C., Hell, K., Neupert, W. and Reichert, A.S. (2004) Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J. Cell Biol.* 165, 167–173.
- [14] McQuibban, G.A., Saurya, S. and Freeman, M. (2003) Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature* 423, 537–541.
- [15] Sesaki, H., Southard, S.M., Hobbs, A.E. and Jensen, R.E. (2003) Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA and mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 308, 276–283.
- [16] Chiron, S., Gaisne, M., Guillou, E., Belenguer, P., Clark-Walker, G.D. and Bonnefoy, N. (2007) Methods in Molecular Biology. Mitochondria: Practical protocols 372, 91–106.
- [17] Haffter, P. and Fox, T.D. (1992) Nuclear mutations in the petite-negative yeast *Schizosaccharomyces pombe* allow growth of cells lacking mitochondrial DNA. *Genetics* 131, 255–260.
- [18] Massardo, D.R., Manna, F., Schafer, B., Wolf, K. and Del Giudice, L. (1994) Complete absence of mitochondrial DNA in the petite-negative yeast *Schizosaccharomyces pombe* leads to resistance towards the alkaloid lycorine. *Curr. Genet.* 25, 80–83.
- [19] Baricault, L., Segui, B., Guegan, L., Olichon, A., Valette, A., Larminat, F. and Lenaers, G. (2007) OPA1 cleavage depends on decreased mitochondrial ATP level and bivalent metals. *Exp. Cell Res.* 313, 3800–3808.
- [20] Bahler, J. et al. (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14, 943–951.
- [21] Hentges, P., Van Driessche, B., Tafforeau, L., Vandenhoute, J. and Carr, A.M. (2005) Three novel antibiotic marker cassettes for gene disruption and marker switching in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 22, 1013–1019.
- [22] Guillou, E., Bousquet, C., Daloyau, M., Emorine, L.J. and Belenguer, P. (2005) Msp1p is an intermembrane space dynamin-related protein that mediates mitochondrial fusion in a Dnm1p-dependent manner in *S. Pombe*. *FEBS Lett.* 579, 1109–1116.
- [23] Pelloquin, L., Belenguer, P., Menon, Y. and Ducommun, B. (1998) Identification of a fission yeast dynamin-related protein involved in mitochondrial DNA maintenance. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 251, 720–726.
- [24] Polarshek, M.M. (1977) Effects of heat shock and cycloheximide on growth and division of the fission yeast, *Schizosaccharomyces pombe*. With an Appendix. Estimation of division delay for *S. pombe* from cell plate index curves. *J. Cell Sci.* 23, 1–23.
- [25] Diot, A., Guillou, E., Daloyau, M., Arnaune-Pelloquin, L., Emorine, L.J. and Belenguer, P. (2009) Transmembrane segments of the dynamin Msp1p couple its functions in the control of mitochondrial morphology and genome maintenance. *J. Cell Sci.* 122, 2632–2639.
- [26] DeVay, R.M., Dominguez-Ramirez, L., Lackner, L.L., Hoppins, S., Stahlberg, H. and Nunnari, J. (2009) Coassembly of Mgm1 isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion. *J. Cell Biol.* 186, 793–803.
- [27] Zick, M., Duvezin-Caubet, S., Schafer, A., Vogel, F., Neupert, W. and Reichert, A.S. (2009) Distinct roles of the two isoforms of the dynamin-like GTPase Mgm1 in mitochondrial fusion. *FEBS Lett.* 583, 2237–2243.
- [28] Sesaki, H., Dunn, C.D., Iijima, M., Shepard, K.A., Yaffe, M.P., Machamer, C.E. and Jensen, R.E. (2006) Ups1p, a conserved intermembrane space protein, regulates mitochondrial shape and alternative topogenesis of Mgm1p. *J. Cell Biol.* 173, 651–658.
- [29] Ehse, S. et al. (2009) Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J. Cell Biol.* 187, 1023–1036.
- [30] Head, B., Griparic, L., Amiri, M., Gandre-Babbe, S. and van der Bliek, A.M. (2009) Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *J. Cell Biol.* 187, 959–966.
- [31] Esser, K., Tursun, B., Ingenhoven, M., Michaelis, G. and Pratz, E. (2002) A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the mAAA complex and the putative rhomboid protease Pcp1. *J. Mol. Biol.* 323, 835–843.
- [32] Koppen, M. and Langer, T. (2007) Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42, 221–242.

S. cerevisiae

Mammifères

S. pombe

		<i>S. cerevisiae</i>		Mammifères		<i>S. pombe</i>
	Nom	Fonction	Nom	Fonction		
Processing peptidases						
MPP	M	Mas1, Mas2	Presequence cleavage	• -MPP, • -MPP	See yeast	Ocr1(Mas1).
MIP	M	Oct1	Removal of octapeptides	MIPEP (HMIP)	See yeast	SPAC1F3.10c
IMP	IM	Imp1, Imp2	Presequence cleavage	IMMP1L, IMMP2L	Unknown	SPBC2D10.07c (Imp1) SPBC336.13c (Imp2)
	IMS	Atp23	Atp6 processing and assembly	KUB3	Unknown	SPCC320.12
Rhomboid	IM	Pcp1	Ccp1 and Mgm1 processing	PARL	Protection against apoptosis	SPC13E7.11 SPBP4H10.10
ATP-dependent proteases						
i-AAA	IM	Yme1	Quality control	YME1L	Unknown	SPCC965.04c
m-AAA	IM	Yta10, Yta12	Quality control, protein processing, membrane dislocation	paraplegin, AFG3L1', AFG3L2	Quality control, cleavage of MrpL32 and OPA1	SPBC543.09 (m-AAA)
Lon	M	Pim1	Quality control, mtDNA maintenance and gene expression	LON	Quality control, mtDNA binding	Lon
ClpXP	M	—		ClpP, ClpX	Quality control	-
Oligopeptidases						
	IMS	Mop112	Degradation of peptides and presequences	PreP''	A• degradation ¹	-
	IMS	Prd1	Degradation of peptides and presequences	Neurolysin	Peptide degradation	-
	M	Lap3	Aminopeptidase, protection against homocysteine ²	Bleomycin hydrolase	See yeast	-
Other proteases						
	IM	Oma1	Quality control	OMA1	Unknown	SPAP14E8.04
	IMS	—		HtrA2 (Omi)	Pro-apoptotic, cleavage of • -APP	-

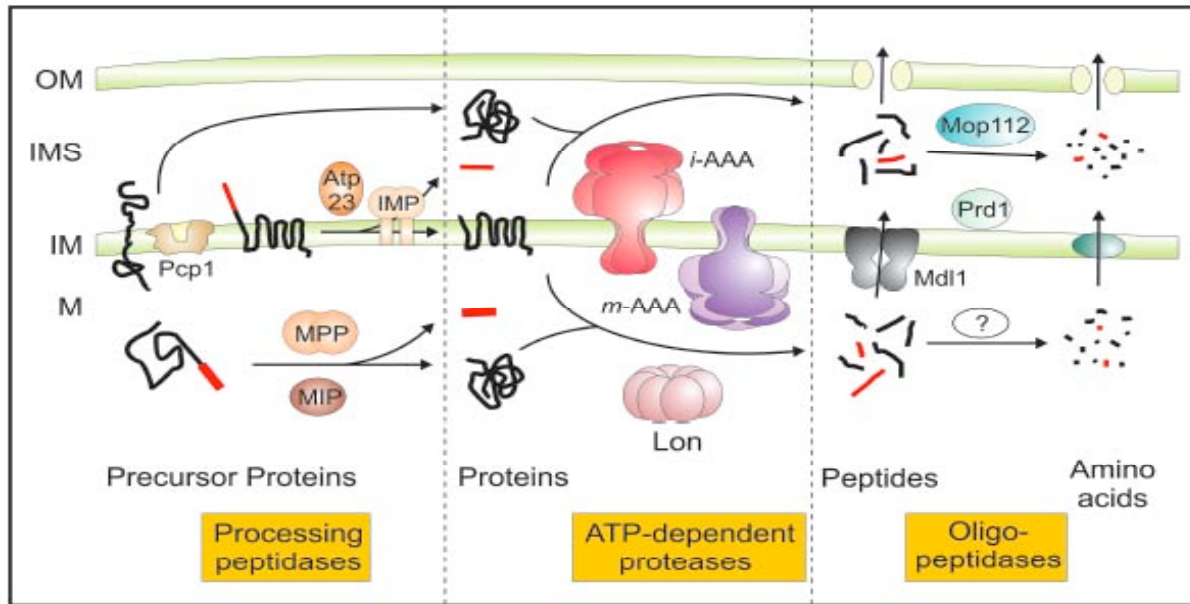
Koppen & Langer 2007 Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology

Tableau n°1 : Les protéases intra-mitochondriales.

4.1.2. Données supplémentaires bibliographiques

La majorité des protéines mitochondriales sont codées par des gènes nucléaires sont donc produites sous la forme d'un précurseur dans le cytoplasme qui sera importé dans la mitochondrie. Ces protéines subissent une maturation protéolytique par des protéases mitochondriales appelées « Processing Peptidases » au cours de leur import. À côté de ce groupe de protéases mitochondriales on trouve deux autres groupes qui diffèrent par rapport à leurs activités (*tableau n°1 et figure n°44*) (Koppen & Langer, 2007). Les « Protéases ATP-dépendantes » peuvent agir comme des « Processing Peptidases » ou comme des enzymes de contrôle-qualité qui dégradent des polypeptides non natifs en peptides. Les « Oligopeptidases », comme Mop112, Prd1 et Lap3 chez *S. cerevisiae*, dégradent ces peptides, ainsi que les MIS, en acides aminés.

Les « Processing Peptidases » sont présentes dans différents compartiments mitochondriaux, certaines peuvent agir séquentiellement. La « Mitochondrial Processing Peptidase » (MPP) est une métallopeptidase hétéro-dimérique qui clive la séquence d'adressage à la mitochondrie dans la matrice. La « Mitochondrial Intermediate Peptidase » (MIP) est une métallopeptidase monomérique qui clive des pré-protéines dans la matrice après action de la MPP. La « Inner Membrane Peptidase » (IMP) est localisée dans la membrane interne ; son site catalytique faisant face à l'IMS elle clive les pré-protéines dans l'IMS après action de la MPP. IMP est un complexe hétéro-oligomérique composé d'une sous-unité non catalytique, Som1p, et deux sous-unités catalytiques (Imp1p et Imp2p) qui ne présentent pas exactement la même spécificité de substrat chez la levure *S. cerevisiae*. En effet, Imp1p est impliquée dans le clivage du Cytb_{2p} et Gut2p (FAD-dépendent glycerol-3-phosphate dehydrogenase) et de la NADH cytochrome b5 réductase codées par le génome nucléaire et de Cox2p codée par le génome mitochondrial, alors que Imp2p est impliquée dans le clivage du Cytb_{2p} et de Cox2p et du Cytc_{1p} codées par le génome mitochondrial et contrôle la stabilité d'Imp1p (Esser et al, 2004; Nunnari et al, 1993). Les deux sous-unités catalytiques ont des homologues murins (IMP1 et IMP2). L'expression de IMP2 murin dans la levure délétée pour *IMP2* ($\Delta imp2$) permet de cliver les Cytb_{2p} et Cytc_{1p} et complémente le déficit de croissance sur source de carbone non-fermentescible (Burri et al, 2005). Chez les mammifères, IMP est impliqué dans la maturation de la protéine apoptogène Smac/Diablo (Burri et al, 2005).



Koppen & Langer 2007 Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology

Figure n°44 : Mécanismes protéolytiques mitochondriaux chez *S. cerevisiae*.

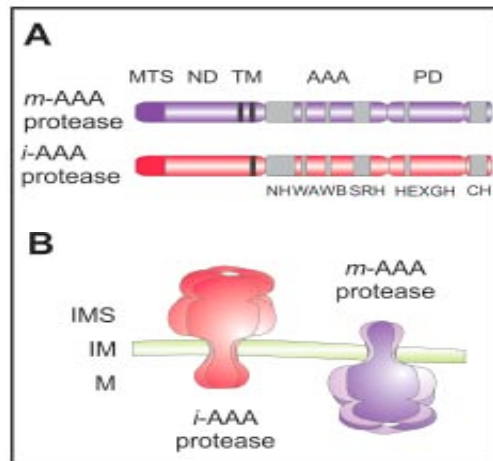
Les protéases intramitochondriales sont fonctionnellement classées en trois groupes : les « Processing Peptidases », les « Protéases dépendantes de l'ATP » et les « Oligopeptidases ».

À côté de ces enzymes génériques, d'autres peptidases mitochondriales agissent comme des « Processing Peptidases ». Celles-ci incluent Atp23p, Rhomboïde (Pcp1p), Oct1p et des membres de la famille des AAA protéases.

Atp23p est une métallopeptidase qui clive chez la levure *S. cerevisiae* la pré-séquence de la protéine Atp6p, une sous-unité de l'ATP synthase codée par le génome mitochondrial, dans l'espace inter-membranaire après son insertion dans la membrane interne (Osman et al, 2007). Indépendamment de son activité protéolytique, Atp23p agit également comme une protéine chaperone qui favorise l'assemblage d'Atp6p dans F₀. Atp23p possède un homologue chez les mammifères dont on ne connaît pas le rôle. ATP6 également codée par le génome mitochondrial chez les mammifères n'a en effet pas de séquence clivable.

Oct1p ou YMIP (Yeast Mitochondrial Intermediate Peptidase) est une peptidase dépendante des métaux qui catalyse une seconde étape de clivage nécessaire à la maturation d'un certain nombre de protéines mitochondriales contenant en C-terminal le motif Rx([Darr])(F/L/I)xx(S/T/G)xxxx([Darr]). Ces protéines sont importées dans la matrice mitochondriale, initialement clivées par la MPP au niveau de deux liaisons peptidiques à partir du résidu R générant un intermédiaire qui sera ensuite clivé par Oct1p pour obtenir la protéine mature. Oct1p joue un rôle dans l'homéostasie du fer mitochondrial, elle interagit fonctionnellement avec Yfh1p et probablement d'autres protéines impliquées dans l'homéostasie du fer.

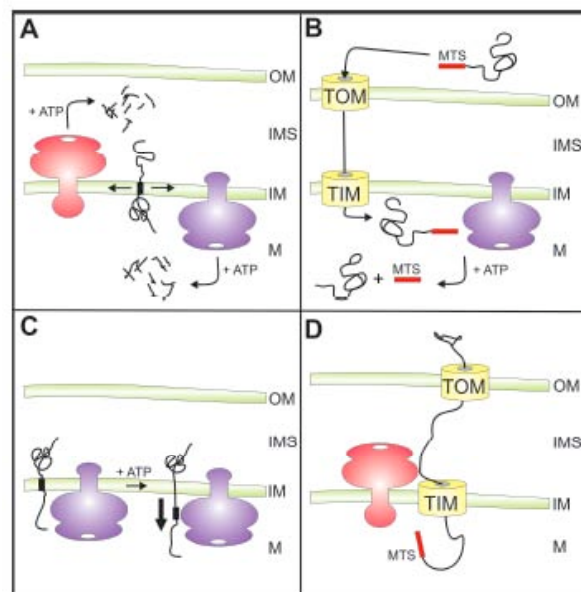
Les protéases de la famille Rhomboïde appartiennent à une famille conservée de sérine peptidases membranaires. Leurs sites catalytiques étant localisés au sein de domaines hydrophobes membranaires, ces enzymes génèrent par clivage de protéines ancrées dans la membrane par leurs domaines transmembranaires des formes solubles fonctionnelles. Un membre mitochondrial conservé de la levure (Pcp1p) à l'homme (PARL) de cette famille a été identifié. Le gène *PCP1*⁺ (Processing of Cytochrome c Peroxydase) a été identifié chez *S. cerevisiae* lors d'un crible génétique visant à identifier des gènes impliqués dans la maturation de la cytochrome c peroxydase (Ccp1p) (Esser et al, 2002). Ccp1p est localisée dans l'espace inter-membranaire grâce à une pré-séquence bipartite qui sera éliminée par Pcp1p après action de la m-AAA protéase (Tatsuta et al, 2007). Pcp1p est ancrée à la membrane interne mitochondriale par 6 segments transmembranaires essentiels. Le second substrat identifié de Pcp1 est Mgm1p. Cette protéase qui génère la forme courte de la dynamine après clivage par la MPP contrôle donc indirectement la morphologie des mitochondries et le maintien de l'ADNmt chez *S. cerevisiae* (McQuibban et al, 2003) (Sesaki et al, 2003a) (Herlan et al, 2003). Chez *S. pombe*, il existe deux homologues de Rhomboïde, Rh1p et Rh2p, auxquels nous nous



Koppen & Langer 2007 Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology

Figure n°45 : Les AAA-protéases mitochondriales.

(A) Représentation schématique des différents domaines des AAA-protéases mitochondriales. MTS : séquence adressage à la mitochondrie, ND : domaine N-terminal, TM : domaine transmembranaire, AAA : domaine AAA, PD : domaine protéolytique, NH : hélices N-terminales, WA : motif Walker A, WB : motif Walker B, SRH : seconde région d'homologie, HEXGH : centre protéolytique, CH : hélices C-terminales. (B) Topologie des AAA-protéases. IMS : espace inter-membranaire, IM : membrane interne, M : matrice



Koppen & Langer 2007 Critical Review in Biochemistry and Molecular Biology

Figure n°46 : Différentes fonctions des AAA protéases dans la mitochondrie.

(A) Les AAA protéases peuvent contrôler la qualité des protéines et dégradent les protéines endommagées en peptide après leur dislocation de la membrane. (B) Les m-AAA protéases peuvent cliver certaines protéines (MrpL32) au niveau de sites particuliers. (C) Les AAA protéases peuvent provoquer une dislocation membranaire de protéines (Ccp1p) dépendante de l'ATP et indépendante de leur activité protéolytique. (D) Les AAA protéases peuvent être impliquées dans l'import de protéine (PNPase) dans l'espace intermembranaire. (TOM = translocase de la membrane externe, TIM = translocase de la membrane interne, OM = membrane externe, IMS = espace inter-membranaire, IM = membrane interne, M = matrice).

sommes intéressés. Chez les mammifères, PARL (Presenilin-Associated Rhomboid-Like) est l'orthologue de Pcp1p. Seule une faible partie d'OPA1 (< 4%) est processée par PARL chez la souris générant une forme courte de la dynamine soluble dans l'espace inter-membranaire ayant un rôle anti-apoptotique (Frezza et al, 2006). Les rôles de PARL dans le remodelage de la structure des crêtes, le relargage du cytochrome c et son effet protecteur vis-à-vis de l'apoptose, révélés par des études menées sur des souris KO, passe par son action sur d'OPA1 (Cipolat et al, 2006).

Les AAA protéases (*figure n°45 et 46*), métallopeptidases caractérisées par le motif consensus HExxH de liaison au métal (*figure n°45*), sont des protéases ATP-dépendantes localisées dans la membrane interne. Elles exposent leurs sites catalytiques soit dans la matrice (m-AAA protéase) soit dans l'espace inter-membranaire (i-AAA protéase) (*figure n°45*) (Langer, 2000). Les AAA-protéases forment de grands complexes composés de plusieurs sous-unités identiques ou étroitement reliées qui s'agenceraient en cylindre hexamérique. Les AAA-protéases codées par des gènes nucléaires sont adressées à la mitochondrie grâce à un signal d'adressage mitochondrial N-terminal et sont ancrées à la membrane interne grâce à un (i-AAA) ou deux (m-AAA) segments transmembranaires (*figure n°45*). En conséquence, les domaines catalytiques situés à la suite des domaines transmembranaires sont exposés dans l'espace inter-membranaire ou la matrice. Le domaine AAA contient des motifs Walker A (WA) et Walker B (WB) impliqués respectivement dans la liaison et l'hydrolyse de l'ATP, et le domaine SRH (so-called second region of homology). À l'image des autres membres de la famille des protéases ATP-dépendantes, les AAA protéases sont impliquées dans la reconnaissance et la dégradation de polypeptides non natifs ou non assemblés. Cependant, elles sont également impliquées dans le clivage de différents substrats ou leur dislocation à travers la membrane. Chez la levure *S. cerevisiae*, la m-AAA protéase est un hétéro-oligomère composé de deux sous-unités étroitement reliées, Yta10p et Yta12p. Des levures délétées pour l'une de ces deux sous-unités, ou exprimant des mutants protéolytiquement inactifs, présentent un déficit de respiration, d'assemblage des complexes respiratoires et de l'ATP synthase dans la membrane interne, ainsi qu'une tendance accrue à perdre leur génome mitochondrial. La m-AAA protéase clive la protéine MrpL32p, une sous-unité des ribosomes mitochondriaux codée par le génome nucléaire, au niveau de sa séquence d'adressage à la mitochondrie N-terminale au cours de son import. L'absence de ce clivage affecte l'assemblage de MrpL32p dans le ribosome et la traduction des protéines de la chaîne

respiratoire. Un rôle non protéolytique ATP-dépendant a été proposée pour la m-AAA protéase dans la dislocation de Ccp1p, permettant son positionnement correct dans la membrane interne nécessaire à son clivage par Pcp1p (Koppen & Langer, 2007). Chez l'homme, la m-AAA protéase est un complexe homo- ou hétéro-oligomérique composé de deux sous-unité AFG3L2 et Paraplégine (Casari et al, 1998). Une troisième sous-unité, AFG3L1, est exprimée chez la souris, alors qu'elle correspond à un pseudogène chez l'homme. La surexpression de la Paraplégine dans les cellules HeLa induit le clivage d'OPA1 au site S1, mais l'inactivation de la m-AAA protéase est sans effet sur le profil global d'expression de la dynamine (Ishihara et al, 2006). Le clivage d'OPA1 dans les levures délétées pour *Yta10* et *Yta12* ($\Delta Yta10\Delta Yta12$) surexprimant AFG3L2 ou AFG3L1 mais pas Paraplégine est restauré (Duvezin-Caubet et al, 2007). Il a été récemment montré que la diminution de l'expression de AFG3L1 et AFG3L2 dans les MEFs diminuait la stabilité de la forme longue d'OPA1 en induisant sa protéolyse par la protéase OMA1 (Ehses et al, 2009). Chez la levure *S. cerevisiae*, les Prohibitines, Phb1p et Phb2p, forment des super complexes d'environ 2MDa avec les deux m-AAA protéases, Yta10p et Yta12p. Ces protéines réguleraient négativement l'activité des m-AAA protéases sur les protéines de la membrane interne non assemblées ou mal re-pliées soit en interagissant avec les substrats soit en modulant l'activité enzymatique de la m-AAA protéase (Steglich et al, 1999). L'inactivation des prohibitines dans les cellules de mammifères induit la fragmentation des mitochondries, la destructuration des crêtes et augmente la sensibilité à l'apoptose. L'ensemble de ces phénotype serait lié à la perte de la forme longue d'OPA1 conséquence d'une stimulation de la protéolyse de la dynamine par les m-AAA protéases (Merkwirth & Langer, 2009). Il a été récemment proposé que les Prohibitines joueraient un rôle d'échafaudage membranaire pour les protéines et des lipides, comme la phosphatidyl ethanolamine et la cardiolipine, et définiraient des domaines fonctionnels au sein de la membrane interne, qui serait essentiels pour le maintien des activités mitochondriales (Osman et al, 2009). Chez *S. pombe* il existe une seule m-AAA protéase mitochondriale ([tableau n°1](#)) à laquelle nous nous sommes intéressés.

Chez la levure *S. cerevisiae* l'i-AAA protéase Yme1p a été isolée dans un crible génétique réalisé pour identifier des protéines dont l'inactivation provoque une augmentation de l'échappement de l'ADNmt vers le noyau (Thorsness & Fox, 1993). Yme1p est nécessaire pour la croissance des levures à basse température en milieu fermentescible et à température élevée en milieu respiratoire (Thorsness et al, 1993). L'inactivation de Yme1p induit un phénotype de cellules petite négatives, les levures ne peuvent plus tolérer la perte du génome mitochondrial. L'identification de différents suppresseurs spécifiques de chacun des

phénotypes liés à la délétion du gène *YME1*⁺ a indiqué qu'un défaut de protéolyse de différents substrats serait la cause de ces déficits, plutôt qu'un effet global délétère de protéines mal conformées. La délétion du gène *YME1*⁺ provoque chez la levure une fragmentation des mitochondries suggérant un rôle de Yme1p dans le maintien de la morphologie mitochondriale chez la levure (Campbell et al, 1994). Ce phénotype peut être supprimé grâce à l'expression d'IAP-1, l'homologue de *YME1*⁺ chez *N. crassa*. Alors que l'expression d'IAP-1 ne restaure ni le déficit de croissance en milieu respiratoire à température élevée ni la protéolyse de la protéine Cox2p non assemblée. YME1L, l'homologue humain de Yme1p restaure, quant à elle, la croissance respiratoire à température élevée. Les i-AAA protéases seraient donc conservées durant l'évolution mais elles présenteraient un certain degré de divergence probablement lié à leur spécificité de substrat (Graef et al, 2007; Klanner et al, 2001). Chez les mammifères à côté du rôle de YME1 dans la protéolyse site spécifique d'OPA1, un rôle non protéolytique de cette protéine dans l'import la PNPase (Polynucleotide Phosphorylase) a récemment été décrit.

Les m-AAA protéases appartiennent à la famille des protéases ATP-dépendantes à domaine ATPase, qui constituent des véritables micro-compartiments protéolytiques. L'énergie libérée de l'hydrolyse de l'ATP est utilisée pour déstructurer les substrats et les transporter à l'intérieur de la chambre protéolytique. Les protéases Lon et Clp appartiennent à cette famille de protéases très conservée depuis les bactéries. La protéase Lon est impliquée dans le contrôle qualité de protéines matricielles. Sa fonction est essentielle en condition de stress thermique et oxydatif.

D'autres protéases sont présentes au sein de la mitochondrie, comme Oma1p et HTRA2 (Omi), sans que l'on puisse les classer fonctionnellement dans les 3 catégories décrites ci-dessus.

Oma1 est un membre d'une grande famille conservée des bactéries à l'homme de métallopeptidases intégrées dans la membrane. Elle a été identifiée chez la levure dans un crible génomique à grande échelle pour des peptidases mitochondriales. Oma1p est localisée à la membrane interne des mitochondries avec son site catalytique situé dans la matrice (Kaser et al, 2003). Chez la levure Oma1p clive la protéine Oxa1p mal repliée au niveau de plusieurs sites (Kaser et al, 2003), et exerce donc une fonction similaire à celle des m-AAA protéases pour le contrôle qualité des protéines de la membrane interne. Elle pourrait faire partie d'un système de sauvetage dans des conditions d'activité limitée des m-AAA protéases. OMA1 a

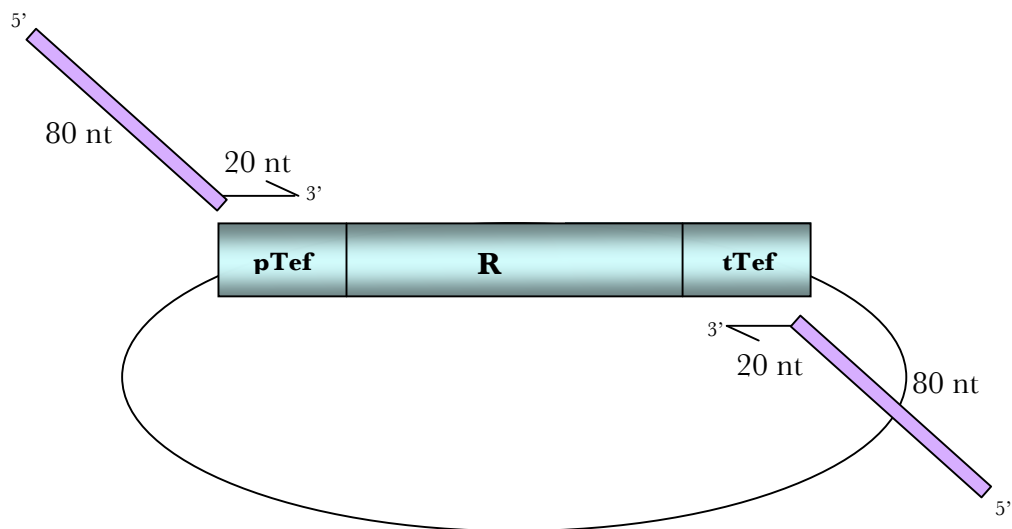


Figure n°47 : Représentation schématique de la construction de la cassette de recombinaison homologue contenant le gène résistance à l'antibiotique (R) par PCR.

La cassette est utilisée pour cibler un événement de recombinaison homologue afin de déléter les protéases Rh2p et Yme1p. Les amorces utilisés dans la PCR contiennent en 5' 80 nucléotides aux zones en amont ou en aval d'ORF des différents protéases et en 3' 20 nucléotides du promoteur (pTef) ou terminateur (tTef).

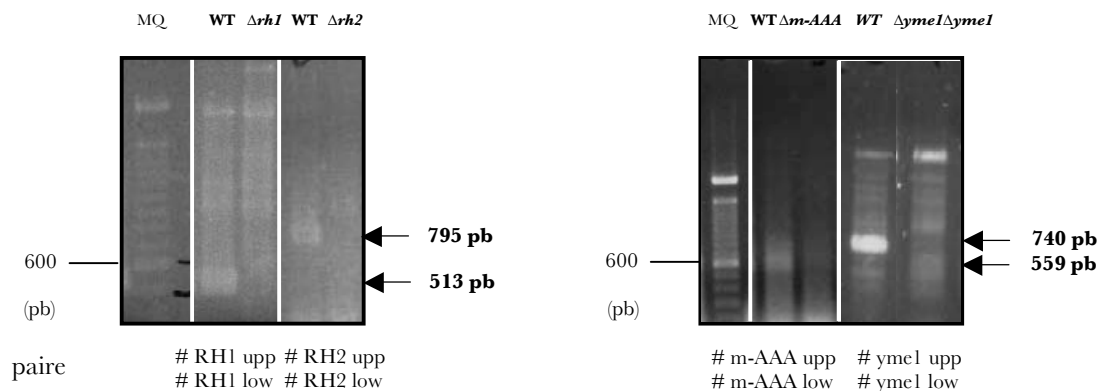


Figure n°48 : Vérification des délétions des gènes *rh1*⁺, *rh2*⁺, *m-AAA*⁺ et *yme1*⁺.

L'absence des gènes *rh1*⁺, *rh2*⁺, *m-AAA*⁺ et *yme1*⁺ a été analysé par PCR en utilisant une paire d'amorces localisées dans le cadre de lecture de ces gènes. Dans les souches parentales portant les gènes sauvages *rh1*⁺, *rh2*⁺, *m-AAA*⁺ et *yme1*⁺ (WT) un produit PCR de 513 pb, 795 pb, 559 pb et 740 pb est détecté respectivement contrairement aux clones recombinants ($\Delta rh1$, $\Delta rh2$, $\Delta m-AAA$, $\Delta yme1$). Les fragments amplifiés sont analysés par électrophorèse sur gel d'agarose et coloration au BET.

récemment été identifiée chez l'homme. Il s'agit d'une protéine mitochondriale dont la fonction est contrôlée négativement par clivage protéolytique par une protéase inconnue. En condition de dissipation du potentiel de membrane mitochondriale ou de diminution d'ATP, le clivage d'OMA1 est inhibé et la protéase est alors impliquée dans le clivage inductible d'OPA1 (Ehse et al, 2009)(Head et al, 2009).

HtrA2 (Omi) est une serine peptidase localisée dans l'espace inter-membranaire chez les mammifères. Elle a été identifiée comme une protéine pro-apoptogène qui serait libérée de la mitochondrie (Koppen & Langer, 2007).

4.1.3. Données supplémentaires expérimentales

Les souches délétées pour les protéases Rhomboïde ($\Delta rh1$, $\Delta rh2$), m-AAA ($\Delta m-AAA$), i-AAA ($\Delta yme1$) et Oma1 ($\Delta oma1$) ont été obtenues par recombinaison homologue. Pour cela, dans le cas des souches $\Delta rh1$ et $\Delta m-AAA$, une cassette de recombinaison homologue contenant 400 pb correspondant aux régions 5' et 3' non traduites des deux gènes ont été synthétisées puis sous-clonées respectivement en amont et en aval du gène de résistance à la Kanamycine (KanaR). Dans le cas des souches $\Delta rh2$, $\Delta yme1$ et $\Delta oma1$ la cassette de recombinaison a été construite par PCR en utilisant deux primers contenant en 5' 80 nucléotides correspondant aux zones amont ou aval de l'ORF de différentes protéases et en 3' 20 nucléotides respectivement du promoteur pTef ou terminateur pTef contrôlant l'expression du gène de résistance à la nourseothricine (NourseoR) ou à l'hygromycine (hygroR) (figure n°47). Ces fragments d'ADN ont été transformés dans une souche de levure sauvage afin de remplacer les gènes d'intérêt par les gènes de résistance ($rh1^+$ et $m-AAA^+$ par KanaR, $rh2^+$ par NourseoR, $yme1^+$ et $oma1^+$ par HygroR). Les transformants ont été étalés sur milieu sélectif contenant l'antibiotique. Les clones recombinants résistants ont ensuite été criblés pour l'absence du gène d'intérêt par PCR sur colonies en utilisant des paires d'oligonucléotides localisées dans le cadre de lecture des gènes codant les différentes protéases (figure n°48). Le remplacement du gène par la cassette de recombinaison homologue ainsi que l'absence d'insertion supplémentaire a également été vérifié par Southern blot (figures n°49, 50, 51 et 52). Ainsi deux clones indépendantes $\Delta rh1$, $\Delta m-AAA$, $\Delta yme1$ et un clone $\Delta rh2$, ont été sélectionnés. Notons que, dans le cas de Yme1, aucune colonie délétée de ce gène dans un environnement génétique sauvage n'a pu être obtenue. Cependant le gène $yme1^+$ a pu être délété dans un fond génétique

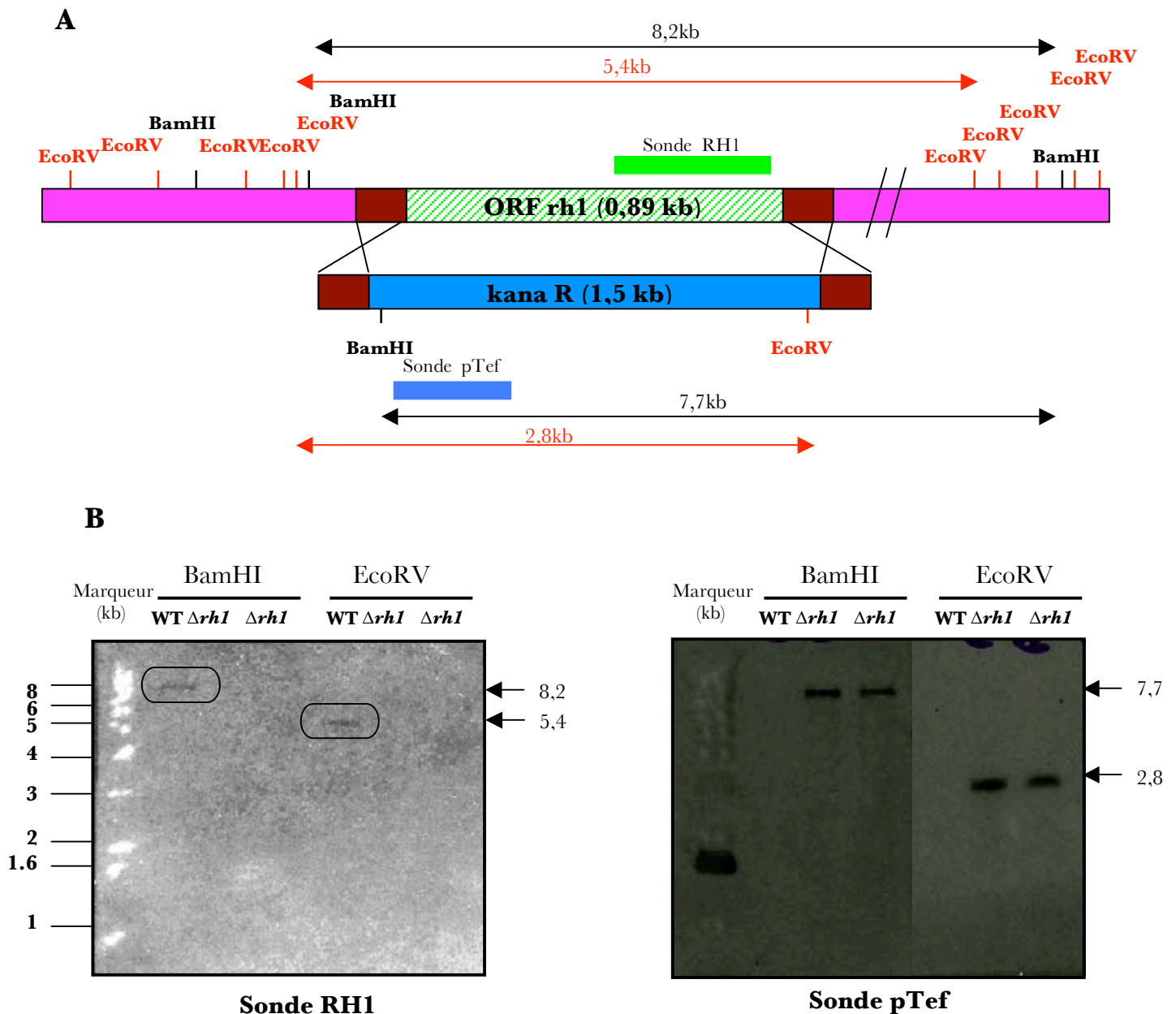


Figure n°49 : Construction des souches délétées pour *rh1*⁺.

(A) Représentation schématique du locus sauvage portant le gène *rh1*⁺ et de son remplacement par le gène de résistance à la Kanamycine (KanaR) par recombinaison homologue. (B) Analyse par Southern blot des souches parentales et recombinantes résistantes à la Kanamycine. L'ADN génomique des cellules parentales (WT) ou recombinantes ($\Delta rh1$) a été extrait, digéré par des enzymes de restriction, séparé par électrophorèse, transféré sur filtre et soumis à une hybridation avec une sonde correspondant au gène *rh1*⁺ (RH1) ou au promoteur pTef. Dans les cellules parentales, le gène *rh1*⁺ est contenu dans un fragment BamHI de 8,2 kb et dans un fragment EcoRV de 5,4 kb révélé par la sonde RH1. Ces deux fragments ne sont pas présents dans les cellules recombinantes. La présence d'un fragment BamHI de 7,7 kb et d'un fragment EcoRV de 2,8 kb révélés par la sonde pTef démontre le remplacement du gène *rh1*⁺ par le gène KanaR dans les clones recombinants. Ces deux fragments ne sont pas présents dans la souche parentale. Aucun fragment supplémentaire n'est révélé par la sonde pTef révélant qu'il n'y pas d'intégration supplémentaire de la cassette de recombinaison au niveau d'un autre locus.

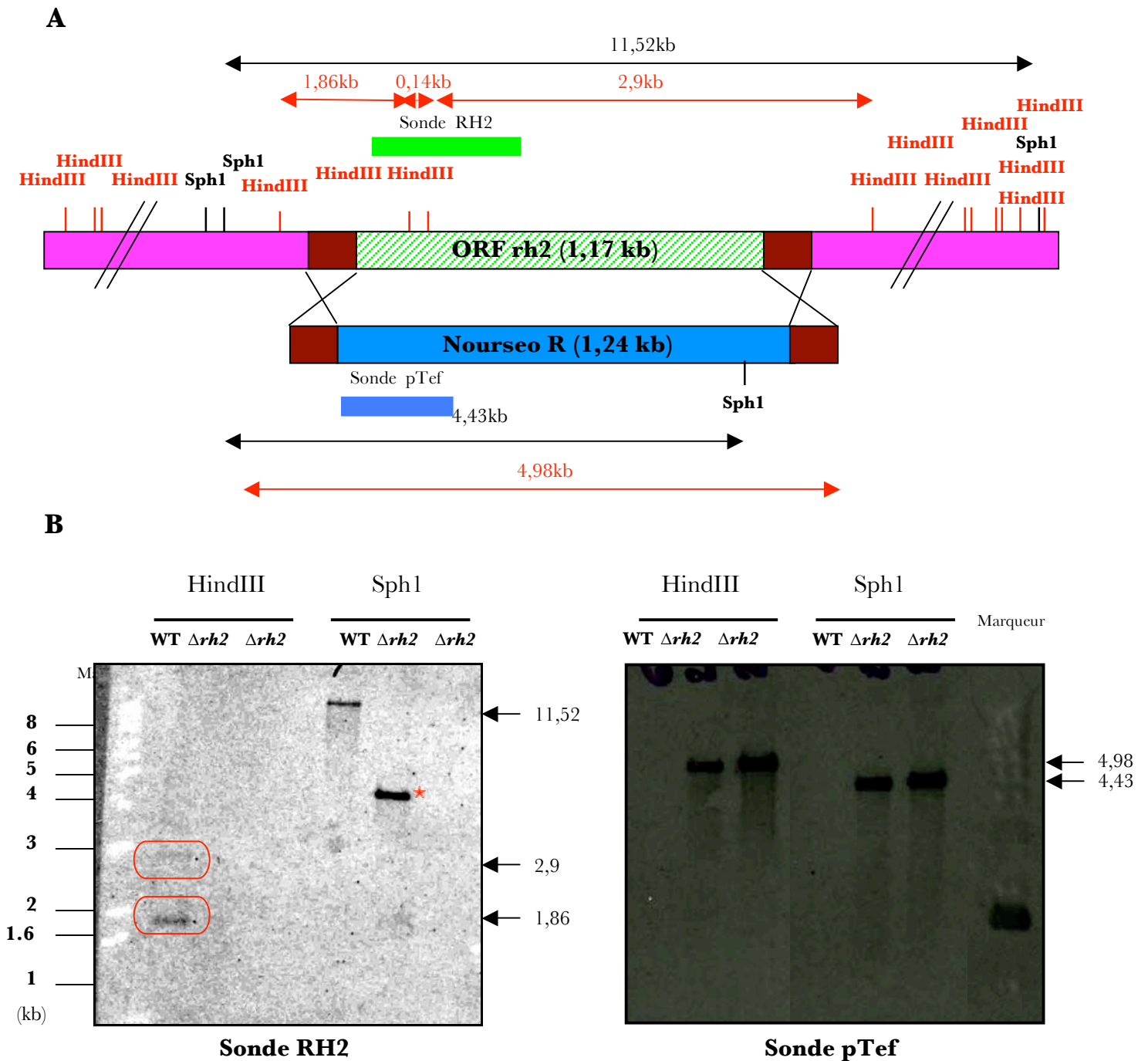


Figure n°50 : Construction des souches délétées pour *rh2*⁺.

(A) Représentation schématique du locus sauvage portant le gène *rh2*⁺ et de son remplacement par le gène résistance à la Nourseothricine (NourseoR) par recombinaison homologue. (B) Analyse par Southern blot des souches parentales (WT) et recombinantes résistantes à la Nourseothricine ($\Delta rh2$) en utilisant une sonde localisée dans le gène *rh2*⁺ (RH2) et une sonde localisée dans le promoteur pTef. La présence du gène *rh2*⁺ dans la souche parentale est révélée par l'obtention de deux fragments HindIII de 2,9 et 1,86 kb et d'un fragment SphI de 11,52 kb dans l'hybridation avec la sonde RH2. La délétion du gène *rh2*⁺ dans les souches recombinantes et son remplacement par le gène NourseoR est révélé par la détection d'un fragment HindIII de 4,98 kb et un fragment SphI de 4,43 kb par la sonde pTef. Une des deux souches $\Delta rh2$ présente un fragment SphI non attendu de 4 kb révélé par la sonde RH2 (★).

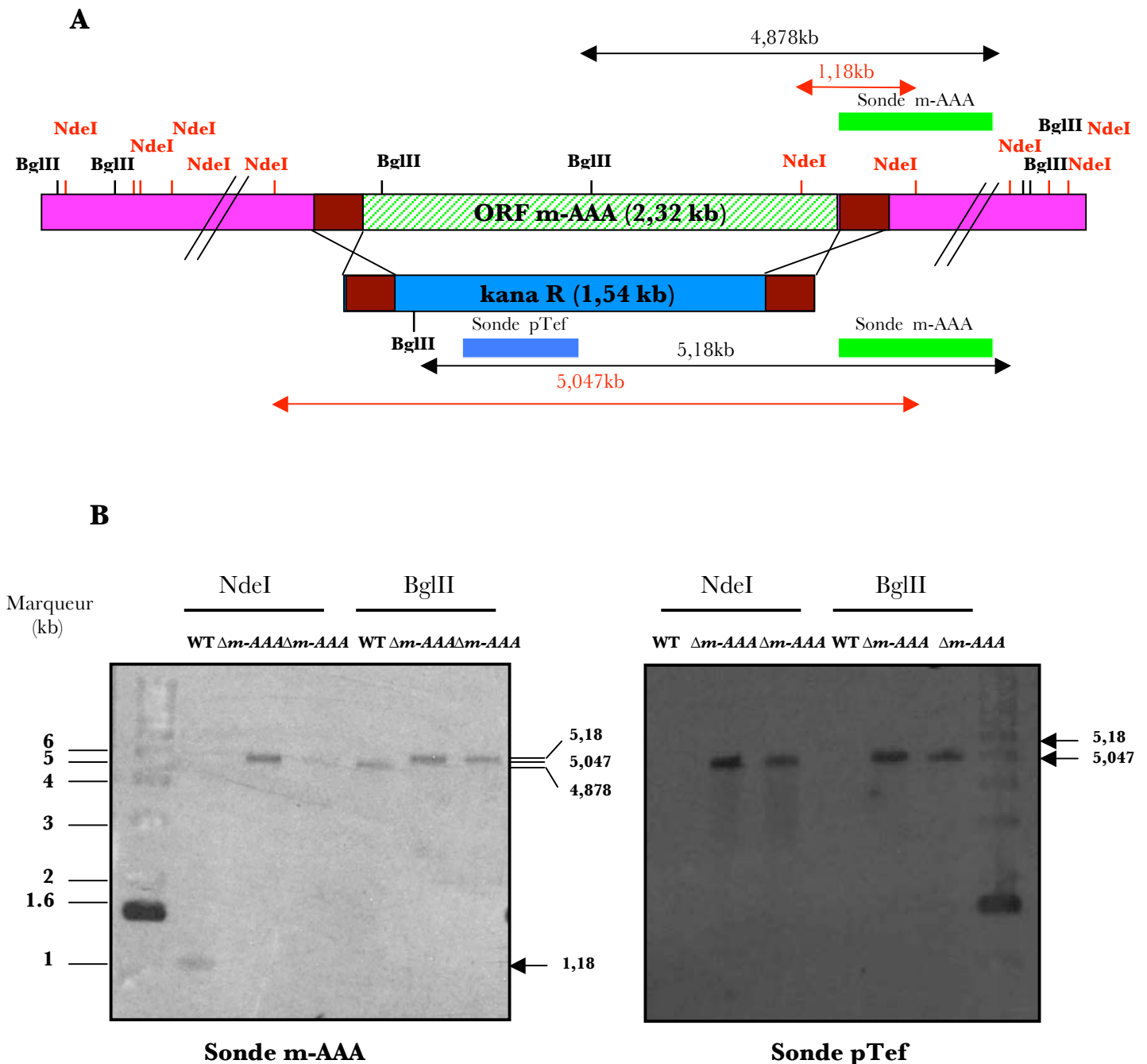


Figure n°51 : Construction des souches délétées pour *m-AAA*⁺ protéase.

(A) Représentation schématique du locus sauvage portant le gène *m-AAA*⁺ et de son remplacement par le gène résistance à la Kanamycine (KanaR) par recombinaison homologue. (B) Analyse par Southern blot des souches parentales (WT) et recombinantes résistantes à la Kanamycine ($\Delta m-AAA$) en utilisant une sonde localisée dans le gène *m-AAA*⁺ (m-AAA) et une sonde localisée dans le promoteur pTef. Le gène *m-AAA*⁺ dans la souche parentale est révélé par l'obtention d'un fragment NdeI de 1,186 kb et d'un fragment BglIII de 4,878 kb hybridant avec la sonde m-AAA. La délétion du gène *m-AAA* dans les souches recombinantes et son remplacement par le gène KanaR est révélé par la détection avec la sonde pTef d'un fragment NdeI de 5,047 kb et un fragment BglIII de 5,18 kb. Ces derniers sont également révélés par la sonde m-AAA.

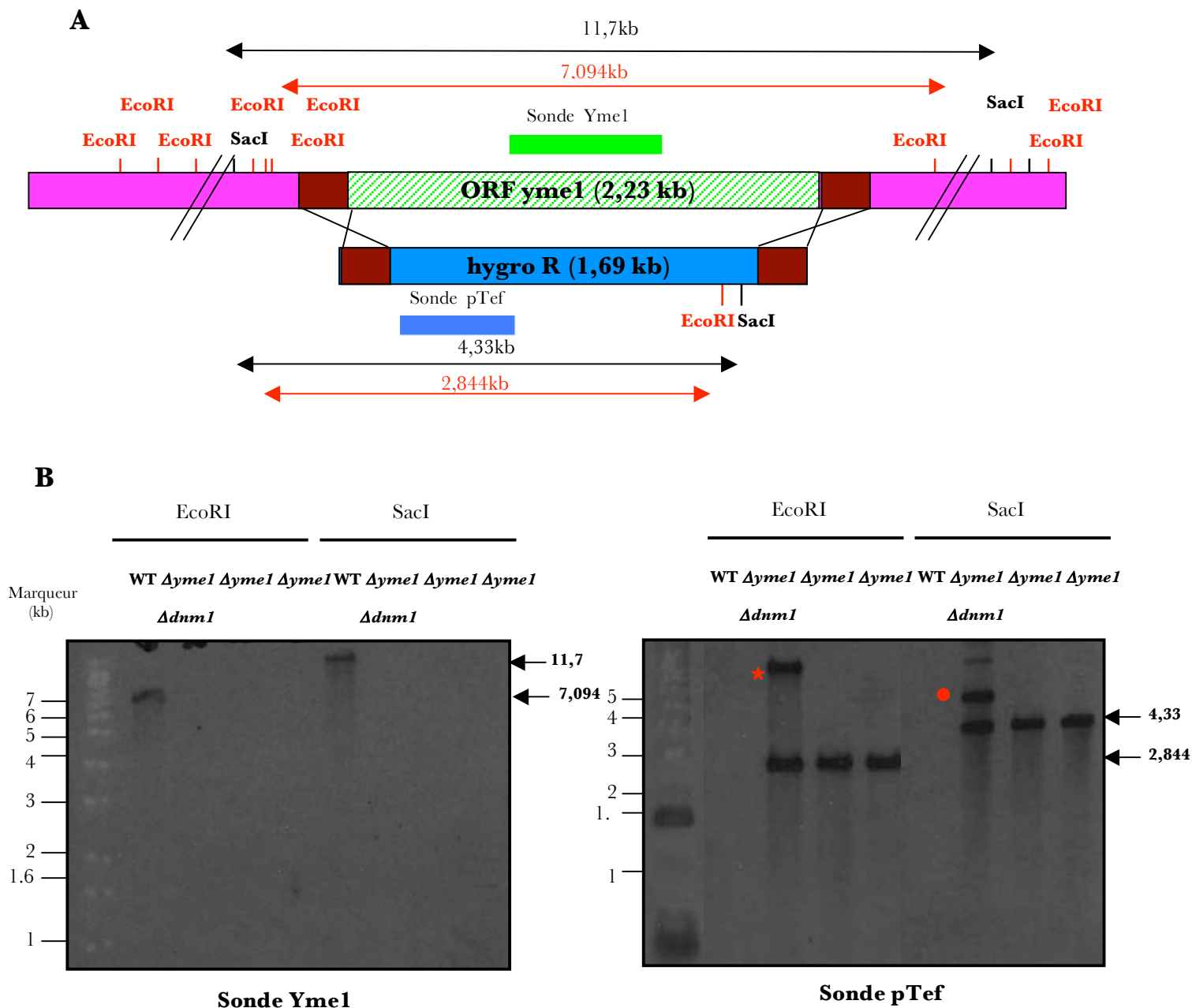


Figure n°52 : Construction des souches délétées pour *yme1*⁺.

(A) Représentation schématique du locus sauvage portant le gène *yme1*⁺ et de son remplacement par le gène résistance à hygromycine (*hygroR*) par recombinaison homologue. (B) Analyse par Southern blot des souches parentales (WT) et recombinantes résistantes à l'hygromycine ($\Delta yme1$) en utilisant une sonde localisée dans le gène *yme1*⁺ et une sonde localisée dans le promoteur pTef. La présence du gène *yme1*⁺ dans la souche parentale est révélée par l'obtention d'un fragment EcoRI de 7,094 kb et d'un fragment SacI de 11,7 kb hybridant avec la sonde Yme1. La délétion du gène *yme1*⁺ dans les souches recombinantes et son remplacement par le gène *hygroR* est révélée par la détection d'un fragment EcoRI de 2,844 kb et d'un fragment SacI de 4,33 kb par la sonde pTef. Dans la souche $\Delta yme1 \Delta dnm1$ notons la présence d'un fragment EcoRI supplémentaire de 10 kb (★) et d'un fragment SacI supplémentaire de 5,5 kb (●) qui correspondent au remplacement du gène *dnm1*⁺ par le gène KanaR sous le contrôle du pTef.

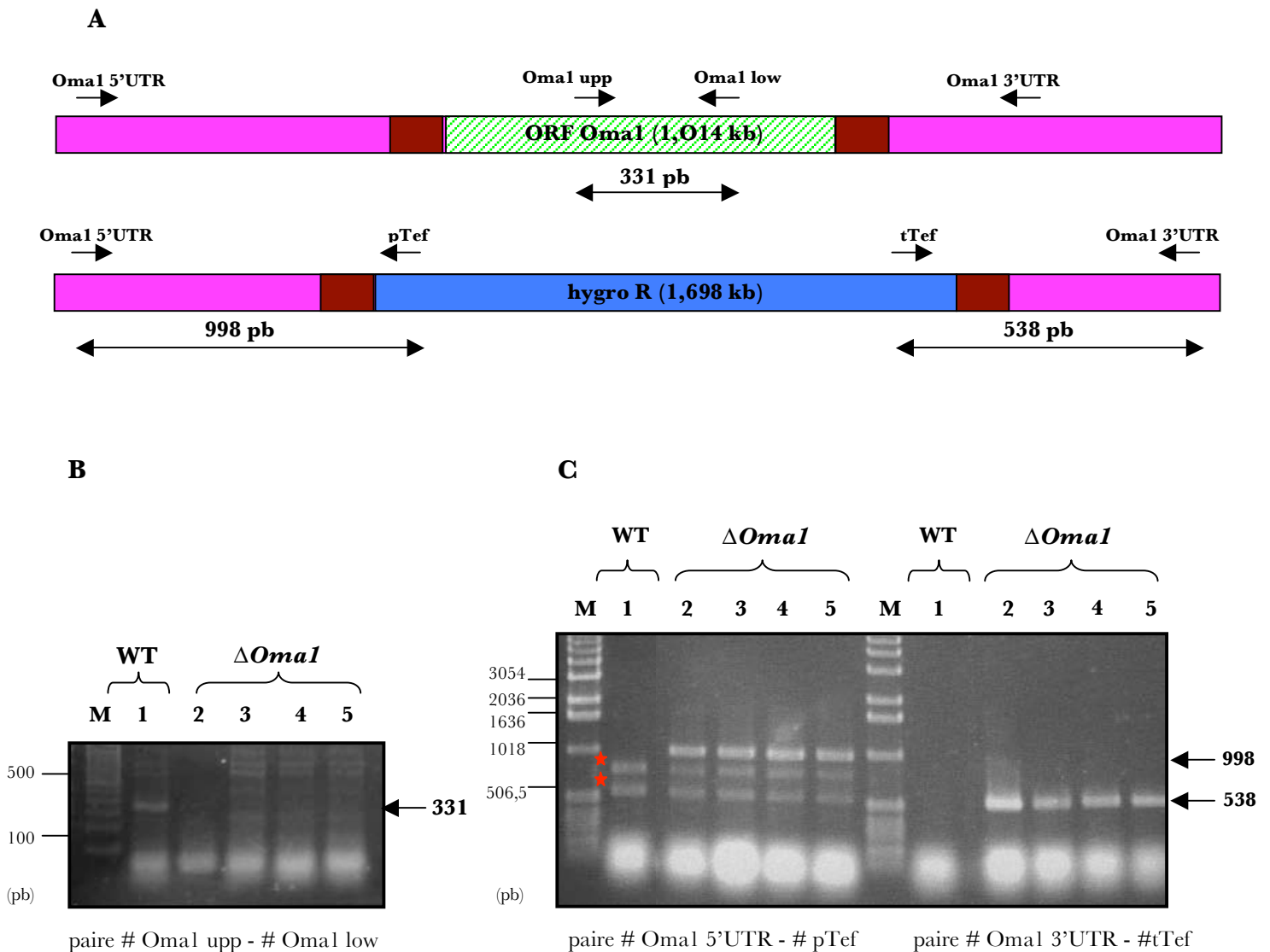


Figure n°53 : Vérification de la délétion du gène *oma1*⁺ par PCR.

(A) Représentation schématique du locus contenant le gène *oma1*⁺ sauvage ou remplacé par le gène résistance à l'hygromycine (*hygroR*). (B et C) Une expérience de PCR sur colonies a été réalisée sur des souches parentales (WT) et recombinantes (Δ *Oma1*) résistantes à l'hygromycine en utilisant différents couples d'amorces. Les produits PCR ont été analysés par électrophorèse sur gel d'agarose et coloration au BET. (B) L'absence du gène *oma1*⁺ a été analysée en utilisant une paire d'oligonucléotides localisée dans le cadre de lecture du gène *oma1*⁺ (*Oma1 upp* et *Oma1 low*). Dans la souche parentale portant le gène *oma1*⁺ sauvage (piste 1) un produit PCR de 331 pb est détecté contrairement aux quatre clones recombinants *hygroR* (pistes 2, 3, 4, 5). (C) Le remplacement du gène *oma1*⁺ par le gène *hygroR* a été analysé en utilisant des amorces localisées dans le gène *hygroR* au niveau du terminateur *tTef* et du promoteur *pTef* et des amorces localisées dans le gène *oma1*⁺ hors de la cassette de recombinaison en 5' et 3'. La présence d'un fragment de 998 pb amplifiés grâce au couple de primers *Oma1 5'UTR* et promoteur *pTef* et d'un fragment de 538 pb amplifié grâce au couple de primers *Oma1 3'UTR* et terminateur *tTef* dans les souches recombinantes (pistes 2-5) atteste du remplacement du gène *oma1*⁺ par le gène *hygroR*. ★ = bande non-spécifique

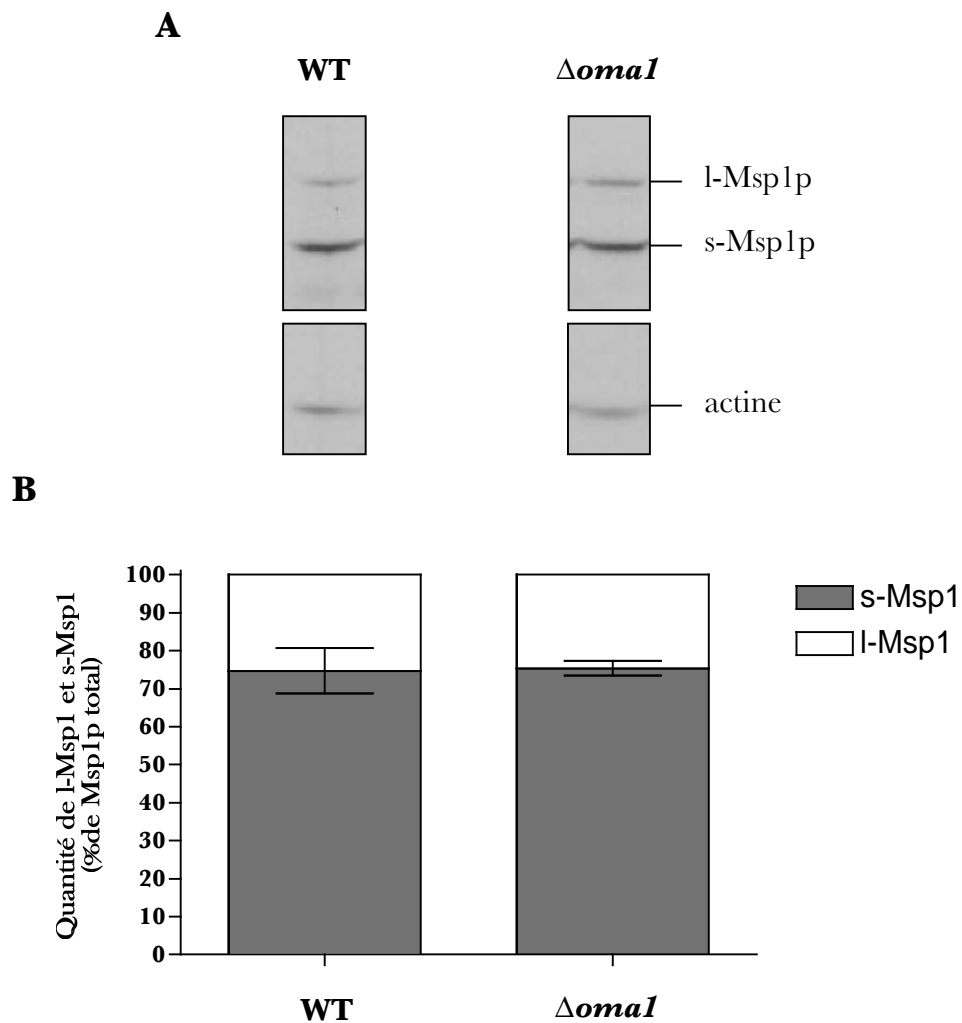


Figure n°54 : Détection de Msp1p dans les souches délétées pour *oma1*⁺.

(A) Un extrait protéique a été réalisé à partir de levures parentales ou délétées pour le gène *oma1*⁺ puis analysé par SDS-PAGE et soumis à une immunodétection avec un anticorps anti-Msp1p ou un anticorps anti-actine. (B) La quantification du rapport entre les formes longue (l-Msp1p) et courte (s-Msp1p) de Msp1p a été réalisée par analyse densitométrique à l'aide du logiciel ImageJ. Les résultats représentent la moyenne de 4 expériences indépendantes +/- SEM.

déléte pour *dnm1* ($\Delta dnm1 \Delta yme1$). Des colonies délétées pour le gène *yme1*⁺ et portant un gène *dnm1*⁺ sauvage ($\Delta Yme1$) ont ensuite été obtenues par croisement.

La délétion du gène *oma1*⁺ a été vérifiée uniquement par PCR à l'aide d'une amorce localisée dans la cassette de recombinaison et d'une amorce localisée au locus *oma1*⁺ hors de la cassette de recombinaison (figure n°53). L'expression de Msp1p dans la souche délétée du gène *oma1*⁺ a été vérifiée par Western blot réalisé sur quatre clones indépendants en comparaison avec la souche parentale. Ces résultats montrent qu'en absence du gène *oma1*⁺, la proportion des isoformes s- et l-Msp1 n'est pas affectée (figure n°54).

Des souches délétées pour les gènes *imp1*⁺, *imp2*⁺, *atp23*⁺ et *oct1*⁺ ont été commandées chez BIONEER sous la forme de diploïdes contenant un allèle délété et remplacé par le gène KanaR et un allèle sauvage. Les haploïdes obtenus après sporulation et sélection grâce à la résistance à la kanamycine ont été testés par PCR à l'aide d'amorces localisées dans le cadre de lecture des différentes protéases. Les résultats de la PCR ont montré la présence de ces gènes dans toutes les colonies criblées. Il est à noter que ces quatre gènes ne sont pas essentiels chez la levure *S. pombe* (Idiris et al, 2006) (*Schizosaccharomyces pombe* GeneDB). La vérification de l'intégration de la cassette de la recombinaison réalisée par le fournisseur n'ayant été réalisée que par PCR, ces clones KanaR doivent correspondre à des événements d'intégration aléatoire. Nous envisageons de cribler plus de clones ou de nous procurer les levures délétées auprès d'une autre source (Kim et al). Une banque de délétion des gènes chez *S. pombe* contenant 4,836 diploïdes de délétion a en effet été récemment publiée (Kim et al).

4.2. Étude de la maturation protéolytique d'OPA1 dans la levure *S. pombe*

Afin de clarifier les mécanismes de protéolyse d'OPA1, largement controversés quand nous avons débuté nos travaux, nous avons décidé d'utiliser le modèle *S. pombe*. Pour cela, nous avons exprimé la protéine OPA1 dans des levures délétées pour les gènes des protéases potentiellement impliquées dans le clivage d'OPA1 ($\Delta yme1$, $\Delta rh1$ et $\Delta m-AAA$). Ces levures, ainsi que des levures contrôles sauvages (auxotrophes pour la leucine) ont été transformées par des vecteurs (pREP41) exprimant les différents variants d'épissage d'OPA1 sous contrôle du promoteur *nmt1* réprimé par la thiamine.

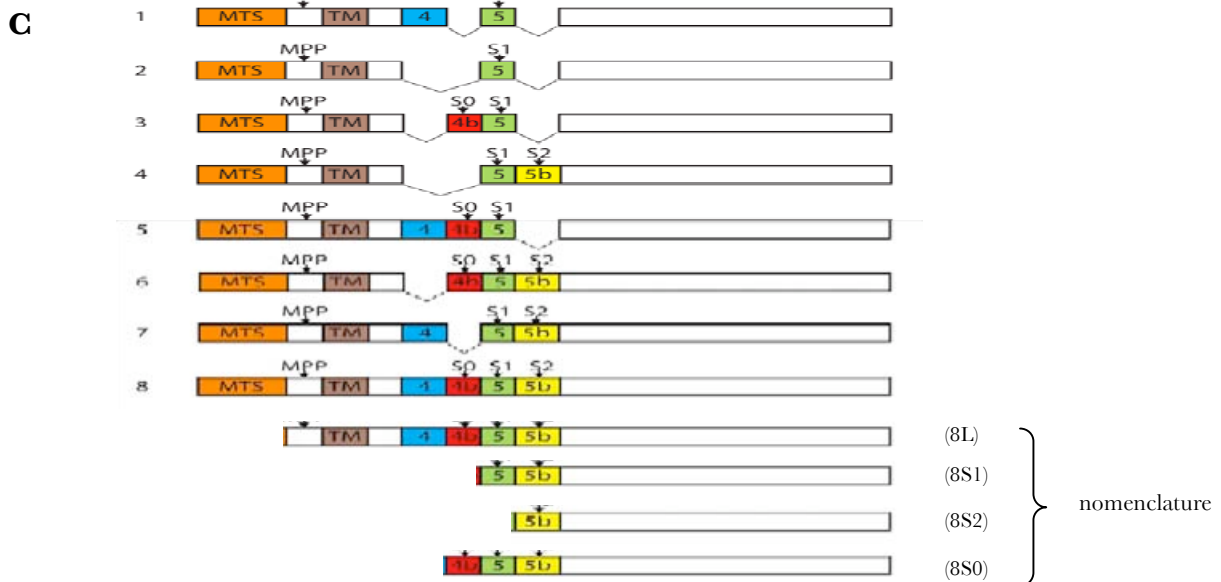
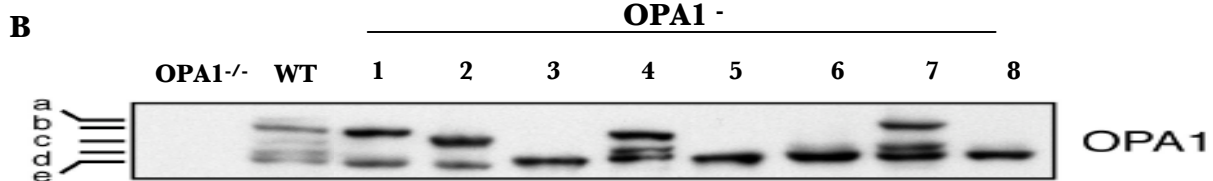
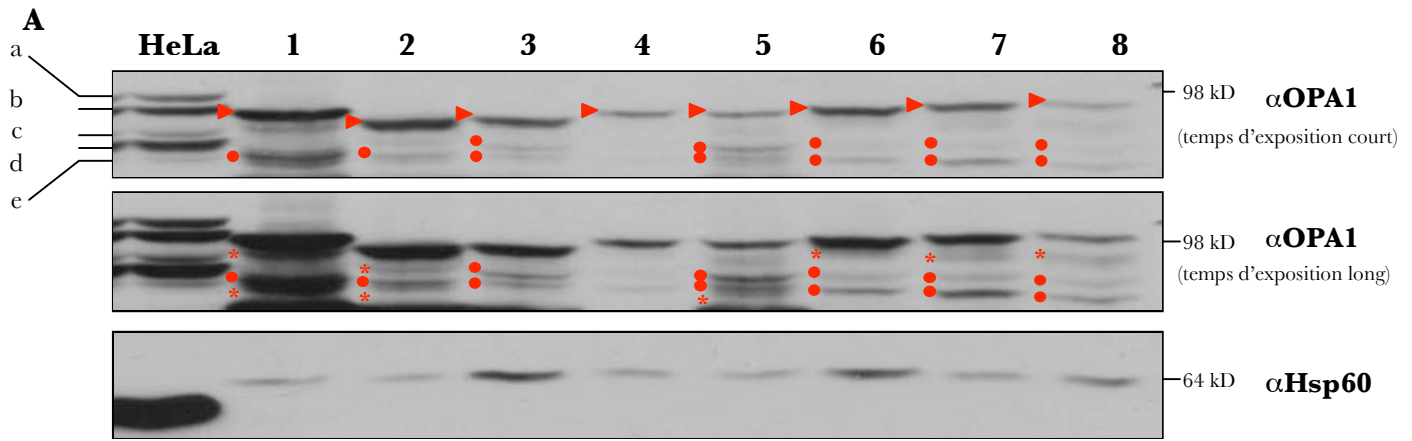


Figure n°55 : Expression ectopique des 8 variants d'épissage d'OPA1 dans la levure *S. pombe* ou dans les MEF OPA1^{-/-}.

(A) Les protéines ont été extraites de levures sauvages exprimant un des 8 variants d'épissages d'OPA1, séparées par SDS PAGE, transférées sur nitrocellulose puis soumises à une immunodétection avec un anticorps dirigé contre OPA1 ou contre Hsp60 comme témoin de charge. Les 5 bandes détectées dans les cellules HeLa ont été annotées a, b, c, d et e. (B) Immunodétection de la protéine OPA1 avec un anticorps dirigé contre la dynamine sur des extraits réalisés à partir de MEF sauvage (WT) ou MEF délétées pour le gène OPA1 (OPA1^{-/-}) et exprimant 1 des 8 variants de la dynamine (pistes 1 à 8). Les 5 bandes détectées dans les cellules de types sauvages ont été annotées a, b, c, d et e. (Song *et al*, 2007). (C) Schéma récapitulatif des différents variants d'OPA1. Le précurseur d'OPA1 va donner par clivage par la MPP la forme longue L-OPA1. La forme L-OPA1 par clivage protéolytique au niveau du site S1 présent dans tous les variants donne la forme S1-OPA1, au niveau du site S2 présent dans les variants 4, 6, 7 et 8 donne la forme S2-OPA1 et au niveau du site S0 présent dans les variants 3, 5, 6 et 8 donne la forme S0-OPA1. Un exemple du clivage d'OPA1 est donné pour l'isoforme 8 (bas de figure).

4.2.1. Expression d'OPA1 dans une levure sauvage

Le profil d'expression des différents variants d'OPA1 a été analysé en réalisant des expériences d'immunodétection avec l'anticorps anti-OPA1 sur des extraits protéiques de levures cultivées sans thiamine pendant 24h à 25°C pour induire l'expression du promoteur *nmt1*. Les niveaux d'expression obtenus dans ces conditions étant très élevés, comme en témoigne la présence du précurseur d'OPA1 (résultats non montrés), nous avons donc mené nos expériences sur des levures non induites, ie cultivées en présence de thiamine. Dans ces conditions, le niveau de fuite du promoteur est suffisant pour visualiser OPA1. Il est à noter que l'anticorps anti-OPA1 ne reconnaît aucune protéine de levure (résultats non montrés).

Pour tous les variants d'OPA1 exprimés dans la souche *S. pombe* sauvage (WT) des bandes abondantes de haut poids moléculaire apparent (PMa) sont observées (▶) (*figure n°55A*). Elles pourraient correspondre aux formes longues d'OPA1. En effet, leurs PMa sont compatibles avec les PM calculés des différentes formes longues des 8 variants de la dynamine (*tableau n°2*). Ainsi, le clivage du précurseur d'OPA1 par la MPP de *S. pombe* semble se faire correctement. Des formes de plus petits PMa, moins abondantes que les formes de haut PMa, pourraient, elles, correspondre aux formes courtes de la dynamine (●) (*figure n°55A*). Ainsi, l'expression des variants 1 et 2 d'OPA1 génèrent une seule forme courte (1S1, 2S1), comme lorsque ces variants sont exprimés dans les MEFs (*figure n°55B*), dont le PMa est compatible avec le PMa calculé (*tableau n°2*). L'expression du variant 7 d'OPA1 chez la levure génère comme dans les MEFs deux formes courtes. La plus abondante présente un PMa compatible avec le PMa calculé de la forme 7S2, la seconde très minoritaire correspondrait à la forme 7S1. Aucune forme courte n'est détectée pour le variant 4 exprimé chez la levure, alors que ce variant génère deux formes courtes quand il est exprimé dans les MEFs. De même alors que les variants 3, 5, 6 et 8 sont totalement clivés en une seule forme courte dans les MEFs, deux formes courtes sont générées chez la levure. Néanmoins, il faut noter la présence de bandes supplémentaires (*) par rapport aux isoformes attendues d'intensité parfois très proche de celles que nous avons attribuées aux formes courtes d'OPA1, ainsi que de nombreux produits de dégradation dont le PMa est < 80 kDa (non montrés).

Variants	Poids moléculaire apparent (KDa)	Poids moléculaire calculé (KDa)
1 L	90	101
1S1	78	89
2L	88	97
2S1	78	89
3L	88	99
3S0	79	89
3S1	78	87
4L	90	101
4S1	-	93
4S2	-	90
5L	90	103
5S0	79	89
5S1	78	87
6L	90	103
6S0	80	93
6S1		90
6S2		87
7L	92	105
7S1	80	93
7S2	78	90
8L	92	107
8S0	79	93
8S1		90
8S2		87

Tableau n°2 : Tableau récapitulatif des poids moléculaires apparents des différentes formes d'OPA1 détectées chez la levure en figure 55A et des poids moléculaires théoriques pour toutes les isoformes issues du clivage protéolytique des variants d'OPA1.

Nomenclature :
8L : forme longue du variant 8
8S1 : forme courte du variant 8 clivé sur le site S1
8S2 : forme courte du variant 8 clivé sur le site S2
8S0 : forme courte du variant 8 clivé sur le site S0

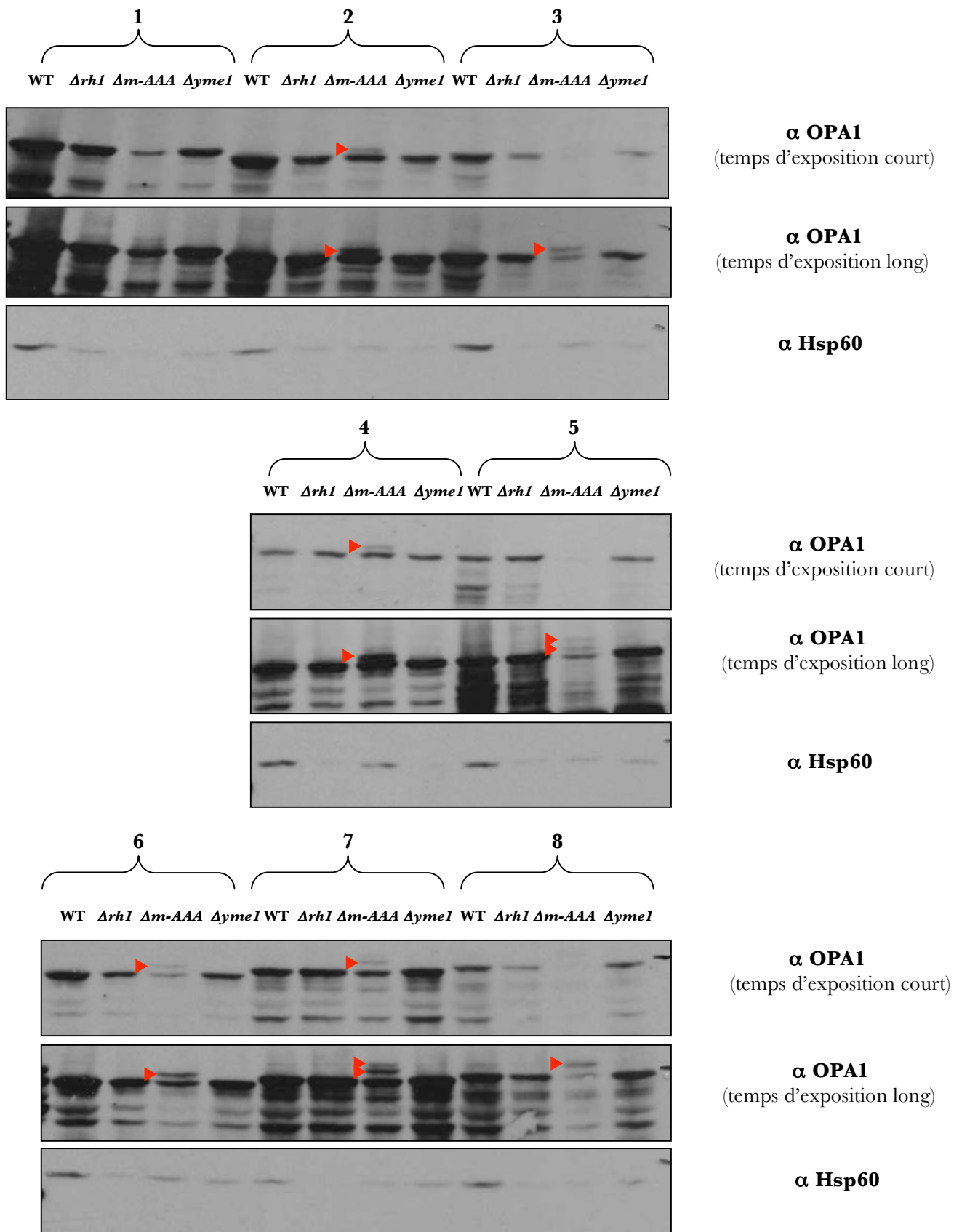


Figure n°56 : Expression d'OPA1 dans des levures délétées pour les gènes *rh1*⁺, *m-AAA*⁺ et *yme1*⁺.

Les protéines ont été extraites de levures transformées par un vecteur (pREP41) exprimant un des huit variants d'épissage d'OPA1, séparées par SDS-PAGE, transférées sur filtre nitrocellulose puis soumises à une immunodétection à l'aide d'anticorps dirigé contre OPA1 ou contre Hsp60.

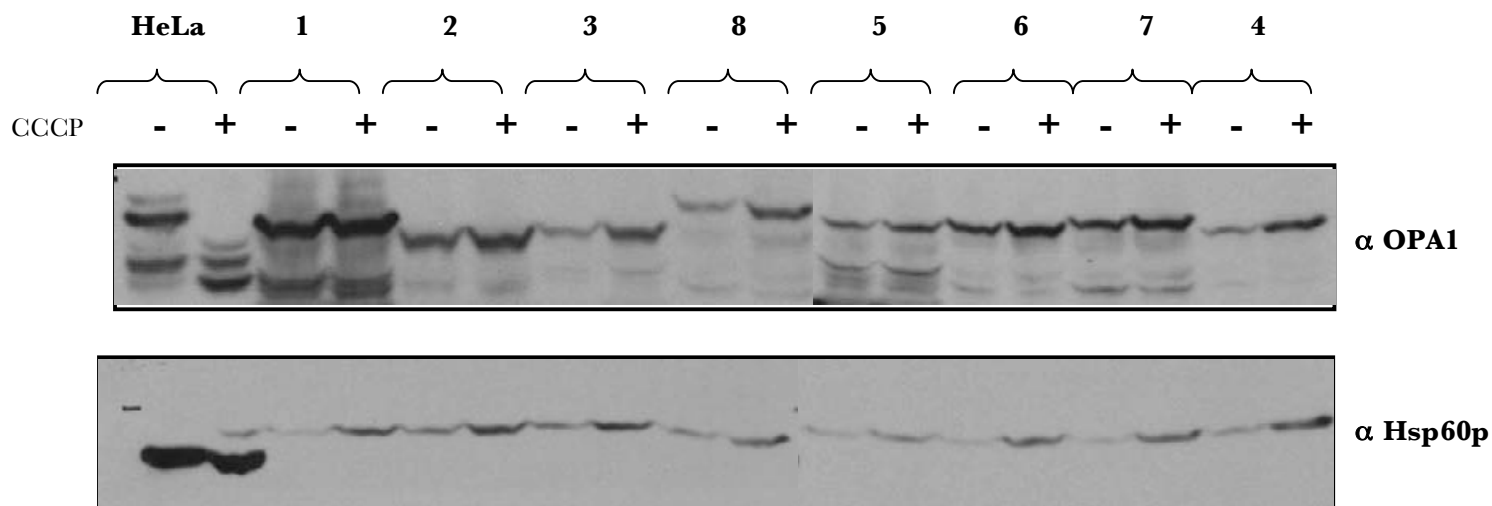


Figure n°57 : Expression d'OPA1 dans des levures traitées au CCCP.

Les protéines ont été extraites à partir de levures exprimant un des huit variants d'épissage d'OPA1, traités pendant 1h par 20 μ M de CCCP. Les protéines ont été séparées par SDS-PAGE, transférées sur filtre puis soumises à une immunodétection à l'aide d'anticorps dirigé contre OPA1 ou contre Hsp60p.

4.2.2. Protéases impliquées dans le clivage d'OPA1 chez *S. pombe*

Même si le clivage des formes courtes d'OPA1 ne semble pas très efficace chez *S. pombe*, il pourrait être suffisant pour déterminer quelle protéase est impliquée. Nous avons donc analysé le profil d'expression d'OPA1 chez *S. pombe* dans les contextes génétiques délétées pour les protéases Rhomboïde ($\Delta rh1$), Yme1p ($\Delta yme1$) et m-AAA ($\Delta m-AAA$) (figure n°56). OPA1 dans les souches délétées pour *yme1*⁺ et *rh1*⁺ présente un profil identique à celui retrouvé dans les souches sauvages. Les seules variations observées sont dans les souches n'exprimant plus la protéase m-AAA : une à deux bandes dont le PMA est supérieur à celui de la forme L-OPA1 sont détectées pour tous les variants sauf le variant 1. L'apparition de cette bande semble se faire au détriment de la forme longue d'OPA1.

4.2.3. Clivage inductible d'OPA1 dans la levure *S. pombe*

Chez les mammifères, OPA1 subit deux types de clivage : un clivage dit basal ainsi qu'un clivage dit inductible en réponse à une diminution du potentiel de membrane, de la quantité d'ATP ou à un stimulus apoptotique (Baricault et al, 2007; Griparic et al, 2007; Guillery et al, 2008; Ishihara et al, 2006; Song et al, 2007). Nous avons donc testé si le clivage inductible d'OPA1 pouvait être effectué chez la levure. Pour cela, nous avons traité les cellules exprimant les différents variants d'OPA1 par 20 μM de CCCP pendant 1h ou 24h. L'expression d'OPA1 a été vérifiée par Western blot. Contrairement aux cellules HeLa où ce traitement induit comme attendu un clivage des formes longues d'OPA1, l'expression d'OPA1 en présence de CCCP reste inchangée chez la levure (figure n°57).

4.3. Discussion et perspective

Il a été récemment démontré que les isoformes longues et courtes des protéines OPA1/Mgm1p/Msp1p chez les mammifères et les levures n'ont pas les mêmes rôles et

présentent des propriétés biochimiques différentes (DeVay et al, 2009; Diot et al, 2009; Herlan et al, 2003; Song et al, 2007; Zick et al, 2009a), soulignant l'importance des processus qui contrôlent la maturation protéolytique de ces dynamines. Les mécanismes protéolytiques générant les différentes isoformes n'étant pas conservés entre Mgm1p et OPA1, nous avons posé la question pour Msp1p chez la levure *S. pombe* dont la divergence évolutive est aussi grande pour *S. cerevisiae* que pour l'homme.

Nous avons pu montrer que la protéase Rhomboïde1 (Rh1p), comme dans le cas de Mgm1p, est impliquée dans la génération de la forme courte de Msp1p. Il existe cependant une seconde protéase également impliquée dans ce processus que nous avons tenté d'identifier. Malheureusement les souches commandées chez BIONEER délétées pour les protéases candidates Imp1p, Imp2p, Atp23p et Oct1p, que nous avons sélectionnées comme pouvant être impliquées dans la maturation de Msp1p compte tenu de leur localisation et de leur mode d'action, ne sont pas délétées pour les gènes attendus. Ces souches seront soit commandées auprès d'une autre source (Kim et al) ou construites par recombinaison homologue. Yme1p, contrairement à OPA1 et comme pour Mgm1p, n'est pas impliquée dans le clivage de Msp1p en condition basale. Contrairement à Mgm1p et comme dans le cas d'OPA1, le rapport des isoformes longues et courtes de Msp1p est modifié dans la souche $\Delta m\text{-AAA}$. Mais cette protéase chez *S. pombe* contrôlerait en condition basale la stabilité de la forme longue de Msp1p et ne serait pas impliquée dans la génération de la forme courte. D'autre part, l'expression de Msp1p n'est pas modifiée dans une levure *S. pombe* délétée pour *oma1*⁺ en condition basale, et ne semble pas sensible à une dissipation du potentiel de membrane mitochondrial ($\Delta\Psi$) par le CCCP. Msp1p ne se comporterait donc pas comme OPA1 qui est clivée par OMA1 en situation de dissipation dû $\Delta\Psi$. Il serait néanmoins intéressant d'étudier l'expression de Msp1p dans des levures délétées à la fois pour la m-AAA protéase et Oma1p. En effet, la protéase OMA1 est impliquée dans le clivage des protéines membranaires OPA1 et OXA1 chez les mammifères et la levure respectivement en absence de m-AAA protéase (Ehse et al, 2009; Kaser et al, 2003). De même, nous souhaitons étudier l'expression de Msp1p dans les levures délétées pour les gènes codant *rh1*⁺ et *m-AAA*⁺. En effet, il a été montré que le clivage de Ccp1p par Pcp1p est dépendant de l'activité d'hydrolyse de l'ATP de la m-AAA protéase chez *S. cerevisiae* (Tatsuta et al, 2007). L'utilisation d'un mutant du domaine catalytique de la m-AAA permettra de déterminer si la fonction de cette protéase dans le clivage de Msp1p requiert son activité protéolytique. Compte tenu du rôle des prohibitines dans la maturation d'OPA1, il semble également intéressant d'étudier la maturation de

Msp1p dans une levure délétée par les gènes *phb1*⁺ (SPAC1782.06c) et *phb2*⁺ (SPCC1322.16). D'autant, qu'il a récemment été montré que la délétion des gènes *GEPI*⁺ (*UPS2*⁺), de *UPS1*⁺ et de *PSDI*⁺, partenaires génétiques de la prohibitine, affecte le clivage de Mgm1p. (Birner et al, 2003; Osman et al, 2009; Osman et al, 2007).

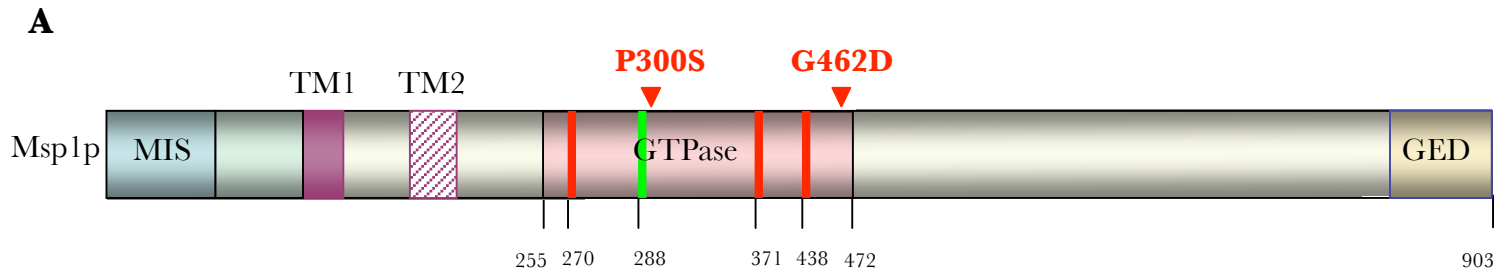
Les travaux que nous avons menés pour étudier la protéolyse de Msp1p ont été réalisés en milieu glucose et en condition basale. Le rapport entre les isoformes l/s de Msp1p étant modifié lors d'un changement de source de carbone (glucose et éthanol/glycérol), il serait intéressant de déterminer la contribution des différentes protéases et de leurs régulations dans ce processus. Chez *S. cerevisiae*, Ups1p, une protéine de l'IMS associée à la membrane interne récemment découverte, régule la topogénèse de Mgm1p, la morphologie mitochondriale et la croissance cellulaire de façon dépendante de la source de carbone (Sesaki et al, 2006). Dans des levures délétées pour le gène *UPS1*⁺ ($\Delta UPS1$) cultivées en milieu fermentescible (glucose), la formation de s-Mgm1 est diminuée, le réseau mitochondrial apparaît fragmenté et agrégé rappelant les mitochondries de cellules délétées pour *PCPI*⁺ et *MGM1*⁺, et la croissance est affectée. L'ensemble de ces phénotypes n'est pas observé quand la souche est cultivée en milieu respiratoire (éthanol/glycérol) (Sesaki et al, 2006). La fonction d'Ups1p est conservée au cours de l'évolution chez les eucaryotes. En effet, l'expression de son homologue humain, PRELI, peut compléter les levures $\Delta UPS1$ pour le clivage Mgm1p ainsi que pour les défauts de morphologie et de croissance cellulaire (Sesaki et al, 2006). Ups1p régule le niveau de cardiolipine essentiellement présent dans la membrane interne mitochondriale (Osman et al, 2009; Tamura et al, 2009). La diminution du niveau de cardiolipine altère la conformation de la translocase Tim23p et diminue son association avec le complexe PAM entraînant un défaut dans le système d'import mitochondrial au niveau de la membrane interne (Tamura et al, 2009). Ainsi la diminution d'association du complexe PAM avec Tim23p pourrait affecter la génération de s-Mgm1p dans les levures $\Delta UPS1$. Cependant, dans d'autres travaux, il a été montré que l'absence de synthèse de cardiolipine dans les levures délétées pour le gène *CRDI*, codant la cardiolipine synthase, affecte peu le clivage de Mgm1p en milieu respiratoire (Osman et al, 2009). La diminution de la quantité de phosphatidyléthanolamine affecte également le clivage de Mgm1p dans les levures délétées pour le gène *GEPI* ou pour le gène *PSDI* codant la phosphatidyléthanolamine synthase. La composition en phospholipides membranaires (phosphatidyléthanolamine et cardiolipine) est donc importante pour le clivage et changement de rapport entre les isoformes longues et courtes de Mgm1p.

Afin de mieux comprendre le mécanisme de maturation protéolytique d'OPA1, qui était controversé à l'époque où nous avons débuté notre travail, nous avons souhaité utiliser *S. pombe* comme modèle. Cependant, nos résultats ont montré que cette levure ne semble pas être un modèle très pertinent pour l'étude de la maturation protéolytique d'OPA1. En effet, alors que le clivage du précurseur en forme longue est efficace chez *S. pombe*, la génération des formes courtes est très peu efficace suggérant une absence de conservation fonctionnelle des protéases impliquées.

Des études précédentes menées chez la levure *S. cerevisiae* ont montré que les variants 1 et 7 d'OPA1 étaient clivés par les m-AAA protéases, Yta10p et Yta12p (Duvezin-Caubet et al, 2007; Ishihara et al, 2006). Néanmoins, il faut noter que l'ensemble des formes courtes d'OPA1 générées chez *S. cerevisiae* disparaît dans les mutants *yta10* ou *yta12*. Chez *S. pombe* la délétion de l'unique m-AAA protéase ne provoque pas la disparition des formes courtes d'OPA1 permettant de conclure que la m-AAA protéase chez *S. pombe* n'a pas d'activité de type « processing peptidase » sur OPA1. Toutefois une à deux formes de plus haut PMa que L-OPA1 sont détectées dans les levures $\Delta m\text{-AAA}$ exprimant les variants 2 à 8 d'OPA1. Elles pourraient résulter d'un mauvais clivage de la forme L-OPA1 lié à la perte de l'activité de dislocation de la m-AAA protéase. L'absence de clivage d'OPA1 dans les souches de *S. pombe* délétées pour *yml1*⁺ et *rh1*⁺ va dans le sens des résultats obtenus chez *S. cerevisiae* (Duvezin-Caubet et al, 2007; Ishihara et al, 2006). Néanmoins, il est difficile de conclure compte tenu de la faible efficacité de clivage d'OPA1 chez *S. pombe*. Cette faible efficacité de clivage pourrait être mise à profit pour exprimer les protéases de mammifères chez la levure exprimant les différents variants d'OPA1.

5. Recherche de partenaires génétiques de *msp1*⁺

Afin de réaliser un criblage pour rechercher des partenaires génétiques de *msp1*⁺, nous avons construit un mutant thermosensible. Ainsi, les mutations ponctuelles, P300S et G462D, choisies par homologie à des mutations connues pour être thermosensibles chez d'autres



B

Souris	DYN2	TRR PLI	RGYIG
Rat	DYN2	TRR PLI	RGYIG
Hum.	DYN2	TRR PLI	RGYIG
Hum.	DYN1	TRR PLV	RGYIG
Rat	DYN1	TRR PLV	RGYIG
Droso.	SHIBIRE	TRR PLI	RGYIG
C.e.	DYN1	TRR PLI	RGYVG
S.c.	Drp1p	TRR PLI	LGIIG
S.c.	Mgm1p	TRR PIE	M Y YVG
S.p.	Msp1p	TRR PIE	YGYIG
Hum.	OPA1	TRSP VK	LG Y FA

Figure n°58 : Position des mutations P300S et G462D sur la dynamine Msp1p et alignement de séquences de dynamines

(A) Position des mutations P300S et G462D sur la dynamine Msp1p. Trait vert : séquence signature des dynamines, traits rouges : séquences consensus de liaison et d'hydrolyse du GTP. MIS = séquence adressage à la mitochondrie, TM1 et TM2 = domaines transmembranaires, GTPase = domaine GTPase, GED = domaine effecteur de l'activité GTPase. (B) Alignement de séquences de dynamines. Les acides aminés proline en position 300 et glycine en position 462 de Msp1p sont conservés chez les dynamines. Hum. = humain, C.e. = *Caenorhabditis elegans*, S.c. = *Saccharomyces cerevisiae*, S.p. = *Schizosaccharomyces pombe*, Droso. = *Drosophila melanogaster*

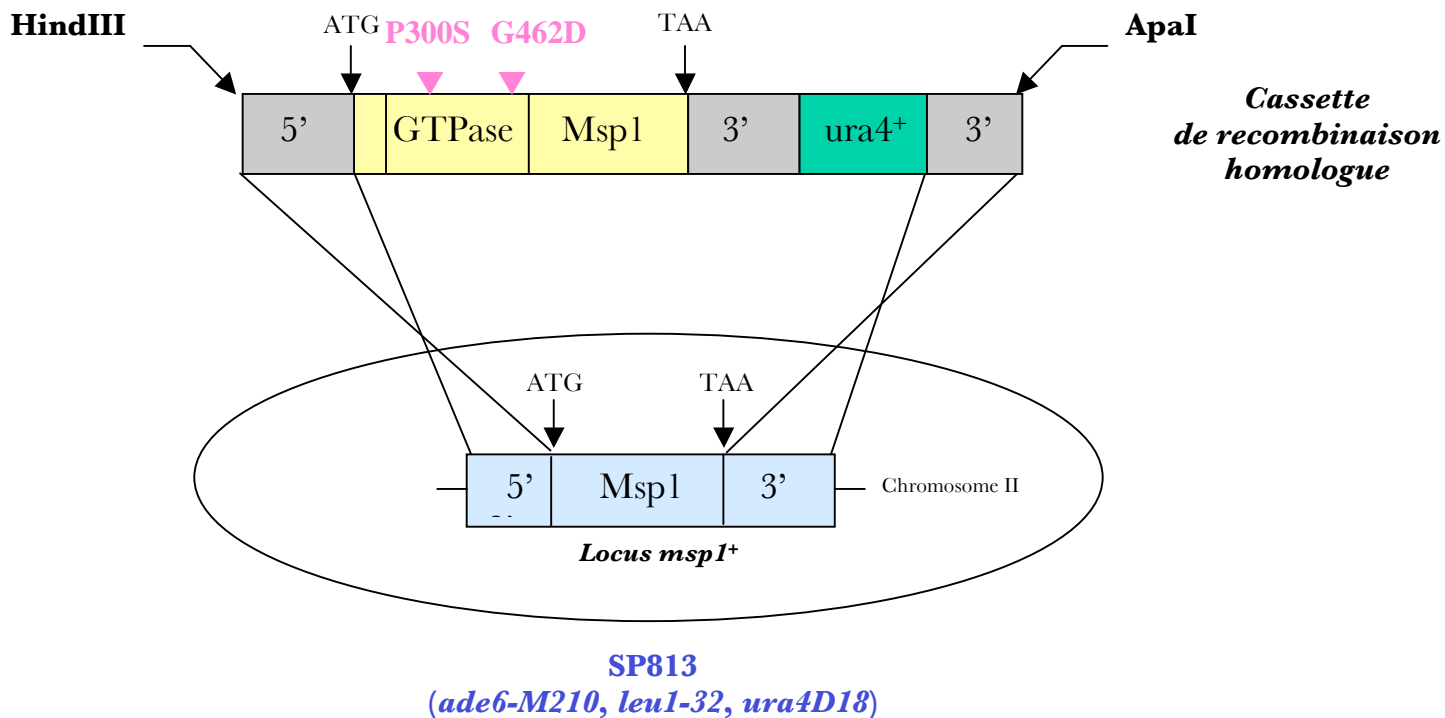
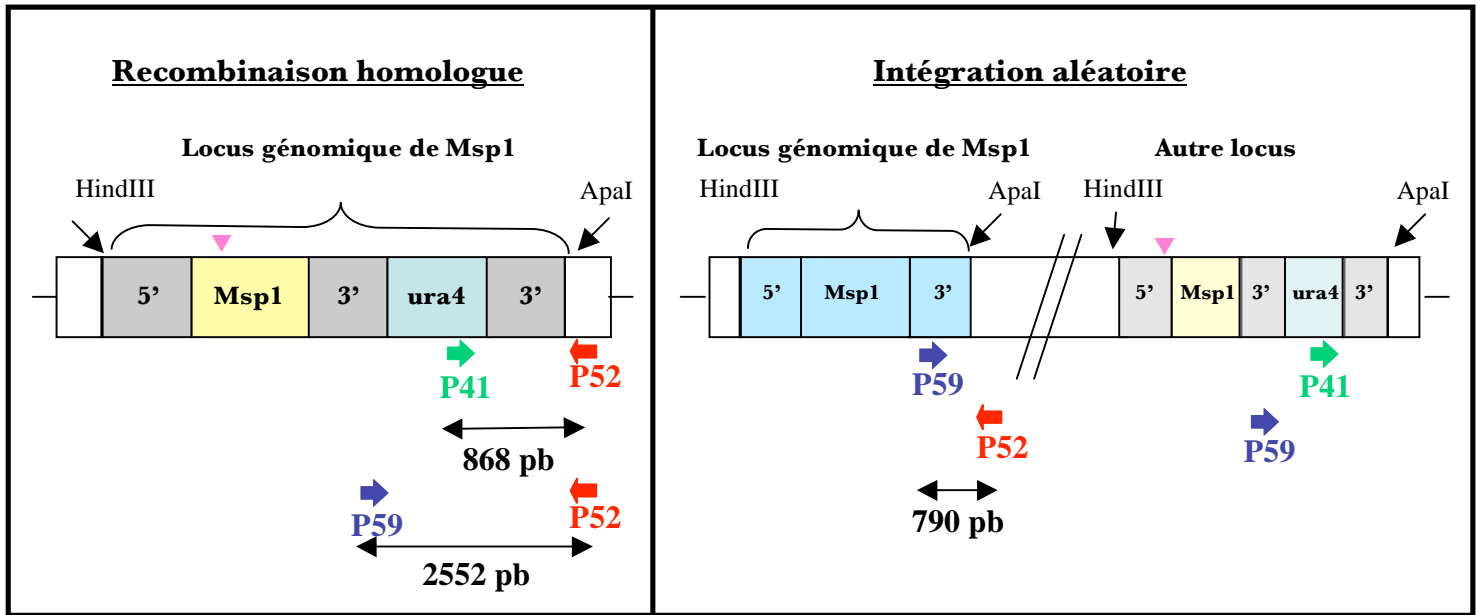


Figure n°59 : Stratégie d'obtention des mutants Msp1P300S et Msp1G462D.

A



B

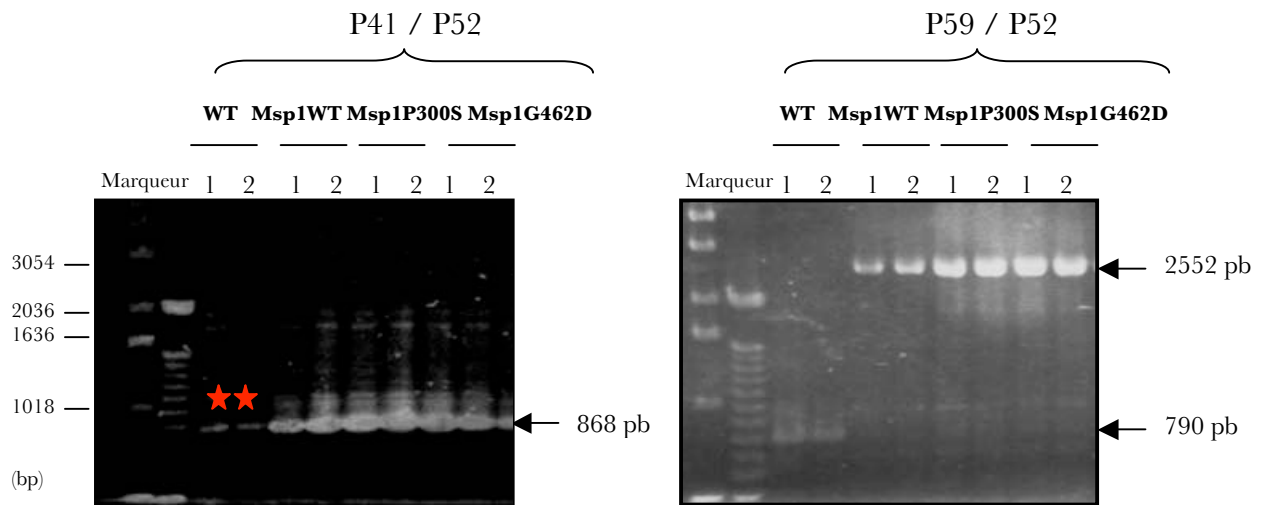


Figure n°60 : Criblage des clones recombinants par PCR.

(A) Schéma des événements de recombinaison homologue ou d'intégration aléatoire de la cassette de recombinaison dans le génome de *S. pombe*. Les amorces utilisées en PCR pour distinguer les deux types de processus et les produits d'amplification correspondant sont schématisés. (B) Résultats de la PCR pour deux clones parentaux (WT), deux clones recombinants ayant intégré la cassette de recombinaison *Msp1WT*, *Msp1P300S* et *Msp1G462D* au locus du gène *msp1⁺*. Les produits d'amplification obtenus en utilisant les couples d'amorces P41-P52 et P59-P52 ont été analysés par électrophorèse et coloration au BET. ★ = production d'amplification non spécifique

dynamines, respectivement DYN-1 chez *C. elegans* et Mgm1p chez *S. cerevisiae* (Clark et al, 1997), ont été introduites dans le cadre de lecture de *msp1*⁺ (figure n°58). La mutation P300S correspond à une substitution de la proline en position 300, localisée dans le domaine GTPase de la dynamine au niveau de la séquence signature des dynamines, par une sérine. La mutation G462D correspond à une substitution de la glycine en position 462, localisée dans le domaine GTPase hors des séquences consensus d'hydrolyse et de fixation des nucléotides et de la signature des dynamines, par un acide aspartique.

5.1. Obtention d'un mutant thermosensible de Msp1

Les mutations P300S et G462D ont été introduites dans la séquence de Msp1p par mutagenèse dirigée de type PCR inverse. Des tests de complémentation fonctionnelle ont permis de montrer que l'expression ectopique de ces mutants permettait de compléter la délétion du gène *msp1*⁺, quelle que soit la température. Cependant ces tests ont été réalisés en exprimant les formes de Msp1p mutées sous la dépendance d'un promoteur fort et en utilisant un vecteur multi-copies. Pour pallier un éventuel « effet dose », il a donc été décidé d'exprimer la dynamine mutée à un taux endogène en intégrant la mutation au locus génomique du gène *msp1*⁺ par recombinaison homologue.

Pour cela, un insert d'ADN (HindIII-ApaI), portant une version sauvage (Msp1WT) ou mutée du cadre de lecture de *msp1*⁺ (Msp1P300S ou Msp1G462D) flanquée de ses régions 5' et 3' non traduites ainsi que le gène *ura4*⁺ inséré dans la région 3' de *msp1*⁺, a été transformé dans une souche (SP813) auxotrophe pour l'uracile (figure n°59). Les clones recombinants ayant intégré la cassette de recombinaison, au locus du gène *msp1*⁺ (recombinaison homologue), ou ailleurs dans le génome (intégration aléatoire), ont été sélectionnés pour leur prototrophie vis-à-vis de l'uracile sur un milieu qui en est dépourvu.

Pour déterminer si l'événement d'intégration de la cassette a été réalisé comme souhaité, par recombinaison homologue, un criblage par PCR sur de l'ADN génomique extrait des divers clones recombinants a été effectué en utilisant 3 amorces : une amorce située en 3' de l'ORF de *msp1*⁺ (P59), une amorce hybridant avec *ura4*⁺ (P41), et une amorce positionnée en aval de l'extrémité 3' de la cassette de recombinaison (P52) (figure n°60A). Ainsi, le couple d'amorce P41/P52, en donnant un produit d'amplification de 868 pb témoigne d'une recombinaison homologue, alors que le couple d'amorce P59/P52 met en évidence une intégration aléatoire si un produit d'amplification de 790 pb est obtenu. Nous avons obtenu

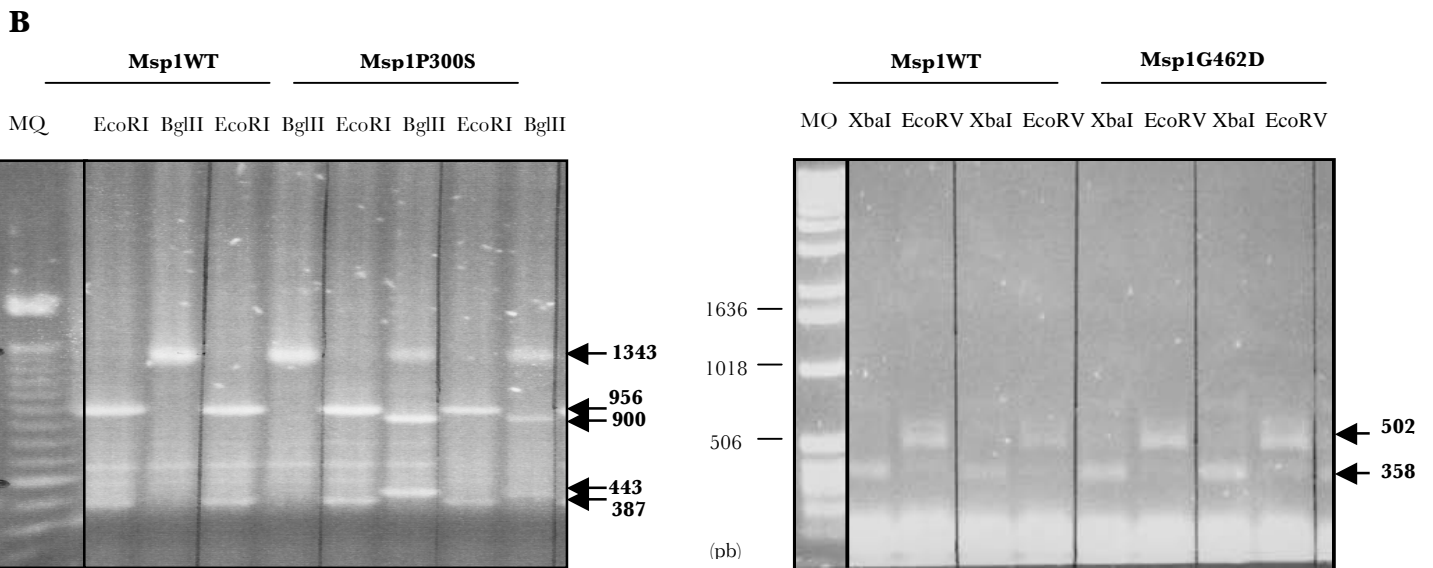
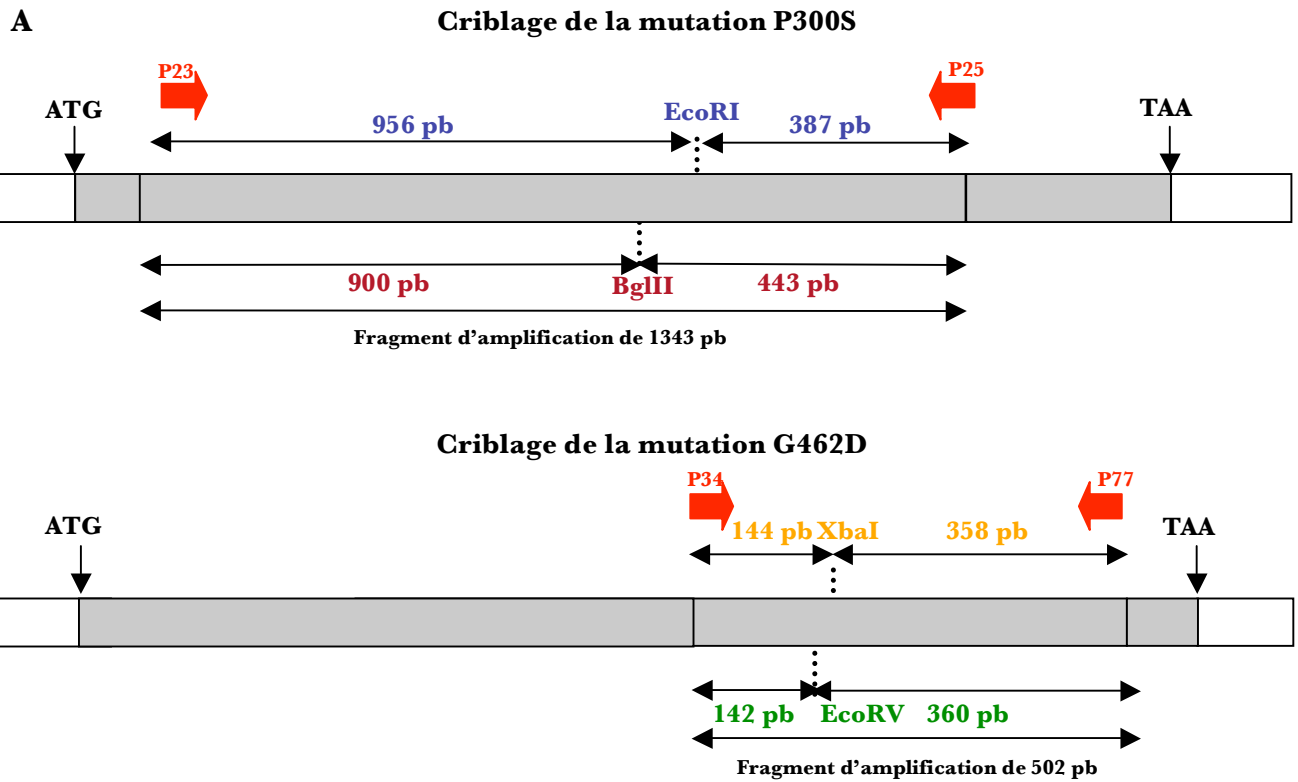


Figure n°61 : Criblage de l'intégration des mutations P300S et G462D dans le cadre de lecture de *mspI*⁺.

(A) Schéma indiquant les fragments amplifiés par PCR par les couples d'amorces P23/P25 et P34/P77 et les sites de restrictions EcoRI, BglII, XbaI et EcoRV sur le cadre de lecture de *mspI*⁺ (grisé). (B) Les résultats de la digestion des fragments amplifiés pour deux clones recombinants Msp1WT (droite et gauche), Msp1P300S (gauche) et Msp1G462D (droite) sont présentés. Les produits d'amplification obtenus en utilisant les amorces P23/P25 (Msp1WT et Msp1P300S) ou P34/P77 (Msp1WT et Msp1P300S) ont été digérés par EcoRI ou BglII (mutation P300S) et XbaI ou EcoRV (mutation G462D) ont été analysés par électrophorèse en gel d'agarose et coloration au BET.

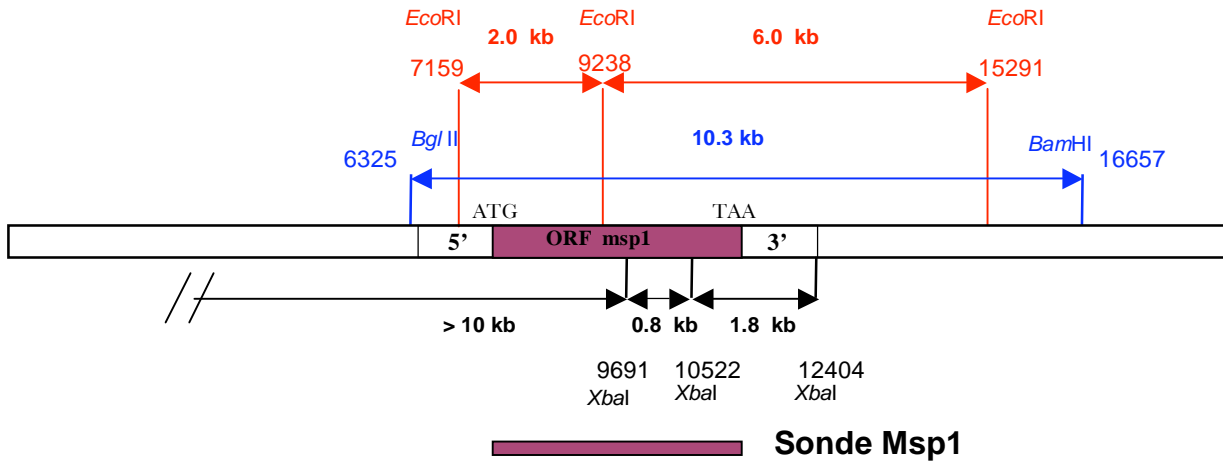
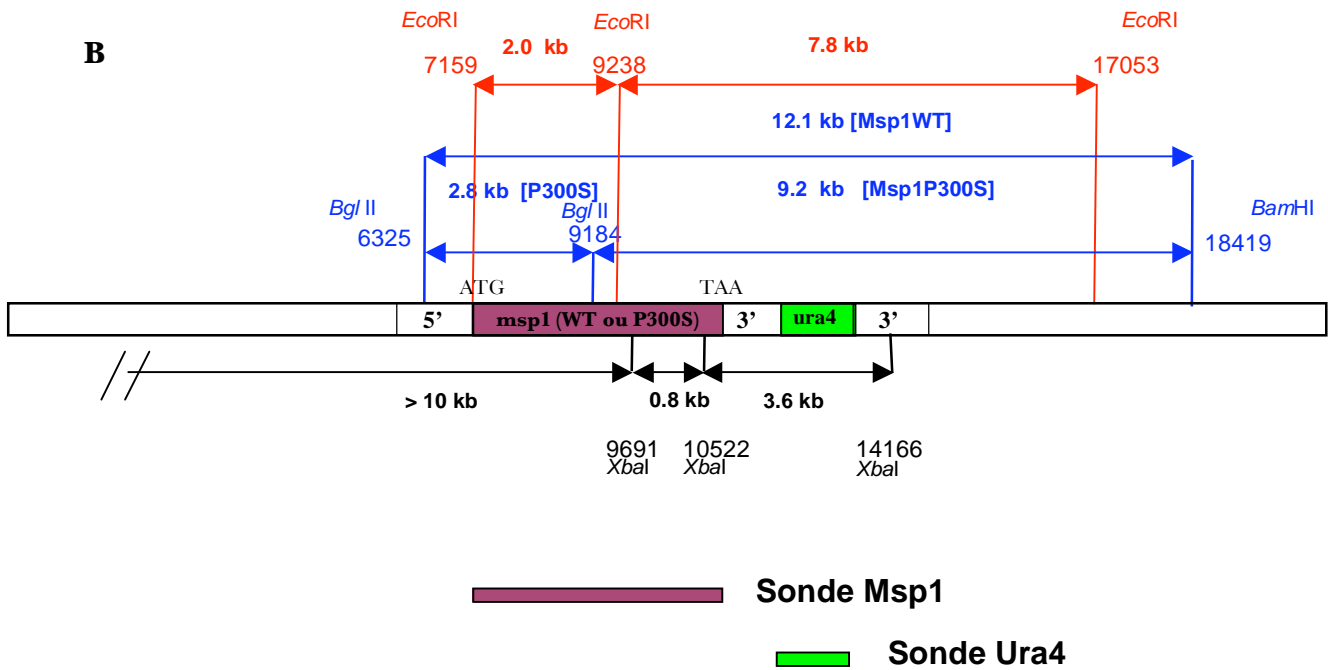
A**B**

Figure n°62 : Schéma représentatif des résultats de Southern blot attendus.

(A) Carte de restriction des locus *msp1*⁺ sauvage (A) et de l'allèle recombiné (B). Les positions des sites EcoRI, BglII, BamHI et XbaI sont indiquées ainsi que celles des fragments de restriction issus de la digestion par ces enzymes qui hybrident avec la sonde Msp1 ou la sonde Ura4.

respectivement 2, 35 et 23 clones recombinants homologues pour 23, 110 et 163 clones *ura*⁺ Msp1WT, Msp1P300S et Msp1G462D prototrophes pour l'uracile. La figure 60B montre les résultats pour 2 clones recombinants homologues Msp1WT, Msp1P300S et G462D, en comparaison avec deux clones parentaux (WT).

Les événements de recombinaison homologue, dirigés côté 3' par la nécessité d'intégrer le gène *ura4*⁺, peuvent côté 5' avoir lieu en amont ou en aval de la mutation. Nous avons donc vérifié si les événements de recombinaison homologue ont conduit à l'intégration de la mutation par cartographie physique (*figure n°61*). En effet, l'introduction des mutations P300S et G462D dans le cadre de lecture de *msp1*⁺ a créé respectivement un site de restriction BglII ou EcoRV. Des fragments contenant la zone de la mutation ont été amplifiés par PCR en utilisant les amorces P23/P25 pour la mutation P300S ou P34/P77 pour G462D. Ces fragments respectivement de 1343 ou 502 pb ont ensuite été digérés par BglII ou EcoRV. La digestion du fragment de 1343 pb (mutation P300S) par EcoRI donne 2 fragments de restriction de 956 et 387 pb, et par BglII 2 fragments de 900 et 443 pb si la mutation est intégrée (*figure n°61A*). La digestion du fragment de 502 pb (mutation G462D) donne deux fragments de restriction de 358 et 144 pb pour XbaI, et de 360 et 142 pb pour EcoRV si la mutation est intégrée (*figure n°61A*). L'analyse du profil de digestion des 35 recombinants homologues obtenus avec la cassette Msp1P300S a permis d'identifier 10 événements d'intégration de la mutation. Sur les 23 clones recombinants homologues obtenus avec la cassette G462D aucun n'a intégré la mutation (*figure n°61B*).

Le remplacement du gène *msp1*⁺ par la cassette de recombinaison homologue Msp1WT ou Msp1P300S a également été vérifié par Southern blot. L'ADN génomique des cellules parentales (WT) ou recombinantes (Msp1WT et Msp1P300S) a été extrait, digéré par des enzymes de restriction, séparé par électrophorèse, transféré sur filtre et soumis à une hybridation avec une sonde correspondant aux séquences codantes des gènes *msp1*⁺ ou *ura4*⁺. Dans les cellules parentales, la sonde Msp1 doit hybrider avec trois fragments XbaI de 0.8, 1.8 et >10 kb, deux fragments EcoRI de 2.0 et 6.0 kb et un fragment BglII/BamHI de 10.3 kb (*figure n°62A*). Dans les clones recombinants homologues Msp1WT ou P300S, la sonde Msp1 doit hybrider avec trois fragments XbaI de 3.6, 0.8 et >10 kb et avec deux fragments EcoRI (7.8 et 2.0 kb) (*figure n°62B*). Dans la souche Msp1WT, la sonde de Msp1 doit hybrider avec un fragment BglII/BamHI de 12.1 kb alors que dans la souche Msp1P300S deux fragments de 2.8 et 9.2 kb doivent être reconnues par cette sonde. La sonde Ura4 ne doit révéler, uniquement dans les clones recombinants, un fragment XbaI de 3.6 kb, un fragment EcoRI de 7.8 kb et un fragment BglII/BamHI de 9.2 kb (P300S) ou de 12,1 kb (WT) (*figure n°62B*).

La figure 63 présente les résultats obtenus pour 2 clones parentaux (WT), 2 clones Msp1WT et 2 clones Msp1P300S. Les résultats révèlent les fragments attendus dans tous les cas, confirmant l'insertion correcte de la cassette de recombinaison au locus du gène *msp1⁺* par recombinaison homologue et l'absence d'intégration aléatoire ailleurs dans le génome (figure n°63).

Nous avons donc obtenu et validé deux clones recombinants indépendants ayant inséré la cassette de recombinaison WT (Msp1WT) ou muté (Msp1P300S) au locus du gène *msp1⁺*. Ces clones ont ensuite été caractérisés soit directement soit après avoir été croisés avec une souche contenant le gène *msp1⁺* sauvage (T611) et sélectionnés par rapport à leur prototrophie vis-à-vis de l'uracile. Nous avons retenu deux clones Msp1WT indépendants et quatre clones Msp1P300S, indépendantes deux à deux. Les mêmes résultats ont été obtenus avec les clones de la "première génération" ou de la "deuxième génération" qui sont présents ci-après.

L'absence de clone recombinant ayant intégré la mutation G462D, pourtant en aval de la mutation P300S, laisse supposer que cette mutation confère un phénotype létal ou très désavantageux à la levure. Pour conclure, il faudrait soit cribler plus de clones soit réaliser l'insertion de la mutation dans un diploïde et analyser les tétrades obtenues après sporulation.

5.2. Caractérisation du mutant thermosensible Msp1P300S

5.2.1. Effet de la mutation Msp1P300S sur la morphologie du réseau mitochondrial

Msp1p étant un acteur de la dynamique mitochondriale impliqué dans la fusion des mitochondries, nous avons tout d'abord vérifié l'effet de la mutation P300S sur la morphologie du réseau mitochondrial à température restrictive. Pour visualiser le réseau mitochondrial, nous avons étiqueté au niveau génomique, la protéine mitochondriale Arg11p en C-terminal par la protéine fluorescente mCherry (Bahler et al, 1998; Snaith et al, 2005). Pour cela, deux clones parentaux (Msp1WT) et quatre clones recombinants (Msp1P300S) ont été croisés avec une souche sauvage (MP283) exprimant la protéine Arg11p-mCherry et résistante à la Nourseothricine précédemment construite et caractérisée au laboratoire. Les levures haploïdes, issues de 2 clones Msp1WT et 2 clones Msp1P300S indépendants

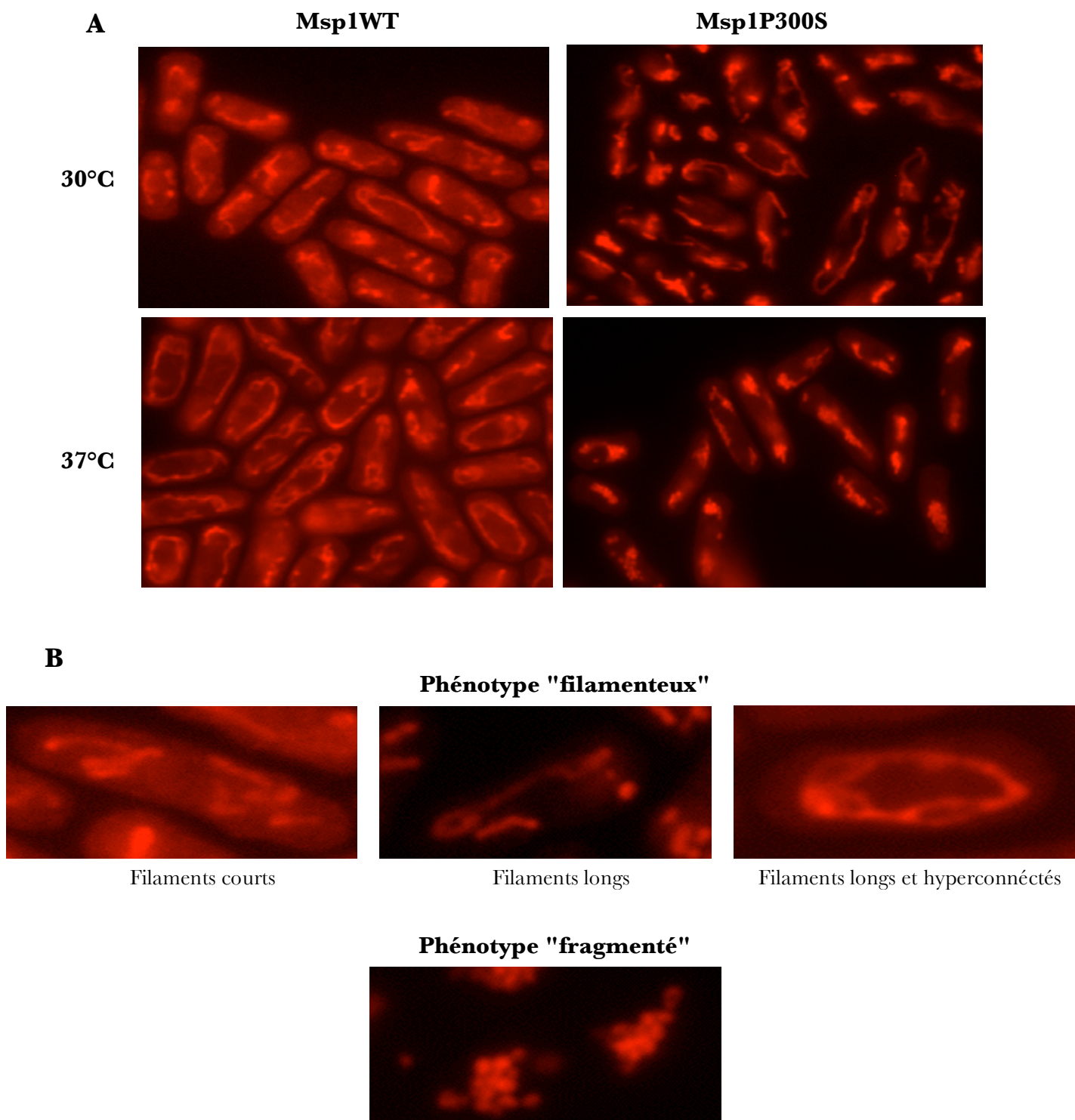


Figure n°64 : Observation des mitochondries en microscopie à fluorescence de levures sauvages (Msp1WT) ou mutées (P300S) pour Msp1p à température permissive et restrictive.

(A) Des cellules sauvages (Msp1WT) ou mutées pour Msp1p (Msp1P 300S) ont été cultivées à 30°C ou à 37°C pendant 3h en milieu glucose puis fixées à la formaldéhyde et observées en microscopie à fluorescence. Les mitochondries sont visualisées grâce à la protéine mitochondriale Arg11p étiqueté par mCherry. (B) Agrandissement de cellules présentant des mitochondries filamenteuses ou fragmentées.

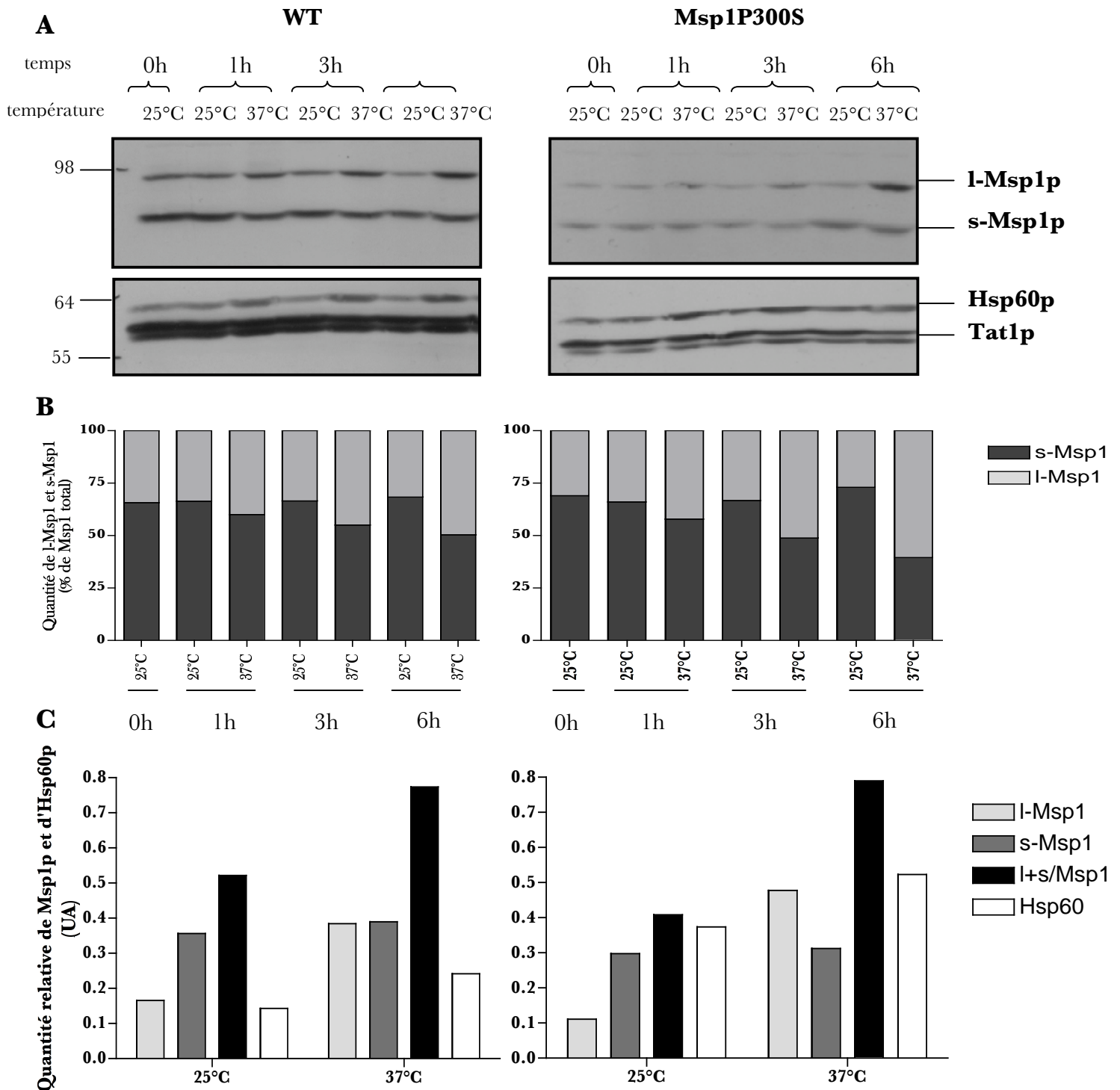


Figure n°65 : Expression de Msp1p sauvage (WT) ou mutée (P300S) à température permissive et restrictive en milieu glucose.

(A) Des levures sauvages (WT, panels de gauche) ou mutées pour *msp1*⁺ (Msp1P300S, panels de droite) ont été cultivées de 0h à 6h à 25°C ou 37°C. Un extrait protéique a été réalisé à partir de ces levures, puis analysé par SDS-PAGE et soumis à une immunodétection avec des anticorps dirigés contre Msp1p, Hsp60p (protéine mitochondriale) et Tat1p (tubuline) comme témoin de charge. (B) La quantification de la quantité des formes longue (l-Msp1p) et courte (s-Msp1p) de Msp1p par rapport à la quantité totale de dynamine a été réalisée par analyse densitométrique à l'aide du logiciel ImageJ. (C) La quantification des formes longue ou courte de Msp1p et de Hsp60p par rapport au témoin de charge Tat1p a été réalisée par analyse densitométrique à l'aide du logiciel ImageJ.

sélectionnés pour leur prototrophie vis-à-vis de l'uracile, leur résistance à la Nourseothricine ainsi que pour la fluorescence de leurs mitochondries, ont été analysées. Le réseau mitochondrial des souches Msp1WT et Msp1P300S cultivées de 0h à 6h à 30°C et 37°C en milieu glucose a été observé par microscopie à fluorescence (*figure n°64*). À température permissive, les levures sauvages présentent un réseau mitochondrial formé de filaments plus ou moins longs et interconnectés. De très rares cellules présentent un réseau pouvant paraître fragmenté. Après 3h de culture à 37°C, les mitochondries des levures *msp1*⁺ apparaissent globalement plus longues et plus interconnectées. À température permissive, les levures *msp1-P300S* présentent un réseau mitochondrial hétérogène formé majoritairement de filaments courts et longs. Quelques cellules, peu nombreuses, présentent un réseau mitochondrial fragmenté. Après 3h de culture à 37°C, le réseau mitochondrial des levures *msp1-P300S* est totalement fragmenté : les mitochondries apparaissent comme des « dots » regroupés sous forme de grappes. Ce phénotype, détecté dès 1h de mise en culture à température restrictive, est similaire à celui observé dans les levures délétées du gène *msp1*⁺ ou exprimant des mutants dominants négatifs (GTPase, GED, TM) de la dynamine, témoignant de l'inactivation de la protéine Msp1P300S mutée à température restrictive.

Le profil d'expression de Msp1p à température restrictive a été analysé par immunodétection sur des extraits de protéines préparés à partir d'une souche sauvage (WT) et mutée (Msp1P300S) cultivées de 0h à 6h en milieu glucose à 25°C et 37°C. À température permissive, Msp1p est présente dans la souche sauvage comme attendue sous forme de deux protéines, une longue (l-Msp1p) et une courte (s-Msp1p). l-Msp1p représente 33% de la quantité totale de la dynamine et le rapport l/s reste stable tout au long de la cinétique (*figure n°65B*). À 37°C, une augmentation du rapport l/s est observée dès 1h de croissance ; la forme longue atteint 49,7% de la quantité totale de Msp1p après 6h (*figure n°65B*). De la même façon, la protéine l-Msp1P300S représente à température permissive 31% de la quantité totale de la dynamine et augmente quand les cellules sont incubées à 37°C pour atteindre 60% après 6h de culture. L'augmentation du rapport l/s à température élevée semble être la conséquence d'une augmentation de la quantité de forme l-Msp1p, la quantité de forme s-Msp1p restant inchangée (*figure n°65C*). De la même façon, la quantité de protéine Hsp60p est augmentée quand les cellules sont cultivées à température élevée. Les changements d'expression de Msp1p ne sont pas liés à la mutation P300S, mais à la température, car le mutant portant cette substitution se comporte comme la souche sauvage.

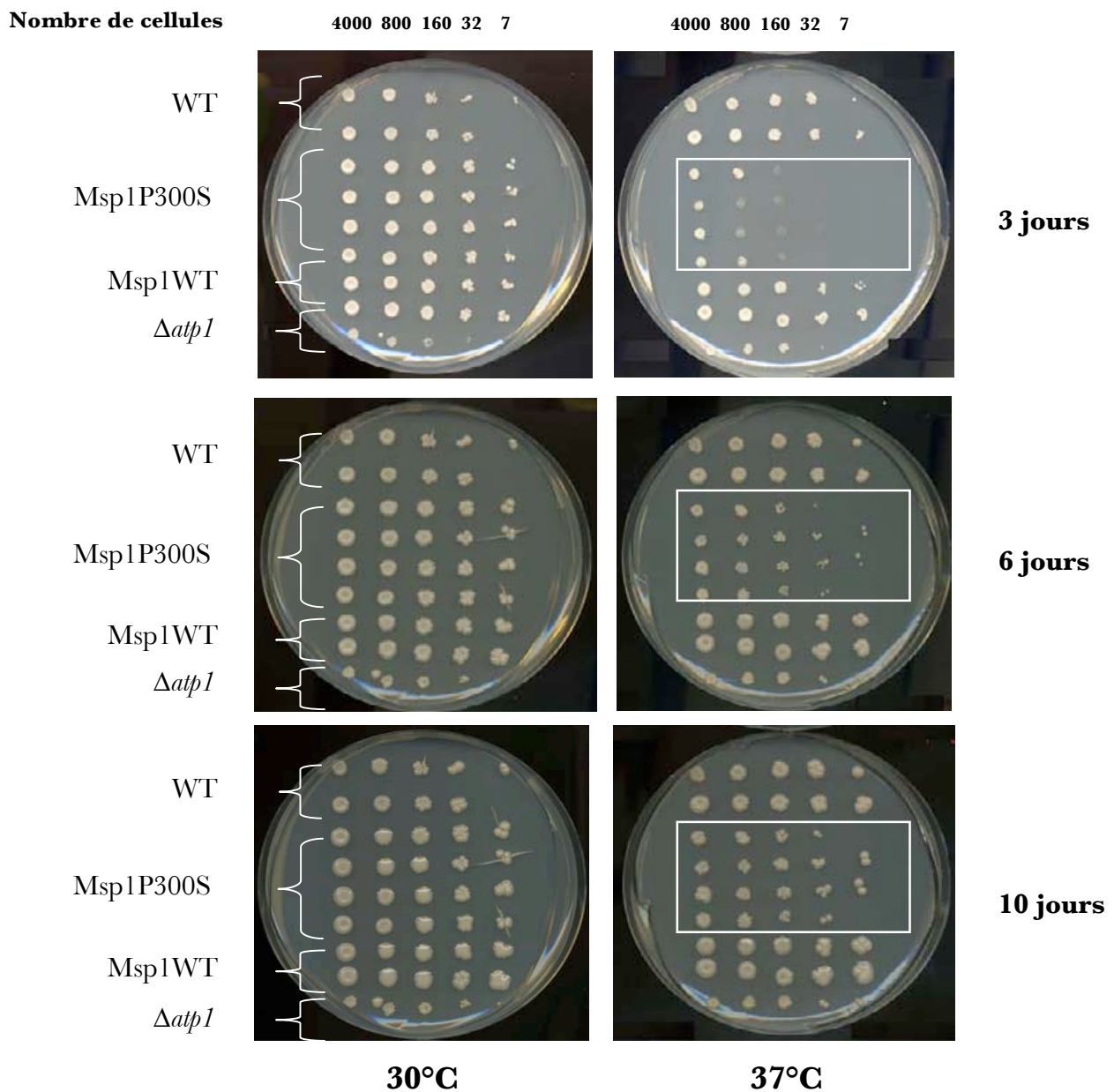


Figure n°66 : Croissance des levures WT, Msp1WT et Msp1P300S en milieu glucosé.

Un nombre décroissant de cellules a été déposé sur un milieu gélosé contenant 3% glucose puis incubé à 30°C et 37°C pendant 10 jours. Les résultats sont montrés pour 2 clones parentaux (WT) et 2 clones indépendantes de la souche recombinante portant le gène *msp1*⁺ sauvage (Msp1WT) et 4 clones, dont deux indépendants, pour la souche recombinante portant le gène *msp1-P300S* (Msp1P300S) et un clone de la souche $\Delta atp1$.

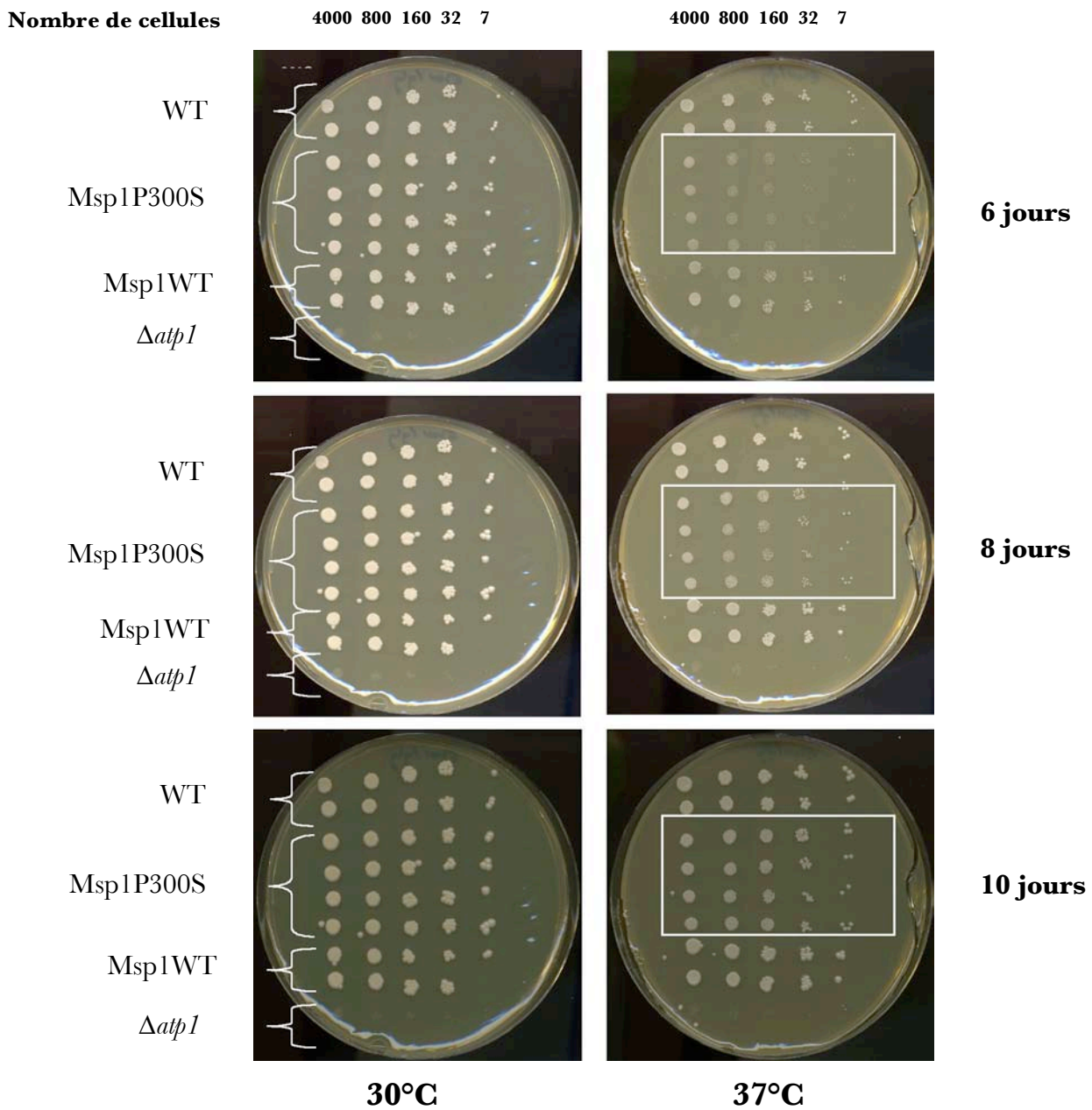


Figure n°67 : Croissance des levures WT, Msp1WT et Msp1P300S en milieu éthanol/glycérol.

Un nombre décroissant de cellules a été déposé sur un milieu gélosé contenant 3% éthanol et 3% glycérol puis incubé à 30°C et 37°C pendant 10 jours. Les résultats sont montrés pour 2 clones parentaux (WT) et 2 clones indépendants de la souche recombinante portant le gène *msp1*⁺ sauvage (Msp1WT) et 4 clones, dont deux indépendants, pour la souche recombinante portant le gène *msp1-P300S* (Msp1P300S) et un clone de la souche $\Delta atp1$.

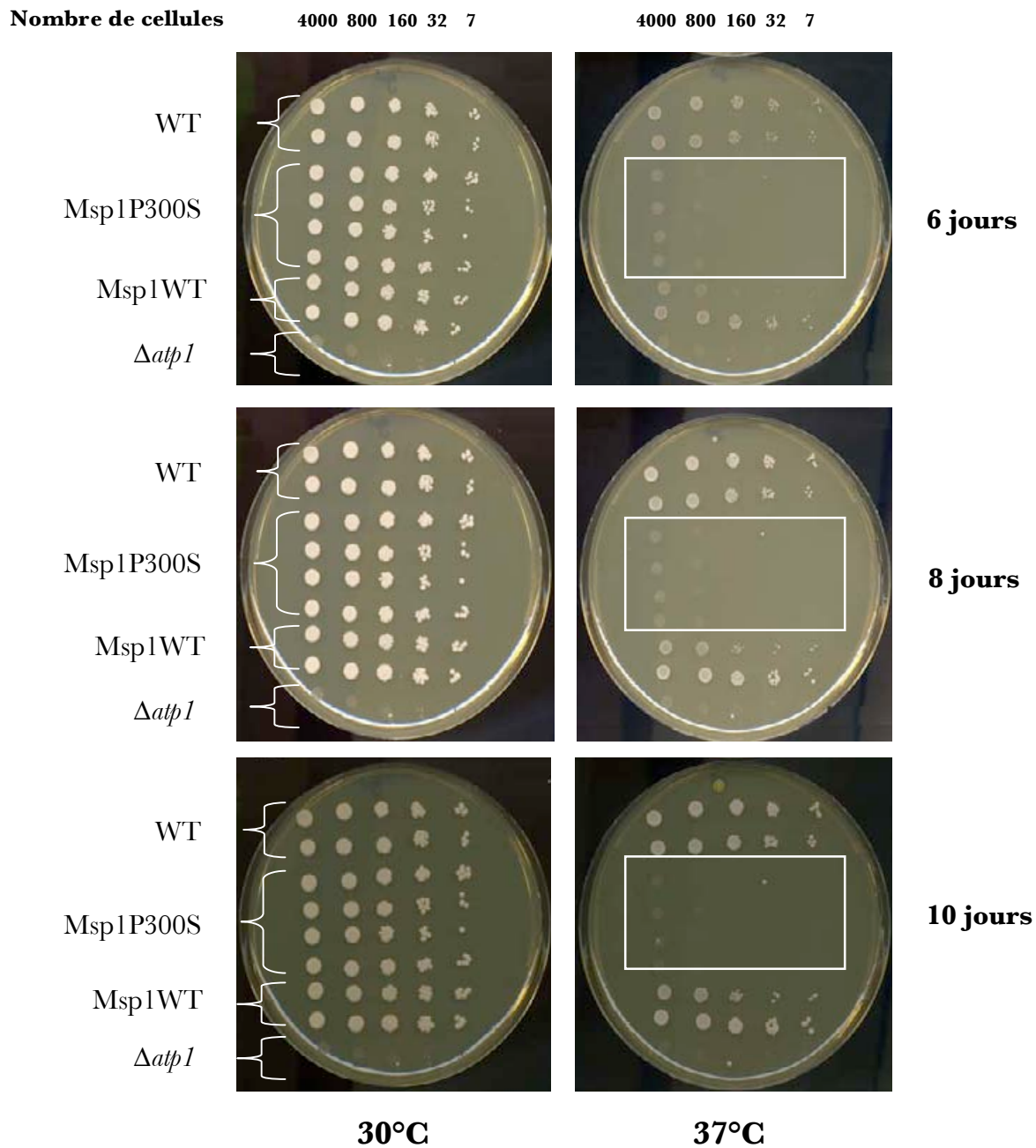


Figure n°68 : Croissance des levures WT, Msp1WT et Msp1P300S en milieu galactose.

Un nombre décroissant de cellules a été déposé sur un milieu gélosé contenant 2% galactose puis incubé à 30°C et 37°C pendant 10 jours. Les résultats sont montrés pour 2 clones parentaux (WT) et 2 clones indépendants de la souche recombinante portant le gène *msp1*⁺ sauvage (Msp1WT) et 4 clones, dont deux indépendantes, pour la souche recombinante portant le gène *msp1-P300S* (Msp1P300S) et un clone de la souche $\Delta atp1$.

5.2.2. Effet de la mutation P300S sur la croissance dans différents milieux

Nous avons ensuite recherché des conditions de culture pour lesquelles la souche Msp1P300S présenterait un phénotype thermolétal, condition indispensable à l'utilisation de ce mutant dans un crible génétique pour rechercher des partenaires de *msp1*⁺. Nous avons analysé la croissance des levures Msp1P300S en présence de sources de carbone fermentescibles ou non fermentescible. Pour cela, nous avons déposé des quantités décroissantes de cellules WT, Msp1WT et Msp1P300S sur un milieu gélosé contenant du glucose ou du galactose (fermentescible), ou de l'éthanol/glycérol (respiratoire). Les levures ont été incubées pendant 10 jours à température permissive (30°C) ou restrictive (37°C). Une souche délétée du gène codant pour la sous-unité α de l'ATP synthase ($\Delta atp1$), incapable de survivre en milieu respiratoire, a été utilisée comme témoin.

Dans le milieu fermentescible contenant 3% glucose aucune différence de croissance n'a été observée entre les souches portant un gène *msp1*⁺ sauvage (WT et Msp1WT) ou muté (Msp1P300S) tout au long des 10 jours d'incubation à température permissive (*figure n°66A*). Contrairement aux souches WT et Msp1WT, les 4 clones mutés *msp1-P300S* montrent un défaut de croissance nettement visible après 3 jours à 37°C. Après 6 jours, la différence de croissance entre les souches mutées et sauvages commence à s'estomper pour n'être que peu visible à 10 jours. En milieu glucose, la souche $\Delta atp1$ pousse à 30°C comme à 37°C, mais les colonies formées sont, quelle que soit la température, plus petites par rapport aux autres souches.

Dans un milieu de respiration contenant 3% éthanol et 3% glycérol, les souches WT, Msp1WT et Msp1P300S poussent de façon identique à 30°C (*figure n°67*). À température restrictive, les souches *msp1-P300S* présentent un défaut de croissance après 6 jours d'incubation. Après 8 jours, la différence de croissance entre les souches mutées et sauvages commence à s'estomper pour n'être que très peu visible à 10 jours. En milieu éthanol/glycérol comme attendu, la souche $\Delta atp1$ ne pousse à aucune température.

En milieu galactose à 30°C (*figure n°68*), les mutants Msp1P300S montrent une croissance aussi efficace que les souches WT et Msp1WT, alors que la souche $\Delta atp1$ ne pousse pas ou peu. À 37°C, la croissance des mutants Msp1P300S, comme celle de la souche $\Delta atp1$, et contrairement à celle des souches portant le gène *msp1*⁺ sauvage (WT et Msp1WT) est inhibée. Cet effet est également détecté à 35.5°C.

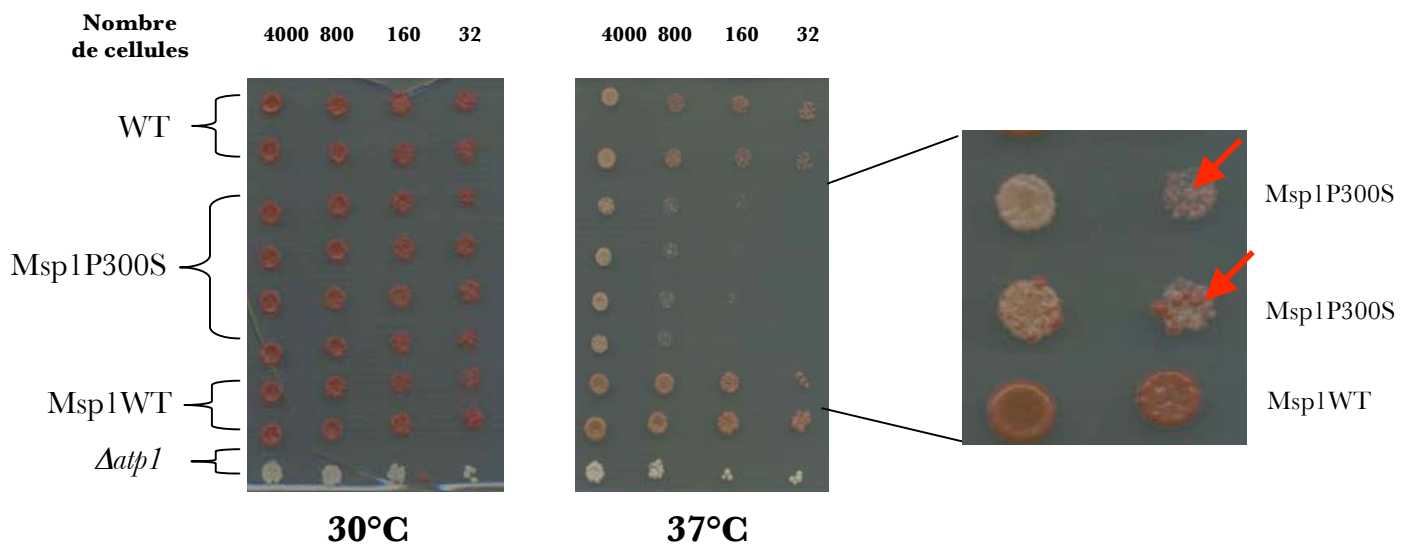


Figure n°69 : Croissance des levures WT, Msp1WT et Msp1P300S en milieu pauvre en adénine.

Un nombre décroissant de cellules a été déposé sur milieu gélosé pauvre en adénine contenant 3% glucose pauvre en adénine puis incubé à 30°C et 37°C pendant 10 jours. Les résultats sont montrés pour 2 clones parentaux (WT) et 2 clones indépendants de la souche recombinante portant le gène *msp1*⁺ sauvage (Msp1WT) et 4 clones, dont deux indépendants, pour la souche recombinante portant le gène *msp1-P300S* (Msp1P300S) et un clone de la souche $\Delta atp1$.

La mutation P300S provoque donc à température restrictive un ralentissement de croissance en milieu glucose et en milieu éthanol/glycérol et la létalité en milieu galactose. Rappelons que le galactose, substrat fermentescible ne peut être utilisé chez *S. pombe* qu'en présence d'une phosphorylation oxydative opérante. Ces résultats pouvant indiquer que la mutation du gène *msp1*⁺ perturbe le fonctionnement des mitochondries, nous avons donc testé le comportement de la souche Msp1P300S, qui porte une mutation dans le gène *ade6* (*ade6-M210*), dans un « test en goutte » réalisé sur un milieu glucose pauvre en adénine (*figure n°69*). Les levures mutées pour le gène *ade6* accumulent un intermédiaire de la voie de biosynthèse de l'adénine (phosphoribosylaminoimidazole, AIR) quand elles poussent sur un milieu dont la concentration de l'adénine est limitée (Chiron et al, 2007). L'oxydation de cet intermédiaire, qui nécessite une chaîne respiratoire fonctionnelle, conduit à la formation d'un pigment rouge. Les levures mutées pour le gène *ade6* qui présentent un défaut de respiration restent donc de couleur crème quand elles poussent sur un milieu pauvre en adénine. À 30°C, les quatre clones Msp1300S, ainsi que les souches portant un gène *msp1*⁺ sauvage (WT et Msp1WT), présentent une coloration rouge caractéristique de la présence de l'allèle *ade6-M210* (*figure n°69*). À 37°C, les souches Msp1P300S contrairement aux souches WT et Msp1WT présentent une coloration rosâtre liée à la présence de colonies blanches, roses et rouges. Ceci indique une altération de la capacité à oxyder l'AIR probablement liée à un défaut de respiration.

5.2.3. Effet de la mutation P300S sur la respiration mitochondriale

Afin de déterminer si la mutation P300S affecte réellement la fonction de la chaîne respiratoire, nous avons mesuré le taux de consommation d'O₂ de levures sauvages ou mutées pour le gène *msp1*⁺ cultivées en milieu éthanol/glycérol à température permissive et restrictive par oxygraphie. L'utilisation de CCCP, un agent découplant ou d'antimycine A, un inhibiteur du complexe III, permet de confirmer la nature mitochondriale de la respiration mesurée par l'oxygraphe (*figure n°70*). À 30°C, une stimulation légère de respiration en présence de 0,02 et 0,2 µM de CCCP (environ 17 et 19% respectivement) est observée pour des souches Msp1WT, cette stimulation atteint 73% en présence de 2 µM de CCCP (*figure n°70A*). À 30°C, la respiration des souches Msp1WT et Msp1P300S est inhibée de 60% et 65% respectivement à une concentration d'antimycine de 0,02 µM et de 94% à une concentration de 0,2 µM. Aucun effet n'est détecté à 0,002 µM d'antimycine. Dans les deux souches le taux

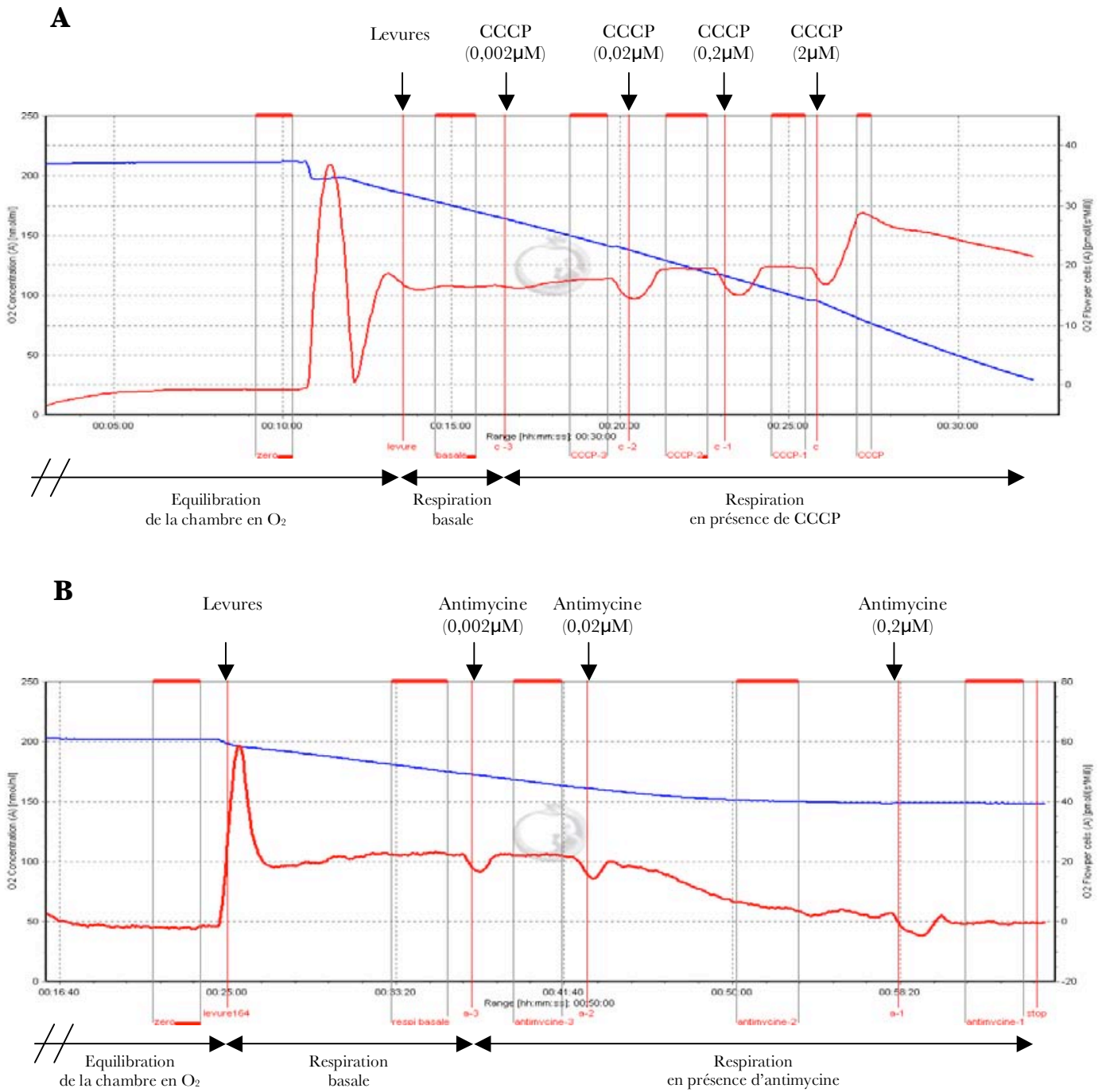


Figure n°70 : Respiration basale ou modulée de levures sauvages.

Des levures sauvages (Msp1WT) ont été cultivées à 30°C en milieu éthanol/glycérol et leur respiration mesurées par oxygraphie en présence ou non de CCCP (A) ou d'antimycine (B). Courbe bleue : concentration d'O₂ (nmol/ml) dans la chambre de l'oxygraphe. Courbe rouge : taux d'O₂ (pmol/(s*million cellules)) consommé par les levures.

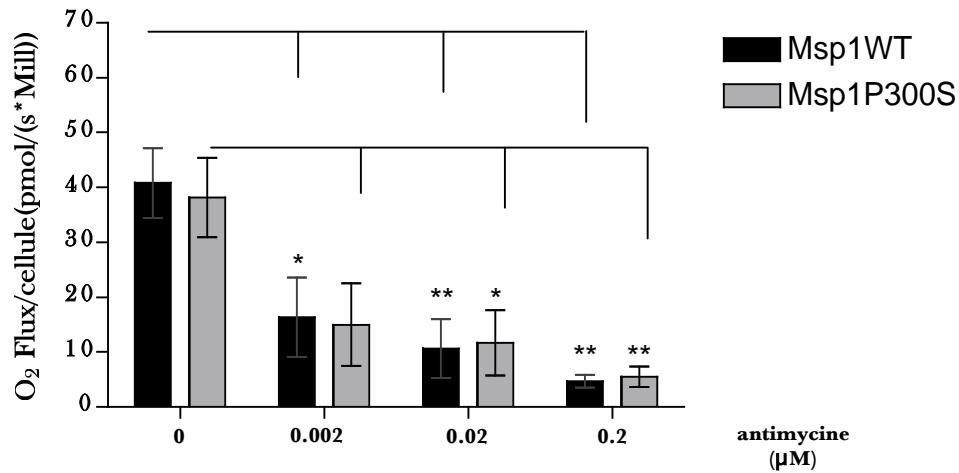


Figure n°71 : Respiration des levures en présence d'antimycine A à 37°C.

Des levures sauvages et mutées pour le gène *msp1*⁺ ont été cultivées pendant 6h en milieu éthanol/glycérol à 37°C et leur respiration a été mesurée par oxygraphie en présence ou absence d'antimycine. Les résultats sont la moyenne +/- SEM de 4 à 7 expériences indépendantes. L'analyse statistique est réalisée avec le test T de student : * p<0,03, ** p<0,0045, ** p<0,0023 pour Msp1WT et * p<0,0181 et ** p<0,0091 pour Msp1P300S respectivement.

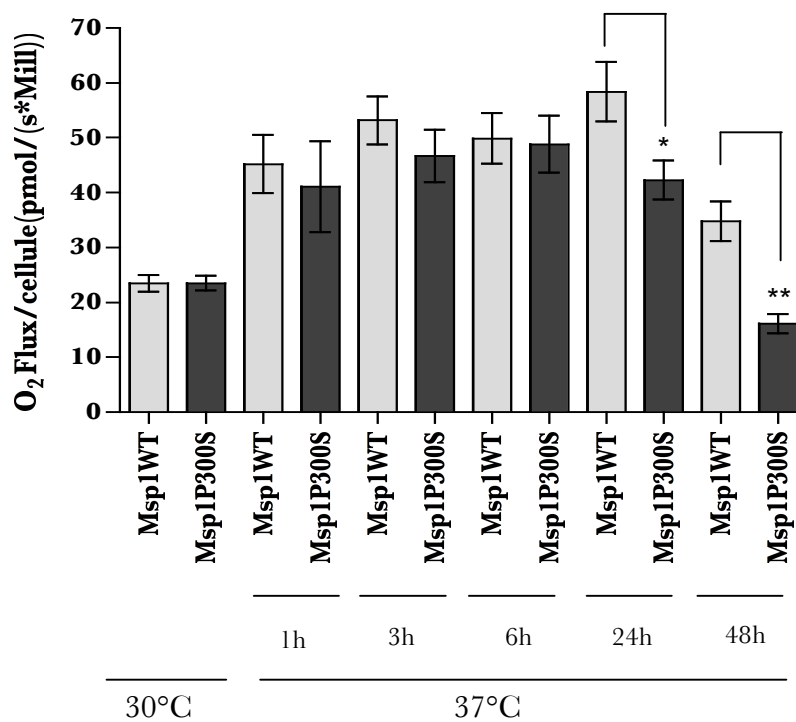


Figure n°72 : Respiration basale des levures sauvages (Msp1WT) et mutées (Msp1P300S).

Les levures portant un gène *msp1*⁺ sauvage (Msp1WT) ou muté (Msp1P300S) ont été cultivées à 30°C ou à 37°C pendant 48h en milieu éthanol/glycérol et leur respiration mesurées par oxygraphie. Les résultats sont la moyenne +/- SEM de 4 à 7 expériences indépendantes. L'analyse statistique est réalisée avec le test T de student (* p< 0.0390, ** p< 0.0095).

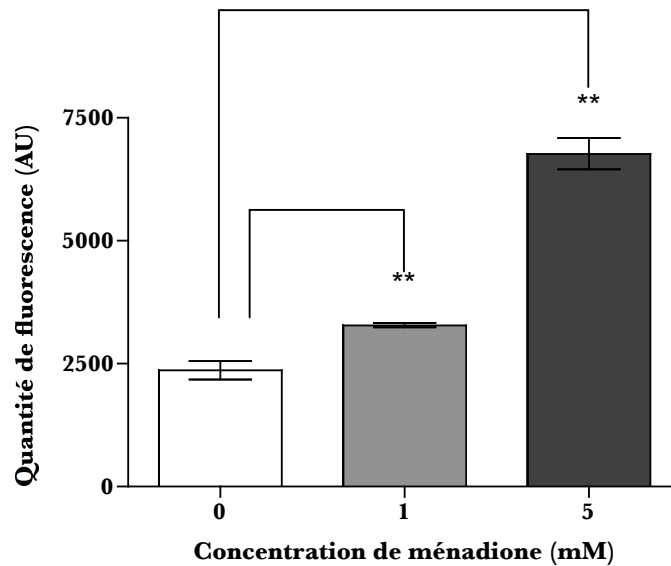


Figure n°73 : Production de ROS dans une levure sauvage en présence de ménadione.

Des levures sauvages (WT) cultivées en milieu contenant 3% glucose ont été traitées pendant 3h sans ou avec ménadione (1 et 5 mM), puis incubées 80 min en présence de la sonde H₂DCFDA. Un extrait cellulaire a ensuite été effectué et la quantité de fluorescence mesurée à l'aide d'un fluorimètre. La quantité de fluorescence, a été ramenée à la quantité de protéines présentes dans l'extrait. Les résultats présentés sont la moyenne +/- SEM de 3 expériences indépendantes. L'analyse statistique est réalisée avec le test T de student (** p< 0.0084, *** p< 0.0010).

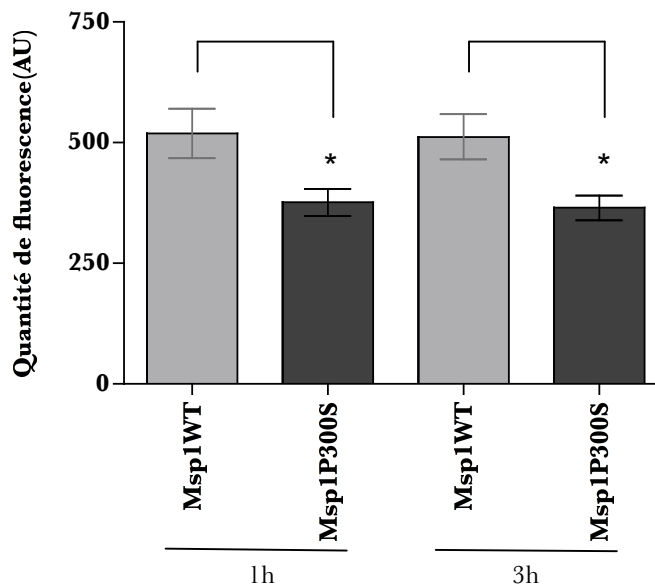


Figure n°74 : Production de ROS des levures sauvages (Msp1WT) et mutées (Msp1P300S) à température restrictive.

Les levures cultivées en milieu éthanol/glycérol ont été placées pendant 1h ou 3h à 37°C puis incubées 80 min en présence de la sonde H₂DCFDA. Un extrait cellulaire a ensuite été effectué et la quantité de fluorescence mesurée à l'aide d'un fluorimètre. La quantité de fluorescence a été ramenée à la quantité de protéines présentes dans l'extrait. Les résultats correspondent à la moyenne +/- SEM de 14 à 16 expériences indépendantes. L'analyse statistique est réalisée avec le test T de student. (* p< 0.0216 pour 1h et * p< 0.01 pour 3h).

de respiration mitochondriale avoisine donc les 6%. Après 6h à 37°C, la respiration des deux souches Msp1WT et Msp1P300S est plus sensible à l'antimycine et un taux de respiration non mitochondriale de 5% est atteint dans les deux cas (*figure n°71*) et reste stable au moins pendant 48h (non montré).

À 30°C les levures sauvages (Msp1WT) et mutées pour le gène *msp1+* (Msp1P300S) montrent un taux de consommation d'O₂ équivalent (*figure n°72*). À 37°C, la consommation d'O₂ est plus élevée dans la souche Msp1WT comme dans la souche Msp1P300S pendant les premières 24h. Après la mise en culture à température restrictive aucune différence significative de la consommation en O₂ entre les souches Msp1WT et Msp1P300S n'est observée jusqu'à 6h, bien que la tendance semble être à la baisse. Au delà, la consommation en O₂ de la souche mutée est significativement réduite d'un facteur 1,4 à 24h et d'un facteur 2,3 à 48h par rapport à la souche sauvage. La mutation P300S provoque donc à température restrictive une diminution de la respiration détectable après 24h de culture. Compte tenu de la variabilité des mesures de consommation d'oxygène à 37°C, il est possible qu'une baisse de respiration faible se produise dès les premières heures de croissance à température restrictive.

5.2.4. Effet de la mutation P300S sur la production de ROS

La chaîne respiratoire étant un des sites majeurs de production des ROS (Hamanaka & Chandel; Kowaltowski et al, 2009; Murphy, 2009), nous avons mesuré leur taux dans des cellules sauvages (Msp1WT) ou mutées (Msp1P300S) pour le gène *msp1+* par spectrofluorométrie en utilisant la sonde fluorescente H₂DCFDA. Cette sonde permet d'évaluer les concentrations intracellulaires en peroxyde d'hydrogène et hydroxyperoxydes. Après action d'estérases intracellulaires, la sonde H₂DCFDA va être oxydée et va émettre une fluorescence proportionnelle à la quantité ROS. Pour tester l'efficacité de la sonde chez *S. pombe* nous avons mesuré le taux de ROS sur des levures cultivées en présence de ménadione (1 et 5 mM), un agent pro-oxydant (*figure n°73*). Une augmentation du taux de ROS proportionnelle à la quantité de ménadione est observée comme attendu. Les levures mutées pour le gène *msp1+* (Msp1P300S) présentent une diminution significative (environ 28%) du taux de ROS dès 1h de culture en milieu éthanol/glycérol à température restrictive (*figure n°74*).

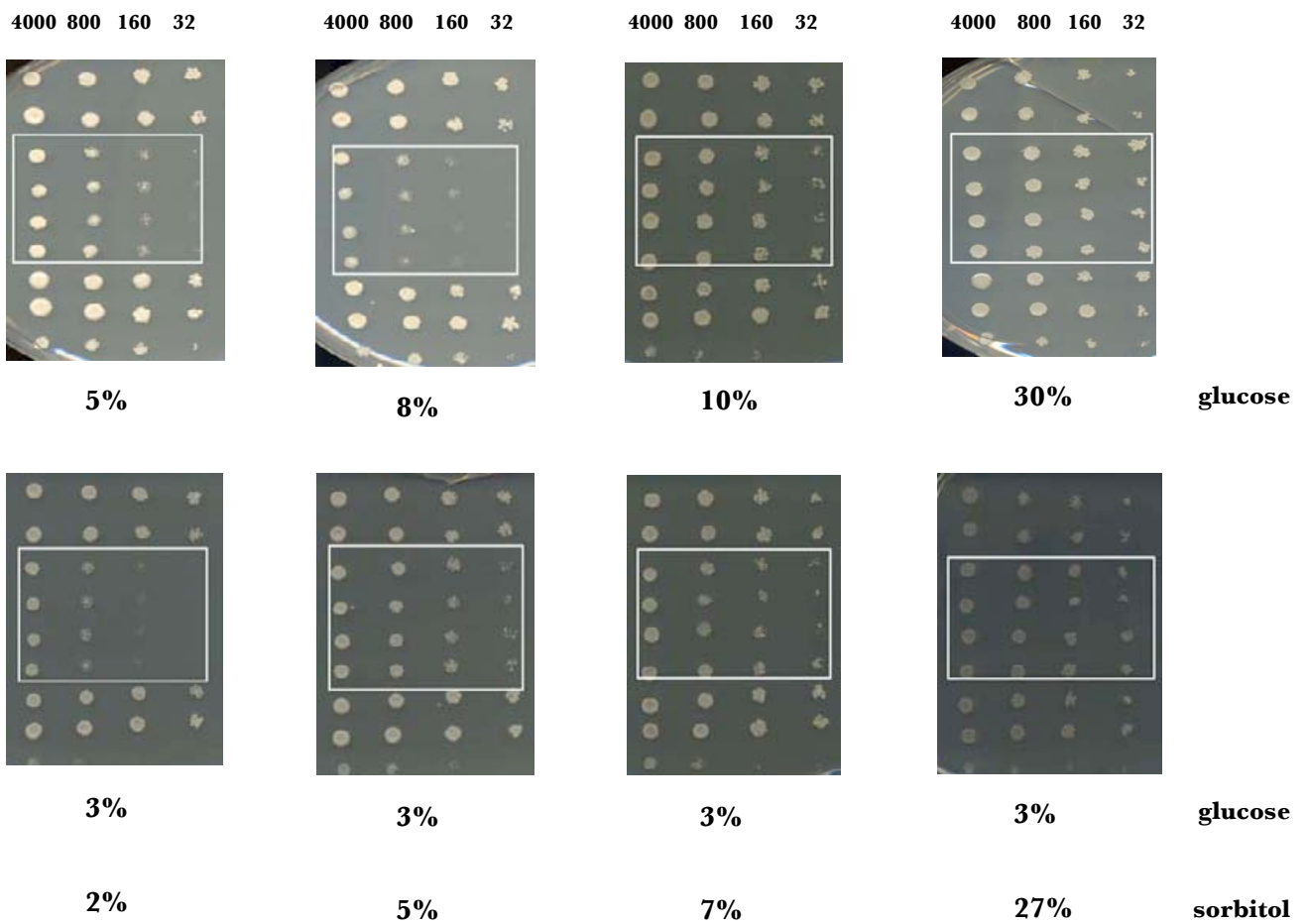
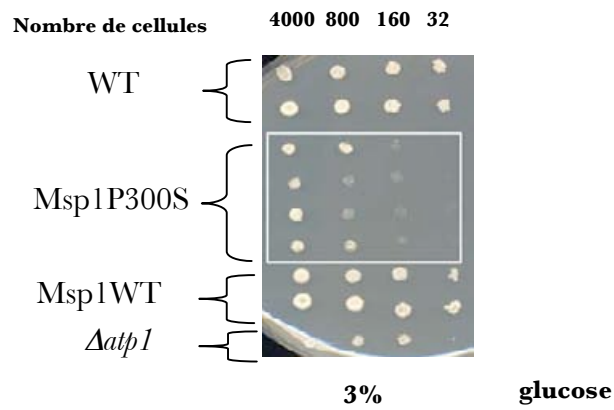


Figure n°75 : Croissance des levures WT, Msp1WT et Msp1P300S en milieu glucose plus ou moins sorbitol à température restrictive.

Un nombre décroissant de cellules a été déposé sur un milieu gélosé contenant 3, 5, 8, 10 ou 30% glucose (A) ou 3% glucose plus 2, 5, 7 ou 27% sorbitol (B) puis incubé à 37°C pendant 3 jours.

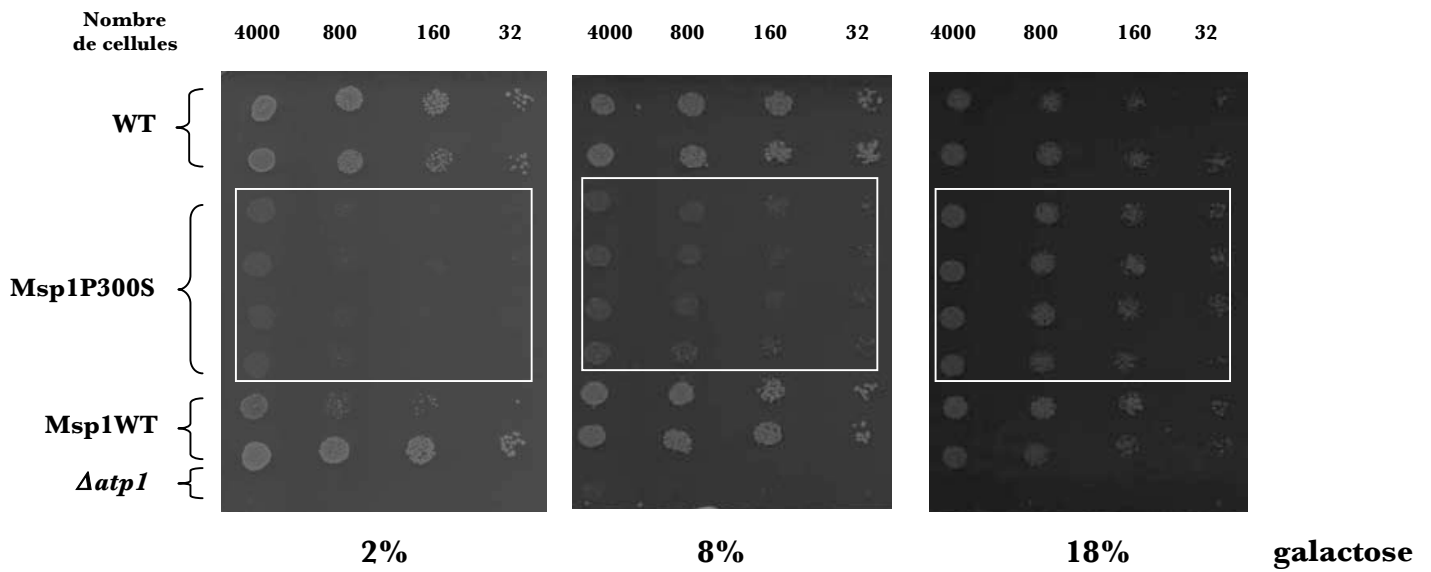
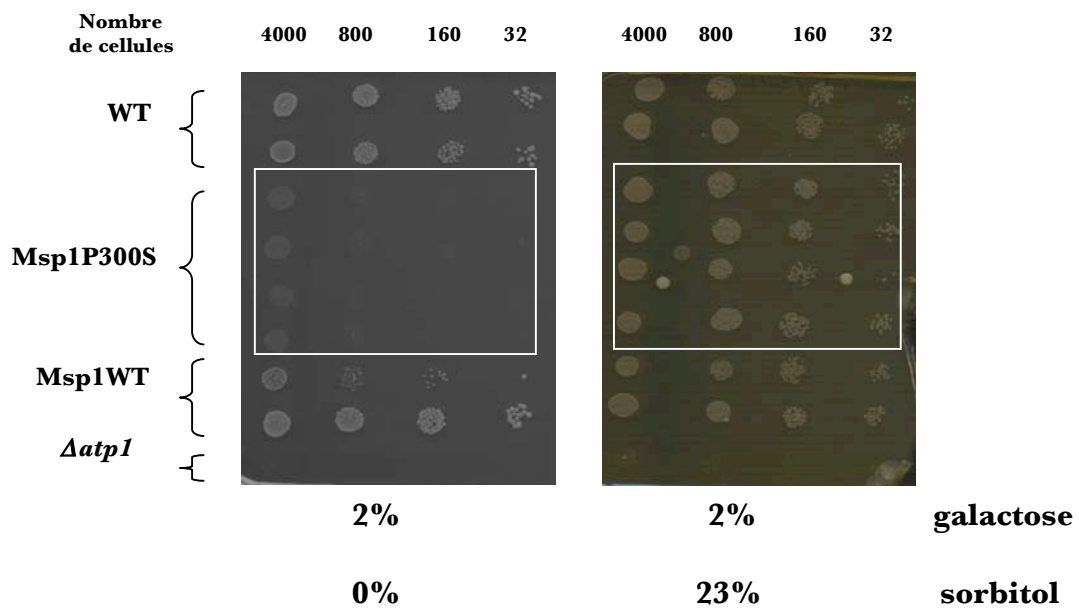
A**B**

Figure n°76 : Croissance des souches WT, Msp1WT et Msp1P300S en milieu galactose plus ou moins sorbitol à température restrictive.

Un nombre décroissant de cellules a été déposé sur un milieu gélosé contenant 2, 8 et 18% galactose (A) ou 2% galactose plus 23% (B) sorbitol puis incubé à 37°C pendant 10 jours.

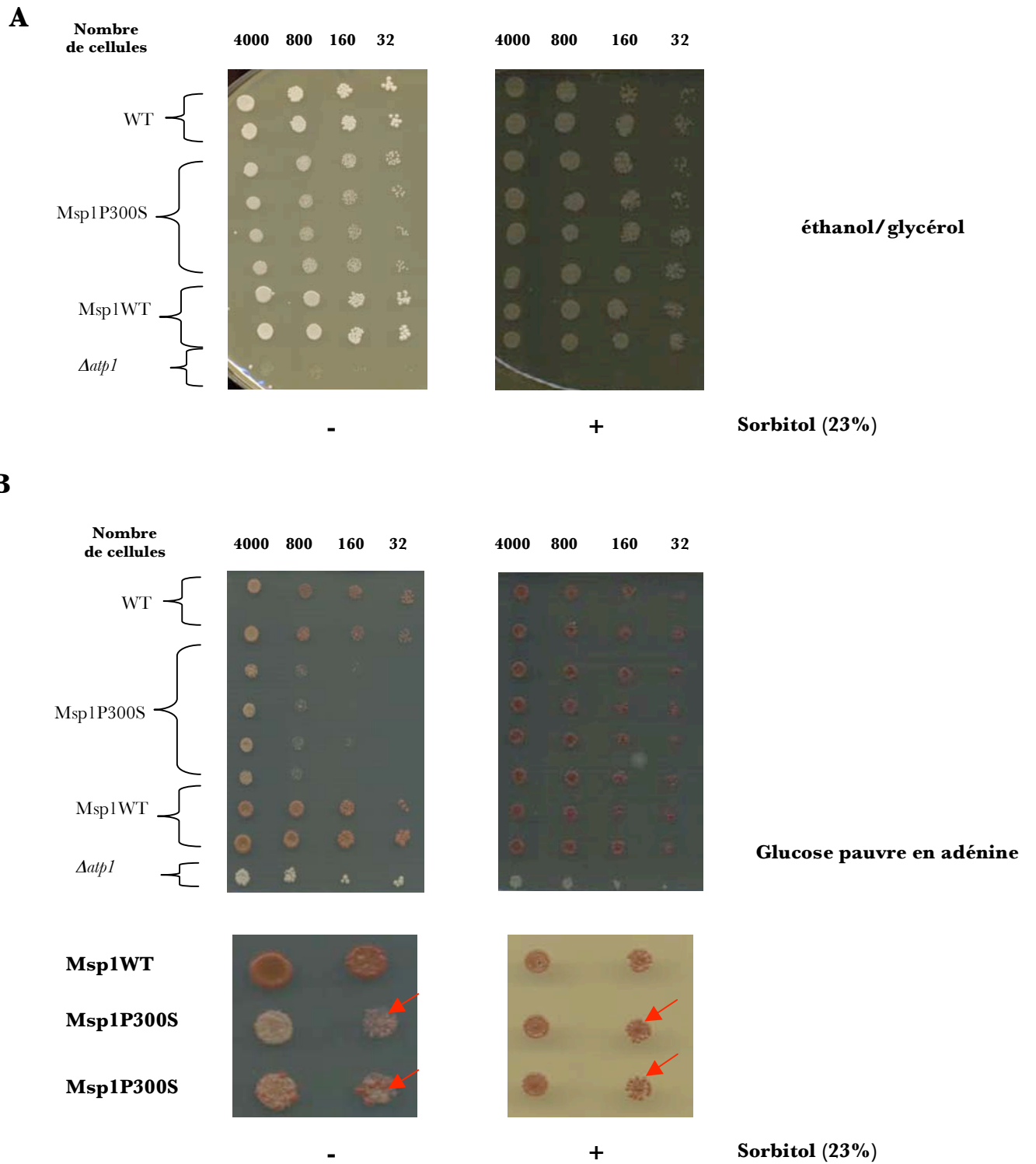


Figure n°77 : Croissance des levures WT, Msp1WT et Msp1P300S en milieu éthanol/glycérol ou glucose pauvre en adénine plus ou moins sorbitol à température restrictive.

Un nombre décroissant de cellules a été déposé sur un milieu gélosé contenant 3% éthanol et 3% glycérol plus 23% sorbitol (A) ou 3% glucose pauvre en adénine plus 23% sorbitol (B) puis incubé à 37°C pendant 6 jours.

5.2.5. Effet de l'osmolarité sur la croissance du mutant Msp1P300S

Afin de compenser le déficit de croissance de la souche mutée pour le gène *msp1⁺* en milieu glucose après 3 jours de culture à température restrictive (*figure n°66*), nous avons augmenté la concentration en sucre du milieu de 3% à 10% (*figure n°75A*). Dans un milieu 10% glucose le déficit de croissance de la souche Msp1P300S n'est plus observé. Pour déterminer si cet effet était due à une augmentation de la glycolyse ou de l'osmolarité, nous avons testé l'effet du sorbitol, un sucre non métabolisable. Les souches WT, Msp1WT et Msp1P300S ont été cultivées dans un milieu 3% glucose complété par différentes quantités de sorbitol (*figure n°75B*). Ces quantités de sorbitol ont été utilisées afin d'obtenir une osmolarité équivalente à celle des milieux contenant du glucose précédemment utilisés ou correspondante à une concentration (27% soit 1,48M) habituellement utilisée pour réaliser un stress osmotique. L'addition de sorbitol restaure progressivement le défaut de croissance de la souche *msp1-P300S* à température restrictive.

L'effet d'une augmentation de la quantité de galactose de 2% à 18% sur la létalité du mutant Msp1P300S à température restrictive a également été testé. À 18% aucune différence n'est notée entre les souches contenant le gène *msp1⁺* sauvage (WT, Msp1WT) ou muté (Msp1P300S) (*figure n°76A*). L'addition de sorbitol (23%) dans le milieu 2% galactose restaure également la viabilité du mutant P300S à 37°C (*figure n°76B*). De même, l'addition de sorbitol (23%) compense le défaut de croissance de la souche Msp1P300S en milieu éthanol/glycérol (*figure n°77A*) ainsi que le défaut d'oxydation observé en milieu glucose pauvre en adénine (*figure n°77B*).

L'augmentation de la quantité de substrats ou la présence de sorbitol en quantité élevée, compense donc le déficit de croissance observé en milieu glucose et éthanol/glycérol ou la létalité en milieu galactose, ainsi que la capacité à oxyder l'AIR de la souche *msp1-P300S* (Msp1P300S). Notons que la viabilité du mutant *Δatp1* sur milieu éthanol/glycérol ou galactose n'est elle pas restaurée par l'addition de sorbitol.

5.2.6. Sensibilité de la souche Msp1 P300S au stress oxydatif

Il a été montré que des mutants de respiration chez *S. cerevisiae* sont hyper sensibles au stress oxydatif (Thorpe et al, 2004). Nous avons donc testé l'effet d'un stress oxydant sur la viabilité de la souche *msp1-P300S*, en réalisant un test en goutte en milieu glucose

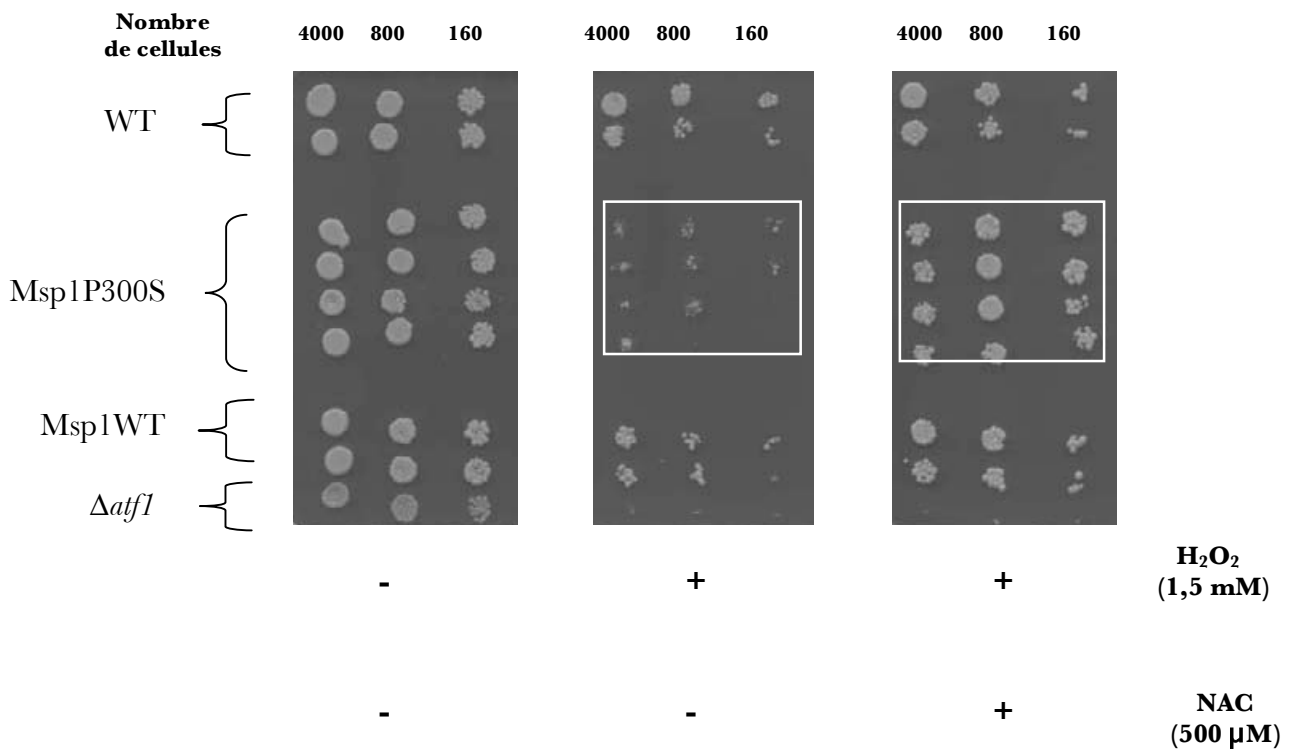


Figure n°78 : Viabilité des levures WT, Msp1WT et Msp1P300S en présence d'H₂O₂ à température restrictive.

Un nombre décroissant de cellules a été déposé sur un milieu gélosé contenant 10% glucose en présence ou absence d'H₂O₂ (1,5 mM) et de NAC (500 µM) puis incubé à 37°C pendant 5 jours. La souche sensible au stress oxydatif, *Δatf1*, a été utilisée comme contrôle.

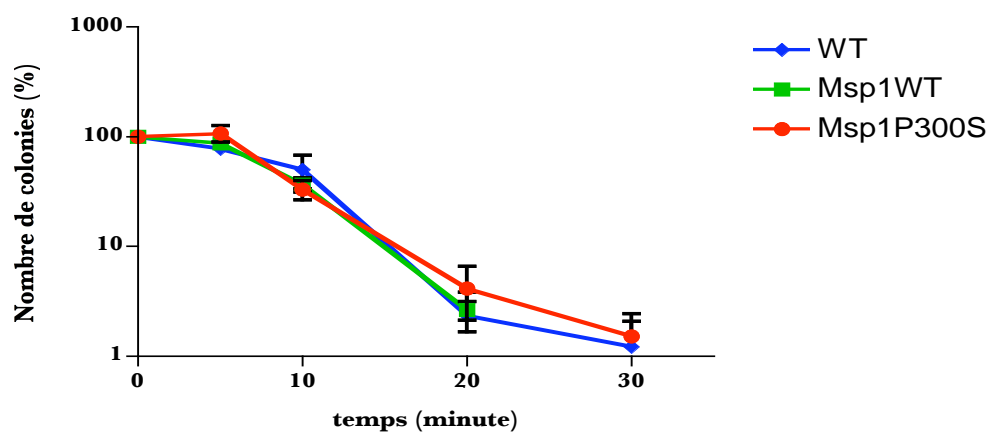


Figure n°79 : Sensibilité de la souche Msp1P300S à un stress thermique.

Des levures WT, Msp1WT ou Msp1P300S ont été incubées pendant 30 minutes à 48°C en milieu glucose puis déposées sur milieu gélosé contenant du glucose et incubées à 30°C pendant 7 jours. Le nombre de colonies formées a été compté et ramené à 100% pour la souche non traitée à 48°C. Les résultats sont la moyenne +/- SEM de 2 expériences indépendantes pour les clones WT et Msp1WT et de 4 expériences indépendantes pour les clones Msp1P300S.

contenant 1,5mM d'H₂O₂. Nous avons utilisé, comme témoin, une souche délétée pour le gène *atf1*⁺ (Δ *atf1*), un facteur de transcription impliqué dans la voie de la réponse au stress oxydatif (Ikner & Shiozaki, 2005). La souche témoin Δ *atf1* présente une inhibition totale de croissance en présence de 1,5mM d'H₂O₂. Contrairement aux souches sauvages (WT et Msp1WT), les souches mutées (Msp1P300S) présentent un défaut de croissance réversé par un anti-oxydant, la NAC (N-acétylcystéine) (*figure n°78*). Ces résultats révèlent une sensibilité accrue des mutants Msp1P300S au stress oxydatif à température restrictive.

5.2.7. Sensibilité de la souche Msp1 P300S au stress thermique

Pour déterminer si les effets observés à 37°C pour les mutants Msp1P300S ne seraient pas la conséquence d'un défaut de la voie de signalisation du stress thermique (Gacto et al, 2003; Smith et al), les levures sauvages (WT et Msp1WT) et mutées (Msp1P300S) pour le gène *msp1*⁺ ont été cultivées en milieu glucose liquide et traitées pendant 5, 10, 20 et 30 minutes à 48°C. Ces cellules ont ensuite été étalées sur un milieu glucose gélosé et la viabilité cellulaire a été estimée en déterminant le nombre de colonies formées après 7 jours à 30°C. La viabilité des mutants Msp1P300S face à un choc thermique est identique à celle des souches WT et Msp1WT (*figure n°79*).

5.3. Mise au point des conditions de criblage de suppresseurs de la létalité induite par la perte de *msp1*⁺

Afin de rechercher, dans une banque d'ADNc ou une banque génomique, des suppresseurs multi-copies de la létalité induite par l'inactivation de Msp1p, nous avons choisi d'utiliser le milieu galactose. En effet seul ce milieu provoque une inhibition totale de croissance de la souche Msp1P300S dans les tests que nous avons réalisés précédemment. Pour valider la stratégie expérimentale avant le criblage de la banque, les souches Msp1P300S et Msp1WT ont été transformées par un vecteur (pREP41) permettant d'exprimer la forme sauvage de Msp1p ou un contrôle négatif, la Chloremphenicol Acetyl Transférase bactérienne (CAT). Après électroporation, les transformants ont été sélectionnés, grâce à leur prototrophie vis-à-vis de la leucine en milieu galactose et incubés à 25°C ou 37°C.

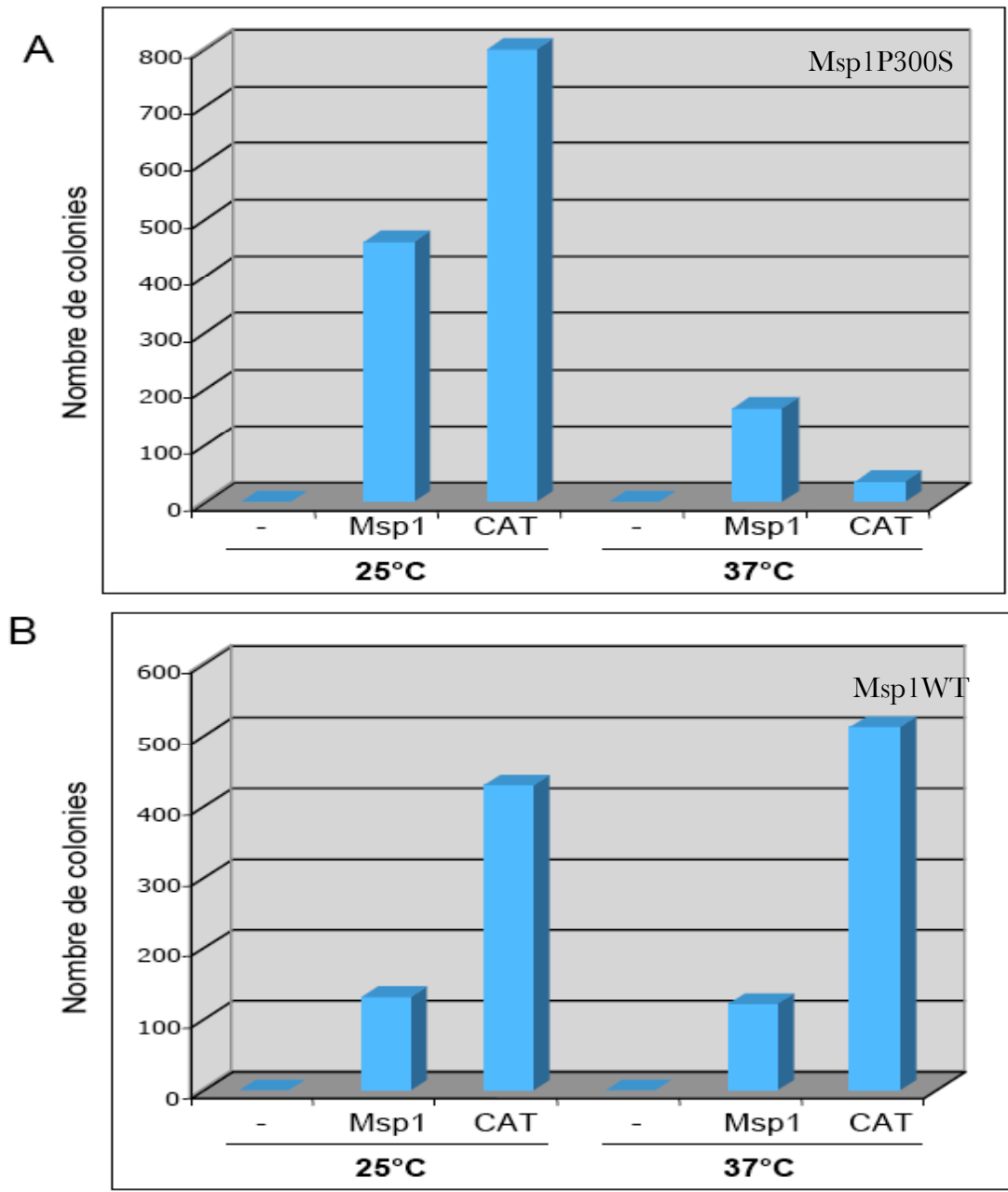


Figure n°80 : Nombres de transformants obtenus sur milieu galactose.

Les souches Msp1P300S (A) et Msp1WT (B) ont été transformées par le vecteur pREP41 permettant d'exprimer la forme sauvage de Msp1 ou un contrôle négatif (CAT). Après électroporation les transformants ont été étalés sur milieu gélosé contenant 2% galactose dépourvu de leucine et incubés à 25°C ou 37°C. Les résultats sont la moyenne de deux expériences indépendantes.

Pour la souche Msp1P300S à 25°C le nombre de transformants obtenus avec le vecteur permettant d'exprimer CAT est supérieur au nombre de transformants obtenus avec le vecteur permettant d'exprimer Msp1p (*figure n°80A*). Ceci pourrait être lié à la surexpression de la dynamine qui a un effet délétère pour la croissance de la levure (Pelloquin et al, 1998). À l'inverse à 37°C le nombre de transformants obtenus par le vecteur permettant d'exprimer CAT est nettement inférieur à celui obtenu par le vecteur permettant d'exprimer Msp1p. Ceci pourrait être expliqué par la capacité de la forme ectopique sauvage de Msp1p contrairement à CAT, à compléter la perte de fonction de Msp1P300S à 37°C. La souche Msp1WT montre un comportement identique à 25°C et à 37°C, avec un nombre de transformants supérieur d'un facteur 3 à 4 avec le vecteur permettant d'exprimer CAT par rapport au vecteur permettant d'exprimer Msp1p (*figure n°80B*).

L'ensemble de ces résultats permet de proposer que l'expression de Msp1p sauvage permet de supprimer la létalité induite à température restrictive par la mutation P300S.

5.4. Conclusion et perspectives

Pour approfondir nos connaissances sur la dynamine OPA1/Msp1p, je me suis intéressée à sa caractérisation chez la levure *S. pombe*. Nous avons construit un mutant thermosensible de Msp1p, muté sur son domaine GTPase (P300S), qui est affecté dans son rôle fusogène. En effet, à température restrictive (37°C) les levures porteuses de la mutation P300S sur le gène *msp1*⁺ présentent un réseau mitochondrial fragmenté. Ces résultats seront confirmés par une analyse de la capacité des mitochondries de la souche Msp1P300S à fusionner lors de la conjugaison. L'absence de létalité de ce mutant en milieu respiratoire montre que cette mutation n'induit pas la perte totale du génome mitochondrial comme dans le cas d'un mutant nul (Pelloquin et al, 1998). La mutation P300S de Msp1 inhiberait donc la fonction de la protéine dans la dynamique mitochondriale sans affecter son rôle dans la maintenance du génome mitochondrial. Ainsi, comme dans le cas de la surexpression du mutant de délétion du domaine TM1 et contrairement à la délétion du gène ou à l'expression des mutants des domaines GTPase, GED ou TM2, les deux fonctions de la dynamine seraient découplées.

Nous avons analysé les effets de la mutation P300S de Msp1p sur fonctionnement de la chaîne respiratoire en cultivant la souche mutée sur des milieux respiratoires ou

fermentescibles. Sur milieu glucose, la mutation P300S provoque un ralentissement de croissance à température restrictive. À l'image des mutants de respiration de la levure *S. pombe* qui présentent un déficit de croissance en milieu glucose, ce ralentissement de croissance pourrait être provoqué par un mauvais fonctionnement de la chaîne respiratoire. Cette hypothèse est renforcée par la mise en évidence d'une altération de la capacité de la souche Msp1P300S, porteuse de l'allèle *ade6-M210*, à oxyder l'intermédiaire de la voie de biosynthèse de l'adénine, AIR, quand elle est cultivée en milieu pauvre en adénine. Un défaut de fonctionnement de la chaîne respiratoire mitochondriale pourrait entraîner une diminution de la quantité d'ATP (ou de la capacité à re-oxyder les équivalent réduits) et provoquer ainsi un ralentissement de croissance. Rappelons que chez *S. pombe* l'effet Crabtree (répression de la respiration par le glucose) est moins prononcé que chez *S. cerevisiae* (Foury & Goffeau, 1972). L'élévation de la concentration en glucose à 10% pourrait, en augmentant la glycolyse, compenser le défaut de croissance de la souche *msp1-P300S* observé à 3% glucose.

L'hypothèse d'un défaut de respiration induit par la mutation P300S de Msp1p est en accord avec le retard de croissance observé quand cette souche est cultivée en milieu respiratoire (éthanol-glycérol) à température restrictive. De même, le taux de consommation d'oxygène mesuré par oxygraphie est significativement réduit après 24h de croissance à température restrictive dans ce milieu. Cette réduction de la respiration est tardive et postérieure à la fragmentation des mitochondries qui débute dès 15 min après la mise en culture à température restrictive et est totale après 60 min. Ce défaut de respiration semble donc une conséquence secondaire du défaut de morphologie des mitochondries, qui pourrait être lié à une déplétion en génome mitochondrial qu'il conviendra de caractériser. On pourrait également proposer qu'un défaut de structuration de la membrane interne induit par l'inactivation de Msp1p puisse à long terme en perturbant l'organisation de la chaîne respiratoire affecter son fonctionnement. L'inactivation de la dynamine humaine OPA1 provoque un défaut de respiration associé à une baisse de l'activité des complexes respiratoires I, III et IV dans les MEFs traitées par interférence à l'ARN (Chen et al, 2005), ainsi qu'une diminution plus ou moins sévère du nombre de nucléoïdes par mitochondrie dans les MEFs OPA1^{-/-} (Chen et al, 2007).

Les mutants de gènes nucléaires affectant la respiration chez *S. pombe*, incapables de pousser sur milieu éthanol/glycérol, sont également pour la plupart d'entre-eux déficients pour la croissance en milieu galactose (Chiron et al, 2007). Le mutant Msp1P300S qui ne montre qu'un retard de croissance en milieu éthanol/glycérol n'est pourtant pas capable de vivre à température restrictive sur milieu galactose. La sévérité du phénotype sur milieu

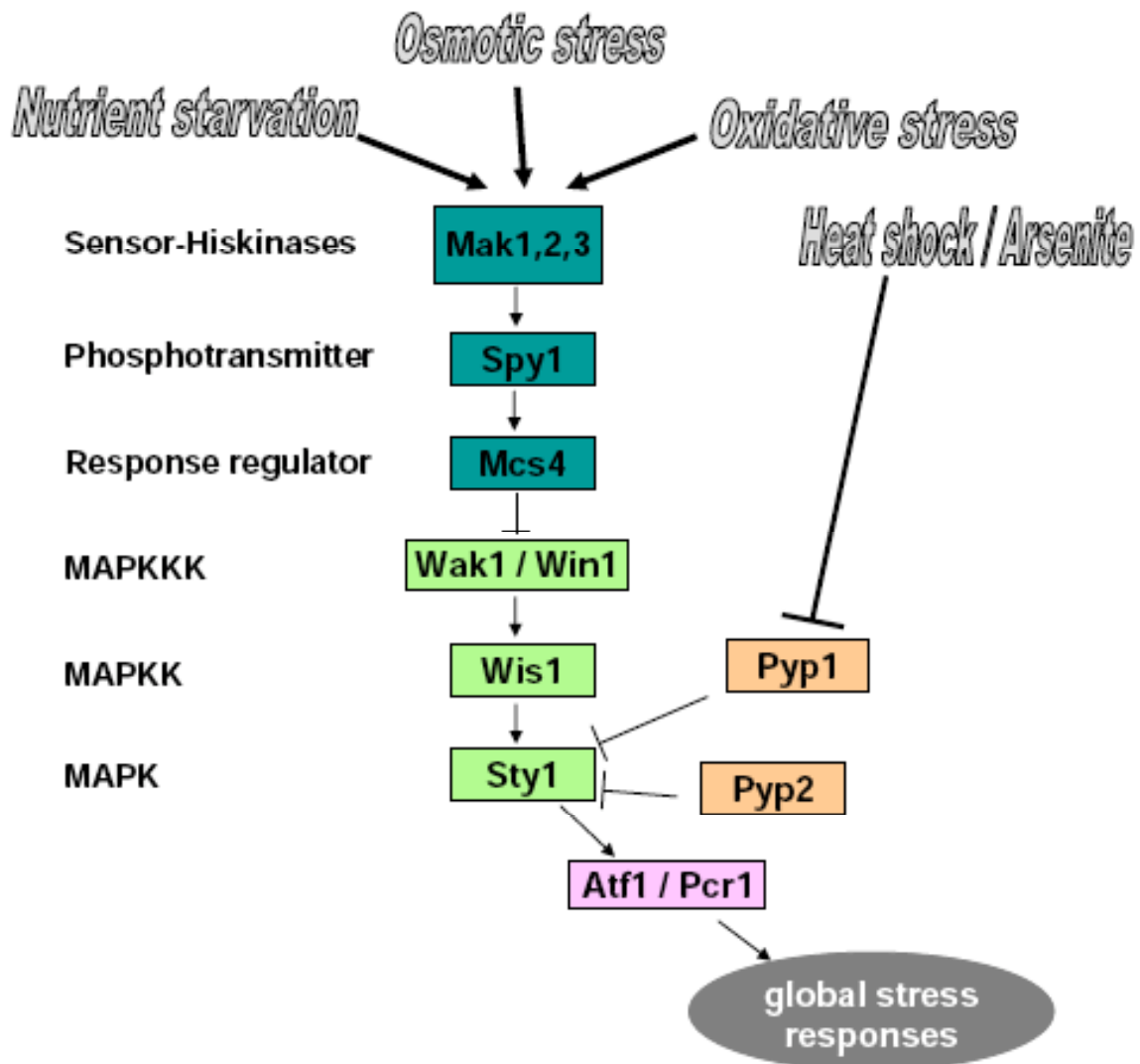
galactose, qui ségrège avec la mutation P300S comme l'ensemble des autres phénotypes associés, reste à ce jour inexplicée. Une hypothèse proposée pour expliquer l'impossibilité d'utiliser le galactose en absence de phosphorylation oxydative est la faible efficacité de la voie d'entrée du galactose dans la glycolyse (voie de Leloir). La glycolyse serait alors limitée et ne produirait pas assez d'ATP pour assurer la croissance des cellules sans respiration. Dans la voie de Leloir, le galactose est tout d'abord phosphorylé par la galactokinase (Gal1p), puis un groupement uridyl est ajouté par la galactose-1-P uridyl transférase (Gal7p) et enfin l'UDP galactose-4'-épimérase (Gal10p) va permettre la transformation de l'UDP-galactose en UDP-glucose, le groupement uridyl retransmis au galactose et le glucose entre dans la voie glycolytique. Nous avons testé si la létalité du mutant Msp1P300S en milieu galactose pouvait être compensée par une augmentation de l'expression des enzymes de voie Leloir. Pour cela, des levures mutées pour le gène *msp1*⁺ ont été transformées par un plasmide portant un fragment d'ADN génomique (chromosome II position 4482702 et 4492267) contenant les gènes *gal1*⁺, *gal7*⁺ et *gal10*⁺ (don de N. Bonnefoy), et leur croissance en milieu galactose a été testée à température restrictive. Aucune complémentation n'a été observée; cependant le gène *gal7*⁺ présent dans ce fragment étant incomplet (absence des 113 premiers nucléotides du cadre de lecture et de son promoteur) nous reproduirons ces expériences avec le cluster complet.

Le ralentissement de croissance de la souche exprimant Msp1P300S en milieu glucose et éthanol-glycérol, ainsi que la létalité en milieu galactose, sont compensés par l'addition de sorbitol, un sucre non métabolisable, dans le milieu de culture. Les levures pour palier une élévation d'osmolarité du milieu extracellulaire accumulent à l'intérieur de la cellule du glycérol afin de maintenir l'homéostasie osmotique (Clotet & Posas, 2007). Chez la levure, le glycérol est synthétisé à partir d'un intermédiaire de la glycolyse, le dihydroxyacétophosphate, en deux étapes catalysées par une glycerophosphate dehydrogenase dépendante du NADH et une phosphatase (Flores et al, 2000). Chez *S. pombe*, comme chez *S. cerevisiae*, il existe deux glycerophosphates dehydrogenases NADH dépendantes dont une, Gpd1p, est induite en réponse à un stress osmotique (Aiba et al, 1995). L'expression du gène *gpd1*⁺ est contrôlée au niveau transcriptionnel par une voie de signalisation de type MAPK impliquant les protéines Win/Wak (MAPKKK), Wis1 (MAPKK) et Sty1 (MAPK) (Gacto et al, 2003; Smith et al) (*figure n°81*). Nous pouvons proposer que la synthèse de glycérol induite par une élévation de l'osmolarité en augmentant la quantité de substrat disponible, ou en permettant la ré-oxydation du NADH, compenserait le défaut de respiration

induit par la mutation P300S. Dans ce sens, nous avons observé qu'une augmentation d'osmolarité compense également l'altération de la capacité de la souche Msp1P300S, porteuse de l'allèle *ade6-M210* à oxyder l'intermédiaire AIR quand elle est cultivée en milieu pauvre en adénine. Pour vérifier que le défaut de croissance de la souche Msp1300S à 37°C en milieu de fermentation et de respiration, et sa létalité en présence de galactose, sont bien liées à une activation de la voie de signalisation du stress osmotique et à la synthèse du glycérol, nous pourrions mesurer la quantité de glycérol intracellulaire produit (Aiba et al, 1995) et déterminer si l'inactivation de Gpd1p ou de Wis1p empêche la restauration de la croissance.

Dans le sens de notre hypothèse, des travaux récents ont montré qu'un stress osmotique provoquait chez *S. cerevisiae* une « activation » précoce des mitochondries (Pastor et al, 2009). En présence de concentrations élevées en sels (NaCl 1M et KCl 1,5M) une augmentation de la quantité de certaines protéines mitochondriales (citrate synthase, sous-unité 2 de la succinate deshydrogénase et sous-unité 6 de la cytochrome c oxydase) et de leur activité enzymatique (succinate deshydrogénase) a été observée. Cette activation de l'expression de gènes nucléaires codant des protéines mitochondriales est soumise à un contrôle transcriptionnel impliquant la voie de signalisation du stress osmotique MAPK Hog1 et la protéine kinase Snf1p impliquée dans l'adaptation à un switch métabolique fermentation/respiration. La contribution des mitochondries à la réponse à une augmentation d'osmolarité consisterait à réduire le niveau de ROS produit dans cette situation. La nécessité d'une mitochondrie fonctionnelle pour sa chaîne respiratoire pour compenser le défaut de croissance ou la létalité du mutant P300S de Msp1 en présence de sorbitol est en accord avec l'incapacité de ce sucre à restaurer la létalité induite par le galactose et l'éthanol glycérol du mutant respiratoire $\Delta atp1$.

Alors qu'une élévation de l'osmolarité est létale pour les mutants de la voie de signalisation du stress osmotique (Wis1p Sty1p Atf1p) ou leurs cibles (Gpd1p), un effet protecteur a été décrit pour une souche de levure *S. pombe* mutée pour les gènes *ptc1*⁺ et *ptc3*⁺ codant différentes isoformes de la phosphatase PP2A (Shiozaki & Russell, 1995). Une souche délétée pour les deux gènes est incapable de croître à 36°C et l'addition de sorbitol (1,2M), de maltose (0.5M), de galactose (1M) ou de KCl (0.5M) supprime ce phénotype. Le double mutant présente des défauts de morphologie visualisables dès 30°C (ie les cellules apparaissent déformées et élargies) qui s'intensifient à 36°C provoquant la lyse des cellules. Ces défauts de morphologie sont supprimés par l'addition de sorbitol et la délétion du gène *wis1*⁺. La perte



Vivancos 2006 Mol Genet Genomics

Figure n°81 : Voie de la MAP Kinase Sty1 chez la levure à fission *S. pombe*.

Les facteurs de transcription Atf1p et Pcr1p, la MAP kinase Sty1p, la MAPK kinase Wis1p, les MAPK kinases Wak1p et Win1p, le régulateur de réponse Mcs4p, la phosphotransmetteur Spy1p et les histidines kinases Mak1p, 2 et 3 compose la voie de signalisation MAP Kinase Sty1 activée en condition de stress. Les phosphatases Pyp1p et Pyp2p inactivent la kinase Sty1p par la déphosphorylation.

des gènes *ptc1*⁺ et *ptc3*⁺ provoquerait donc une hyperactivation de la voie de signalisation au stress osmotique, conduisant à une augmentation de l'osmolarité intra-cellulaire qui serait alors compensée par une augmentation de l'osmolarité du milieu de culture. Les phosphatases PP2A seraient donc impliquées dans la signalisation du stress osmotique et possèderaient des effets antagonistes à ceux de la MAPK. Des défauts de morphologie et une tendance accrue à lyser à haute température; tous deux supprimés par la présence d'un osmostabilisateur, ont également été observés dans des mutants de la levure *S. pombe* déficients pour la synthèse des glycanes constituant la paroi. La souche de levure mutée pour le gène *msp1*⁺ (Msp1P300S) présente une morphologie tout à fait normale à température permissive, et aucune différence n'a été notée entre cette souche et une souche présentant un gène *msp1*⁺ sauvage (WT, Msp1WT) à température restrictive. Néanmoins, il serait intéressant de déterminer si la mutation de la souche Msp1P300S provoque une élévation de l'osmolarité intra-cellulaire ou des défauts de composition de sa paroi. Pour cela, la quantité de glycérol intra-cellulaire (Aiba et al, 1995) et la sensibilité de la souche à une digestion par la glucanase (Shiozaki & Russell, 1995) pourraient être mesurées.

Contrairement à *S. cerevisiae* qui possède une grande variété de voies de signalisation pour percevoir et s'adapter aux changements d'environnements extra-cellulaires, *S. pombe* répond aux différents stress en utilisant une voie commune, la voie MAPK Sty1, homologue aux voies Junk et p38 des eucaryotes supérieurs (*figure n°81*). Néanmoins, tous les éléments de cette voie de signalisation n'opèrent pas dans tous les cas et des facteurs de transcription différents sont activés en réponse à différents stress (Gacto et al, 2003; Smith et al). Par exemple, lors de la signalisation d'un stress osmotique, la phosphorylation de Wis1p constitue un élément clé, alors que la signalisation d'un stress thermique met en jeu une inhibition de la déphosphorylation de Sty1p par les phosphatases Pyp1p et Pyp2p et puis Ptc1p et Ptc3p (Nguyen & Shiozaki, 1999). Afin de déterminer si le défaut de croissance, ou la létalité, de la souche Msp1P300S à température restrictive ne proviendrait pas d'un problème dans la signalisation du stress thermique, nous avons vérifié la sensibilité de la souche à un choc de thermique. Aucune différence de viabilité n'a été observée, après incubation à 48°C, entre la souche mutée et les souches sauvages pour le gène *msp1*⁺. Néanmoins il serait intéressant de caractériser l'état d'activation des différents protagonistes de la voie MAPK en mesurant leur expression et leur état de phosphorylation.

La voie MAPK Sty1p est également impliquée dans la réponse au stress oxydatif. La réponse au stress oxydatif chez *S. pombe* est complexe (Herrero et al, 2008; Vivancos et al, 2006) (*figure n°81*). En effet, elle est dose dépendante et implique deux mécanismes différents.

Les levures *S. pombe* exposées à de faibles niveaux d' H_2O_2 (0,2mM) tendent à mettre en place une réponse adaptative qui requiert le facteur de transcription, Pap1p, alors qu'à de haut niveau de stress oxydant (1mM) la voie *sty1* est activée. Nous avons mesuré la sensibilité de la souche Msp1P300S à l'exposition à des doses croissantes d' H_2O_2 . À une concentration de 1,5mM induisant une réponse aigue *Atf1* dépendante la souche mutée pour le gène *msp1*⁺ présente une viabilité réduite par rapport aux souches porteuses du gène *msp1*⁺ sauvage. Cette sensibilité à un stress oxydant élevé, qui pourra être confirmée en utilisant d'autres types de stress oxydants, est reversée par l'addition d'un anti-oxydant, la NAC. Des études menées chez *S. cerevisiae* ont montré que la plupart des mutants hypersensibles à l' H_2O_2 correspondent à des gènes impliqués dans la fonction mitochondriale (Thorpe et al, 2004). Chez *S. pombe*, des dysfonctions mitochondriales ont été associées à la mise en place d'un stress oxydatif intrinsèque (Zuin et al, 2008). L'hypersensibilité du mutant Msp1P300S à l' H_2O_2 pourrait donc être liée à un défaut de respiration entraînant une augmentation de la production de ROS endogène. L'addition de ROS exogènes deviendrait alors délétère pour la viabilité de la souche. Nous avons mesuré le taux de ROS présent dans la souche mutée pour *msp1*⁺ à température restrictive. Ce taux est légèrement mais significativement diminué (facteur 1,6) dans les premières heures de mise en culture à 37°C. Le défaut de respiration n'étant conséquent qu'à partir de 24h, il faudrait mesurer le taux de ROS à des temps plus tardifs de culture à 37°C. La diminution précoce des ROS pourrait être le reflet d'une diminution de la respiration de la souche, qui bien que non significative semble observée dans les premières heures de culture à 37°, à condition qu'elle soit associée à une faible efficacité de l'entrée des substrats dans la chaîne respiratoire. En effet, à quantité de substrat non limitante, une diminution de l'efficacité de la respiration provoque une augmentation de la quantité de ROS. Cependant, le taux de ROS intra-cellulaire étant la résultante de leur synthèse et de leur détoxification, nous devons à présent mesurer le niveau d'activation des défenses anti-oxydantes.

Lors des différents tests que nous avons réalisés pour mettre au point des conditions de létalité induite par la mutation P300S, seule la croissance en milieu galactose a rempli ce critère indispensable pour rechercher des suppresseurs multicopies. Notre stratégie de criblage a été validée en mettant en évidence la capacité de Msp1p exprimée de façon ectopique à compléter la létalité en milieu galactose induite par la mutation P300S à température restrictive. Néanmoins le nombre de clones obtenus (environ 100 clones/ μg d'ADN) semble

faible pour cribler une banque, mais il est probablement lié à la toxicité d'une production forte et continue de Msp1. Le nombre très faible de transformants obtenu pour le témoin négatif (vecteur codant la protéine bactérienne CAT), correspondant probablement à des révertants, pourrait cependant ne pas être à négliger dans une stratégie de criblage de banque. L'ensemble de ces observations, et la nature de la létalité sur milieu galactose demeurant inconnue, nous avons préféré différer notre recherche de partenaires génétiques de Msp1.

C. Spéculations

J'ai participé, au cours de ma thèse, à la caractérisation fonctionnelle de la dynamine Msp1p chez la levure *S. pombe*.

Nous nous sommes tout d'abord intéressés à son processus de maturation protéolytique, compte tenu de l'importance que revêt ce processus dans le contrôle de la fonction de la dynamine. En effet, les différentes isoformes de la protéine générées par clivages protéolytiques jouent des rôles essentiels et complémentaires aussi bien chez la levure que chez les mammifères (DeVay et al, 2009; Diot et al, 2009; Herlan et al, 2003; Song et al, 2007; Zick et al, 2009a). Nous avons montré, en caractérisant les protéases impliquées dans ce processus, que la maturation de la dynamine chez la levure à fission présente des similitudes et des divergences avec chacun de ces deux homologues, Mgm1p chez *S. cerevisiae* et OPA1 chez les mammifères, suggérant que ce processus s'est adapté dans ces différents organismes évolutionnairement éloignés afin de remplir différentes fonctions. Par exemple la dynamine n'est clivée efficacement par la protéase rhomboïde 1 que chez les levures, contrairement à l'i-AAA protéase qui clive la dynamine de mammifère mais n'est pas impliquée, de façon logique, chez les levures qui ne possèdent pas les sites de clivage. La m-AAA protéase influence, quant à elle, la stabilité de la dynamine chez *S. pombe* et les mammifères, mais est sans d'effet chez *S. cerevisiae*.

Des changements de rapports entre les différentes isoformes des trois dynamines ont été décrits dans un certain nombre de conditions physiologiques, suggérant que la régulation de leurs fonctions pouvait être contrôlée par les protéases impliquées dans les processus de génération de ces isoformes. Ainsi, il a été récemment montré chez les mammifères que la protéase OMA1 clive OPA1 en situation de perte du Δy et d'apoptose conduisant à une diminution de la forme longue de la dynamine et à une fragmentation des mitochondries (Cipolat et al, 2006; Duvezin-Caubet et al, 2007; Ehses et al, 2009; Griparic et al, 2007; Guillery et al, 2008; Head et al, 2009; Herlan et al, 2004; Herlan et al, 2003; Ishihara et al, 2006; Song et al, 2007). Chez les levures le réseau mitochondrial s'hyperfilamente quand elles sont cultivées en milieu respiratoire (Jakobs et al, 2003). Nous avons montré que ce processus s'accompagne d'une augmentation du rapport forme longue sur forme courte de Msp1p et allons tenter de déterminer si ceci est la conséquence d'un changement de clivage protéolytique de la dynamine. De même il serait intéressant de déterminer dans quelle mesure

la dynamine contrôle cette adaptation nutritionnelle du réseau mitochondrial et influence ainsi la stimulation de la respiration.

Nous avons montré que l'inactivation de la dynamine provoque une fragmentation des mitochondries et s'accompagne d'une diminution de la consommation d'O₂ des levures effective après 24h. Cette diminution pourrait être la conséquence d'une perturbation du fonctionnement de la chaîne respiratoire. Nous proposons également qu'une baisse, légère (inférieure à 20 %), de respiration soit effective dès les premières heures après inactivation de la dynamine mais que, compte tenu la variabilité de la respiration des levures à 37°C, nous n'avons pu mettre évidence de façon significative. Cette perturbation du fonctionnement de la chaîne respiratoire pourrait entraîner une augmentation de la production de ROS qui à son tour déclencherait une réponse anti-oxydante. Le taux de ROS intra-cellulaire serait donc dans un premier temps maîtrisé. A long terme, les défenses anti-oxydantes pourraient être dépassées, ce qui provoquerait une sensibilisation à un stress oxydatif exogène et une augmentation du taux de ROS induisant des dommages oxydatifs affectant la respiration. L'augmentation de l'osmolarité en activant les mitochondries, en agissant sur l'état redox ou en modifiant la composition lipidique des membranes pourrait contrer ce cycle vicieux (Clotet & Posas, 2007). Ce modèle qui demeure purement spéculatif pourra être vérifié en mesurant le fonctionnement des différents complexes respiratoires et la mise en place des défenses anti-oxydantes. Il serait également intéressant de déterminer l'influence d'une augmentation du glycérol en condition hyper-osmotique sur le taux de phosphatidylethanolamine et de cardiolipine des membranes mitochondriales qui influence la dynamique mitochondriale (Sesaki et al, 2006). Ce modèle, s'il se vérifie, pourrait revêtir un intérêt majeur dans le cadre de la compréhension de la pathogenèse de l'ADOA-1 provoquée par des mutations d'OPA1. De façon intéressante, il a récemment été montré dans des modèles invertébrés que des mutations d'OPA1 augmentaient le taux production de ROS ou la sensibilité à un stress oxydant et qu'un traitement anti-oxydant pouvait réverser certains des effets délétères provoqués par l'inactivation d'OPA1 (Landes et al, 2010).

D. Matériels et Méthodes

I. Méthodes spécifiques à *S. pombe*

Pour en savoir plus sur la levure *S. pombe*, vous pouvez consulter les sites web suivants :

<http://www-rcf.usc.edu/~forsburg/index.html>

http://www.sanger.ac.uk/Projects/S_pombe/

A. Maintien et croissance des souches

1. Milieux

Les levures *S. pombe* sont cultivées à 25 ou 30°C en milieux liquides sous agitation (200 rpm), ou sur des milieux solidifiés par l'addition d'agar (20 g/l).

Sans pression de sélection à exercer, les cellules sont cultivées en milieu riche :

YEA :

- extrait de levures	5 g/l
- glucose	30 g/l
- adénine	225 mg/l

Pour la croissance en condition respiratoire, les cellules sont cultivées en milieu riche :

YEPEA :

- extrait de levures	10 g/l
- bactopeptone	20 g/l
- glucose	1 g/l
- glycérol 50 %	60 ml/l
- éthanol	30 ml/l
- adénine	225 mg/l

YEPGA:

- extrait de levures	10 g/l
- bactopeptone	20 g/l
- glucose	1 g/l
- galactose	20 g/l
- adénine	225 mg/l

Si on désire sélectionner une souche vis-à-vis de la prototrophie, on la cultive en milieu minimum :

EMM (Bio 101- 4110-022)

- Potassium hydrogen phtalate	3 g/l
- Na ₂ PO ₄	2,2 g/l
- NH ₄ Cl	5 g/l
- Glucose	20 g/l
- Sels	2,1 g/l
- Vitamines	0,02g/l

en ajoutant ou non selon les cas :

- de l'adénine	225 mg/l
	ou 10 mg/l (milieu pauvre en adénine)
- de l'uracile	225 mg/l
- de la leucine	225 mg/l

Pour favoriser un métabolisme respiratoire un milieu minimum sans glucose sera utilisé.

EMM (Bio 101- 4110-022)

- Potassium hydrogen phtalate	3 g/l
- Na ₂ PO ₄	2,2 g/l
- NH ₄ Cl	5 g/l
- Sels	2,1 g/l
- Vitamines	0,02 g/l

complémenté par :

- glucose	1 g/l
- galactose	20 g/l
- glycérol 50 %	60 ml/l
- éthanol	30 ml/l

- et des suppléments nécessaires (adénine, leucine, uracile)

Pour permettre la sporulation de levures diploïdes, on utilise un milieu pauvre en azote à base d'extrait de Malt (30 g/l) à pH5,5.

2. Conservation et culture des souches

La conservation des souches de levures se fait à -80°C, en présence de 25 % glycérol dans un cryotube. Les levures après décongélation sont régulièrement repiquées sur un milieu nutritif gélosé.

Pour les expériences, les levures sont cultivées en milieu liquide en phase exponentielle de croissance à une densité voisine de 1.10^7 cellules/ml. La densité est déterminée par comptage dans une cellule de Neubauer et l'ensemencement est calculé de la manière suivante :

$$\text{Volume à prélever} = \frac{\text{densité cellulaire finale} \times \text{Volume de culture finale}}{\text{densité cellulaire initiale} \times 2^{\text{nombre de génération pendant le temps de culture}}}$$

3. Test en goutte

Les levures cultivées 24 heures dans milieu en liquide sont diluées à des densités de 1.10^6 , 2.10^5 , 4.10^4 , 8.10^3 , $1,6.10^3$ cellules/ml puis déposées sur des milieux nutritifs gélosés sous forme de gouttes de 4 µl et incubées à différentes températures pendant 10 jours.

B. Evaluation de la respiration mitochondriale

La respiration mitochondriale est mesurée grâce à l'oxygraphe 2K haute résolution de Oroboros Instruments (Innsbrück, Autriche). Elle est effectuée sur un nombre de 3.10^6 cellules dans 2 ml de milieu de culture à l'intérieur d'une chambre d'analyse munie d'une électrode à oxygène. L'état basal, correspondant à la respiration non stimulée des levures, a été mesuré à 30°C ou à 37°C. Les agents pharmacologiques suivants ont été utilisés pour moduler l'activité de la chaîne respiratoire et vérifier la nature mitochondriale de la respiration : antimycine A, inhibiteur du complexe III (0.002, 0.02 et 0.2 µM final) et CCCP (carbonylcyanide-3-chlorophenylhydrazone) un agent découplant (0.002, 0.02, 0.2 et 2 µM final). La quantité totale (nmol O₂/ml) et la vitesse de consommation de l'oxygène par les levures (pmol O₂/s*milions cellules) sont données par le logiciel d'utilisation de l'appareil, DataXLab.

C. Mesure du taux de ROS

Le taux de ROS est mesuré à l'aide de la sonde, 2',7' -dichlorofluorescéine diacetate (H2DCF-DA, Molecular Probes). Cette molécule, une fois clivée par les estérases cellulaires, réagit avec l'H₂O₂ en émettant un signal fluorescent.

- Cultiver 10 ml des cellules à une densité de 1. 10⁷ cellules/ml dans le milieu approprié
- Ajouter 10 µg/ml final de sonde dans le milieu et incuber pendant 80 min à l'abri de la lumière dans les conditions de culture (37°C ou 25°C)
- Centrifuger à 2000 g, 5 min à 4°C
- Reprendre le culot par un volume de PBS 1X
- Centrifuger à 2000 g, 5min à 4°C
- Transvaser le culot repris par 1 à 2 ml de PBS 1X dans un eppendorf
- Centrifuger à 2000 g, 5 min à 4°C
- Éliminer le surnageant, et congeler le culot dans l'azote liquide (conservation possible à -80°C)
- Ajouter au culot décongelé 600 µl d'eau et un volume de 300 µl billes froides (SIGMA diamètre 425 µm-600 µm, conservées à -20°C)
- La lyse s'effectue mécaniquement grâce à un agitateur automatique (FastPrep FP120, BIO 101) placé à 4°C
- Agiter 6x 30sec
- Observer au microscope à contraste de phase pour vérifier la lyse cellulaire
- Chauffer une aiguille et percer le fond du tube, déposer immédiatement dans un tube neuf
- Centrifuger les deux tubes l'un sur l'autre jusqu'à 6500 rpm puis arrêter la centrifugeuse
- Refaire 1 fois cette centrifugation brève
- Jeter le tube contenant des billes et garder l'extrait
- Centrifuger à 14000 g, 10min à 4°C
- Éliminer le culot et conserver le surnageant
- Déposer 120 µl d'extrait sur une microplaque opaque et effectuer le dosage des ROS en utilisant un fluorimètre (Wallac victor λ_{ex} de 490 nm, λ_{em} de 535 nm)
- Réaliser un dosage protéique des extraits sur des échantillons en triplicate en utilisant le Kit DC Protein Assay (Biorad) en utilisant un lecteur de plaque.

D. Transformation

1. Vecteurs utilisés

Les vecteurs d'expression pREP sont les plus utilisés chez *S. pombe*. Ils peuvent être amplifiés chez la bactérie *E. Coli* grâce à une origine de répllication bactérienne et un marqueur de sélection procaryote : le gène de résistance à l'ampicilline. Ils possèdent une séquence de répllication autonome (ars) et un gène de sélection, soit *LEU2* pour pREP1, 41 ou 81, soit *ura4⁺* pour pREP2, 42 et 82, permettant respectivement, la complémentation de cellules auxotrophes pour la leucine ou l'uracile. Le gène d'intérêt dans les vecteurs d'expression pREP est placé en aval du promoteur nmt1 (no message in thiamine) (Maundrell, 1993) qui est réprimé en présence de 4 μ M de thiamine dans le milieu de culture. Après 3 lavages à l'eau, la culture des levures en milieu dépourvu de thiamine permet l'expression du promoteur. On considère qu'il faut attendre environ 16 heures pour dé-réprimer le promoteur à 28°C (Maundrell, 1993).

2. Transformation par électroporation

- Cultiver les cellules à une densité de $1 \cdot 10^7$ cellules/ml dans le milieu approprié (compter 25 ml de culture pour une transformation)
- Centrifuger à 800 g, 5 min à 20°C
- Reprendre le culot par un volume d'eau stérile glacé
- Centrifuger à 800 g, 5 min à 4°C
- Reprendre le culot par un volume de Sorbitol 1 M stérile glacé
- Centrifuger à 800 g, 5 min à 4°C
- Remettre les cellules en suspension dans du Sorbitol 1 M stérile glacé à une densité de $5 \cdot 10^7$ cellules/ml (à cette densité, la suspension cellulaire est pâteuse).
- Ajouter 1 μ g d'ADN à 50 μ l de cette suspension cellulaire dans un tube eppendorf à 4°C
- Transférer le mélange dans une cuve à électroporation froide (4°C)
- Appliquer un choc électrique grâce à l'électroporateur Gene Pulseur™ (BIORAD) réglé sur 1,5kV, 200 Ω , 25 μ F
- Ajouter immédiatement après le choc 900 μ l de Sorbitol 1 M stérile glacé
- Centrifuger à 800 g, 5 min à 4°C
- Remettre le culot en suspension dans 100 μ l de milieu et étaler rapidement les cellules sur milieu sélectif

3. Recombinaison homologue

- Il faut prévoir 20 ml de culture cellulaire à 1.10^7 cellules/ml pour une transformation
- Centrifuger à 800 g, 5 min à 4°C
- Laver le culot de levures par 20 ml d'eau stérile froide
- Reprendre le culot par 0,5 ml d'eau stérile froide et transférer dans un tube eppendorf
- Laver par 0,5 ml de LiAc/TE 1X
- Reprendre le culot dans du LiAc/TE 1X pour être à une densité cellulaire de 2.10^9 cellules/ml (ajouter donc le volume nécessaire pour obtenir un volume final de 100 µl)
- Ajouter 1 µl d'ADN de sperme de saumon (20 mg/ml) et 10 µl d'ADN contenant la cassette de recombinaison à transformer
- Incuber 10 min à température ambiante
- Ajouter 260 µl de 40 %PEG/LiAc/TE (préparé au moment) et reprendre au pipetman
- Incuber 45 min à 30°C en agitant de temps en temps
- Ajouter 43 µl de DMSO
- Incuber 5 min à 42°C (choc thermique)
- Laver par 1 ml d'eau stérile
- Reprendre dans 500 µl d'eau stérile
- Etaler sur milieu riche
- Incuber les boîtes environ 18h à 30°C
- Répliquer sur le milieu riche sélectif, contenant du G418 (100 mg/l), de l'hygromycine (100 mg/l) ou nourséothricine (50 mg/l) pour une sélection KanaR, HygroR ou NatR respectivement
- Incuber les boîtes de 2 à 3 jours à 30°C à l'abri de la lumière

LiAc/TE 1X: réalisé en mélangeant les solutions suivantes :

10X LiAc : 1 M acétate de lithium, ajuster à pH7,5 avec de l'acide acétique

10X TE : 0,1 M Tris-HCl, 0,01 M EDTA, pH7,5

40 % PEG/LiAc/TE : soit dissoudre 8 g de PEG 4000 dans 2 ml de 10X LiAc, 2 ml de 10X TE et 9,25 ml d' H₂O stérile : filtrer stérilement. Soit, à partir des solutions 40 % PEG/LiAc/TE = 8 ml PEG 50 % + 1 ml LiAc 10X + 1 ml TE 10X

E. PCR sur colonies

Mix réactionnel :

Note : chaque réaction se fait dans un volume de 50 μ l.

	cc stock	cc finale	volume/réaction
Tampon PCR	5 X	1 X	10 μ l
Taq polymérase	5 U/ μ l	1,25 U	0,25 μ l
MgCl ₂	25 mM	2,5 mM	5 μ l
dNTPs	10 mM	0,1 mM	0,5 μ l
primer 1	100 μ M	0,5 μ M	0,25 μ l
primer 2	100 μ M	0,5 μ M	0,25 μ l
eau	qsp 25 μ l		8,75 μ l

- Distribuer 25 μ l d'eau stérile par tube 0,5 ml (PCR)
- Ajouter une pointe de cône de cellules
- Distribuer 25 μ l de mix par tube 0,5 ml (PCR)
- Mélanger à l'aide de la pipette
- Déposer les tubes dans l'appareil PCR
- Mise en route du programme (Appareil PCR, PERKIN ELMER)
- Vérifier l'amplification sur gel d'agarose

PROGRAMME #104

Dénaturation	3 min à 94 °C	} 35 cycles
Dénaturation	1 min à 94°C	
Hybridation	30 sec à 55 °C	
Elongation	1 min à 72°C	
Elongation	5 min à 72°C	

F. Observations en microscopie à fluorescence

Les levures sont fixées directement dans leur milieu de culture en présence de 3,7 % de formaldéhyde pendant 30 min. Les cellules sont lavées par du PBS 1X et conservées à 4°C dans du PBS 1X, 0,02 % d'Azide de sodium.

Une goutte de suspension cellulaire est déposée sur une lamelle de verre et étalée à la pipette pasteur. Une fois la suspension cellulaire sèche, 2 µl de Mowiol avec ou sans DAPI (1 µg/ml) sont déposés sur les cellules et l'ensemble est recouvert d'une lamelle.

II. Techniques relative à l'ADN

A. Préparation d'ADN plasmidique

Les Kits Midi ou MaxiPrep *NucleoBond*, commercialisés par Macherey- Nagel ont été utilisés selon les recommandations du fournisseur.

B. Digestion enzymatique

Les plasmides extraits ont été digérés selon le protocole donné par le fabricant (*New England BioLabs*). Les profils de digestion ont été analysés sur gel d'agarose 0.8 ou 1.5 % et révélés sous UV après coloration au BEt.

C. Extraction d'ADN génomique chez *S.pombe*

- La culture de cellules est amenée jusqu'en phase stationnaire
- Prélever de 5 (à 10 ml) de culture
- Centrifuger à 800 g, 5 min à 4°C

- Ajouter 1 ml de la solution SP1 (enzymes lytiques (SIGMA L1412) à 1 mg/ml et Zymolyase-20T (MP Biomedicals 32092) à 1 mg/ml) et incuber environ 1 heure à 37°C pour permettre la lyse de la paroi par l'enzyme.
- Observer au microscope, en présence de SDS, la libération des cellules de la paroi qui les entoure. Arrêter la lyse quand de nombreuses parois vides et de nombreux débris cellulaires sont visualisés.
- Centrifuger à 5000 g pendant 10 min
- Reprendre le culot dans 500 µl de TE (50 mM Tris-HCl, pH8.0, 20 mM EDTA)
- Ajouter 50 µl SDS 10 %
- Incuber 20 min à 65°C
- Ajouter 200 µl d'Acétate de potassium 5 M
- Incuber 30 min dans la glace
- Centrifuger à 5000 rpm pendant 15 min à 4°C
- Récupérer le surnageant en faisant bien attention de ne pas pipeter le précipité blanc
- Ajouter 200 µl de phénol et 200 µl de chloroforme et vortexer au moins 1 min
- Centrifuger à 12000 g pendant 5 min à 4°C
- Récupérer la phase supérieure et ajouter 200 µl de Chloroforme
- Centrifugation à 12000 g pendant 5 min à 4°C
- Récupérer la phase supérieure et ajouter 1 ml d'éthanol 100 %
- Centrifuger à 14000 rpm pendant 5 min à 4°C
- Aspirer le surnageant et laisser sécher le culot
- Reprendre le culot dans 300 µl TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA) pendant la nuit à température ambiante
- Ajouter 50 µl de RNAase A à une concentration de 50 µg/ml
- Incuber 1 heure à 37°C
- Ajouter 500 µl d'isopropanol
- Centrifuger à 14000 rpm pendant 10 min à 4°C
- Garder le culot, y ajouter 1ml d'éthanol 70 % et vortexer
- Centrifuger à 14000 rpm pendant 10 min à 4°C
- Aspirer le surnageant et laisser sécher le culot
- Reprendre le culot par 50 µl de TE (10 mM Tris-HCl, 1 mM EDTA)

D. Southern Blot

1. Digestion de l'ADN génomique et préparation de la sonde

- Digérer 40 µg d'ADN total extrait de *S. pombe* dans un volume final de 50 µl en présence de 1 à 2 unités d'enzyme par µg d'ADN selon l'efficacité de l'enzyme. Incuber 3 heures à la température appropriée.
- Digérer le vecteur (qui sert à sonde) par l'enzyme et faire migrer le produit de digestion sur un gel d'agarose et purifier le fragment d'intérêt avec le Kit Nucleospin Extract II (Macherey-Nalgen).

2. Séparation des fragments d'ADN sur gel d'agarose et transfert sur filtre

Les fragments de restriction issus de la digestion de l'ADN génomique sont séparés sur un gel de 0,8 % d'agarose dans du tampon TAE 1X

- Déposer 1 à 2 µg de marqueurs de taille commerciaux (phage lambda digéré HindIII, Bio-Rad)
- Déposer les échantillons d'ADN après ajout de 10 µl de tampon de charge 6X dans 50 µl de digestion d'ADN de *S. pombe*.
- La migration est réalisée toute la nuit à température ambiante à ampérage constant (30mA) avec re-circularisation du tampon
- Le gel est incubé dans une solution contenant du BEt. L'ADN est observé sous UV et les marqueurs sont repérés à l'encre de chine.

3. Transfert des fragments d'ADN sur membrane de nylon

Dénaturer l'ADN en trempant les gels dans du NaOH 0,4 M pendant 45 à 60 min. L'ADN sera transféré passivement sur une membrane pendant la nuit. Pour cela :

- Prendre une cuve, y placer un support surélevé qui portera le montage
- Mettre une solution NaOH 0,4 M dans le bac
- Mettre sur le support le pont = un wathman fin trempé dans du NaOH 0,4 M, qui va dépasser du support pour tremper dans le bac dans le sens de la longueur ou dans la largeur
- Chasser les bulles en faisant rouler une pipette et remettre du tampon NaOH 0,4 M dessus

- Placer le gel d'agarose sur le wathman, la face perforée des puits contre le wathman et la face plane sur le dessus
- Chasser l'air des puits avec une seringue remplie de NaOH 0,4 M
- Chasser les bulles en faisant rouler une pipette et remettre du tampon NaOH 0,4 M dessus
- Déposer la membrane de Nylon (Hybond N+, AMERSHAM) préalablement marquée et trempée dans le tampon NaOH 0,4 M
- Chasser les bulles en faisant rouler une pipette et remettre du tampon NaOH 0,4 M dessus
- Déposer un wathman fin préalablement trempé dans le tampon NaOH 0,4 M puis égoutté.
- Chasser les bulles en faisant rouler une pipette
- Ajouter 7 à 8 buvards épais ou wathman très épais secs !!! dessus
- Déposer une plaque de verre pour aplatir le tout et un poids léger une bouteille de 100 ml mi-remplie (pas plus !!)
- Laisser diffuser pendant une nuit à température ambiante
- Le lendemain défaire le montage et le retourner de manière à avoir le gel dessus
- Perforer le gel et la membrane au niveau des marques laissées par l'encre de chine pour repérer les marqueurs et les puits.
- Rincer 2X la membrane dans du SSC 3X
- Sécher la membrane entre deux papiers absorbants et à l'air libre (elle peut être conservée sèche).

4. Marquage des sondes

- Dénaturer l'ADN (25 à 50 ng dans 45 µl) en chauffant 5-10 min à 95°C
- Mettre dans la glace ~5 min
- Centrifuger brièvement pour descendre la condensation
- Prendre 1 tube « Ready to Go » (Kit AMERSHAM) par sonde : Ajouter 45 µl d'ADN et 5 µl (α -³²P) dCTP.
- Bien mélanger et incuber 30 min à 37°C
- Prendre 1 colonne Séphadex G-25 ou G-50 et bien mélanger en inversant plusieurs fois
- Oter (1) le bouchon du haut de la colonne
(2) le bouchon du bas de la colonne
- Laisser le tampon sortir de la colonne par gravité
- Placer la colonne dans un tube de collection
- Centrifuger 2 min à 1100 g dans un rotor swinging

- Déposer délicatement la sonde marquée au centre des billes
- Placer la colonne dans un tube de collection neuf
- Centrifuger 4 min à 1100 g dans un rotor swinging
- Récupérer (~50 µl) de sonde et compter la radioactivité de 1 aliquot (pour indication 1 µl donne entre 0.2 et 2 x10⁶ cpm)

5. Hybridation

- Préparer le tampon d'hybridation (Tampon Church): pour 100 ml ajouter dans l'ordre :

H ₂ O :	4,8 ml
1 % BSA :	10 ml de BSA 10 % fraction IV
7 % SDS :	35 ml de SDS 20 %
0,5 M Phosphate Buffer pH6,8 :	24,5 ml de Na ₂ HPO ₄ 1 M 25,5 ml de NaH ₂ PO ₄ 1 M
1 mM EDTA :	200 ml de EDTA 0,5 M

- Pré-hybrider les filtres 30 min à 65 °C et placer le reste du tampon à 65 °C

- Dénaturer les sondes avant l'hybridation

- Mélanger dans l'ordre :

ADN saumon 2mg/ml	500 µl
Sonde (0.5 à 1x10 ⁶ cpm/ml)	50 µl
NaOH 1 M	500 µl (vortexer)
Tris-HCl 2 M pH7,5	140 µl (mélanger)
HCl 1 M	500 µl (mélanger)

- Ajouter la préparation au tampon d'hybridation

- Hybrider sur la nuit à 65°C sous agitation

- Laver 3 fois 20 min avec 2X SSC 0,1 % SDS à température ambiante

- Laver 3 fois 20 min avec 0,1X SSC 0,05 % SDS à 60°C

- Exposer les filtres ainsi lavés plusieurs heures (ou sur la nuit) avant révélation. Il est nécessaire de conserver les filtres dans un film plastique si on veut les réutiliser car il ne faut pas qu'ils sèchent.

III. Techniques relatives aux protéines

A. Lyse cellulaire

- Récupérer 50 ml de cellules à $1 \cdot 10^7$ cellules/ml en les centrifugeant à 1600 g pendant 5min
- Reprendre le culot par 1 à 2 ml de LB et transvaser dans un tube eppendorf
- Centrifuger à 2000 g 5 min à 4°C
- Eliminer le surnageant, et congeler le culot dans l'azote liquide (conservation possible à -80°C)
- Ajouter au culot décongelé 200 µl de LB+ et un volume de 500 µl billes froides (SIGMA diamètre 425 µm-600 µm, conservées à -20°C)
- La lyse s'effectue mécaniquement grâce à un agitateur FastPrep (FP120 Bio 101) placé à 4°C
- Agiter 5x30sec (remettre les tubes dans la glace au bout de 3X pour maintenir la température des échantillons à 4°C)
- Observer au microscope pour vérifier la lyse cellulaire
- Chauffer une aiguille et percer le fond du tube, déposer immédiatement dans un tube neuf
- Centrifuger les deux tubes l'un sur l'autre jusqu'à 6500rpm puis arrêter la centrifugeuse
- Refaire 1 fois cette centrifugation brève
- Jeter le tube contenant les billes et garder celui contenant l'extrait
- Centrifuger à 14000 g, 10min à 4°C (au moins 2 fois)
- Récupérer l'extrait protéique clarifié des débris cellulaires et effectuer un dosage Bradford

LB (lysis buffer) :

50 mM Tris HCL pH 7,4
250 mM NaCl
5 mM EDTA
5 mM EGTA
1 mM DTT
0,1 % Triton

LB+ idem LB plus

1 % Triton
1 % NP40
0,1 % SDS
1 % DOC
inhibiteurs de protéases (Boehringer)
Pepstatine 1 µg/ml

B. Electrophorèse et immunodétection

Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel polyacrylamide, en présence de SDS, et transférées sur membrane de Nitrocellulose. Après saturation dans du TBS 1X, 0,2 % Tween, 5 % Lait (TBST-Lait) pendant 1 heure, les membranes sont incubées avec les anticorps primaires dilués dans du TBST-Lait, sur la nuit, à 4°C, sous agitation. Après 3 lavages TBST et une incubation d'une heure à température ambiante avec des anticorps secondaires couplés HRP dilués dans TBST-Lait, la révélation est réalisée par chimioluminescence (ECL, PerkinElmer Life Sciences).

Quand nécessaire, une analyse densitométrique des signaux obtenus a été réalisée à l'aide d'Image J (National Institutes of Health; <http://rsbweb.nih.gov/ij/>).

IV. Liste des anticorps utilisés

N° LABO	NOM	FOURNISSEUR	REFERENCE	DILUTION WB
#2	mouse mAb anti-Hsp60 (LK2)	SIGMA	H-3524	1/1000
#7	rabbit anti-Opa1 Δ260Nter-Δ58Cter (SE3512)	EUROGENTEC		1/500
#29	mouse anti-HA (12CA5)	ROCHE	1 666 606	1/10000
#31	mouse anti-Actine	CHEMICON	MAB1501	1/10000
#40	rabbit anti-Msp1 (SE5704)	EUROGENTEC		1/500
	anti-Tat (anti-tubulin)	Don de P. Nurse		1/1000
secondaire	rabbit IgG (HRP)	ABCAM	ab6721	1/10000
secondaire	mouse IgG (HRP)	ABCAM	ab6789	1/10000

V. Liste des souches *S. pombe* utilisées

N° Souche	Mating	Génotype
MP73	h+	<i>leu1-32 anc1::leu2</i> Don de V. Trézeguet
MP79	h+	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-216 his3 Δatp3::kanaR</i> Don de N. Bonnefoy
MP88	??	<i>Δatp2</i> Don de N. Bonnefoy
MP95	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 Δatf1::ura4⁺</i>
MP123	h+	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210 msp1P300S:ura4⁺</i>
MP124	h+	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210 msp1P300S:ura4⁺</i>
MP125	h-	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210 msp1P300S:ura4⁺</i>
MP127	h+	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210 msp1P300S:ura4⁺</i>
MP133	h-	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210 ΔParaplegin::KanaR</i>
MP134	h-	<i>leu1-32 ura4D18 ade6-210 ΔParaplegin::KanaR</i>
MP164	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 msp1::msp1 wt ura4⁺</i>
MP165	h+	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 msp1::msp1 wt ura4⁺</i>
MP170	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh1::KanR pSLF102 CoxIV GFP</i>
MP171	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh1::KanR pSLF102 CoxIV GFP</i>
MP180	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 ΔParaplegine::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant A</i>
MP181	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 ΔParaplegine::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant O</i>
MP182	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 ΔParaplegine::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant B</i>
MP183	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 ΔParaplegine::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant C</i>
MP184	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 ΔParaplegine::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant AB</i>
MP185	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 ΔParaplegine::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant BC</i>
MP186	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 ΔParaplegine::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant A</i>
MP187	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 ΔParaplegine::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant ABC</i>

MP188	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 ΔParaplegine::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant A</i>
MP189	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 ΔParaplegine::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant O</i>
MP190	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 ΔParaplegine::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant B</i>
MP191	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 ΔParaplegine::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant C</i>
MP192	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 ΔParaplegine::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant AB</i>
MP193	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 ΔParaplegine::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant BC</i>
MP194	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 ΔParaplegine::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant AC</i>
MP195	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 ΔParaplegine::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant ABC</i>
MP196	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh1::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant A</i>
MP197	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh1::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant O</i>
MP198	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh1::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant B</i>
MP199	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh1::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant C</i>
MP200	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh1::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant AB</i>
MP201	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh1::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant BC</i>
MP202	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh1::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant AC</i>
MP203	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh1::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant ABC</i>
MP204	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh1::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant A</i>
MP205	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh1::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant O</i>
MP206	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh1::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant B</i>

MP207	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh1::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant C</i>
MP208	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh1::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant AB</i>
MP209	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh1::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant BC</i>
MP210	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh1::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant AC</i>
MP211	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh1::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant ABC</i>
MP233	h+	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δdnm1::KanaR Δyme1::hygroR</i>
MP234	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δyme1::hygroR</i>
MP235	??	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δyme1::hygroR</i>
MP238	h+	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh2 :: NatR</i>
MP239	h+	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh2 :: NatR</i>
MP248	??	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh2::NatR Δrh1::KanaR</i>
MP249	??	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δrh2::NatR Δrh1::KanaR</i>
MP265	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 ΔParaplegine::KanaR</i> <i>pREP41 Msp1HA</i>
MP266	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 ΔParaplegine::KanaR</i> <i>pREP41 Msp1HA</i>
MP295	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 msp1-P300S::ura4⁺</i> <i>arg11⁺::mCherry-NatR</i>
MP297	h+	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 msp1⁺::ura4⁺</i> <i>arg11⁺::mCherry-NatR</i>
MP299	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 msp1-P300S::ura4⁺</i> <i>arg11⁺::mCherry-NatR</i>
MP301	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 msp1⁺::ura4⁺</i> <i>arg11⁺::mCherry-NatR</i>
MP315	??	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6 ΔParaplegine::KanaaR</i> <i>arg11⁺::mCherry-NatR</i>
MP317	??	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6 Δrh1::KanaR</i> <i>arg11⁺::mCherry-NatR</i>
MP333	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6 Δyme1::HygroR</i> <i>arg11⁺::mCherry-NatR</i>
MP335	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6 Δyme1::HygroR</i>

		<i>pRep41 OPA1 variant A</i>
MP336	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6 Δyme1::HygroR</i> <i>pRep41 OPA1 variant O</i>
MP337	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6 Δyme1::HygroR</i> <i>pRep41 OPA1 variant B</i>
MP338	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6 Δyme1::HygroR</i> <i>pRep41 OPA1 variant C</i>
MP339	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6 Δyme1::HygroR</i> <i>pRep41 OPA1 variant AB</i>
MP340	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6 Δyme1::HygroR</i> <i>pRep41 OPA1 variant BC</i>
MP341	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6 Δyme1::HygroR</i> <i>pRep41 OPA1 variant AC</i>
MP342	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6 Δyme1::HygroR</i> <i>pRep41 OPA1 variant ABC</i>
MP368	h+	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δoma1::HygroR</i> <i>arg11⁺::mCherry-NatR</i>
MP369	h+	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δoma1::HygroR</i> <i>arg11⁺::mCherry-NatR</i>
MP370	h+	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δoma1::HygroR</i> <i>arg11⁺::mCherry-NatR</i>
MP371	h+	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 Δoma1::HygroR</i> <i>arg11⁺::mCherry-NatR</i>
MP372	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 ΔParaplegine::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant AC</i>
MP374		<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 ΔParaplegine::KanaR</i> <i>pRep41 OPA1 variant ABC</i>
MP376	h+	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 msp1-P300S::ura4⁺</i> <i>pAL-KS</i>
MP378	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 msp1-P300S::ura4⁺</i> <i>pAL-KS</i>
MP381	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 msp1⁺::ura4⁺</i> <i>pAL-KS</i>
MP382	h+	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 msp1⁺::ura4⁺</i> <i>pAL-KS</i>
MP385	h+	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 msp1-P300S::ura4⁺</i> <i>pAL-KS GAL (LELOIR) Don de N. Bonnefoy</i>

MP387	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 msp1-P300S::ura4⁺</i> <i>pAL-KS GAL (LELOIR)</i> Don de N. Bonnefoy
MP389	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 msp1⁺::ura4⁺</i> <i>pAL-KS GAL (LELOIR)</i> Don de N. Bonnefoy
MP391	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210 msp1⁺::ura4⁺</i> <i>pAL-KS GAL (LELOIR)</i> Don de N. Bonnefoy
MP392	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 Δatp1::KanaR</i> <i>pAL-KS pREP42X</i>
MP394	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 Δatp1::KanaR</i> <i>pAL-KS GAL (LELOIR)</i> Don de N. Bonnefoy
SP813	h+	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210</i>
SP972	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210</i>
T611	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 ade6-210</i>
T713	h-	<i>leu1-32 ura4-D18 Δatp1::kanaR</i> Don de N. Bonnefoy

E. Bibliographie

- Aiba H, Yamada H, Ohmiya R, Mizuno T (1995) The osmo-inducible *gpd1+* gene is a target of the signaling pathway involving *Wis1* MAP-kinase kinase in fission yeast. *FEBS Lett* 376(3): 199-201
- Akepati VR, Muller EC, Otto A, Strauss HM, Portwich M, Alexander C (2008) Characterization of OPA1 isoforms isolated from mouse tissues. *J Neurochem* 106(1): 372-383
- Alavi MV, Bette S, Schimpf S, Schuettauf F, Schraermeyer U, Wehrl HF, Ruttiger L, Beck SC, Tonagel F, Pichler BJ, Knipper M, Peters T, Laufs J, Wissinger B (2007) A splice site mutation in the murine *Opa1* gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. *Brain* 130(Pt 4): 1029-1042
- Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, Rodriguez M, Kellner U, Leo-Kottler B, Auburger G, Bhattacharya SS, Wissinger B (2000) OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 26(2): 211-215
- Alirol E, James D, Huber D, Marchetto A, Vergani L, Martinou JC, Scorrano L (2006) The mitochondrial fission protein *hFis1* requires the endoplasmic reticulum gateway to induce apoptosis. *Mol Biol Cell* 17(11): 4593-4605
- Amati-Bonneau P, Valentino ML, Reynier P, Gallardo ME, Bornstein B, Boissiere A, Campos Y, Rivera H, de la Aleja JG, Carroccia R, Iommarini L, Labauge P, Figarella-Branger D, Marcorelles P, Furby A, Beauvais K, Letournel F, Liguori R, La Morgia C, Montagna P, Liguori M, Zanna C, Rugolo M, Cossarizza A, Wissinger B, Verny C, Schwarzenbacher R, Martin MA, Arenas J, Ayuso C, Garesse R, Lenaers G, Bonneau D, Carelli V (2008) OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain* 131(Pt 2): 338-351
- Antignani A, Youle RJ (2006) How do Bax and Bak lead to permeabilization of the outer mitochondrial membrane? *Curr Opin Cell Biol* 18(6): 685-689
- Arnoult D, Grodet A, Lee YJ, Estaquier J, Blackstone C (2005a) Release of OPA1 during Apoptosis Participates in the Rapid and Complete Release of Cytochrome c and Subsequent Mitochondrial Fragmentation. *J Biol Chem* 280(42): 35742-35750
- Arnoult D, Rismanchi N, Grodet A, Roberts RG, Seeburg DP, Estaquier J, Sheng M, Blackstone C (2005b) Bax/Bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission and mitoptosis during programmed cell death. *Curr Biol* 15(23): 2112-2118
- Bach D, Pich S, Soriano FX, Vega N, Baumgartner B, Oriola J, Daugaard JR, Lloberas J, Camps M, Zierath JR, Rabasa-Lhoret R, Wallberg-Henriksson H, Laville M, Palacin M, Vidal H, Rivera F, Brand M, Zorzano A (2003) Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* 278(19): 17190-17197
- Bahler J, Wu JQ, Longtine MS, Shah NG, McKenzie A, 3rd, Steever AB, Wach A, Philippsen P, Pringle JR (1998) Heterologous modules for efficient and versatile PCR-based gene targeting in *Schizosaccharomyces pombe*. *Yeast* 14(10): 943-951
- Ban T, Heymann JA, Song Z, Hinshaw JE, Chan DC (2010) OPA1 disease alleles causing dominant optic atrophy have defects in cardiolipin-stimulated GTP hydrolysis and membrane tubulation. *Hum Mol Genet* 19(11): 2113-2122
- Baricault L, Segui B, Guegan L, Olichon A, Valette A, Larminat F, Lenaers G (2007) OPA1 cleavage depends on decreased mitochondrial ATP level and bivalent metals. *Exp Cell Res* 313(17): 3800-3808

Barsoum M⁷, Yuan H, Gerencser AA, Liot G, Kushnareva Y, Graber S, Kovacs I, Lee WD, Waggoner J, Cui J, White AD, Bossy B, Martinou JC, Youle RJ, Lipton SA, Ellisman MH, Perkins GA, Bossy-Wetzel E (2006) Nitric oxide-induced mitochondrial fission is regulated by dynamin-related GTPases in neurons. *Embo J* 25(16): 3900-3911

Berger KH, Sogo LF, Yaffe MP (1997) Mdm12p, a component required for mitochondrial inheritance that is conserved between budding and fission yeast. *J Cell Biol* 136(3): 545-553

Berger KH, Yaffe MP (1996) Mitochondrial distribution and inheritance. *Experientia* 52(12): 1111-1116

Bhar D, Karren MA, Babst M, Shaw JM (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(25): 17312-17320

Birner R, Nebauer R, Schneider R, Daum G (2003) Synthetic lethal interaction of the mitochondrial phosphatidylethanolamine biosynthetic machinery with the prohibitin complex of *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell* 14(2): 370-383

Bleazard W, McCaffery JM, King EJ, Bale S, Mozdy A, Tieu Q, Nunnari J, Shaw JM (1999) The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol* 1(5): 298-304.

Boldogh I, Vojtov N, Karmon S, Pon LA (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(6): 1371-1381

Boldogh IR, Pon LA (2006) Interactions of mitochondria with the actin cytoskeleton. *Biochim Biophys Acta* 1763(5-6): 450-462

Boldogh IR, Pon LA (2007) Mitochondria on the move. *Trends Cell Biol* 17(10): 502-510

Braschi E, Zunino R, McBride HM (2009) MAPL is a new mitochondrial SUMO E3 ligase that regulates mitochondrial fission. *EMBO Rep* 10(7): 748-754

Brazer SC, Williams HP, Chappell TG, Cande WZ (2000) A fission yeast kinesin affects Golgi membrane recycling. *Yeast* 16(2): 149-166

Breckenridge DG, Kang BH, Kokel D, Mitani S, Staehelin LA, Xue D (2008) *Caenorhabditis elegans* drp-1 and fis-2 regulate distinct cell-death execution pathways downstream of ced-3 and independent of ced-9. *Mol Cell* 31(4): 586-597

Breckenridge DG, Stojanovic M, Marcellus RC, Shore GC (2003) Caspase cleavage product of BAP31 induces mitochondrial fission through endoplasmic reticulum calcium signals, enhancing cytochrome c release to the cytosol. *J Cell Biol* 160(7): 1115-1127

Brooks C, Wei Q, Feng L, Dong G, Tao Y, Mei L, Xie ZJ, Dong Z (2007) Bak regulates mitochondrial morphology and pathology during apoptosis by interacting with mitofusins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(28): 11649-11654

Bullerwell CE, Leigh J, Forget L, Lang BF (2003) A comparison of three fission yeast mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res* 31(2): 759-768

Burgess SM, Delaney M, Jensen RE (1994) MMM1 encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J Cell Biol* 126: 1375-1391

Burri L, Strahm Y, Hawkins CJ, Gentle IE, Puryer MA, Verhagen A, Callus B, Vaux D, Lithgow T (2005) Mature DIABLO/Smac is produced by the IMP protease complex on the mitochondrial inner membrane. *Mol Biol Cell* 16(6): 2926-2933

Cai Q, Sheng ZH (2009) Mitochondrial transport and docking in axons. *Exp Neurol* 218(2): 257-267

Campbell CL, Tanaka N, White KH, Thorsness PE (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(8): 899-905

Campello S, Lacalle RA, Bettella M, Manes S, Scorrano L, Viola A (2006) Orchestration of lymphocyte chemotaxis by mitochondrial dynamics. *J Exp Med* 203(13): 2879-2886

Cartoni R, Martinou JC (2009) Role of mitofusin 2 mutations in the physiopathology of Charcot-Marie-Tooth disease type 2A. *Exp Neurol* 218(2): 268-273

Casari G, De Fusco M, Ciarmatori S, Zeviani M, Mora M, Fernandez P, De Michele G, Filla A, Coccozza S, Marconi R, Durr A, Fontaine B, Ballabio A (1998) Spastic paraplegia and OXPHOS impairment caused by mutations in *paraplegin*, a nuclear-encoded mitochondrial metalloprotease. *Cell* 93(6): 973-983

Cassidy-Stone A, Chipuk JE, Ingeman E, Song C, Yoo C, Kuwana T, Kurth MJ, Shaw JT, Hinshaw JE, Green DR, Nunnari J (2008) Chemical inhibition of the mitochondrial division dynamin reveals its role in Bax/Bak-dependent mitochondrial outer membrane permeabilization. *Dev Cell* 14(2): 193-204

Cereghetti GM, Stangherlin A, Martins de Brito O, Chang CR, Blackstone C, Bernardi P, Scorrano L (2008) Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105(41): 15803-15808

Cervený KL, Jensen RE (2003) The WD-repeats of *Net2p* interact with *Dnm1p* and *Fis1p* to regulate division of mitochondria. *Mol Biol Cell* 14(10): 4126-4139

Cervený KL, McCaffery JM, Jensen RE (2001) Division of mitochondria requires a novel DMN1-interacting protein, *Net2p*. *Mol Biol Cell* 12(2): 309-321

Cervený KL, Studer SL, Jensen RE, Sesaki H (2007) Yeast mitochondrial division and distribution require the cortical *num1* protein. *Dev Cell* 12(3): 363-375

Chang CR, Blackstone C (2007) Cyclic AMP-dependent protein kinase phosphorylation of Drp1 regulates its GTPase activity and mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 282(30): 21583-21587

Chen H, Chan DC (2009) Mitochondrial dynamics--fusion, fission, movement, and mitophagy--in neurodegenerative diseases. *Hum Mol Genet* 18(R2): R169-176

Chen H, Chomyn A, Chan DC (2005) Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 280(28): 26185-26192

Chen H, Detmer SA, Ewald AJ, Griffin EE, Fraser SE, Chan DC (2003) Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* 160(2): 189-200

Chen H, McCaffery JM, Chan DC (2007) Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* 130(3): 548-562

- Chen XJ, Clark-Walker GD (2000) The petite mutation in yeasts: 50 years on. *Int Rev Cytol* 194: 197-238
- Chen YJ, Zhang P, Egelman EH, Hinshaw JE (2004) The stalk region of dynamin drives the constriction of dynamin tubes. *Nat Struct Mol Biol* 11(6): 574-575
- Chiron S, Gaisne M, Guillou E, Belenguer P, Clark-Walker GD, Bonnefoy N (2007) Studying Mitochondria in an Attractive Model : *Schizosaccharomyces pombe*, *Methods Mol Biol* 372: 91-105
- Chiron S, Suleau A, Bonnefoy N (2005) Mitochondrial translation: elongation factor tu is essential in fission yeast and depends on an exchange factor conserved in humans but not in budding yeast. *Genetics* 169(4): 1891-1901
- Cho DH, Nakamura T, Fang J, Cieplak P, Godzik A, Gu Z, Lipton SA (2009) S-nitrosylation of Drp1 mediates beta-amyloid-related mitochondrial fission and neuronal injury. *Science* 324(5923): 102-105
- Choi SY, Huang P, Jenkins GM, Chan DC, Schiller J, Frohman MA (2006) A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat Cell Biol* 8(11): 1255-1262
- Cipolat S, de Brito OM, Dal Zilio B, Scorrano L (2004) OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101: 15927-15932
- Cipolat S, Rudka T, Hartmann D, Costa V, Serneels L, Craessaerts K, Metzger K, Frezza C, Annaert W, D'Adamio L, Derks C, Dejaegere T, Pellegrini L, D'Hooge R, Scorrano L, De Strooper B (2006) Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* 126(1): 163-175
- Clark SG, Shurland DL, Meyerowitz EM, Bargmann CI, van der Bliek AM (1997) A dynamin GTPase mutation causes a rapid and reversible temperature- inducible locomotion defect in *C. elegans*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94(19): 10438-10443
- Clotet J, Posas F (2007) Control of cell cycle in response to osmopressure: lessons from yeast. *Methods Enzymol* 428: 63-76
- Collins TJ, Berridge MJ, Lipp P, Bootman MD (2002) Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *EMBO J* 21(7): 1616-1627
- Cribbs JT, Strack S (2007) Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep* 8(10): 939-944
- Cuddeback SM, Yamaguchi H, Komatsu K, Miyashita T, Yamada M, Wu C, Singh S, Wang HG (2001) Molecular cloning and characterization of Bif-1. A novel Src homology 3 domain-containing protein that associates with Bax. *J Biol Chem* 276(23): 20559-20565
- Cuesta A, Pedrola L, Sevilla T, Garcia-Planells J, Chumillas MJ, Mayordomo F, LeGuern E, Marin I, Vilchez JJ, Palau F (2002) The gene encoding ganglioside-induced differentiation-associated protein 1 is mutated in axonal Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *Nat Genet* 30(1): 22-25
- Da Cruz S, Parone PA, Gonzalo P, Bienvenut WV, Tondera D, Jourdain A, Quadroni M, Martinou JC (2008) SLP-2 interacts with prohibitins in the mitochondrial inner membrane and contributes to their stability. *Biochim Biophys Acta* 1783(5): 904-911

Davies VJ, Hollins AJ, Piechota MJ, Yip W, Davies JR, White KE, Nicols PP, Boulton ME, Votruba M (2007) *Opa1* deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. *Hum Mol Genet* 16(11): 1307-1318

de Brito OM, Scorrano L (2008) Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* 456(7222): 605-610

De Vos KJ, Allan VJ, Grierson AJ, Sheetz MP (2005) Mitochondrial function and actin regulate dynamin-related protein 1-dependent mitochondrial fission. *Curr Biol* 15(7): 678-683

Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L, Lenaers G, Belenguer P, Hamel CP (2001) Mutation spectrum and splicing variants in the *OPA1* gene. *Human Genetics* 109: 584-591

Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, Pelloquin L, Grosgeorge J, Turc-Carel C, Perret E, Astarie-Dequeker C, Lasquelléc L, Arnaud B, Ducommun B, Kaplan J, Hamel CP (2000) Nuclear gene *OPA1*, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 26(2): 207-210

Detmer SA, Chan DC (2007a) Complementation between mouse *Mfn1* and *Mfn2* protects mitochondrial fusion defects caused by *CMT2A* disease mutations. *J Cell Biol* 176(4): 405-414

Detmer SA, Chan DC (2007b) Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(11): 870-879

DeVay RM, Dominguez-Ramirez L, Lackner LL, Hoppins S, Stahlberg H, Nunnari J (2009) Coassembly of *Mgm1* isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion. *J Cell Biol* 186(6): 793-803

Diot A, Guillou E, Daloyau M, Arnaune-Pelloquin L, Emorine LJ, Belenguer P (2009) Transmembrane segments of the dynamin *Msp1p* uncouple its functions in the control of mitochondrial morphology and genome maintenance. *J Cell Sci* 122(Pt 15): 2632-2639

Dohm JA, Lee SJ, Hardwick JM, Hill RB, Gittis AG (2004) Cytosolic domain of the human mitochondrial fission protein *fis1* adopts a TPR fold. *Proteins* 54(1): 153-156

Duvezin-Caubet S, Jagasia R, Wagener J, Hofmann S, Trifunovic A, Hansson A, Chomyn A, Bauer MF, Attardi G, Larsson NG, Neupert W, Reichert AS (2006) Proteolytic processing of *OPA1* links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 281(49): 37972-37979

Duvezin-Caubet S, Koppen M, Wagener J, Zick M, Israel L, Bernacchia A, Jagasia R, Rugarli EI, Imhof A, Neupert W, Langer T, Reichert AS (2007) *OPA1* processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the *m*-AAA protease in mitochondria. *Mol Biol Cell* 18(9): 3582-3590

Ehse S, Raschke I, Mancuso G, Bernacchia A, Geimer S, Tondera D, Martinou JC, Westermann B, Rugarli EI, Langer T (2009) Regulation of *OPA1* processing and mitochondrial fusion by *m*-AAA protease isoenzymes and *OMA1*. *J Cell Biol* 187(7): 1023-1036

Escobar-Henriques M, Westermann B, Langer T (2006) Regulation of mitochondrial fusion by the F-box protein *Mdm30* involves proteasome-independent turnover of *Fzo1*. *J Cell Biol* 173(5): 645-650

- Esser K, Jan PS, Pratje E, Michaelis G (2004) The mitochondrial IMP peptidase of yeast: functional analysis of domains and identification of Gut2 as a new natural substrate. *Mol Genet Genomics* 271(5): 616-626
- Esser K, Tursun B, Ingenhoven M, Michaelis G, Pratje E (2002) A novel two-step mechanism for removal of a mitochondrial signal sequence involves the mAAA complex and the putative rhomboid protease Pcp1. *J Mol Biol* 323(5): 835-843
- Estaquier J, Arnoult D (2007) Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. *Cell Death Differ* 14(6): 1086-1094
- Eura Y, Ishihara N, Oka T, Mihara K (2006) Identification of a novel protein that regulates mitochondrial fusion by modulating mitofusin (Mfn) protein function. *J Cell Sci* 119(23): 4913-4925
- Eura Y, Ishihara N, Yokota S, Mihara K (2003) Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J Biochem (Tokyo)* 134(3): 333-344
- Farkasovsky M, Kuntzel H (1995) Yeast Num1p associates with the mother cell cortex during S/G2 phase and affects microtubular functions. *J Cell Biol* 131(4): 1003-1014
- Fehrenbacher KL, Yang HC, Gay AC, Huckaba TM, Pon LA (2004) Live Cell Imaging of Mitochondrial Movement along Actin Cables in Budding Yeast. *Curr Biol* 14(22): 1996-2004
- Fekkes P, Shepard KA, Yaffe MP (2000) Gag3p, an outer membrane protein required for fission of mitochondrial tubules. *J Cell Biol* 151(2): 333-340.
- Flores CL, Rodriguez C, Petit T, Gancedo C (2000) Carbohydrate and energy-yielding metabolism in non-conventional yeasts. *FEMS Microbiol Rev* 24(4): 507-529
- Forsburg SL (2003) Overview of *Schizosaccharomyces pombe*. *Curr Protoc Mol Biol Chapter 13: Unit 13 14*
- Foury F, Goffeau A (1972) Glucose superrepressed and derepressed respiratory mutants in a "petite-negative" yeast: *Schizosaccharomyces pombe* 972h. *Biochem Biophys Res Commun* 48(1): 153-160
- Frank S, Gaume B, Bergmann-Leitner ES, Leitner WW, Robert EG, Catez F, Smith CL, Youle RJ (2001) The role of dynamin-related protein 1, a mediator of mitochondrial fission, in apoptosis. *Dev Cell* 1(4): 515-525
- Frederick RL, Shaw JM (2007) Moving mitochondria: establishing distribution of an essential organelle. *Traffic* 8(12): 1668-1675
- Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, Bartoli D, Polishuck RS, Danial NN, De Strooper B, Scorrano L (2006) OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 126(1): 177-189
- Fritz S, Rapaport D, Klanner E, Neupert W, Westermann B (2001) Connection of the mitochondrial outer and inner membranes by Fzo1 is critical for organellar fusion. *J Cell Biol* 152(4): 683-692
- Fritz S, Weinbach N, Westermann B (2003) Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast. *Mol Biol Cell* 14(6): 2303-2313

Fukushima NH, Brisch E, Keegan BR, Bleazard W, Shaw JM (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(9): 2756-2766

Gacto M, Soto T, Vicente-Soler J, Villa TG, Cansado J (2003) Learning from yeasts: intracellular sensing of stress conditions. *Int Microbiol* 6(3): 211-219

Gallop JL, Jao CC, Kent HM, Butler PJ, Evans PR, Langen R, McMahon HT (2006) Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *Embo J* 25(12): 2898-2910

Germain M, Mathai JP, McBride HM, Shore GC (2005) Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodelling of mitochondrial cristae during apoptosis. *Embo J* 24(8): 1546-1556

Goldman SJ, Taylor R, Zhang Y, Jin S Autophagy and the degradation of mitochondria. *Mitochondrion* 10(4): 309-315

Graef M, Seewald G, Langer T (2007) Substrate recognition by AAA+ ATPases: distinct substrate binding modes in ATP-dependent protease Yme1 of the mitochondrial intermembrane space. *Mol Cell Biol* 27(7): 2476-2485

Griffin EE, Graumann J, Chan DC (2005) The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J Cell Biol* 170(2): 237-248

Grimm S, Brdiczka D (2007) The permeability transition pore in cell death. *Apoptosis* 12(5): 841-855

Griparic L, Kanazawa T, van der Blik AM (2007) Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J Cell Biol* 178(5): 757-764

Griparic L, van der Wel NN, Orozco IJ, Peters PJ, van der Blik AM (2004) Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem* 279(18): 18792-18798

Guillery O, Malka F, Landes T, Guillou E, Blackstone C, Lombes A, Belenguer P, Arnoult D, Rojo M (2008) Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol Cell* 100(5): 315-325

Guillou E, Bousquet C, Daloyau M, Emorine LJ, Belenguer P (2005) Msp1p is an intermembrane space dynamin-related protein that mediates mitochondrial fusion in a Dnm1p-dependent manner in *S. pombe*. *FEBS Lett* 579(5): 1109-1116

Hackenbrock C (1966) Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *Journal of Cell Biology* 30: 269-297

Haffter P, Fox TD (1992) Nuclear mutations in the petite-negative yeast *Schizosaccharomyces pombe* allow growth of cells lacking mitochondrial DNA. *Genetics* 131(2): 255-260

Hajek P, Chomyn A, Attardi G (2007) Identification of a novel mitochondrial complex containing mitofusin 2 and stomatin-like protein 2. *J Biol Chem* 282(8): 5670-5681

Hales KG, Fuller MT (1997) Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell* 90(1): 121-129

Halliwel B, Aeschbach R, Loliger J, Aruoma OI (1995) The characterization of antioxidants. *Food Chem Toxicol* 33(7): 601-617

Hamanaka RB, Chandel NS (2010) Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes. *Trends Biochem Sci*. doi:10.1016/j.tibs.2010.04.002

Han XJ, Lu YF, Li SA, Kaitsuka T, Sato Y, Tomizawa K, Nairn AC, Takei K, Matsui H, Matsushita M (2008) CaM kinase I alpha-induced phosphorylation of Drp1 regulates mitochondrial morphology. *J Cell Biol* 182(3): 573-585

Harder Z, Zunino R, McBride H (2004) Sumo1 conjugates mitochondrial substrates and participates in mitochondrial fission. *Curr Biol* 14(4): 340-345

Head B, Griparic L, Amiri M, Gandre-Babbe S, van der Blik AM (2009) Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *J Cell Biol* 187(7): 959-966

Herlan M, Bornhord C, Hell K, Neupert W, Reichert AS (2004) Alternative topogenesis of Mgm1 and mitochondrial morphology depend on ATP and a functional import motor. *J Cell Biol* 165(2): 167-173

Herlan M, Vogel F, Bornhord C, Neupert W, Reichert AS (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(30): 27781-27788

Hermann GJ, Thatcher JW, Mills JP, Hales KG, Fuller MT, Nunnari J, Shaw JM (1998) Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol* 143(2): 359-373

Herrero E, Ros J, Belli G, Cabisco E (2008) Redox control and oxidative stress in yeast cells. *Biochim Biophys Acta* 1780(11): 1217-1235

Hinshaw JE, Schmid SL (1995) Dynamin self-assembles into rings suggesting a mechanism for coated vesicle budding. *Nature* 374: 190-192

Hobbs AE, Srinivasan M, McCaffery JM, Jensen RE (2001) Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. *J Cell Biol* 152(2): 401-410

Hollenbeck PJ, Saxton WM (2005) The axonal transport of mitochondria. *J Cell Sci* 118(Pt 23): 5411-5419

Hoog JL, Schwartz C, Noon AT, O'Toole ET, Mastrorade DN, McIntosh JR, Antony C (2007) Organization of interphase microtubules in fission yeast analyzed by electron tomography. *Dev Cell* 12(3): 349-361

Hoppins S, Horner J, Song C, McCaffery JM, Nunnari J (2009) Mitochondrial outer and inner membrane fusion requires a modified carrier protein. *J Cell Biol* 184(4): 569-581

Hudson G, Amati-Bonneau P, Blakely EL, Stewart JD, He L, Schaefer AM, Griffiths PG, Ahlqvist K, Suomalainen A, Reynier P, McFarland R, Turnbull DM, Chinnery PF, Taylor RW (2008) Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain* 131(Pt 2): 329-337

Hwa JJ, Hiller MA, Fuller MT, Santel A (2002) Differential expression of the *Drosophila* mitofusin genes *fuzzy onions (fzo)* and *dmfn*. *Mech Dev* 116(1-2): 213-216

Idiris A, Bi K, Tohda H, Kumagai H, Giga-Hama Y (2006) Construction of a protease-deficient strain set for the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, useful for effective production of protease-sensitive heterologous proteins. *Yeast* 23(2): 83-99

Ikner A, Shiozaki K (2005) Yeast signaling pathways in the oxidative stress response. *Mutat Res* 569(1-2): 13-27

Ingerman E, Perkins EM, Marino M, Mears JA, McCaffery JM, Hinshaw JE, Nunnari J (2005) *Dnm1* forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol* 170(7): 1021-1027

Ishihara N, Eura Y, Mihara K (2004) Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci* 117(Pt 26): 6535-6546

Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K (2006) Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *Embo J* 25(13): 2966-2977

Ishihara N, Nomura M, Jofuku A, Kato H, Suzuki SO, Masuda K, Otera H, Nakanishi Y, Nonaka I, Goto YI, Taguchi N, Morinaga H, Maeda M, Takayanagi R, Yokota S, Mihara K (2009) Mitochondrial fission factor *Drp1* is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol* 11(8): 958-966

Jakobs S, Martini N, Schauss AC, Egner A, Westermann B, Hell SW (2003) Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component *Fis1p*. *J Cell Sci* 116(Pt 10): 2005-2014

James DI, Parone PA, Mattenberger Y, Martinou JC (2003) *hFis1*, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* 278(38): 36373-36379

Jofuku A, Ishihara N, Mihara K (2005) Analysis of functional domains of rat mitochondrial *Fis1*, the mitochondrial fission-stimulating protein. *Biochem Biophys Res Commun* 333(2): 650-659

Jones BA, Fangman WL (1992) Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev* 6(3): 380-389

Jourdain I, Gachet Y, Hyams JS (2009) The dynamin related protein *Dnm1* fragments mitochondria in a microtubule-dependent manner during the fission yeast cell cycle. *Cell Motil Cytoskeleton* 66(8): 509-523

Karbowski M, Arnoult D, Chen H, Chan DC, Smith CL, Youle RJ (2004a) Quantitation of mitochondrial dynamics by photolabeling of individual organelles shows that mitochondrial fusion is blocked during the Bax activation phase of apoptosis. *J Cell Biol* 164(4): 493-499

Karbowski M, Jeong SY, Youle RJ (2004b) Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J Cell Biol* 166(7): 1027-1039

Karbowski M, Lee YJ, Gaume B, Jeong SY, Frank S, Nechushtan A, Santel A, Fuller M, Smith CL, Youle RJ (2002) Spatial and temporal association of Bax with mitochondrial fission sites, *Drp1*, and *Mfn2* during apoptosis. *J Cell Biol* 159(6): 931-938

Karbowski M, Neutzner A, Youle RJ (2007) The mitochondrial E3 ubiquitin ligase *MARCH5* is required for *Drp1* dependent mitochondrial division. *J Cell Biol* 178(1): 71-84

Karbowska M, Norris KL, Cleland MM, Jeong SY, Youle RJ (2006) Role of Bax and Bak in mitochondrial morphogenesis. *Nature* 443(7112): 658-662

Kaser M, Kambacheld M, Kisters-Woike B, Langer T (2003) Oma1, a novel membrane-bound metallopeptidase in mitochondria with activities overlapping with the m-AAA protease. *J Biol Chem* 278(47): 46414-46423

Kim DU, Hayles J, Kim D, Wood V, Park HO, Won M, Yoo HS, Duhig T, Nam M, Palmer G, Han S, Jeffery L, Baek ST, Lee H, Shim YS, Lee M, Kim L, Heo KS, Noh EJ, Lee AR, Jang YJ, Chung KS, Choi SJ, Park JY, Park Y, Kim HM, Park SK, Park HJ, Kang EJ, Kim HB, Kang HS, Park HM, Kim K, Song K, Song KB, Nurse P, Hoe KL (2010) Analysis of a genome-wide set of gene deletions in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Nat Biotechnol* 28(6): 617-623

Kim JY, Hwang JM, Ko HS, Seong MW, Park BJ, Park SS (2005) Mitochondrial DNA content is decreased in autosomal dominant optic atrophy. *Neurology* 64(6): 966-972

Klanner C, Prokisch H, Langer T (2001) MAP-1 and IAP-1, two novel AAA proteases with catalytic sites on opposite membrane surfaces in mitochondrial inner membrane of *Neurospora crassa*. *Mol Biol Cell* 12(9): 2858-2869

Koch A, Thiemann M, Grabenbauer M, Yoon Y, McNiven MA, Schrader M (2003) Dynammin-like protein 1 is involved in peroxisomal fission. *J Biol Chem* 278(10): 8597-8605

Koch A, Yoon Y, Bonekamp NA, McNiven MA, Schrader M (2005) A role for Fis1 in both mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 16(11): 5077-5086

Koppen M, Langer T (2007) Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases. *Crit Rev Biochem Mol Biol* 42(3): 221-242

Kornmann B, Currie E, Collins SR, Schuldiner M, Nunnari J, Weissman JS, Walter P (2009) An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science* 325(5939): 477-481

Koshiba T, Detmer SA, Kaiser JT, Chen H, McCaffery JM, Chan DC (2004) Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* 305(5685): 858-862

Kowaltowski AJ, de Souza-Pinto NC, Castilho RF, Vercesi AE (2009) Mitochondria and reactive oxygen species. *Free Radic Biol Med* 47(4): 333-343

Kuznetsov AV, Hermann M, Saks V, Hengster P, Margreiter R (2009) The cell-type specificity of mitochondrial dynamics. *Int J Biochem Cell Biol* 41(10): 1928-1939

Labrousse AM, Zappaterra MD, Rube DA, van der Bliek AM (1999) *C. elegans* dynammin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell* 4(5): 815-826

Lackner LL, Horner JS, Nunnari J (2009) Mechanistic analysis of a dynammin effector. *Science* 325(5942): 874-877

Langer T (2000) AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. *Trends Biochem Sci* 25(5): 247-251

Langer T, Kaser M, Klanner C, Leonhard K (2001) AAA proteases of mitochondria: quality control of membrane proteins and regulatory functions during mitochondrial biogenesis. *Biochem Soc Trans* 29(4): 431-436

- Lee S, Jeong SY, Lim WC, Kim S, Park YY, Sun X, Youle RJ, Cho H (2007) Mitochondrial fission and fusion mediators, hFis1 and OPA1, modulate cellular senescence. *J Biol Chem* 282(31): 22977-22983
- Lee YJ, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ (2004) Roles of the Mammalian mitochondrial fission and fusion mediators fis1, drp1, and opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* 15(11): 5001-5011
- Legros F, Lombes A, Frachon P, Rojo M (2002) Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell* 13(12): 4343-4354.
- Lenaers G, Pelloquin L, Olichon A, Emorine LJ, Guillou E, Delettre C, Hamel CP, Ducommun B, Belenguer P (2002) What similarity between human and fission yeast proteins is required for orthology? *Yeast* 19(13): 1125-1126
- Leonard JV, Schapira AH (2000) Mitochondrial respiratory chain disorders I: mitochondrial DNA defects. *Lancet* 355(9200): 299-304
- Li Z, Okamoto K, Hayashi Y, Sheng M (2004) The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* 119(6): 873-887
- Liu H, Nakagawa T, Kanematsu T, Uchida T, Tsuji S (1999) Isolation of 10 differentially expressed cDNAs in differentiated Neuro2a cells induced through controlled expression of the GD3 synthase gene. *J Neurochem* 72(5): 1781-1790
- Liu X, Weaver D, Shirihai O, Hajnoczky G (2009) Mitochondrial 'kiss-and-run': interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. *EMBO J* 28(20): 3074-3089
- Malka F, Guillery O, Cifuentes-Diaz C, Guillou E, Belenguer P, Lombes A, Rojo M (2005) Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes. *EMBO Rep* 6(9): 853-859
- Mannella CA (2006) Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta* 1763(5-6): 542-548
- Mannella CA, Pfeiffer DR, Bradshaw PC, Moraru, II, Stepchenko B, Loew LM, Hsieh CE, Buttle K, Marko M (2001) Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *Dig Liver Dis* 33(9): 795-802
- Margineantu DH, Gregory Cox W, Sundell L, Sherwood SW, Beechem JM, Capaldi RA (2002) Cell cycle dependent morphology changes and associated mitochondrial DNA redistribution in mitochondria of human cell lines. *Mitochondrion* 1(5): 425-435
- Maundrell K (1993) Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* 123: 127-130
- McQuibban GA, Saurya S, Freeman M (2003) Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature* 423(6939): 537-541
- Meeusen S, DeVay R, Block J, Cassidy-Stone A, Wayson S, McCaffery JM, Nunnari J (2006) Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* 127(2): 383-395
- Meeusen S, McCaffery JM, Nunnari J (2004) Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* 305(5691): 1747-1752

- Meier P, Finch A, Evan G (2000) *Apoptosis in development. Nature* 407(6805): 796-801
- Meisinger C, Pfannschmidt S, Rissler M, Milenkovic D, Becker T, Stojanovski D, Youngman MJ, Jensen RE, Chacinska A, Guiard B, Pfanner N, Wiedemann N (2007) *The morphology proteins Mdm12/Mmm1 function in the major beta-barrel assembly pathway of mitochondria. EMBO J* 26(9): 2229-2239
- Merkwirth C, Dargazanli S, Tatsuta T, Geimer S, Lower B, Wunderlich FT, von Kleist-Retzow JC, Waisman A, Westermann B, Langer T (2008) *Prohibitins control cell proliferation and apoptosis by regulating OPA1-dependent cristae morphogenesis in mitochondria. Genes Dev* 22(4): 476-488
- Merkwirth C, Langer T (2009) *Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. Biochim Biophys Acta* 1793(1): 27-32
- Messerschmitt M, Jakobs S, Vogel F, Fritz S, Dimmer KS, Neupert W, Westermann B (2003) *The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. J Cell Biol* 160(4): 553-564
- Misaka T, Miyashita T, Kubo Y (2002) *Primary structure of a dynamin-related mouse mitochondrial GTPase and its distribution in brain, subcellular localization, and effect on mitochondrial morphology. J Biol Chem* 277(18): 15834-15842
- Mitra K, Wunder C, Roysam B, Lin G, Lippincott-Schwartz J (2009) *A hyperfused mitochondrial state achieved at G1-S regulates cyclin E buildup and entry into S phase. Proc Natl Acad Sci U S A* 106(29): 11960-11965
- Mokranjac D, Neupert W (2008) *Energetics of protein translocation into mitochondria. Biochim Biophys Acta* 1777(7-8): 758-762
- Mokranjac D, Neupert W (2009) *Thirty years of protein translocation into mitochondria: unexpectedly complex and still puzzling. Biochim Biophys Acta* 1793(1): 33-41
- Mozdy AD, McCaffery JM, Shaw JM (2000) *Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. J Cell Biol* 151(2): 367-380
- Murphy MP (2009) *How mitochondria produce reactive oxygen species. Biochem J* 417(1): 1-13
- Nakada K, Inoue K, Ono T, Isobe K, Ogura A, Goto YI, Nonaka I, Hayashi JI (2001) *Inter-mitochondrial complementation: Mitochondria-specific system preventing mice from expression of disease phenotypes by mutant mtDNA. Nat Med* 7(8): 934-940
- Naylor K, Ingerman E, Okreglak V, Marino M, Hinshaw JE, Nunnari J (2006) *Mdv1 interacts with assembled dnm1 to promote mitochondrial division. J Biol Chem* 281(4): 2177-2183
- Neupert W, Brunner M (2002) *The protein import motor of mitochondria. Nat Rev Mol Cell Biol* 3(8): 555-565
- Neutzner A, Youle RJ (2005) *Instability of the mitofusin Fzo1 regulates mitochondrial morphology during the mating response of the yeast Saccharomyces cerevisiae. J Biol Chem* 280(19): 18598-18603
- Nguyen AN, Shiozaki K (1999) *Heat-shock-induced activation of stress MAP kinase is regulated by threonine- and tyrosine-specific phosphatases. Genes Dev* 13(13): 1653-1663

- Niemann A, Ruegg M, La Padula V, Schenone A, Suter U (2005) Ganglioside-induced differentiation associated protein 1 is a regulator of the mitochondrial network: new implications for Charcot-Marie-Tooth disease. *J Cell Biol* 170(7): 1067-1078
- Niemann A, Wagner KM, Ruegg M, Suter U (2009) GDAP1 mutations differ in their effects on mitochondrial dynamics and apoptosis depending on the mode of inheritance. *Neurobiol Dis* 36(3): 509-520
- Nunnari J, Fox TD, Walter P (1993) A mitochondrial protease with two catalytic subunits of nonoverlapping specificities. *Science* 262(5142): 1997-2004
- Nunnari J, Marsshall WF, Straight A, Murray A, Sedat JW, Walter P (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, Shaw JM (2005) Mitochondrial Morphology and Dynamics in Yeast and Multicellular Eukaryotes. *Annu Rev Genet* 39: 503-536
- Olichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, Lenaers G (2003) Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 278(10): 7743-7746
- Olichon A, Elachouri G, Baricault L, Delettre C, Belenguer P, Lenaers G (2007) OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death Differ* 14(4): 682-692
- Olichon A, Emorine LJ, Descoins E, Pelloquin L, Bricchese L, Gas N, Guillou E, Delettre C, Valette A, Hamel CP, Ducommun B, Lenaers G, Belenguer P (2002) The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett* 523(1-3): 171-176
- Ono T, Isobe K, Nakada K, Hayashi JI (2001) Human cells are protected from mitochondrial dysfunction by complementation of DNA products in fused mitochondria. *Nat Genet* 28(3): 272-275
- Osman C, Haag M, Potting C, Rodenfels J, Dip PV, Wieland FT, Brugger B, Westermann B, Langer T (2009) The genetic interactome of prohibitins: coordinated control of cardiolipin and phosphatidylethanolamine by conserved regulators in mitochondria. *J Cell Biol* 184(4): 583-596
- Osman C, Wilmes C, Tatsuta T, Langer T (2007) Prohibitins interact genetically with Atp23, a novel processing peptidase and chaperone for the F1Fo-ATP synthase. *Mol Biol Cell* 18(2): 627-635
- Osteryoung KW, Nunnari J (2003) The division of endosymbiotic organelles. *Science* 302(5651): 1698-1704
- Parone PA, James DI, Da Cruz S, Mattenberger Y, Donze O, Barja F, Martinou JC (2006) Inhibiting the mitochondrial fission machinery does not prevent Bax/Bak-dependent apoptosis. *Mol Cell Biol* 26(20): 7397-7408
- Pastor MM, Proft M, Pascual-Ahuir A (2009) Mitochondrial function is an inducible determinant of osmotic stress adaptation in yeast. *J Biol Chem* 284(44): 30307-30317

- Pedrola L, Espert A, Valdes-Sanchez T, Sanchez-Piris M, Sirkowski EE, Scherer SS, Farinas I, Palau F (2008) Cell expression of GDAP1 in the nervous system and pathogenesis of Charcot-Marie-Tooth type 4A disease. *J Cell Mol Med* 12(2): 679-689
- Pedrola L, Espert A, Wu X, Claramunt R, Shy ME, Palau F (2005) GDAP1, the protein causing Charcot-Marie-Tooth disease type 4A, is expressed in neurons and is associated with mitochondria. *Hum Mol Genet* 14(8): 1087-1094
- Pelloquin L, Belenguer P, Menon Y, Ducommun B (1998) Identification of a fission yeast dynamin-related protein involved in mitochondrial DNA maintenance. *Biochem Biophys Res Commun* 251(3): 720-726
- Pelloquin L, Belenguer P, Menon Y, Gas N, Ducommun B (1999a) Fission yeast Msp1 is a mitochondrial dynamin related protein. *J Cell Science* 112: 4151-4161
- Pelloquin L, Ducommun B, Belenguer P (1999b) Interaction between the fission yeast nim1/cdr1 protein kinase and a dynamin-related protein. *FEBS letters* 443: 71-74
- Perkins G, Renken C, Martone ME, Young SJ, Ellisman M, Frey T (1997) Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol* 119(3): 260-272
- Perkins GA, Frey TG (2000) Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy. *Trends Biochem Sci* 25(7): 319-324
- Pich S, Bach D, Briones P, Liesa M, Camps M, Testar X, Palacin M, Zorzano A (2005) The Charcot-Marie-Tooth type 2A gene product, Mfn2, up-regulates fuel oxidation through expression of OXPHOS system. *Hum Mol Genet* 14(11): 1405-1415
- Pierrat B, Simonen M, Cueto M, Mestan J, Ferrigno P, Heim J (2001) SH3GLB, a new endophilin-related protein family featuring an SH3 domain. *Genomics* 71(2): 222-234
- Pitts KR, Yoon Y, Krueger EW, McNiven MA (1999) The dynamin-like protein DLP1 is essential for normal distribution and morphology of the endoplasmic reticulum and mitochondria in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 10(12): 4403-4417
- Praefcke GJ, McMahon HT (2004) The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 5(2): 133-147
- Prince FP (1999) Mitochondrial cristae diversity in human Leydig cells: a revised look at cristae morphology in these steroid-producing cells. *Anat Rec* 254(4): 534-541
- Rapaport D, Brunner M, Neupert W, Westermann B (1998) Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* 273(32): 20150-20155
- Riedl SJ, Salvesen GS (2007) The apoptosome: signalling platform of cell death. *Nat Rev Mol Cell Biol* 8(5): 405-413
- Rizzuto R, Pinton P, Carrington W, Fay FS, Fogarty KE, Lifshitz LM, Tuft RA, Pozzan T (1998) Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science* 280(5370): 1763-1766

Robinson BH, Petrova-Benedict R, Buncic JR, Wallace DC (1992) Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: a screening test for affected patient fibroblasts. *Biochem Med Metab Biol* 48(2): 122-126

Rojo M, Legros F, Chateau D, Lombes A (2002) Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* 115(Pt 8): 1663-1674

Santel A, Frank S, Gaume B, Herrler M, Youle RJ, Fuller MT (2003) Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* 116(Pt 13): 2763-2774

Santel A, Fuller MT (2001) Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* 114(Pt 5): 867-874

Satoh M, Hamamoto T, Seo N, Kagawa Y, Endo H (2003) Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 300(2): 482-493

Schatz G (2007) The magic garden. *Annu Rev Biochem* 76: 673-678

Scheffler IE (1999) *Mitochondria: Wiley-Liss.*

Scheffler IE (2001) Mitochondria make a come back. *Adv Drug Deliv Rev* 49(1-2): 3-26

Sesaki H, Dunn CD, Iijima M, Shepard KA, Yaffe MP, Machamer CE, Jensen RE (2006) Ups1p, a conserved intermembrane space protein, regulates mitochondrial shape and alternative topogenesis of Mgm1p. *J Cell Biol* 173(5): 651-658

Sesaki H, Jensen RE (1999) Division versus fusion: Dnm1p and Fzo1p antagonistically regulate mitochondrial shape. *J Cell Biol* 147(4): 699-706

Sesaki H, Jensen RE (2001) UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J Cell Biol* 152(6): 1123-1134

Sesaki H, Jensen RE (2004) Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J Biol Chem* 279(27): 28298-28303

Sesaki H, Southard SM, Hobbs AE, Jensen RE (2003a) Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA and mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 308(2): 276-283

Sesaki H, Southard SM, Yaffe MP, Jensen RE (2003b) Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell* 14(6): 2342-2356

Shah ZH, Hakkaart GA, Arku B, de Jong L, van der Spek H, Grivell LA, Jacobs HT (2000) The human homologue of the yeast mitochondrial AAA metalloprotease Yme1p complements a yeast yme1 disruptant. *FEBS Lett* 478(3): 267-270

Shaw JM, Nunnari J (2002) Mitochondrial dynamics and division in budding yeast. *Trends Cell Biol* 12(4): 178-184

Shepard KA, Yaffe MP (1999) The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance. *J Cell Biol* 144(4): 711-720

- Sheridan C, Delivani P, Cullen SP, Martin SJ (2008) Bax- or Bak-induced mitochondrial fission can be uncoupled from cytochrome C release. *Mol Cell* 31(4): 570-585
- Shiozaki K, Russell P (1995) Counteractive roles of protein phosphatase 2C (PP2C) and a MAP kinase kinase homolog in the osmoregulation of fission yeast. *EMBO J* 14(3): 492-502
- Simon VR, Karmon SL, Pon LA (1997) Mitochondrial inheritance: cell cycle and actin cable dependence of polarized mitochondrial movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Motil Cytoskeleton* 37(3): 199-210
- Skulachev VP, Bakeeva LE, Chernyak BV, Domnina LV, Minin AA, Pletjushkina OY, Saprunova VB, Skulachev IV, Tsyplenkova VG, Vasiliev JM, Yaguzhinsky LS, Zorov DB (2004) Thread-grain transition of mitochondrial reticulum as a step of mitoptosis and apoptosis. *Mol Cell Biochem* 256-257(1-2): 341-358
- Smirnova E, Griparic L, Shurland DL, van Der Bliek AM (2001) Dynamin-related protein drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* 12(8): 2245-2256
- Smirnova E, Shurland DL, Ryazantsev SN, van der Bliek AM (1998) A human dynamin-related protein controls the distribution of mitochondria. *J Cell Biol* 143(2): 351-358
- Smith DA, Morgan BA, Quinn J Stress signalling to fungal stress-activated protein kinase pathways. *FEMS Microbiol Lett* 306(1): 1-8
- Snaith HA, Samejima I, Sawin KE (2005) Multistep and multimode cortical anchoring of tea1p at cell tips in fission yeast. *Embo J* 24(21): 3690-3699
- Soderberg K, Mascarello JT, Breen GA, Scheffler IE (1979) Respiration-deficient Chinese hamster cell mutants: genetic characterization. *Somatic Cell Genet* 5(2): 225-240
- Sogo LF, Yaffe MP (1994) Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol* 126: 1361-1373
- Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC (2007) OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol* 178(5): 749-755
- Steglich G, Neupert W, Langer T (1999) Prohibitins regulate membrane protein degradation by the m-AAA protease in mitochondria. *Mol Cell Biol* 19(5): 3435-3442
- Stojanovski D, Koutsopoulos OS, Okamoto K, Ryan MT (2004) Levels of human Fis1 at the mitochondrial outer membrane regulate mitochondrial morphology. *J Cell Sci* 117(Pt 7): 1201-1210
- Suen DF, Norris KL, Youle RJ (2008) Mitochondrial dynamics and apoptosis. *Genes Dev* 22(12): 1577-1590
- Sugioka R, Shimizu S, Tsujimoto Y (2004) Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J Biol Chem* 279(50): 52726-52734
- Suzuki M, Jeong SY, Karbowski M, Youle RJ, Tjandra N (2003) The solution structure of human mitochondria fission protein Fis1 reveals a novel TPR-like helix bundle. *J Mol Biol* 334(3): 445-458
- Suzuki M, Neutzner A, Tjandra N, Youle RJ (2005) Novel structure of the N terminus in yeast Fis1 correlates with a specialized function in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 280(22): 21444-21452

Taguchi N, Ishihara N, Jofuku A, Oka T, Mihara K (2007) Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem* 282(15): 11521-11529

Tamura Y, Endo T, Iijima M, Sesaki H (2009) Ups1p and Ups2p antagonistically regulate cardiolipin metabolism in mitochondria. *J Cell Biol* 185(6): 1029-1045

Tatsuta T, Augustin S, Nolden M, Friedrichs B, Langer T (2007) m-AAA protease-driven membrane dislocation allows intramembrane cleavage by rhomboid in mitochondria. *EMBO J* 26(2): 325-335

Thorpe GW, Fong CS, Alic N, Higgins VJ, Dawes IW (2004) Cells have distinct mechanisms to maintain protection against different reactive oxygen species: oxidative-stress-response genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* 101(17): 6564-6569

Thorsness PE, Fox TD (1993) Nuclear mutations in *Saccharomyces cerevisiae* that affect the escape of DNA from mitochondria to the nucleus. *Genetics* 134(1): 21-28

Thorsness PE, White KH, Fox TD (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(9): 5418-5426

Tieu Q, 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(2): 353-366

Tieu Q, Okreglak V, Naylor K, Nunnari J (2002) The WD repeat protein, Mdv1p, functions as a molecular adaptor by interacting with Dnm1p and Fis1p during mitochondrial fission. *J Cell Biol* 158(3): 445-452

Tondera D, Czauderna F, Paulick K, Schwarzer R, Kaufmann J, Santel A (2005) The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Sci* 118(14): 3049-3059

Tondera D, Grandemange S, Jourdain A, Karbowski M, Mattenberger Y, Herzig S, Da Cruz S, Clerc P, Raschke I, Merkwirth C, Ehse S, Krause F, Chan DC, Alexander C, Bauer C, Youle R, Langer T, Martinou JC (2009) SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J* 28(11): 1589-1600

Tondera D, Santel A, Schwarzer R, Dames S, Giese K, Klippel A, Kaufmann J (2004) Knockdown of MTP18, a novel phosphatidylinositol 3-kinase-dependent protein, affects mitochondrial morphology and induces apoptosis. *J Biol Chem* 279(30): 31544-31555

Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, Stiles L, Haigh SE, Katz S, Las G, Alroy J, Wu M, Py BF, Yuan J, Deeney JT, Corkey BE, Shirihai OS (2008) Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *Embo J* 27(2): 433-446

van der Blik AM, Koehler CM (2003) A mitochondrial rhomboid protease. *Dev Cell* 4(6): 769-770

Varadi A, Johnson-Cadwell LI, Cirulli V, Yoon Y, Allan VJ, Rutter GA (2004) Cytoplasmic dynein regulates the subcellular distribution of mitochondria by controlling the recruitment of the fission factor dynamin-related protein-1. *J Cell Sci* 117(Pt 19): 4389-4400

Verstreken P, Ly CV, Venken KJ, Koh TW, Zhou Y, Bellen HJ (2005) Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at *Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron* 47(3): 365-378

Vivancos AP, Jara M, Zuin A, Sanso M, Hidalgo E (2006) Oxidative stress in *Schizosaccharomyces pombe*: different H₂O₂ levels, different response pathways. *Mol Genet Genomics* 276(6): 495-502

Voelker DR (2005) Bridging gaps in phospholipid transport. *Trends Biochem Sci* 30(7): 396-404

Wakabayashi J, Zhang Z, Wakabayashi N, Tamura Y, Fukaya M, Kensler TW, Iijima M, Sesaki H (2009) The dynamin-related GTPase Drp1 is required for embryonic and brain development in mice. *J Cell Biol* 186(6): 805-816

Wasiak S, Zunino R, McBride HM (2007) Bax/Bak promote sumoylation of DRP1 and its stable association with mitochondria during apoptotic cell death. *J Cell Biol* 177(3): 439-450

Waterham HR, Koster J, van Roermund CW, Mooyer PA, Wanders RJ, Leonard JV (2007) A lethal defect of mitochondrial and peroxisomal fission. *N Engl J Med* 356(17): 1736-1741

Weir BA, Yaffe MP (2004) Mmd1p, a novel, conserved protein essential for normal mitochondrial morphology and distribution in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. *Mol Biol Cell* 15(4): 1656-1665

Wong ED, Wagner JA, Gorsich SW, McCaffery JM, Shaw JM, Nunnari J (2000) The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J Cell Biol* 151(2): 341-352

Wong ED, Wagner JA, Scott SV, Okreglak V, Holewinski TJ, Cassidy-Stone A, Nunnari J (2003) The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J Cell Biol* 160(3): 303-311

Yaffe MP, Harata D, Verde F, Eddison M, Toda T, Nurse P (1996) Microtubules mediate mitochondrial distribution in fission yeast. *Proc Natl Acad Sci USA* 93: 11664-11668

Yaffe MP, Stuurman N, Vale RD (2003) Mitochondrial positioning in fission yeast is driven by association with dynamic microtubules and mitotic spindle poles. *Proc Natl Acad Sci U S A* 100(20): 11424-11428

Yamaguchi R, Lartigue L, Perkins G, Scott RT, Dixit A, Kushnareva Y, Kuwana T, Ellisman MH, Newmeyer DD (2008) Opa1-mediated cristae opening is Bax/Bak and BH3 dependent, required for apoptosis, and independent of Bak oligomerization. *Mol Cell* 31(4): 557-569

Yanagida M (2002) The model unicellular eukaryote, *Schizosaccharomyces pombe*. *Genome Biol* 3(3): COMMENT2003

Yoon Y, Krueger EW, Oswald BJ, McNiven MA (2003) The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* 23(15): 5409-5420

Yoon Y, Pitts KR, Dahan S, McNiven MA (1998) A novel dynamin-like protein associates with cytoplasmic vesicles and tubules of the endoplasmic reticulum in mammalian cells. *J Cell Biol* 140(4): 779-793

Yoon Y, Pitts KR, McNiven MA (2001) Mammalian dynamin-like protein dlp1 tubulates membranes. *Mol Biol Cell* 12(9): 2894-2905

Yoon YS, Yoon DS, Lim IK, Yoon SH, Chung HY, Rojo M, Malka F, Jou MJ, Martinou JC, Yoon G (2006) Formation of elongated giant mitochondria in DFO-induced cellular senescence: involvement of enhanced fusion process through modulation of Fis1. *J Cell Physiol* 209(2): 468-480

Zhang P, Hinshaw JE (2001) Three-dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state. *Nat Cell Biol* 3(10): 922-926

Zhang Y, Chan DC (2007) Structural basis for recruitment of mitochondrial fission complexes by Fis1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 104(47): 18526-18530

Zick M, Duvezin-Caubet S, Schafer A, Vogel F, Neupert W, Reichert AS (2009a) Distinct roles of the two isoforms of the dynamin-like GTPase Mgm1 in mitochondrial fusion. *FEBS Lett* 583(13): 2237-2243

Zick M, Rabl R, Reichert AS (2009b) Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* 1793(1): 5-19

Zuchner S, Mersiyanova IV, Muglia M, Bissar-Tadmouri N, Rochelle J, Dadali EL, Zappia M, Nelis E, Patitucci A, Senderek J, Parman Y, Evgrafov O, Jonghe PD, Takahashi Y, Tsuji S, Pericak-Vance MA, Quattrone A, Battaloglu E, Polyakov AV, Timmerman V, Schroder JM, Vance JM, Battaloglu E (2004) Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat Genet* 36(5): 449-451

Zuin A, Gabrielli N, Calvo IA, Garcia-Santamarina S, Hoe KL, Kim DU, Park HO, Hayles J, Ayte J, Hidalgo E (2008) Mitochondrial dysfunction increases oxidative stress and decreases chronological life span in fission yeast. *PLoS One* 3(7): e2842

Zunino R, Schauss A, Rippstein P, Andrade-Navarro M, McBride HM (2007) The SUMO protease SENP5 is required to maintain mitochondrial morphology and function. *J Cell Sci* 120(Pt 7): 1178-1188

F. Annexes



Contents lists available at ScienceDirect

Seminars in Cell & Developmental Biology

journal homepage: www.elsevier.com/locate/semcdb



Review

OPA1 (dys)functions

Thomas Landes^a, Ingrid Leroy^a, Ambre Bertholet^a, Alan Diot^a, Farnoosh Khosrobakhsh^a, Marlène Daloyau^a, Noélie Davezac^a, Marie-Christine Miquel^{a,b}, Delphine Courilleau^a, Emmanuelle Guillou^c, Aurélien Olichon^d, Guy Lenaers^e, Laetitia Arnauné-Pelloquin^a, Laurent J. Emorine^a, Pascale Belenguer^{a**}

^a Université de Toulouse, UPS, CNRS; UMR 52412, Laboratoire Métabolisme Plasticité Mitochondries, F-31000, France

^b UPMC, Paris, F-75005, France

^c CNIO, Madrid, E-28029, France

^d Institut Claudius Regaud, Toulouse, F-31000, France

^e Institut des Neurosciences de Montpellier, F-34000, France

article info

Article history:
Available online xxx

Keywords:
Mitochondria
Apoptosis
mtDNA
ADOA
Dynamin

abstract

Mitochondrial morphology varies according to cell type and cellular context from an interconnected filamentous network to isolated dots. This morphological plasticity depends on mitochondrial dynamics, a balance between antagonistic forces of fission and fusion. DRP1 and FIS1 control mitochondrial outer membrane fission and Mitofusins its fusion. This review focuses on OPA1, one of the few known actors of inner membrane dynamics, whose mutations provoke an optic neuropathy. Since its first identification in 2000 the characterization of the functions of OPA1 has made rapid progress thus providing numerous clues to unravel the pathogenetic mechanisms of ADOA-1.

© 2009 Elsevier Ltd. All rights reserved.

Contents

1. Introduction.....	00
2. OPA1 expression.....	00
3. OPA1, mitochondrial fusion.....	00
4. OPA1, apoptosis.....	00
5. OPA1, mtDNA maintenance.....	00
6. OPA1, energetic metabolism.....	00
7. Animal models of ADOA-1.....	00
8. Conclusion.....	00
Acknowledgements.....	00
References.....	00

1. Introduction

Mitochondria form a highly dynamic reticulum which morphology varies according to cell types and contexts and depends on continuous fission and fusion of both mitochondrial outer (OM) and inner membranes (IM). In the past decade, genetic screens in yeast led to the identification of several evolutionarily conserved pro-

teins essential for the maintenance of mitochondrial morphology. In mammals, FIS1 and DRP1 drive mitochondrial fission whereas fusion involves the OM proteins Mitofusin-1 and -2 (MFN1 and MFN2), and the IM-located OPA1 [1]. Accumulating data show the impact of mitochondrial dynamics on mitochondrial functions and on the physiology of the cell [2]. Furthermore these processes are essential for mammalian development and are affected in neurodegenerative diseases.

In this review, we will focus on OPA1 and discuss to which extent the recent progresses in elucidating the different functions of this dynamin could help understanding the pathological mechanisms of type 1 optic atrophy (ADOA-1 OMIM 165500). ADOA-1 is a neurological disease caused by mutations of OPA1, that affects retinal

* Corresponding author at: Laboratoire Métabolisme Plasticité Mitochondries, Université Paul Sabatier, BAT4R3B1, 118 route de Narbonne, 31062 Toulouse cedex 09, France. Tel.: +33 5 61 55 62 38; fax: +33 5 61 55 81 66.
E-mail address: pascale.belenguer@cic.lfr (P. Belenguer).

ganglion cells (RGC) whose axons form the optic nerve, and leads to reduced visual acuity and possibly to blindness [3].

2. OPA1 expression

The **OPA1** gene encodes a mitochondrial protein localized in the inter-membrane space (IMS) and associated to mitochondrial membranes [4–7]. OPA1, and its yeast orthologues Mgm1p in *Saccharomyces cerevisiae* and Msp1p in *Schizosaccharomyces pombe*, belongs to the dynamins' family [8–11]; with which it shares three conserved regions: a GTPase domain, a middle domain and a carboxy-terminal coiled-coil domain (CC-II) also called GTPase effector domain (GED) (Fig. 1). The latter is involved in the oligomerization and activation of the dynamins. The amino-terminal region of OPA1, preceding the GTPase domain, displays a mitochondrial import sequence (MIS) followed by a predicted transmembrane domain (TM1) and a coiled-coil domain (CC-I) located downstream of alternatively spliced exons (Fig. 1).

In humans **OPA1** ORF is built from 30 exons, 3 of which (4, 4b and 5b) are alternatively spliced leading to 8 mRNA (Fig. 1) [12]. Exon 4 that is evolutionary conserved does not present any remarkable domain whereas both exons 4b and 5b that are specific to vertebrates encode hydrophobic domains (TM2a and TM2b) and the latter an additional coiled-coil region (CC-0) [13,14]. Precursors translated from the eight **OPA1** mRNA are targeted to mitochondria via their MIS which is removed upon import by the mitochondrial processing peptidase (MPP) to give rise to long isoforms (l-OPA1) [4,6]. Each l-OPA1 isoform is then subjected to a limited proteolysis generating one or two short isoforms (s-OPA1) [15]. Both short and long isoforms of OPA1 are associated to mitochondrial membranes, and it is proposed that l-OPA1 is anchored to the IM while s-OPA1, lacking TM1, is peripherally attached to the IM, a fraction of it having the possibility to diffuse in the IMS and to associate to OM [4–7,16]. Numerous and discordant studies on the generation of s-OPA1 have implicated three mitochondrial proteases recognizing two cleavage sites (Fig. 1). The rhomboid protease PARL, the mammalian counterpart of Pcp1p that cleaves Mgm1p [17], is involved in the generation of a low abundant s-OPA1 isoform soluble in the IMS [16]. However PARL does not wholly explain the processing of OPA1 since its knockdown/out does not affect the ratio of l- to s-isoforms of the dynamin [7,14,18,19]. Based on an over-expression study, the m-AAA protease paraplegin is proposed to cleave OPA1 at S1 (Fig. 1), but its knockout does not affect the processing of the protein [7,14,19]. However the contribution in OPA1 processing of two other subunits of the m-AAA complex, AFG3L1 and AFG3L2, is revealed by experiments conducted in yeast [14]. Furthermore recent data suggest that prohibitins, that regulate the activity of m-AAA proteases, modify the processing of OPA1 [20]. The i-AAA protease YME1L is responsible for cleavage at S2 (Fig. 1), and other sites [15,18]. Interestingly, l-OPA1 isoforms containing exon 4b are totally processed into short forms [15]. To make this picture more complex, the cleavage of OPA1 does not only occur in basal condition but is also induced by both apoptosis and dissipation of

mitochondrial membrane potential ($m\psi$). Loss of $m\psi$ destabilizes l-OPA1 and enhances the cleavage at S1 and at other sites not including S2 [7,15,18,19]. Increased sensitivity to apoptosis of **Parl**^{-/-} cells has been proposed to be due to an altered processing of OPA1 leading to the loss of the low abundant soluble s-OPA1 [16]. Nevertheless, nor PARL, nor m-AAA proteases, nor YME1L, totally account for the processing of the dynamin upon dissipation of $m\psi$ or apoptotic stimuli.

Although **OPA1** is ubiquitously expressed, it shows tissue specific expression patterns. High mRNA expression levels occur in retina, brain, liver, heart and pancreas and the relative abundance of the eight **OPA1** splice variants shows tissue specificity [9,12,21,22]. Furthermore, changes in the relative abundance of l- and s-OPA1 has been observed in various tissues [4,22].

Altogether, these data reveal that **OPA1** expression is highly regulated at both post-transcriptional and post-translational levels. The later indeed includes proteolytic processing but further studies will certainly also reveal the role of phosphorylation, ubiquitination and sumoylation that regulate other actors controlling mitochondrial dynamics such as DRP1 and the yeast homologue of Mitofusins Fzo1p [1].

3. OPA1, mitochondrial fusion

Loss of function of OPA1 by RNAi or gene knockout, or of Mgm1p and Msp1p, causes fragmentation of the tubular mitochondrial reticulum [5,23–26]. Conversely, over-production of this protein promotes mitochondrial elongation in cells where mitochondria are punctuated [4,27]. Surprisingly, over-expression of the dynamin in cells with tubular mitochondria causes mitochondrial fragmentation [5,28]. However, such cells still possess a normal mitochondrial fusion activity [27,29]. The profusion activity of OPA1 is further confirmed by experiments showing that mitochondrial fusion is impaired in OPA1-depleted or **Opa1**^{-/-} cells [15,26,27,29,30]. Interestingly, levels of OPA1 can differentially influence two types of fusion: a "transient fusion" that result in rapid exchange of soluble components without affecting the morphology of mitochondria and a "complete fusion" that permits the exchange of all mitochondrial components and affect mitochondrial morphology [31].

Since cleavage of l-OPA1 induced by dissipation of $m\psi$ or by apoptosis correlates with mitochondrial fragmentation [7,18,19,32], it has been initially proposed that long form of the dynamin are crucial for OPA1-mediated mitochondrial fusion while short forms are unable to fuse mitochondria [7]. This has been also proposed for Mgm1p since mitochondria from **PCP1**-deleted *Saccharomyces cerevisiae* cells lacking s-Mgm1p can fuse [33]. However, this hypothesis has not been then confirmed since both short and long forms of the dynamin are required to restore the fusion of mitochondria in **MGM1**-deleted cells [17]. Similarly, splicing variants that produce both l- and s-OPA1 have the capacity to restore defective mitochondrial fusion in **Opa1**^{-/-} cells, while those that only produce s-OPA1 do not [15]. Furthermore a non-cleavable

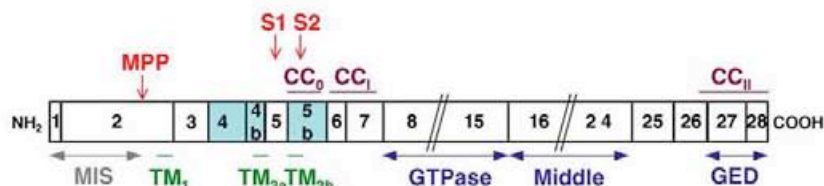


Fig. 1. Schematic representation of OPA1 structure. OPA1 shares structural features with dynamins: a GTPase domain, a Middle domain and a GTPase Effector Domain (GED) containing a coiled-coil region (CC-II). Before the GTPase domain, OPA1 displays a Mitochondrial Import Sequence (MIS) followed by a predicted transmembrane region (TM1) and a coiled-coil region (CC-I). All these domains are present in the eight splice variants of the dynamin while predicted transmembrane domains (TM2a and TM2b) and additional coiled-coil region (CC-0) are only present in spliced exons. Intra-mitochondrial proteolytic cleavage sites for Mitochondrial Processing Peptidase (MPP), Paraplegin (S1) and YME1L (S2) are indicated. Numbers correspond to OPA1 exons.

form of OPA1 is not able to induce fusion in *Opa1*^{-/-} cells and short forms can restore the capacity of this isoform to mediate fusion. However in contrast to the requirement for a combination of long and short forms in normal condition, stress induced mitochondrial hyperfusion only relies on l-OPA1 [34].

Although the two forms of the dynamin function together in fusion, their roles may be different. Long forms could be required to target the short one lacking transmembrane domain via self-interactions as recently proposed in yeast [35,36]. In yeast intragenic complementation of Mgm1p GTPase mutants with GED mutants *in vivo* have indeed indicated that oligomerization is required for the fusogenic activity of the dynamin [37]. This could occur in mammals since both GTPase and GED domains are essential for the profusion function of OPA1 [27]. Furthermore s-OPA1 can restore the capacity of a co-expressed non-cleavable form to mediate fusion in *Opa1*^{-/-} cells. In fact, the two coiled-coil domains present in all OPA1 isoforms could be responsible for the formation of homotypic complexes between distinct OPA1 molecules since synthetic CC-I and CC-II peptides homo-associated *in vitro* [22]. On the contrary CC-0 located in exon 5b has been involved in hetero-interaction with CCI.

While loss of OPA1, Mgm1p and Msp1p ultimately leads to mitochondrial fragmentation, data obtained first in yeast and recently in mammals indicate that, in accordance to its localization, the dynamin functions primarily in fusion of the inner membrane. Knockout of *Opa1* does not abolish OM fusion *ex vivo* and mitochondria depleted from Mgm1p cannot fuse *in vitro* their IM while they are competent for OM fusion [26,37]. Furthermore, accumulation of multi-matrix structures reflecting fusion of OM without IM fusion have been revealed by electron microscopy both in *Opa1*^{-/-} cells and in temperature-sensitive Mgm1p mutants. However, it should be noticed that *in vivo* yeast lacking Mgm1p show no OM fusion [38], suggesting that fusion of OM and IM is not as tightly coupled in mammals as in yeast. Furthermore OPA1, unlike Mitofusins, is indeed needed only on one mitochondrion to promote fusion between two adjacent mitochondria *ex vivo* while *in vitro* Mgm1p is required on both mitochondria for efficient fusion [26,37].

As mutation in OPA1 were linked to ADOA-1, one could wonder to what extent inactivation of OPA1-mediated fusion contributes to the pathogenesis? Fibroblasts from ADOA-1 patients possess either normal or fragmented mitochondrial networks in comparison with controls [39–41]. Interestingly, fibroblasts from adult heterozygous OPA1 mutant mice show an increased mitochondrial fragmentation [42]. Increased fragmentation of mitochondria has also been observed in cultured fibroblasts and myotubes of related patients bearing a deletion in the GTPase domain of OPA1 [43]. Since this alteration of mitochondrial shape is not associated to altered bioenergetics or increased sensitivity to apoptosis, it could be assumed that profusion activity of OPA1 *per se* is relevant in ADOA-1 pathogenesis at least in this case. Furthermore in this ADOA-1 pedigree mitochondrial fragmentation is associated with alteration of the distribution of mitochondria in myotube, with clustered organelles alternating with areas displaying sparse mitochondria. Similar alteration of mitochondrial distribution has also been observed in OPA1-silenced rat RGC [44]. These observations could be of high interest; because of its unique ultrastructural and functional peculiarities, mitochondrial distribution could be strictly regulated in the optic nerve to provide the necessary energy, or calcium buffering, at the right place and time [45].

4. OPA1, apoptosis

In addition to mitochondrial fragmentation, downregulation of OPA1, or expression of pathogenic mutants, increases cell sensitivity to spontaneous and induced apoptosis [25,30,39]. These observations lead to propose that OPA1 functions as an anti-

apoptotic protein providing link between mitochondrial dynamics and apoptosis, a subject of extensive debate. Indeed, over-expression of OPA1, by inhibiting cytochrome c release, protects cells from apoptosis induced by intrinsic stimuli [46]. Interestingly, this effect is also observed in MFN1 depleted cells, whereas fusogenic activity of OPA1 is inactivated. This indicates that OPA1 can block apoptosis independently from its role in mitochondrial fusion. Uncoupling of fusogenic and apoptotic functions of the dynamin is also observed upon knock-down of particular OPA1 splice variants, revealing that isoforms which contain exon 4 are important for mitochondrial fusion while those containing either exon 4b or 5b regulate cytochrome c release [13].

Two steps are proposed to lead to cytochrome c release: mobilization from specific stores and translocation through the OM. Scorrano and coll. have first showed that in tBID-induced apoptosis remodeling of cristae, described as cristae fusion and widening of their tubular junction, is a required step in the mobilization of cytochrome c from cristal space where most of it resides [47,48]. This was challenged by Frey and coll. that propose that the observed large-scale mitochondrial morphological alterations are secondary events dispensable for efficient release of cytochrome c [47,48]. However, cristae remodeling events have also been involved in cytochrome c mobilization in cell death triggered by BIK [49]. Recent works implicate OPA1 in the sequestration of cytochrome c within the cristal space [46,50]. This property of OPA1 is attributed to the existence of OPA1-containing complexes that maintain the structure of cristae junctions. Such complexes may contain both the long form and the PARL-cleaved form of OPA1 [46]. Upon incubation of mitochondria with proapoptotic BH3-only proteins, OPA1 complexes rapidly dissociate, leading to mobilization of cytochrome c from the intracristal space to the IMS and subsequent release through the OM into the cytosol. Over-expression of OPA1 stabilizes such complexes and inhibits tBID-induced cytochrome c mobilization [46]. Furthermore, expression of a disassembly-resistant mutant of OPA1 (Q297A) blocked the full release of cytochrome c and apoptosis [50]. Altogether, these results indicate that OPA1 assembly and disassembly regulate cytochrome c mobilization and thus release, though some uncertainties persist concerning the implication of BAX and BAK, and the role of BH3 domains in this process. Furthermore the relationships between cristae remodeling disassembly of OPA1 oligomers, and cytochrome c mobilization are subject of controversy (see for discussion [51,52]). In one model, OPA1 complexes maintain the diameter of cristae junctions in a basal state narrow enough to retained cytochrome c within the intracristal space, its mobilization into the IMS resulting from disruption of the complexes and widening of the junctions [46]. On the contrary, Yamaguchi and coll. proposed that disassembly of OPA1 complexes induce an "open state" that paradoxically corresponds to narrower cristae junction through which cytochrome c freely exits, whereas wider cristae junction containing intact OPA1 complexes might be a "closed state" [50]. However, diameter of the tubular junction (10–20 nm) is wide enough to allow passage of cytochrome c that has a hydrodynamic diameter of 3.4 nm [53]. It has thus been proposed that OPA1 complexes at the junction may act as a diffusion barrier [54]. During apoptosis, the dam is demolished, leaving holes large enough to allow passage of 60–100 kDa proteins. Alternatively, binding to cardiolipin [55], has also be proposed to cause retention of cytochrome c within the cristae. The influence of OPA1 on this process is supported by the fact that Mgm1p has been found to interact and to function with cardiolipin [35,56].

5. OPA1, mtDNA maintenance

While Mgm1p has been identified thanks to its role in mtDNA maintenance, it is only recently that OPA1 has been linked to

mtDNA stability. Missense mutations in **OPA1** cause accumulation of multiple deletions in skeletal muscle. The syndrome associated to these mutations (ADOA-1 plus) is complex, consisting of a combination of dominant optic atrophy, progressive external ophthalmoplegia, peripheral neuropathy, ataxia and deafness [57,58].

As far we know at present no rearrangement but depletion of mtDNA occurs in yeast, and conversely no mtDNA depletion is reported in the skeletal muscle of patients with "ADOA-1 plus" syndrome. However one report described that ADOA-1 patients have slightly reduced mtDNA copy number in blood lymphocyte, while no change in mtDNA copy number has been observed in ADOA-1 fibroblasts [40,59].

How do mutations in **OPA1** lead to mtDNA deletion? Early work in *Saccharomyces cerevisiae* proposed that inactivation of **mgm1-1** temperature-sensitive mutant leads to a defect in mtDNA synthesis resulting in a reduction of the number of molecules per cell at each cell division [8]. Similarly about eight generations in *S. pombe* are necessary to lose mtDNA in Msp1p conditional repression experiments, a duration roughly compatible with a dilution of preexisting nucleoids [10]. Since **OPA1** is probably not directly involved in mtDNA replication, effects on mtDNA could be related to its role in IM structuration. Electron microscopy analyses indeed show that mitochondria from **OPA1**-depleted cells have an altered internal structure [5,25]. **OPA1** inactivation, through changes in cristae morphology, could thus perturb mtDNA anchoring to the IM and thus influence its replication and expression. Disruption of nucleoid could also lead to enhanced mtDNA mutation and facilitate the clonal expansion of somatic mutations [58]. We can also imagine a role of **OPA1** in stabilizing nucleoids through interactions of its N-terminal matrix-tail with mtDNA molecules. However, Dnm1p (the yeast orthologue of DRP1) inactivation reverses both the changes in the organization of the cristae and the loss of mtDNA seen in **MGM1**-deleted yeast, suggesting that the role of Mgm1p in mtDNA maintenance may be a secondary effect of its function in mitochondrial fusion [38]. Accordingly, inactivation of Fzo1p and Ugo1p causes fragmentation of mitochondria and loss of mtDNA in a **DNM1**⁺-dependent manner [60,61]. Another possibility is that impairment of mitochondrial fusion, which is thought to be important for the maintenance of the mitochondrial functions by allowing the exchange of intra-mitochondrial content, might increase mtDNA instability, preventing damaged nucleoids from being repaired or complemented. However, we were recently able to uncouple the function of Msp1p in the control of mitochondrial morphology and genome maintenance in *S. pombe* [62]. **OPA1** is the fifth gene associated with mtDNA "breakage syndrome" together with **ANT1**, **POLG1-2** and **TYMP** [63]. Differences in GTPase activity of **OPA1** may thus affect the dGTP pool ultimately leading to mtDNA stability [57].

6. **OPA1**, energetic metabolism

Considering the similarity of clinical expression between ADOA-1 and Leber Hereditary Optic Neuropathy (LHON [64]) which is mainly due to mutations in subunits of respiratory complex I, the localization of **OPA1** in the IM the major place of oxidative phosphorylation, and its destructuration upon inactivation of the dynamin, it can be postulated that pathogenic **OPA1** mutations could lead to energetic defects. Accordingly, RNAi depleted **OPA1** cells show a severe reduction of endogenous respiration, no stimulation upon addition of uncoupler and a diminution of oxygen consumption driven by complexes I, II and IV [29]. The first data concerning the exploration of energetic metabolism consequences of **OPA1** mutations reveal a defective oxidative phosphorylation with lowered ATP production on muscle from ADOA-1 patients [65]. Then, a coupling defect of oxidative phosphorylation with activities of

complex IV and V respectively reduced and increased, and no change in ATP production has been observed in fibroblasts from ADOA-1 patients bearing various **OPA1** mutations [41]. Whereas in this study the mitochondrial defect is common to all ADOA-1 fibroblasts, these cells do not show similar mitochondrial morphology modifications suggesting that the pathophysiology of ADOA-1 could be related to a mitochondrial energetic defect rather than to the impairment of mitochondrial structure. However the existence and the nature of the energetic defect in ADOA-1 patients appears controversial. It is indeed not found in mitochondria of lymphoblastoid cells lines derived from ADOA-1 patients [66], nor in muscle biopsies of patients harboring a deletion in the GTPase domain of **OPA1** [43]. Zanna and coll. have shown that complex I-driven ATP synthesis is reduced in ADOA-1 patients [40]. In this study, interactions between **OPA1**, AIF and respiratory complexes I, II and III are revealed by immuno-precipitation, providing a potential link between **OPA1** mutations and the respiratory chain defect.

7. Animal models of ADOA-1

Mitochondrial network abnormalities, bioenergetic failure, increased apoptosis have all been proposed as possible causes of ADOA-1. Recent development of *in vivo* models of the disease should provide new insights in understanding the physiopathological processes leading to ADOA-1.

Two **Opa1** mouse models carrying an in frame deletion of 27 amino acids or a premature stop codon in the GTPase domain have been recently published [42,67]. Both **Opa1** homozygous mouse mutants are lethal at early stage of embryogenesis, whereas viable heterozygous mutant mice express an age-dependant disease with progressive loss of RGC, variable degeneration of the ganglion cells and fiber layer, reduced number of axons, swelling or abnormal shape and myelination of axons, as well as functional reduction in visual function. Although the timing of the disease varies between humans and mice, both **Opa1** models recapitulate crucial features of ADOA-1 in humans and will thus be useful for the development of therapeutic strategies. In both models the amount of full-length **OPA1** is reduced to 50% of that seen in wild-type animals while shortened mutant proteins are undetectable. This observation supports haploinsufficiency as a disease mechanism in ADOA-1. By preventing import, mutations in the two first **OPA1** exons that form the MIS, may act by such a mechanism, as do null or quasi null mutations ([68–70] see also e**OPA1** database; <http://lbbma.univ-angers.fr/eOPA1>). Further supporting a haploinsufficiency mechanism, **OPA1** transcripts containing premature termination codons are unstable being probably degraded by nonsense-mediated decay, while missense mutations as well as in frame mutation do not lead to reduction of the mutant transcript [71]. Diminished level of **OPA1** could thus be, depending on the mutation, due to altered level of mRNA or instability of the protein as reported by Alavi and coll. [67]. While haploinsufficiency is thought to be the main pathomechanism in ADOA-1, dominant negative effect also contributes to the pathogenesis. We indeed have described in fibroblasts from ADOA-1 patients that while a truncation of the last 58 amino acid of **OPA1** leads to a 50% drop of the levels of the dynamin no change is observed for a missense mutation in the GTPase domain, suggesting that in the later case dominant negative effects could cause the disease [39]. Dominance negativity has also been proposed for multi-systemic forms of the disease that are all linked to missense mutations affecting the GTPase domain [57,58]. Interestingly, fibroblasts from adult heterozygous **Opa1** mutant mice show an increased mitochondrial fragmentation [42]. Furthermore in the same **Opa1** mouse model, increased level of autophagy is observed in RGC [72]. It has been recently proposed that mitochondria undergoing autophagy have

reduced $m \cdot$ and decreased levels of OPA1, and that fragmentation of the mitochondrial network facilitates this process [73]. Thus, pathogenic mutations of OPA1 by impairing fusion, contributing to depolarization and decreasing OPA1 levels, could result in deregulated autophagy which in turn contributes to the pathogenesis of ADOA-1.

In the last years some invertebrate models bearing OPA1 mutations have been developed. In *Caenorhabditis elegans* mutations of the OPA1 orthologue, *eat-3*, cause mitochondrial fragmentation and inner membrane septa accumulation in matrix, both suggesting defect in fusion, as well as hypersensitivity to oxidative stress but no evidence for increased cell death [74]. Homozygous mutations of *dOpa1*, the drosophila ortholog of OPA1, result in embryonic lethality and cause rough and glossy eyes phenotypes in somatic clones of adult flies by two distinct pathogenic pathways [75]. Rough eye phenotype is caused by increased apoptosis of lattice cells in developing ommatidial structure while glossy eyes phenotype is caused by a more tardive loss of the cone and pigment cells associated with increased ROS production. Heterozygous mutations result in a shortened lifespan, increased production of ROS, sensitivity to oxidative stress, defects in activity of respiratory chain complexes, aberrant mitochondrial structures as well as heart, skeletal muscle and eyes dysfunctions of which the later is partially reversed by antioxidant treatments [76,77]. In accordance recent studies show that OPA1 mutations affect other organs besides the retina in human and mouse [57,58,78–80]. These data suggest that OPA1 mutations could cause multiple organ abnormalities and furthermore indicate that the pathogenesis could be organ specific. Interestingly both invertebrate models emphasize the critical generation of ROS associated to OPA1 dysfunction, as it was proposed for LHON, and point to a possible treatment for ADOA-1.

8. Conclusion

Numerous data have recently accumulated on the essential role of OPA1 in mitochondria. This dynamin-related protein plays role in mitochondrial fusion, cristae structuration, apoptosis and mtDNA maintenance (Fig. 2), probably reflecting its capacity to modulate IM organization and therefore activities of IM-associated proteins. However there are still gaps in our understanding of the molecular mechanisms underlying these functions. Anti-apoptotic function of OPA1 has been related to its capacity to retain cytochrome c within cristal space by forming oligomers at the cristae junction. Nevertheless, regulation of OPA1 oligomers assembly and disassembly is still unknown. We also do not know how OPA1 induce mitochondrial fusion although studies in yeast could enlighten this point. Another major challenge will be to unravel the mechanisms by which OPA1 may affect mtDNA integrity. Finally, although much has still to be discovered on OPA1 functions, understanding the relationship between OPA1 dysfunction and ADOA-1 should benefit from the recent growing knowledge on this protein.

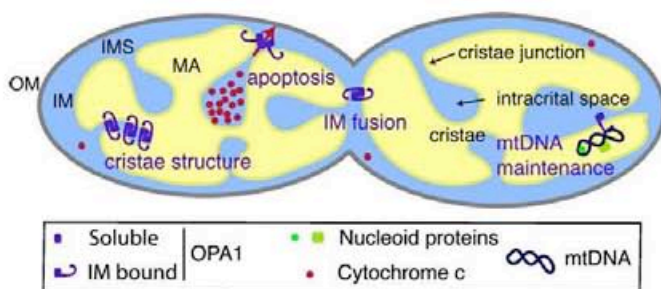


Fig. 2. Cartoon depicting the mitochondrial functions of OPA1.

Acknowledgements

We are indebted to the invaluable support from the following associations: Rétina France, AFM, AMMi, ARC, LNCC and UNADV. EG, AD, TL, AO were recipients of a fellowship from ARC LNCC and FRM.

References

- [1] Liesa M, Palacin M, Zorzano A. Mitochondrial dynamics in mammalian health and disease. *Physiol Rev* 2009;89:799–845.
- [2] Detmer SA, Chan DC. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2007;8:870–9.
- [3] Amati-Bonneau P, Milea D, Bonneau D, Chevrollier A, Ferre M, Guillet V, et al. OPA1-associated disorders: phenotypes and pathophysiology. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1855–65.
- [4] Ollichon A, Emorine LJ, Descoins E, Pelloquin L, Bricchese L, Gas N, et al. The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space. *FEBS Lett* 2002;523:171–6.
- [5] Griparic L, van der Wel NN, Orozco JJ, Peters PJ, van der Blik AM. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem* 2004;279:18792–8.
- [6] Satoh M, Hamamoto T, Seo N, Kagawa Y, Endo H. Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;300:482–93.
- [7] Ishihara N, Fujita Y, Oka T, Mihara K. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J* 2006;25:2966–77.
- [8] Jones BA, Fangman WL. Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev* 1992;6:380–9.
- [9] Delettre C, Lenaers G, Griffoin JM, Gigarel N, Lorenzo C, Belenguer P, et al. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* 2000;26:207–10.
- [10] Pelloquin L, Belenguer P, Menon Y, Ducommun B. Identification of a fission yeast dynamin-related protein involved in mitochondrial DNA maintenance. *Biochem Biophys Res Commun* 1998;251:720–6.
- [11] Praefcke GJ, McMahon HT. The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* 2004;5:133–47.
- [12] Delettre C, Griffoin JM, Kaplan J, Dollfus H, Lorenz B, Faivre L, et al. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet* 2001;109:584–91.
- [13] Ollichon A, Elachouri G, Baricault L, Delettre C, Belenguer P, Lenaers G. OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death Differ* 2007;14:682–92.
- [14] Duvezin-Gaubert S, Koppen M, Wagener J, Zick M, Israel L, Bernacchia A, et al. OPA1 processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria. *Mol Biol Cell* 2007;18:3582–90.
- [15] Song Z, Chen H, Fiket M, Alexander C, Chan DC. OPA1 processing controls mitochondrial fusion and is regulated by mRNA splicing, membrane potential, and Yme1L. *J Cell Biol* 2007;178:749–55.
- [16] Cipolat S, Rudka T, Hartmann D, Costa V, Serneels L, Craessaerts K, et al. Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* 2006;126:163–75.
- [17] Herlan M, Vogel F, Bornhord C, Neupert W, Reichert AS. Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem* 2003;278:27781–8.
- [18] Griparic L, Kanazawa T, van der Blik AM. Regulation of the mitochondrial dynamin-like protein Opa1 by proteolytic cleavage. *J Cell Biol* 2007;178:757–64.
- [19] Guillery O, Malka F, Landes T, Guillou E, Blackstone C, Lombes A, et al. Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol Cell* 2008;100:315–25.
- [20] Merkwirth C, Langer T. Prohibitin function within mitochondria: essential roles for cell proliferation and cristae morphogenesis. *Biochim Biophys Acta* 2009;1793:27–32.
- [21] Alexander C, Votruba M, Pesch UE, Thiselton DL, Mayer S, Moore A, et al. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* 2000;26:211–5.
- [22] Akepati VR, Muller EC, Otto A, Strauss HM, Portwich M, Alexander C. Characterization of OPA1 isoforms isolated from mouse tissues. *J Neurochem* 2008;106:372–83.
- [23] Wong ED, Wagner JA, Gorsich SW, McCaffery JM, Shaw JM, Nunnari J. The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J Cell Biol* 2000;151:341–52.
- [24] Guillou E, Bousquet C, Daloyau M, Emorine LJ, Belenguer P. Msp1p is an intermembrane space dynamin-related protein that mediates mitochondrial fusion in a Dnm1p-dependent manner in *S. pombe*. *FEBS Lett* 2005;579:1109–16.
- [25] Ollichon A, Baricault L, Gas N, Guillou E, Valette A, Belenguer P, et al. Loss of OPA1 perturbs the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis. *J Biol Chem* 2003;278:7743–6.
- [26] Song Z, Ghochani M, McCaffery JM, Frey TG, Chan DC. Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol Biol Cell* 2009;20:3525–32.

- [27] Cipolat S, de Brito OM, Dal Zilio B, Scorrano L. OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc Natl Acad Sci USA* 2004;101:15927–32.
- [28] Misaka T, Miyashita T, Kubo Y. Primary structure of a dynamin-related mouse mitochondrial GTPase and its distribution in brain, subcellular localization, and effect on mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 2002;277:15834–42.
- [29] Chen H, Chomyn A, Chan DC. Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* 2005;280:26185–92.
- [30] Lee YI, Jeong SY, Karbowski M, Smith CL, Youle RJ. Roles of the mammalian mitochondrial fission and fusion mediators *fis1*, *drp1*, and *opa1* in apoptosis. *Mol Biol Cell* 2004;15:5001–11.
- [31] Liu X, Weaver D, Shirihai O, Hajnoczky G. Mitochondrial 'kiss-and-run': Interplay between mitochondrial motility and fusion-fission dynamics. *EMBO J* 2009;28:3074–89.
- [32] Duvezin-Caubet S, Jagasia R, Wagener J, Hofmann S, Trifunovic A, Hansson A, et al. Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J Biol Chem* 2006;281:37972–9.
- [33] Sesaki H, Southard SM, Hobbs AE, Jensen RE. Cells lacking Pcp1p/Ugo2p, a rhomboid-like protease required for Mgm1p processing, lose mtDNA and mitochondrial structure in a Dnm1p-dependent manner, but remain competent for mitochondrial fusion. *Biochem Biophys Res Commun* 2003;308:276–83.
- [34] Tondera D, Grandemange S, Jourdain A, Karbowski M, Mattenberger Y, Herzog S, et al. SLP-2 is required for stress-induced mitochondrial hyperfusion. *EMBO J* 2009;28:1589–600.
- [35] DeVay RM, Dominguez-Ramirez L, Lackner LL, Hoppins S, Stahlberg H, Nunnari J. Coassembly of Mgm1 isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion. *J Cell Biol* 2009;186:793–803.
- [36] Zick M, Duvezin-Caubet S, Schaefer A, Vogel F, Neupert W, Reichert AS. Distinct roles of the two isoforms of the dynamin-like GTPase Mgm1 in mitochondrial fusion. *FEBS Lett* 2009;583:2237–43.
- [37] Meeusen S, DeVay R, Block J, Cassidy-Stone A, Wayson S, McCaffery JM, et al. Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* 2006;127:383–95.
- [38] Sesaki H, Southard SM, Yaffe MP, Jensen RE. Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell* 2003;14:2342–56.
- [39] Olichon A, Landes T, Arnaune-Pelloquin L, Emorine LJ, Mils V, Guichet A, et al. Effects of OPA1 mutations on mitochondrial morphology and apoptosis: relevance to ADOA pathogenesis. *J Cell Physiol* 2007;211:423–30.
- [40] Zanna C, Ghelli A, Porcelli AM, Karbowski M, Youle RJ, Schimpf S, et al. OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. *Brain* 2008;131:352–67.
- [41] Chevrollier A, Guillet V, Loiseau D, Gueguen N, de Crescenzo MA, Vemy C, et al. Hereditary optic neuropathies share a common mitochondrial coupling defect. *Ann Neurol* 2008;63:794–8.
- [42] Davies VI, Hollins AJ, Piechota MJ, Yip W, Davies JR, White KE, et al. Opa1 deficiency in a mouse model of autosomal dominant optic atrophy impairs mitochondrial morphology, optic nerve structure and visual function. *Hum Mol Genet* 2007;16:1307–18.
- [43] Spinazzi M, Cazzola S, Bortolozzi M, Baracca A, Loro E, Casarin A, et al. A novel deletion in the GTPase domain of OPA1 causes defects in mitochondrial morphology and distribution, but not in function. *Hum Mol Genet* 2008;17:3291–302.
- [44] Kamei S, Chen-Kuo-Chang M, Cazeville C, Lenaers G, Olichon A, Belenguer P, et al. Expression of the opa1 mitochondrial protein in retinal ganglion cells: its downregulation causes aggregation of the mitochondrial network. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2005;46:4288–94.
- [45] Lenaers G, Reynier P, Elachouri G, Soukkaireh C, Olichon A, Belenguer P, et al. OPA1 functions in mitochondria and dysfunctions in optic nerve. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1866–74.
- [46] Frezza C, Cipolat S, Martins de Brito O, Micaroni M, Beznoussenko GV, Rudka T, et al. OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* 2006;126:177–89.
- [47] Scorrano L, Ashiya M, Buttke L, Weiler S, Oakes SA, Mannella CA, et al. A distinct pathway remodels mitochondrial cristae and mobilizes cytochrome c during apoptosis. *Dev Cell* 2002;2:55–67.
- [48] Sun MG, Williams J, Munoz-Pinedo C, Perkins GA, Brown JM, Ellisman MH, et al. Correlated three-dimensional light and electron microscopy reveals transformation of mitochondria during apoptosis. *Nat Cell Biol* 2007;9:1057–65.
- [49] Germain M, Mathai JP, McBride HM, Shore GC. Endoplasmic reticulum BIK initiates DRP1-regulated remodeling of mitochondrial cristae during apoptosis. *EMBO J* 2005;24:1546–56.
- [50] Yamaguchi R, Lartigue L, Perkins G, Scott RT, Dixit A, Kushnareva Y, et al. Opa1-mediated cristae opening is Bax/Bak and BH3 dependent, required for apoptosis, and independent of Bak oligomerization. *Mol Cell* 2008;31:557–69.
- [51] Scorrano L. Opening the doors to cytochrome c: changes in mitochondrial shape and apoptosis. *Int J Biochem Cell Biol* 2009;41:1875–83.
- [52] Yamaguchi R, Perkins G. Dynamics of mitochondrial structure during apoptosis and the enigma of Opa1. *Biochim Biophys Acta* 2009;1787:963–72.
- [53] Mirkin N, Jaconcic J, Stojanoff V, Moreno A. High resolution X-ray crystallographic structure of bovine heart cytochrome c and its application to the design of an electron transfer biosensor. *Proteins* 2008;70:83–92.
- [54] Perkins G, Bossy-Wetzell E, Ellisman MH. New insights into mitochondrial structure during cell death. *Exp Neurol* 2009;218:183–92.
- [55] Ow YP, Green DR, Hao Z, Mak TW. Cytochrome c: functions beyond respiration. *Nat Rev Mol Cell Biol* 2008;9:532–42.
- [56] Meglè G, McQuibban GA. The dynamin-related protein mgm1p assembles into oligomers and hydrolyzes GTP to function in mitochondrial membrane fusion (dagger). *Biochemistry* 2009;48:1774–84.
- [57] Amati-Bonneau P, Valentino ML, Reynier P, Gallardo ME, Bornstein B, Boissiere A, et al. OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain* 2008;131:338–51.
- [58] Hudson G, Amati-Bonneau P, Blakely EL, Stewart JD, He L, Schaefer AM, et al. Mutation of OPA1 causes dominant optic atrophy with external ophthalmoplegia, ataxia, deafness and multiple mitochondrial DNA deletions: a novel disorder of mtDNA maintenance. *Brain* 2008;131:329–37.
- [59] Kim JY, Hwang JM, Ko HS, Seong MW, Park BJ, Park SS. Mitochondrial DNA content is decreased in autosomal dominant optic atrophy. *Neurology* 2005;64:966–72.
- [60] Sesaki H, Jensen RE. UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J Cell Biol* 2001;152:1123–34.
- [61] Bleazard W, McCaffery JM, King EJ, Bale S, Mozdy A, Tieu Q, et al. The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol* 1999;1:298–304.
- [62] Diot A, Guillou E, Daloyau M, Arnaune-Pelloquin L, Emorine LJ, Belenguer P. Transmembrane segments of the dynamin Msp1p uncouple its functions in the control of mitochondrial morphology and genome maintenance. *J Cell Sci* 2009;122:2632–9.
- [63] Spinazzola A, Zeviani M. Disorders from perturbations of nuclear-mitochondrial intergenomic cross-talk. *J Intern Med* 2009;265:174–92.
- [64] Carelli V, La Morgia C, Iommarini L, Carroccia R, Mattiazzi M, Sangiorgi S, et al. Mitochondrial optic neuropathies: how two genomes may kill the same cell type? *Biosci Rep* 2007;27:173–84.
- [65] Lodi R, Tonon C, Valentino ML, Iotti S, Clementi V, Malucelli E, et al. Deficit of in vivo mitochondrial ATP production in OPA1-related dominant optic atrophy. *Ann Neurol* 2004;56:719–23.
- [66] Mayorov VI, Lowrey AJ, Biousse V, Newman NJ, Cline SD, Brown MD. Mitochondrial oxidative phosphorylation in autosomal dominant optic atrophy. *BMC Biochem* 2008;9:22.
- [67] Alavi MV, Bette S, Schimpf S, Schuettauf F, Schraermeyer U, Wehrl HF, et al. A splice site mutation in the murine Opa1 gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. *Brain* 2007;130:1029–42.
- [68] Marchbank NJ, Craig JE, Leek JP, Toohey M, Churchill AJ, Markham AF, et al. Deletion of the OPA1 gene in a dominant optic atrophy family: evidence that haploinsufficiency is the cause of disease. *J Med Genet* 2002;39:e47.
- [69] Pesch UE, Leo-Kottler B, Mayer S, Jurklics B, Kellner U, Apfelstedt-Sylla E, et al. OPA1 mutations in patients with autosomal dominant optic atrophy and evidence for semi-dominant inheritance. *Hum Mol Genet* 2001;10:1359–68.
- [70] Fuhrmann N, Alavi MV, Bitoun P, Woernle S, Auburger G, Leo-Kottler B, et al. Genomic rearrangements in OPA1 are frequent in patients with autosomal dominant optic atrophy. *J Med Genet* 2009;46:136–44.
- [71] Schimpf S, Fuhrmann N, Schaich S, Wissinger B. Comprehensive cDNA study and quantitative transcript analysis of mutant OPA1 transcripts containing premature termination codons. *Hum Mutat* 2008;29:106–12.
- [72] White KE, Davies V, Hogan V, Piechota M, Nichols P, Turnbull DM, et al. OPA1 deficiency is associated with increased autophagy in retinal ganglion cells in a murine model of dominant optic atrophy. *Invest Ophthalmol Vis Sci* 2009;50:2567–71.
- [73] Twig G, Elorza A, Molina AJ, Mohamed H, Wikstrom JD, Walzer G, et al. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *EMBO J* 2008;27:433–46.
- [74] Kanazawa T, Zappaterra MD, Hasegawa A, Wright AP, Newman-Smith ED, Buttle KF, et al. The *C. elegans* Opa1 homologue EAT-3 is essential for resistance to free radicals. *PLoS Genet* 2008;4:e1000022.
- [75] Yarosh W, Monserrate J, Tong JJ, Tse S, Le PK, Nguyen K, et al. The molecular mechanisms of OPA1-mediated optic atrophy in *Drosophila* model and prospects for antioxidant treatment. *PLoS Genet* 2008;4:e6.
- [76] Tang S, Le PK, Tse S, Wallace DC, Huang T. Heterozygous mutation of Opa1 in *Drosophila* shortens lifespan mediated through increased reactive oxygen species production. *PLoS One* 2009;4:e4492.
- [77] Shahrestani P, Leung HT, Le PK, Pak WL, Tse S, Ocorr K, et al. Heterozygous mutation of *Drosophila* Opa1 causes the development of multiple organ abnormalities in an age-dependent and organ-specific manner. *PLoS One* 2009;4:e6867.
- [78] Payne M, Yang Z, Katz BJ, Warner JE, Weight CJ, Zhao Y, et al. Dominant optic atrophy, sensorineural hearing loss, ptosis, and ophthalmoplegia: a syndrome caused by a missense mutation in OPA1. *Am J Ophthalmol* 2004;138:749–55.
- [79] Amati-Bonneau P, Guichet A, Olichon A, Chevrollier A, Viala F, Miot S, et al. OPA1 R445H mutation in optic atrophy associated with sensorineural deafness. *Ann Neurol* 2005;58:958–63.
- [80] Alavi MV, Fuhrmann N, Nguyen HP, Yu-Wai-Man P, Heiduschka P, Chinnery PF, et al. Subtle neurological and metabolic abnormalities in an Opa1 mouse model of autosomal dominant optic atrophy. *Exp Neurol* 2009;220:404–9.

AUTHOR: KHOSROBAKHSH Farnoosh

TITLE: Characterization of Msp1p an actor of the mitochondriale dynamics in fission yeast *S.pombe*

ABSTRACT :

Mitochondrial dynamics is a regulated interplay between antagonistic fission and fusion forces acting on mitochondrial membranes. This process determines mitochondrial morphology; when fission or fusion predominates, mitochondria appear as isolated dots or as a filamentous and interconnected network, respectively. Proteins that control the morphology of mitochondria have been identified. Our team has isolated and characterized Msp1p in the fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*, and its human orthologue OPA1, which control mitochondrial fusion. Furthermore we have found that mutations in the *OPA1* gene are associated with the most frequent form of autosomal dominant optic atrophy that features a progressive loss of retinal ganglion cells, often leading to blindness.

Understanding the function of the dynamin Msp1p requires identification of its partners, which was part of my thesis. To perform a genetic screen for *msp1*⁺ interactors, I generated a thermosensitive (ts) mutant of *msp1*⁺ (Msp1P300S) by homology to a ts substitution described at a position conserved in other dynamins. The mutation was integrated at the *msp1*⁺ locus by homologous recombination. I then characterized this mutant to search for conditions of lethality. At restrictive temperature, the mutant had fragmented mitochondria when grown on respiratory, glucose-containing medium, and further showed altered respiration and increased ROS production on non-fermentable ethanol/glycerol-containing medium. Perturbation of colony pigmentation in *ade6* background, which relates to mitochondrial dysfunctions, and lethality on non-fermentable galactose-containing media, were also observed. As a perspective, we plan to take advantage of this latter property to screen a cDNA library for the presence of multicopy suppressors of thermoletality. In addition to this work, we have studied the mechanisms of maturation of Msp1p, which is processed into a long and a short isoform (l- and s-Msp1p) during its biogenesis. Using mutants of various mitochondrial proteases, we demonstrated that the two isoforms of Msp1p are independently formed from the same precursor and that generation of s-Msp1p implicates Rhomboid 1. Furthermore, we showed that the m-AAA protease Paraplegin might control the stability of l-Msp1p. These proteases mutants were also used to study the proteolysis of the eight OPA1 splicing variants heterologously expressed in *S. pombe*. Most of these variants were only processed by Paraplegin, a finding that could allow to precise contradictory results obtained in mammals where Yme1p and Rhomboid 1 were implicated in the maturation of OPA1.

Together, my thesis works will allow to better understand the mode of action of Msp1p in mitochondrial functions and to identify new actors and regulators of mitochondrial dynamics possibly implicated in orphan mitochondrial pathologies.

KEY WORDS: Mitochondria, mitochondrial dynamics, *S. pombe*, yeast, Msp1p, Mgm1p, OPA1

ADDRESS: Université Paul Sabatier - CNRS UMR5241 / UMR5088 - IFR109
Bâtiment 4R3 B1 - 118, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE

AUTEUR: KHOSROBAKHS Farnoosh

TITRE: Caractérisation de Msp1p, un acteur de la dynamique mitochondriale chez la levure à fission

DIRECTRICE DE THÈSE : BELENGUER Pascale

LIEU ET DATE DE SOUTENANCE : 09 Juillet 2010, salle de conférences de l'IFR 109, Toulouse

RESUME

Notre équipe s'intéresse à la dynamique mitochondriale, qui contrôle la forme des mitochondries et régule leurs principales fonctions, et dont l'altération provoque des pathologies neurodégénératives. Ce processus correspond à l'établissement d'un équilibre dynamique entre des forces de fusion et de fission des mitochondries. Quand la force de fission est prépondérante les mitochondries apparaissent sous formes de dots isolés les uns des autres. À l'inverse si la force de fusion prédomine les mitochondries apparaissent sous la forme d'un réseau de filaments plus ou moins longs et interconnectés. Récemment, de nombreuses protéines qui contrôlent la dynamique mitochondriale ont été identifiées. Dans notre équipe il a été isolé puis caractérisé l'une d'entre elle, Msp1 chez la levure à fission et OPA1 son homologue humain. Msp1/OPA1 contrôle la fusion des mitochondries et la mort des cellules. Les mutations de OPA1 provoquent une atrophie optique dominante de type 1, qui touche le nerf optique et peut conduire à la cécité.

Le sujet de thèse qui m'a été confié concerne l'isolement et la caractérisation de partenaires génétiques de Msp1. Pour cela un préalable était requis : disposer d'un mutant thermosensible de la dynamine. Au cours de la première moitié de ma thèse, j'ai construit un mutant thermosensible de Msp1 porteur d'une mutation du domaine GTPase (P300S) par recombinaison homologue. J'ai ensuite caractérisé ce mutant et recherché des conditions de létalité induites par l'inactivation de Msp1. J'ai montré que cette souche est affectée dans la morphologie de ses mitochondries, sa respiration et présente une sensibilité accrue au stress oxydatif. J'ai également montré que cette souche est incapable de proliférer en milieu galactose ce qui m'a permis de mettre au point un crible génétique visant à isoler des supprimeurs multicopies de la létalité induite par l'inactivation de Msp1. En parallèle à ces travaux, j'ai contribué à l'étude des mécanismes de protéolyse de Msp1p. Msp1p existe chez la levure sous deux isoformes : une forme longue (l-msp1) issue du clivage par la peptidase mitochondriale lors de l'import de la dynamine et une forme courte (s-msp1p) dont la formation était inconnue. A l'aide de mutants de différents protéases mitochondriales que nous avons construits, nous avons montré que la protéase Rhomboïde 1 est impliquée dans la formation de s-msp1p, et que la m-AAA protéase, Paraplégine, contrôle la stabilité de la forme l-msp1p. Nous avons également utilisé ces mutants pour caractériser les mécanismes de protéolyse des huit variants d'épissage d'OPA1, que nous avons surexprimés chez ces levures. Pour la plupart des variants d'épissage, la m-AAA protéase, contrairement aux protéases Yme1p et Rhomboïde 1, est impliquée dans le clivage de la dynamine, permettant de revisiter certains résultats contradictoires parus dans la littérature.

Mes travaux de thèse pourraient déboucher sur une meilleure compréhension du rôle de Msp1 et permettre d'identifier de nouveaux acteurs et régulateurs de la dynamique mitochondriale qui pourraient constituer de nouveaux gènes candidats pour des pathologies mitochondriales.

MOTS-CLES : Mitochondrie, dynamique mitochondriale, *S. pombe*, levure, Msp1p, Mgm1p, OPA1

DISCIPLINE : GÈNES, CELLULES ET DÉVELOPPEMENT

ADRESSE DU LABORATOIRE : Université Paul Sabatier - CNRS UMR5241 / UMR5088 - IFR109
Bâtiment 4R3 B1 - 118, route de Narbonne - 31062 TOULOUSE