



# THESE

En vue de l'obtention du

## DOCTORAT DE L'UNIVERSITÉ DE TOULOUSE

Délivré par l'Université Toulouse III - Paul Sabatier  
Discipline ou spécialité : *Biologie cellulaire et moléculaire*

---

Présentée et soutenue par *Diot Alan*  
Le 11 avril 2011

Titre : *Relations structure/fonction de la dynamine mitochondriale Msp1: étude de ses relations avec la membrane interne et de ses activités biochimiques*

---

### JURY

Mme Nathalie Bonnefoy, DR CNRS, UPR 2167, Gif sur Yvette  
Mr Patrice Xavier Petit, DR CNRS, UMR 8104, Paris  
Mr Guy Lenaers, DR CNRS, INSERM U583, Montpellier  
Mr Alain Milon, Professeur d'Université, Toulouse III  
Mr Laurent Emorine, DR CNRS, UMR 5547, Toulouse

Rapporteur  
Rapporteur  
Examineur  
Président  
Directeur de thèse

---

Ecole doctorale : *Biologie Santé Biotechnologie de Toulouse*  
Unité de recherche : *UMR5547*  
Directeur(s) de Thèse : *Mr Laurent Emorine*



## Remerciements

Je tiens à remercier en premier lieu les membres du jury Mme Bonnefoy, Mr Lenaers, Mr Milon et Mr Petit d'avoir accepté de juger ce travail.

Un grand merci à Laurent pour ces nombreuses années où tu m'as fait profiter de ton expérience et de ton esprit critique aussi bien dans la science que sur notre société !

Au risque d'être redondant avec les étudiants qui m'ont précédé, merci Pascale pour ton soutien de tous les moments et ta disponibilité qui font chaud au cœur.

Je tiens aussi à remercier l'ensemble des membres de l'équipe des plus anciens (Laetitia, Marie-Christine, Noélie, Valérie) aux plus jeunes (Aurélié, Stéphanie, Thomas D., Oriane)...je parlais d'ancienneté dans l'équipe bien sûr !! Une petite pensée pour ceux que j'ai connu pendant la thèse et qui sont partis vers d'autres horizons (Thomas L., Delphine, Farnoosh, Ingrid).

Un merci spécial à celles que je n'ai pas encore citées et avec qui j'ai passé beaucoup de temps au labo et toujours dans la bonne humeur : Marlène et Ambre (désolé Marlène il faudra t'occuper d'Ambre toute seule maintenant...bon courage !).

Je remercie les membres des différents labos auxquels j'ai appartenu et ceux auxquels je n'ai pas appartenu mais avec qui j'ai pu boire quelques bières (les Gadaux, Gaëlle, Vanessa, Stéphane, Coralie, JC).

Bien sûr au cours de la thèse les amis sont importants qu'ils soient toulousains (Romain et Isa, Thomas et Magalie, Alexandre (d'Ambre)) ou Gersoïs (Nico et Jenny, Flo, Guitou, Nadine et Dédé, Annick et Yo).

Parmi ces amis, spéciale dédicace à Benjamin pour les raquettes sans raquettes, la rando-escalade et bien sûr les aventures à l'étranger, à Barcelone, en Ecosse ou évidemment en Equateur...c'était lollifun !

Enfin merci à ma chérie qui m'a supporté et encouragé pendant la fin de thèse et à ceux qui sont là depuis le début, ma famille et en particulier ma maman qui m'a toujours soutenu dans mes choix.



## TABLE DES MATIERES

<b>INTRODUCTION</b> .....	<b>1</b>
<b>I-I. Les dynamines</b> .....	<b>3</b>
I-I.1 Fonctions cellulaires .....	4
a – Trafic vésiculaire.....	4
b – Fission d’organelles .....	4
c – Fusion d’organelles .....	5
d – Cytokinèse .....	5
e – Activité antivirale et réponse immunitaire .....	5
I-I.2 Structure protéique.....	7
a – Les dynamines conventionnelles.....	7
b – Les dynamines apparentées.....	8
I-I.3 Mécanisme d’action des dynamines conventionnelles .....	8
a – Auto-assemblage .....	8
b – Activité GTPase .....	9
c – Rôle des dynamines dans la fission membranaire: mode d’action .....	11
d – Partenaires des dynamines .....	13
<b>I-II. Les mitochondries</b> .....	<b>17</b>
I-II.1 Ultra-structure mitochondriale.....	17
I-II.2 Le protéome mitochondrial.....	18
a – Composante mitochondriale.....	18
b – Composante nucléaire.....	19
I-II.3 Fonctions cellulaires.....	21
a – Phosphorylation oxydative .....	21
b – Rôle métabolique: cycle de Krebs, $\beta$ -oxydation des acides gras, le fer .....	23
c – Apoptose .....	23
I-II.4 La cardiolipine, un phospholipide spécifique de la mitochondrie.....	24
a – Un phospholipide unique .....	24
b – Biosynthèse et remodelage de la cardiolipine .....	25
c – Importance cellulaire de la cardiolipine.....	27
<b>I-III. Morphologie et dynamique mitochondriale</b> .....	<b>31</b>
I-III.1 Les acteurs de la fission mitochondriale.....	31
a – Les acteurs essentiels ; Dnm1/Drp1 et Fis1 .....	31
b – Autres acteurs de la fission mitochondriale .....	33
c – Mécanismes d’action de Dnm1/Drp1 .....	35
d – Existe-t-il une machinerie de fission de la membrane interne ? .....	35
I-III.2 Les acteurs de la fusion mitochondriale .....	37
a – Les acteurs essentiels de la fusion de la ME; les mitofusines Fzo1/Mfn1/Mfn2 .....	37
b – Les acteurs essentiels de la fusion de la MI; la dynamine OPA1/Mgm1/Msp1 .....	39
c – Les autres acteurs de la fusion.....	40
d – Mécanismes d’action de la dynamine OPA1/Msp1/Mgm1 .....	41
I-III.3 Pertinence fonctionnelle de la dynamique mitochondriale .....	44
a – Le maintien du génome mitochondrial .....	44
b – Structure des crêtes et apoptose .....	45
c – L’adaptation métabolique .....	46
d – Distribution cellulaire des mitochondries.....	47
e – Neuro-dégénérescence et développement.....	48
<b>I-IV. Thématique et développements de la recherche</b> .....	<b>49</b>

<b>RESULTATS .....</b>	<b>53</b>
<b>R-I. Interactions de Msp1 avec les membranes: rôle dans le contrôle de la morphologie des mitochondries et le maintien de leur génome .....</b>	<b>53</b>
R-I.1 Déterminants structuraux des interactions de Msp1 avec les membranes .....	53
R-I.2 Implication de TM1 et TM2 dans les fonctions de Msp1 .....	55
R-I.3 Effets dominants négatifs des mutants des domaines TM1 et TM2 de Msp1 .....	57
R-I.4 Biogenèse et expression des isoformes l-Msp1 et s-Msp1 .....	59
<b>R-II. Msp1 et enzymes du remodelage des phospholipides membranaires .....</b>	<b>63</b>
<b>R-III. Propriétés biochimiques de Msp1 .....</b>	<b>69</b>
R-III.1 Mise au point et caractérisation du système in vitro .....	69
a - Production, purification et incorporation de Msp1 dans des liposomes .....	69
b - Caractérisation de l'interaction de Msp1 avec les liposomes .....	70
R-III.2 Organisation de domaines membranaires .....	73
a - Msp1 et activité peroxydase du cytochrome c .....	73
b - Effets de Msp1 sur la formation de bicouches planes supportées .....	75
a - Msp1 favorise le mélange des phospholipides .....	77
b - La présence de Msp1 sur deux liposomes opposés inhibe le mélange des phospholipides .....	77
c - Msp1 induit l'hémifusion des liposomes .....	78
R-III.4 Activité GTPase de Msp1 .....	79
a - La forme s-Msp1 possède une activité GTPase .....	79
c - Auto-assemblage de Msp1 .....	82
<b>DISCUSSION.....</b>	<b>85</b>
<b>D-I. Msp1 module l'organisation des membranes .....</b>	<b>85</b>
<b>D-II. Incorporation de Msp1 purifiée dans des liposomes mimant la membrane interne .....</b>	<b>87</b>
<b>D-III. Msp1 induit l'hémifusion des membranes, une étape précoce de la fusion membranaire.....</b>	<b>87</b>
<b>D-IV. L'hémifusion induite par Msp1 est indépendante des domaines GTPase et GED .....</b>	<b>89</b>
<b>D-VII. OPA1/Mgm1/Msp1: mécanoenzyme ou commutateur moléculaire? .....</b>	<b>95</b>
<b>PERSPECTIVES.....</b>	<b>99</b>
<b>P-I. Msp1 et enzymes du remodelage lipidique .....</b>	<b>99</b>
<b>P-II. Etude de l'activité GTPase de l-Msp1 .....</b>	<b>100</b>
<b>P-III. Identification de SIM3; relations avec l'hémifusion .....</b>	<b>100</b>
<b>P-IV. Propriétés de l-Msp1 et s-Msp1 sur la même membrane.....</b>	<b>101</b>
<b>P-V. Msp1 et organisation membranaire .....</b>	<b>102</b>
<b>P-VI. Relation structure/fonctions de Msp1; effets des mutants in vivo .....</b>	<b>103</b>
<b>P-VII. Recherche et caractérisation de partenaires de Msp1 .....</b>	<b>103</b>
<b>P-VIII. Conclusions.....</b>	<b>105</b>

<b>MATERIEL ET METHODES.....</b>	<b>107</b>
<b>I. Méthodes <i>in vitro</i>.....</b>	<b>107</b>
I.1 Production et purification des protéines.....	107
a-Culture des bactéries et production des protéines.....	107
b-Solubilisation des protéines.....	107
c-Purification.....	107
I.2 Liposomes.....	108
I.3 Test de flottaison des liposomes.....	108
I.4 Test d'oligomérisation.....	109
I.5 Test d'association aux liposomes.....	109
I.6 Digestion à la protéinase K.....	109
I.7 Test de fusion.....	110
I.8 Test d'activité GTPase.....	110
I.9 Test « Protein-lipid overlay ».....	111
I.10 Activité peroxydase du cytochrome c.....	112
<b>II. Méthodes spécifiques à <i>S.pombe</i>.....</b>	<b>113</b>
II.1 Maintien et croissance des souches.....	113
a-Milieus.....	113
b-Culture et conservation des souches.....	114
c-Test en goutte.....	114
II.2 Transformation.....	114
a-Vecteurs utilisés.....	114
b-Transformation par électroporation.....	115
c-Chimio-transformation pour recombinaison homologue.....	115
II.3 PCR sur colonie.....	116
II.4 Observation des levures en microscopie à fluorescence.....	117
<b>III. Techniques relatives à l'ADN.....</b>	<b>118</b>
III.1 Préparation d'ADN plasmidique.....	118
III.2 Digestion enzymatique.....	118
III.3 Préparation d'ADN génomique de <i>S.pombe</i> (protocole de Nurse).....	118
III.4 Southern Blot.....	119
a-Digestion de l'ADN génomique et préparation des sondes.....	119
b-Migration de l'ADN digéré sur gel d'agarose et transfert sur filtre.....	119
c-Marquage des sondes.....	120
d-Hybridation.....	121
III.5 Amorces utilisées.....	122
<b>IV. Techniques relatives aux protéines.....</b>	<b>123</b>
IV.1 Extraits Protéiques totaux de levure <i>S.pombe</i> .....	123
IV.2 SDS PAGE.....	123
IV.3 Précipitation TCA-acétone.....	124
<b>BIBLIOGRAPHIE.....</b>	<b>125</b>
<b>ANNEXE I : .....</b>	<b>141</b>
<b>ANNEXE II : .....</b>	<b>151</b>

## LISTE DES FIGURES

### Introduction

Figure I-1. Les dynamines sont impliqués dans une variété de fonctions cellulaires.....	2
Figure I-2. Organisation structurale des dynamines et du domaine GTPase. ....	6
Figure I-3. Organisation d'anneaux de dynamine au cou de vésicules d'endocytose. ....	9
Figure I-4. Assemblage des dynamines. ....	10
Figure I-5. Les partenaires des dynamines. ....	12
Figure I-7. Les crêtes mitochondriales. ....	16
Figure I-6. Ultrastructure mitochondriale.....	17
Figure I-8. Diversité de la morphologie des crêtes. ....	18
Figures I-9. Les complexes d'import mitochondriaux TOM et TIM.....	20
Figure I-10. La chaîne respiratoire mitochondriale. ....	22
Figure I-11. Cardiolipine et courbure des membranes.....	24
Figure I-12. Voie de biosynthèse de la cardiolipine. ....	26
Figure I-13. Les voies de remodelage de la cardiolipine. ....	26
Figure I-14. La cardiolipine est nécessaire au fonctionnement d'un ensemble de protéines mitochondriales.....	28
Figure I-15. Morphologie mitochondriale et type cellulaire. ....	31
Figure I-16. Les acteurs essentiels de la fission Dnm1/Drp1 et Fis1.....	32
Figure I-17. Le mécanisme de fission mitochondriale.....	34
Figure I-18. Les mitofusines.....	36
Figure I-19. La dynamine OPA1/Mgm1/ Msp1.....	38
Figure I-20. Topologie et fonction d'Ugo1. ....	40
Figure I-21. Les isoformes longues et courtes d'OPA1/Mgm1/Msp1.....	42

### Résultats

Figure R-1. Rôle de TM1 et TM2 dans l'association et la localisation de Msp1 à la membrane. ....	52
Figure R-2. Les domaines TM1 et TM2 sont essentiels à la fonction de Msp1.....	54
Figure R-3. Msp1 <sup>ΔTM1</sup> et Msp1 <sup>ΔTM2</sup> ou Msp1 <sup>mutTM2</sup> ont un effet dominant négatif sur la morphologie du réseau mitochondrial.....	56
Figure R-4. Msp1 <sup>ΔTM2</sup> et Msp1 <sup>mutTM2</sup> exercent un effet dominant négatif sur le maintien du génome mitochondrial.....	58
Figure R-5. Importance du rapport l-Msp1/s-Msp1 dans le contrôle de la morphologie du réseau mitochondrial. ....	60
Figure R-6. Délétion des gènes <i>acp6</i> et <i>mtPLase</i> . ....	62
Figure R-7. Vérification de la délétion du gène <i>acp6</i> . ....	64
Figure R-8. La perte ou le gain de fonction des gènes <i>mtPL</i> et <i>Acp6</i> n'a pas d'effet sur la croissance des levures <i>S. pombe</i> . ....	67
Figure R-9. Purification de l-Msp1 et de s-Msp1 et de leurs mutants. ....	68
Figure R-10. Analyse en DLS des liposomes.....	70
Figure R-11. l-Msp1 et s-Msp1 sont associées aux liposomes mimant la membrane interne. ....	70

Figure R-12. l-Msp1 et s-Msp1 ont une affinité préférentielle pour la cardiolipine.....	71
Figure R-13. l-Msp1 et s-Msp1 sont exposées sur la face externe des liposomes.....	71
Figure R-14. L'association de Msp1 avec les liposomes reproduit celle observée avec les membranes mitochondriales <i>in vivo</i> .....	72
Figure R-15. Msp1 n'influence pas l'activité peroxydase du cytochrome c associé aux liposomes de composition lipidique similaire à la MI.....	73
Figure R-17. Le calcium favorise la formation de bicouches en absence de Msp1.....	74
Figure R-18. Msp1 favorise l'étalement de bicouches supportées.....	74
Figure R-16. L'environnement lipidique module l'activité peroxydase du cytochrome c.....	75
Figure R-19. Msp1 favorise la fusion de liposomes en présence d'une dose suboptimale de calcium.....	76
Figure R-20. Msp1 favorise la fusion des liposomes quand elle est présente sur une des deux membranes apposées mais l'inhibe quand elle est présente sur les deux membranes.....	78
Figure R-21. Msp1 induit l'hémifusion des membranes.....	78
Figure R-23. Activité GTPase de l-Msp1.....	80
Figure R-22. s-Msp1 développe une activité GTPase dépendante de son domaine GED.....	81
Figure R-24. Les nucléotides à guanine n'ont pas d'effet sur l'hémifusion induite par Msp1.....	82
Figure R-25. L'hémifusion induite par Msp1 ne dépend pas des domaines GTPase ou GED.....	82
Figure R-26. Msp1 ne s'autoassemble pas dans notre système expérimental.....	83

## **Discussion**

Figure D-1. Modèle de fusion membranaire.....	88
Figure D-2. Mgm1/OPA1 et organisation de la cardiolipine au sein d'une bicouche.....	90
Figure D-3. Le site d'interaction membranaire SIM3.....	94
Figure D-4. Modèle d'action de Msp1.....	96

## LISTE DES ABREVIATIONS

ADNmt : ADN mitochondrial  
ACP6 : Lysophosphatic acid phosphatase-6  
CL : Cardiolipine  
Cox : Cytochrome oxydase  
Fzo1 : Fuzzy ognion 1  
GED : Effecteur du domaine GTPase  
GST : Glutathion-S-adénosyl transférase  
IMS : Espace intermembranaire  
Mfn : Mitofusine  
Mgm1 : Mitochondrial genome maintenance-1  
Msp1 : Mgm1 de *Schizosacharomyces pombe*  
ME : Membrane externe  
MI : Membrane interne  
MTS : Mitochondrial targeting sequence  
Domaine NBAR : N-terminal amphipathic helix Bin/Amphiphysin/Rvs-homology domain  
NBD-PE : 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl phosphatidyl ethanolamine  
NBD-Rho : 7-nitrobenz-2-oxa-1,3-diazol-4-yl rhodamine  
OPA1 : Optic atrophy-1  
PC : phosphatidyl choline  
PE : phosphatidyl ethanolamine  
PI : phosphatidyl inositol  
PI4,5P2 : phosphatidyl inositol 4,5 di-phosphate  
PH : Plecstrin homology  
PS : phosphatidyl serine  
PLA : Phospholipase A  
PLC : Phospholipase C  
PRD : Domaine riche en proline  
SH3 : Sarc Homology  
SIM3 : Site d'interaction membranaire-3  
TIM : Translocase of the inner membrane  
TOM : Translocase of the outer membrane

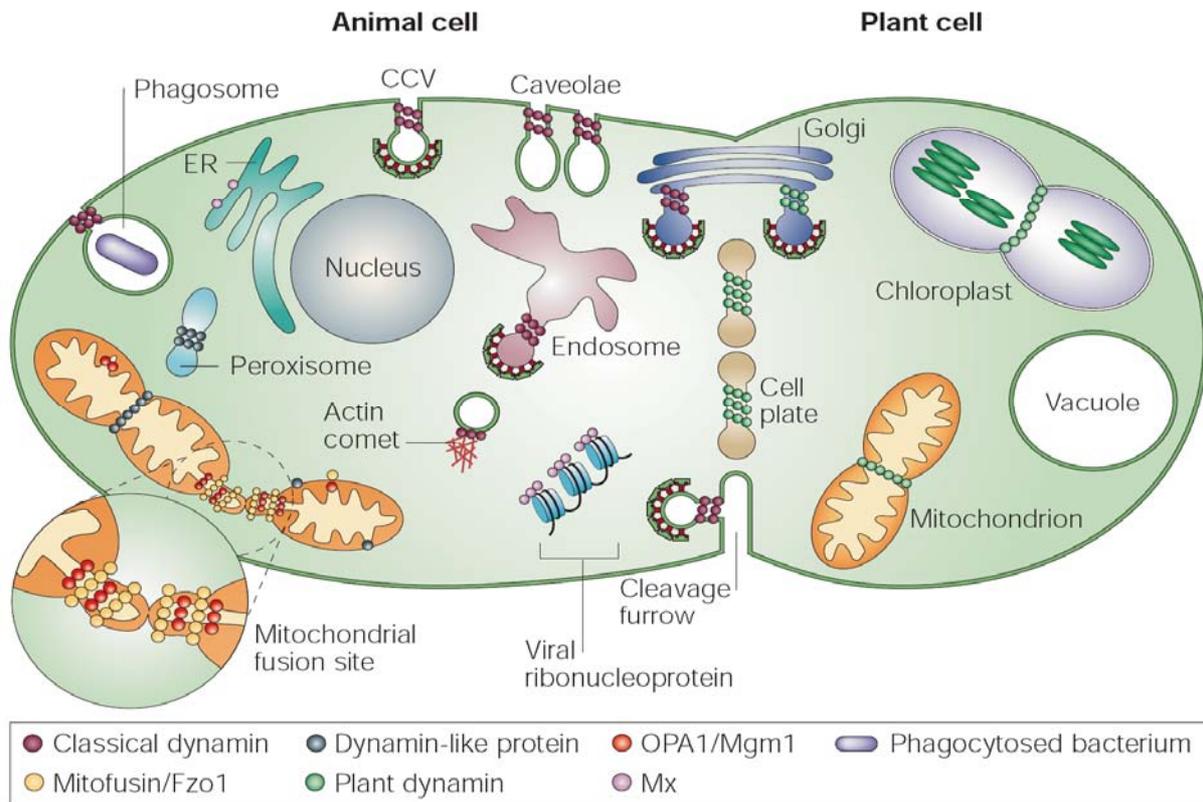
## Introduction

Les mitochondries sont des organites cytoplasmiques délimités par une membrane externe et une membrane interne. Elles sont le siège de la respiration, ou phosphorylation oxydative, qui est la principale source d'énergie cellulaire. Le catabolisme des sucres et des acides gras, fournissant substrats et cofacteurs à la chaîne respiratoire, a également lieu dans les mitochondries qui participent aussi à la biosynthèse des nucléotides, des acides aminés, des phospholipides et des noyaux Fer/Soufre. Ces propriétés, jointes à leur rôle dans la régulation des flux calciques, font des mitochondries un centre de contrôle et de régulation de l'homéostasie cellulaire, ce qui se traduit chez les eucaryotes supérieurs par leur implication dans les processus de mort cellulaire programmée ou apoptose.

La plupart de ces fonctions mitochondriales sont assurées par des protéines codées par des gènes nucléaires dont l'import dans l'organelle requiert l'intégrité des membranes mitochondriales, en particulier de la membrane interne. De plus, le génome mitochondrial qui code pour certaines enzymes de la chaîne respiratoire est contenu dans une structure nucléoprotéique, ou nucléoïde, dont le fonctionnement (réplication, réparation, transcription) dépend aussi de son association à la membrane interne. Cette membrane qui contient près de 80% de protéines, joue d'autre part un rôle majeur dans l'activité de nombreuses enzymes qui y résident ou y sont recrutées. La modulation spatiotemporelle de la structure et des propriétés des membranes mitochondriales pourrait donc avoir des répercussions majeures sur un ensemble de fonctions de l'organelle déterminant la vie ou la mort de la cellule.

La morphologie des mitochondries varie selon le type et le métabolisme cellulaires. Elles peuvent exister sous forme de grains isolés dans le cytoplasme ou former un réseau de filaments plus ou moins interconnectés. Cette variabilité de formes résulte d'un équilibre entre des événements continus de fusion et de fission des membranes de l'organelle en relation avec des mécanismes cytosquelettiques qui contrôlent la mobilité des mitochondries dans la cellule et leur ségrégation au cours de la mitose. L'ensemble de ces processus est maintenant communément appelé "dynamique mitochondriale". Dans la dernière décennie, la caractérisation des acteurs moléculaires de cette dynamique et de mutations de certains d'eux associées à des pathologies humaines, a fermement établi le rôle majeur de la dynamique mitochondriale dans le fonctionnement de l'organelle et la survie de la cellule.

Les acteurs principaux de la dynamique mitochondriale, remarquablement conservés de la levure aux mammifères, appartiennent à la famille des dynamines, de grandes GTPase qui interviennent dans un ensemble d'évènements cellulaires impliquant des remaniements



Organism	Dynamin homologue	Localization	Function
Animals and yeast	Classical dynamins	Plasma membrane, <i>trans</i> -Golgi network and endosomes	Vesicle scission
	Dlp/Dnm1	Mitochondrial outer membrane, peroxisomes	Organelle division
	OPA1/Mgm1	Mitochondrial inner membrane	Mitochondrial fusion and division
	Mitofusin/Fzo1	Mitochondrial outer membrane	Mitochondrial fusion and division
	Yeast Vps1 (a classical dynamin probably performs this function in animal cells)	<i>trans</i> -Golgi network	Vesicle scission
	MxA	Smooth endoplasmic reticulum	Viral resistance
	GBPs	Partially membrane associated	Viral resistance and antiproliferative
Plants	Atlastin1	Golgi of pyramidal neurons	Neural integrity, vesical trafficking?
	ADL1A	Cell-plate tubular network	Cytokinesis
	ADL1C	Cell plate: possibly clathrin-coated-vesicle budding	Cytokinesis
	ADL2A	Plastids	Chloroplast division
	ADL2B	Mitochondria	Mitochondrial division
	Phragmoplastin (ADL4,5)	Cell plate	Cytokinesis
	ADL6	<i>trans</i> -Golgi network	Vesicle scission
	ARC5	Chloroplasts	Chloroplast division

**Figure I-1. Les dynamines sont impliqués dans une variété de fonctions cellulaires.**

Le schéma représente les différents lieux d'action cellulaire des dynamines classiques et apparentées. Le tableau récapitule ces fonctions, les dynamines impliquées et leur localisation. D'après Praefcke & McMahon - 2004 - Nature reviews.

membranaires (endocytose, transport golgien, maturation phago-lysosomiale, migration cellulaire). Notre équipe s'intéresse au rôle et aux mécanismes d'action d'un de ces acteurs de la dynamique mitochondriale, la dynamine OPA1 chez les mammifères et son homologue Msp1 chez la levure *Schizosaccharomyces pombe*, qui intervient dans la fusion des mitochondries. Au-delà de ses effets sur la morphologie filamenteuse ou fragmentée des mitochondries, la dynamine OPA1/Msp1 joue un rôle dans le maintien du génome mitochondrial, la structure des crêtes des mitochondries, la respiration et d'autres voies du métabolisme mitochondrial nécessaires à l'homéostasie cellulaire.

L'hypothèse à la base de mon travail de thèse est donc qu'OPA1/Msp1 est capable de moduler l'ensemble de ces fonctions grâce à son rôle dans l'organisation de la membrane interne où elle réside. Les propriétés à la base de cette activité pourraient s'appuyer sur celles des dynamines classiques, c'est-à-dire une action mécanique due à son association avec les membranes et potentiellement modulée par son activité GTPase, promouvant des changements locaux d'organisation de la membrane interne. Ces possibilités ont été étudiées pour Msp1 chez levure *S. pombe*, modèle biologique simple dont le fonctionnement mitochondrial est plus proche de celui de l'homme que celui de *S. cerevisiae*.

L'introduction qui suit est organisée en quatre parties exposant les données conceptuelles sous-jacentes à nos hypothèses et au développement de la recherche. La première récapitule les connaissances sur les fonctions membranaires, la structure et les mécanismes d'action des dynamines conventionnelles, prototypes de la dynamine OPA1/Msp1. La seconde partie présente brièvement la structure des mitochondries, l'origine des protéines mitochondriales et les fonctions qu'elles assurent au sein de l'organelle. Un paragraphe met en exergue le rôle particulier dans ces fonctions de la cardiolipine, un phospholipide spécifique des membranes mitochondriales. La troisième partie détaille le concept de dynamique mitochondriale, ses acteurs et leurs mécanismes d'actions proposés, et reprend les données en faveur de sa pertinence fonctionnelle. La dernière partie expose la problématique et les hypothèses formulées quant aux mécanismes d'action de la dynamine OPA1/Msp1 pour ensuite résumer les approches mises en oeuvre et présentées dans la section résultats.

## **I-I. Les dynamines**

Les dynamines constituent une superfamille composée des dynamines «classiques» ou «conventionnelles» et des dynamines «apparentées». Ce sont des grandes GTPases dont la structure est conservée (cf. paragraphe I-2) et qui assurent de multiples fonctions cellulaires

dont la majorité requiert un remodelage membranaire (figure I-1) (Praefcke and McMahon, 2004).

### ***I-I.1 Fonctions cellulaires***

#### *a – Trafic vésiculaire*

Chez les mammifères, le trafic vésiculaire est assuré par les dynamines conventionnelles, représentées par les dynamines 1, 2 et 3. La dynamine 1 est localisée à l'extrémité pré-synaptique des neurones, la dynamine 2 est ubiquitaire (Cook et al., 1994; Sontag et al., 1994) et la dynamine 3 est retrouvée dans les cellules de Sertoli des testicules et au niveau des éléments post-synaptiques dans le cerveau (Cook et al., 1996). Les dynamines 1 et 2 sont impliquées dans l'endocytose dépendante de la clathrine, l'internalisation des cavéoles, le recyclage des endosomes et le transport golgien (Damke et al., 1994; Hinshaw, 2000; van der Blik et al., 1993). Chez *Drosophila melanogaster* et *Caenorhabditis elegans* l'ensemble de ces fonctions est assuré par une seule isoforme: Shibire et Dyn respectivement (van der Blik, 1999).

Dans les levures aucune dynamine conventionnelle n'a été trouvée. Cependant, une dynamine apparentée, Vps1, est impliquée dans l'endocytose, le trafic endosomal et vacuolaire (Smaczynska-de et al., 2010). En plus de son rôle dans la vésiculation, Vps1 est également impliquée dans la fission des peroxysomes.

#### *b – Fission d'organelles*

La dynamine apparentée Drp1, appelée Dnm1 chez les levures *Schizosaccharomyces pombe* et *Saccharomyces cerevisiae*, intervient dans la fission mitochondriale (Bleazard et al., 1999; Smirnova et al., 2001). Elle est cytoplasmique et recrutée transitoirement à la membrane externe des mitochondries lors de leur division. Chez les mammifères, une fission des mitochondrie dépendante de Drp1 peut être observée en conditions apoptotiques (Arnoult et al., 2005; Estaquier and Arnoult, 2007). Dans les levures Dnm1 est aussi impliquée dans la fission des peroxysomes orchestrée par Vps1.

Deux dynamines apparentées sont retrouvées chez *Arabidopsis thaliana*: DRP5B et DRP3 (Zhang and Hu, 2009; Zhang and Hu, 2010). DRP5B forme un anneau discontinu au niveau du site de division du chloroplaste permettant la fission de l'organelle. DRP5B est aussi impliquée dans la division des peroxisomes. Deux isoformes de DRP3 existent chez *A. thaliana* et sont localisées au niveau des peroxisomes et des mitochondries dont elles assurent la fission.

### *c – Fusion d'organelles*

Les mitofusines 1 et 2, Mfn1 et Mfn2, sont des dynamines apparentées ancrées dans la membrane externe des mitochondries. Elles jouent un rôle dans le rapprochement et la fusion des mitochondries (Eura et al., 2003). Un seul homologue assurant cette fonction est retrouvé chez les levures *S. pombe* et *S. cerevisiae*; Fzo1 (Hermann et al., 1998).

La fusion mitochondriale fait également intervenir OPA1, un membre de la famille des dynamines localisé à la membrane interne (Olichon et al., 2003), dont les homologues sont Mgm1 et Msp1, dans les levures *S. cerevisiae* et *S. pombe* respectivement (Guillou et al., 2005; Sesaki et al., 2003b). Msp1 et OPA1 ont été initialement identifiées et caractérisées au laboratoire. A l'inverse de Drp1 qui favorise la fission des mitochondries et sensibilise à l'apoptose, Opa1 stimule la fusion mitochondriale et protège de l'apoptose (Olichon et al., 2003).

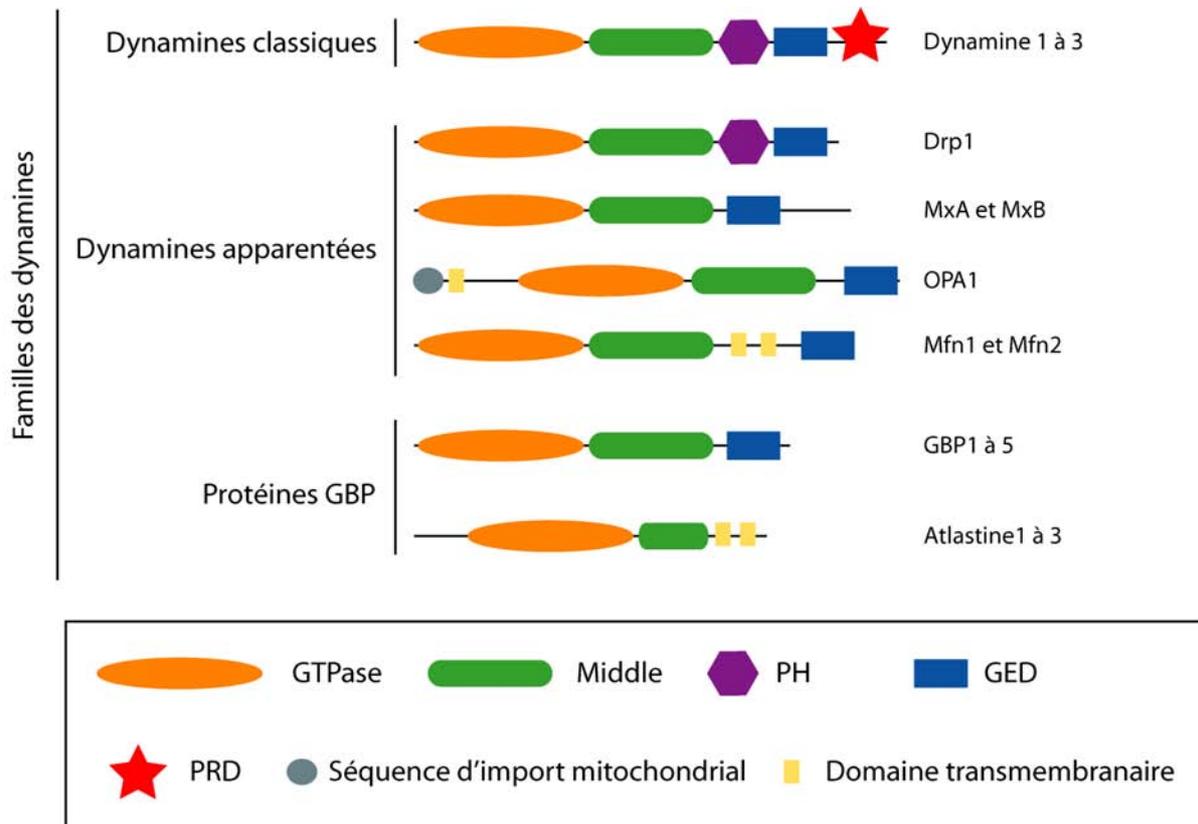
### *d – Cytokinèse*

La dynamine 1, outre son rôle dans le trafic vésiculaire, joue un rôle dans la division cellulaire. Elle est retrouvée le long du fuseau mitotique durant la métaphase, puis colocalise avec les microtubules au niveau de l'anneau contractile en anaphase. Elle est aussi présente au niveau du pont intercellulaire dans les derniers stades de cytokinèse (Thompson et al., 2002). Chez *C. elegans*, la déplétion par RNAi de la dynamine bloque les phases tardives de cytokinèse. Chez les plantes, Drp1 permet la formation et l'expansion de structures tubulaires au niveau de la zone de cytokinèse. Ces structures résultent d'une fusion homotypique de vésicules redirigées à partir du trafic golgien et permettent la synthèse de la nouvelle membrane destinée à séparer les futures cellules filles (Konopka et al., 2006).

### *e – Activité antivirale et réponse immunitaire*

Les dynamines apparentées Mx sont réparties en cinq sous-groupes en fonction de leur structure primaire. L'expression de ces protéines est induite par des infections virales contre lesquelles elles assurent une certaine protection en interférant avec des composants essentiels de l'assemblage des virions, comme de MxA qui séquestre les protéines de la nucléocapside. Chez l'homme MxA est localisée dans le cytoplasme associée aux membranes du compartiment intermédiaire RE-Golgi. MxB est localisée au niveau des pores nucléaires où elle régulerait le transport nucléo-cytoplasmique (Haller et al., 2007).

La dynamine apparentée hGBP1 est particulière car, fait unique dans la famille des dynamines, elle hydrolyse séquentiellement le GTP puis le GDP produit pour donner du GMP (Ghosh et al., 2006). Son expression est stimulée par les interférons et les cytokines. Elle est



	G1 (P-loop)	G2 and switch 1	G3 and switch 2	G4
Dynamin1	I A V V G G Q S A G K S S V L E N F V G	S G I V T R R P L V	L V D L P G M T K V	V I T K L D L
DLP1	I V V V G T Q S S G K S S V L E S L V G	T G I V T R R P L I	L V D L P G M T K V	V I T K L D L
MxA	I A V I G D Q S S G K S S V L E A L S G	S G I V T R C P L V	L I D L P G I T R V	I L T K P D L
OPA1	V V V V G D Q S A G K T S V L E M I A Q	G E M M T R S P V K	L V D L P G V I N T	V L T K V D L
Mitofusin1	V A F F G R T S S G K S S V I N A M L W	I G H I T N C F L S	L V D S P G T D V T	L N N R W D A
GBP1	V A I V G L Y R T G K S Y L M N K L A G	V Q S H T K G I W M	L L D T E G L G D V	V W T I L R D F
Atlastin1	V S V A G A F R K G K S F L M D F M L R	N E P L T G F S W R	L M D T Q G T F D S	I F L V R D W
IIGP1	V A V T G E T G S G K S S F I N T L R G	G A A K T G V V E V	F W D L P G I G S T	V R T K V D S
p21 Ras	L V V V G A G G V G K S A L T I Q L I Q	E Y D P T I E D S Y	I L D T A G Q E E Y	V G N K C D L
EF1 $\alpha$	I V V I G H V D S G K S T T T G H L I Y	E R G I T I D I S L	I I D A P G H R D F	G V N K M D S
Consensus	GxxxxGKS T	T	DxxG	NKxD T

**Figure I-2. Organisation structurale des dynamines et du domaine GTPase.**

Le schéma du haut représente l'organisation des domaines structuraux des dynamines pour chaque membre de cette superfamille. En dessous, les 4 séquences (G1 à G4) du domaine GTPase importantes pour la liaison et l'hydrolyse du GTP sont alignées entre des membres de la famille des dynamines et d'autres GTPases. Le consensus de chaque séquence est indiqué en dessous et montre les acides aminés essentiels à la liaison et l'hydrolyse du GTP. D'après Praefcke & McMahon - 2004 - Nature reviews.

impliquée dans la réponse immunitaire et a des effets anti-angiogéniques dans les cellules endothéliales en inhibant la prolifération, la migration et l'invasion cellulaire (Tietzel et al., 2009).

### ***I-1.2 Structure protéique***

Pour assurer l'ensemble de ces fonctions, les dynamines s'appuient sur une structure protéique conservée. Les dynamines conventionnelles sont constituées de cinq domaines: un domaine GTPase, un domaine Middle, un domaine d'homologie à la pleckstrin (PH), un domaine effecteur de l'activité GTPase (GED) et un domaine riche en proline (PRD) présents dans différentes combinaisons dans les dynamines apparentées (figure I-2).

#### *a – Les dynamines conventionnelles*

##### **Le domaine GTPase**

Le domaine GTPase est conservé dans tous les membres de la superfamille des dynamines. D'un point de vue structural, ce domaine est très similaire à celui des petites GTPase ras. Un seul GTP peut être lié et les quatre séquences consensus de liaison aux nucléotides sont retrouvées (figure I-2):

- le domaine G1 ou P-loop permet la liaison d'un phosphate: **GxxxxGKS/T**.
- le domaine G2 comprend une thréonine impliquée dans la catalyse enzymatique après la liaison du GTP.
- le domaine G3 permet de lier le phosphate  $\gamma$  par un pont hydrogène issu de la glycine de la séquence **DxxG** et est impliqué dans l'hydrolyse des nucléotides.
- le domaine G4 assure la coordination de la base et du ribose: **N/TKxD**.

##### **Le domaine Middle**

Les domaines Middle des différentes dynamines ne présentent que peu d'homologie de structure primaire mais contiennent souvent des motifs coiled-coil. Un peptide synthétique issu de ce domaine de la dynamine 1 montre effectivement une organisation en hélice  $\alpha$  et s'assemble en tétramères (Okamoto et al., 1999). Le domaine Middle est nécessaire à la tétramérisation et à l'auto-assemblage de la dynamine 1 en contactant des interactions avec le domaine GED (Gao et al., 2010; Ramachandran et al., 2007; Zhang and Hinshaw, 2001).

### **Le domaine d'homologie à la Pleckstrin (PH)**

Le domaine PH est constitué de deux feuillets  $\beta$  antiparallèles reliés par une boucle variable et suivis d'hélices  $\alpha$ . Il permet aux dynamines conventionnelles d'interagir avec les phospholipides anioniques de la membrane, en particulier les phosphoinositides (PI4,5P2) (Lee et al., 1999). L'affinité de ce domaine pour le PI4,5P2 est faible à l'état de monomère, mais augmente avec l'assemblage des dynamines (Klein et al., 1998).

### **Le domaine effecteur de l'activité GTPase (GED)**

Le domaine GED contient deux motifs coiled-coil potentiels qui ont été impliqués dans l'interaction protéine-protéine inter- et intramoléculaire (Gao et al., 2010; Ramachandran et al., 2007). Son interaction avec le domaine Middle induit la tétramérisation et l'auto-assemblage des dynamines, et celle avec le domaine GTPase stimule l'hydrolyse du GTP (Ramachandran et al., 2007; Sever et al., 1999). Le GED agit donc comme une GAP (GTPase Activating Protein) interne, en lien avec le niveau d'assemblage de la dynamine.

### **Le domaine riche en proline (PRD)**

Environ 30% des résidus de ce domaine sont des prolines, dont plusieurs sont présentes dans des sites «PxxP» de liaison avec des protéines à domaines SH3 (Sarc Homology). Il permet à la dynamine d'interagir avec l'amphiphysine, SNX9, la PLC $\gamma$ , la calcineurine, ABP1 (Actin Binding Protein 1), Grb2 et l'endophiline.

#### *b - Les dynamines apparentées*

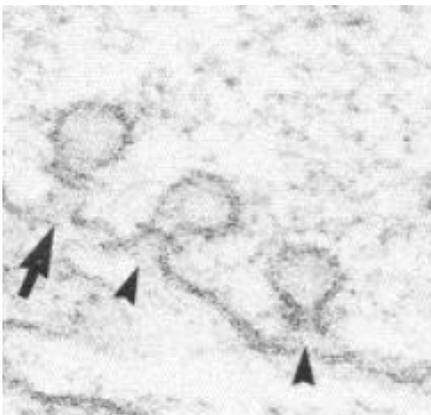
Les dynamines apparentées se différencient des dynamines conventionnelles par le fait qu'elles ne possèdent pas les cinq domaines structuraux mais en conservent trois pour la plupart: le GTPase, le GED et le Middle (figure I-2). Le domaine Middle a été impliqué, comme pour les dynamines classiques, dans l'assemblage de la dynamine apparentée Dnm1 (Ingerman et al., 2005). Les mitofusines Mfn1/Mfn2/Fzo1 et OPA1/Msp1/Mgm1 n'ont pas de domaine PH et leur association à la membrane se fait grâce à des domaines hydrophobes transmembranaires. Ces dernières sont donc des protéines résidentes de la membrane, contrairement aux dynamines classiques qui y sont recrutées transitoirement.

### ***I-1.3 Mécanisme d'action des dynamines conventionnelles***

#### *a - Auto-assemblage*

En 1989 Koenig et Ikeda (Koenig and Ikeda, 1989) ont observé des structures en hélice au cou de vésicules bourgeonnantes dans des mutants thermosensibles de *shibire* (figure I-3).

Ces observations sont les premières à avoir suggéré la propriété d'auto-assemblage des dynamines pour assurer leur fonction dans l'endocytose. Les études sur les dynamines 1 et 2 purifiées ont permis de proposer qu'en condition de force ionique physiologique (150 mM NaCl) elles existent en solution dans un équilibre entre monomères et petits oligomères (dimères à tétramères) (Binns et al., 1999). La liaison au GDP (Carr and Hinshaw, 1997) ou la diminution de la force ionique du milieu (30 mM NaCl) (Warnock et al., 1997; Warnock et al., 1996) stimule leur auto-assemblage en anneaux qui s'assemblent en hélices dans l'état de transition GDP + Pi (figure I-4, A). Ces structures de haut poids moléculaire sédimentent à 100.000 x g.



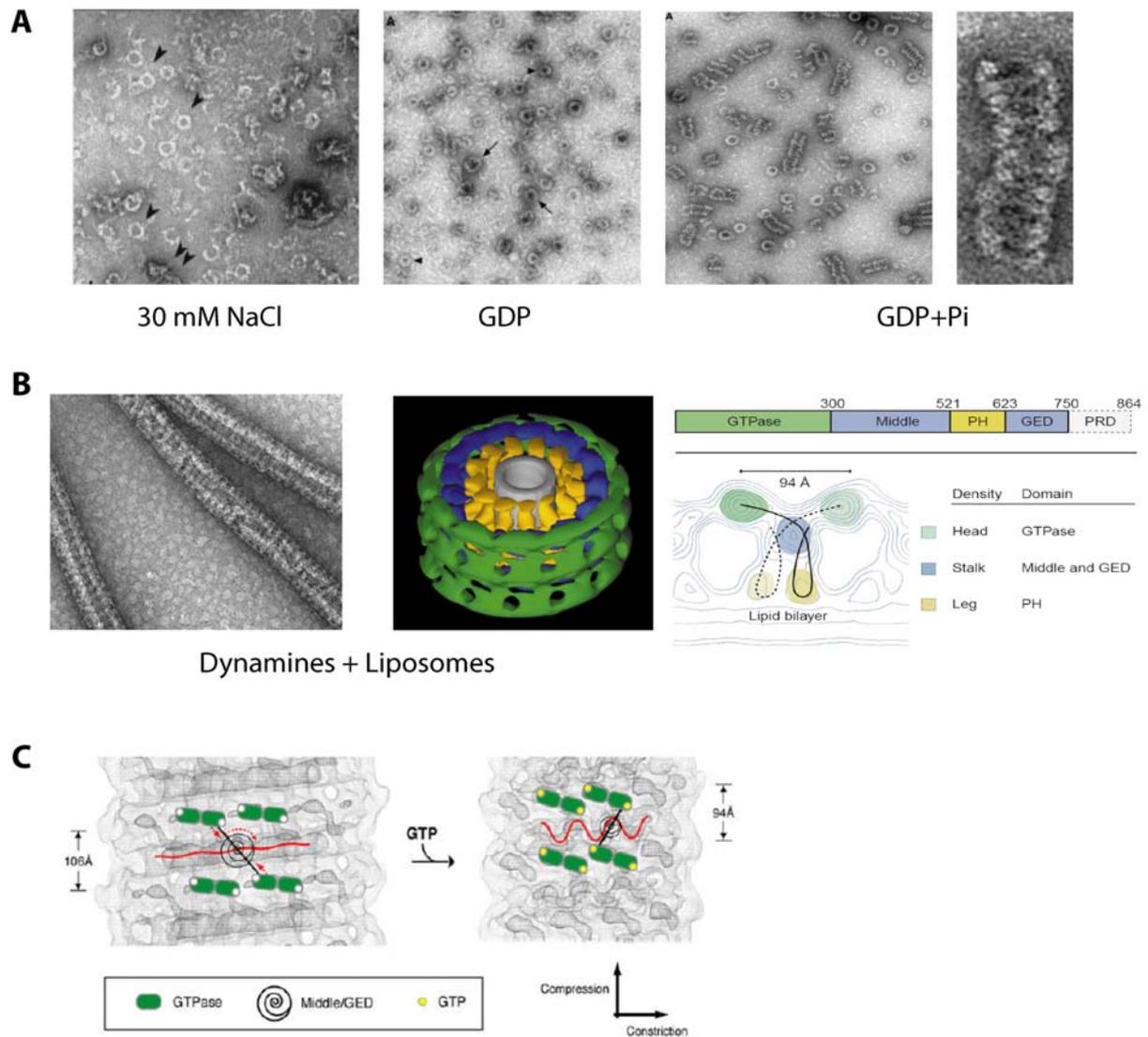
**Figure I-3. Organisation d'anneaux de dynamine au cou de vésicules d'endocytose.**

Les images en microscopie électronique montrent une organisation typique de la dynamine en collier autour du cou de la vésicule (pointe de flèche). La flèche montre une vésicule présentant un collier de deux tours de dynamines. D'après Koenig & Ikeda - 1989- J. Neurosci.

Indépendamment de la force ionique du milieu, l'auto-assemblage des dynamines conventionnelles est stimulé par l'association à des liposomes anioniques et conduit à la formation d'une spirale sur le feuillet externe des vésicules capable de contraindre les liposomes en tubule de 50 nm de diamètre environ (figure I-4, B) (Danino et al., 2004; Takei et al., 1998).

#### *b - Activité GTPase*

Bien que leurs domaines GTPases soient similaires, les dynamines classiques ont des caractéristiques enzymatiques différentes des petites GTPases (Reubold et al., 2005). Leur affinité pour le GTP (quelques dizaines de micromolaires) est en effet plus faible, mais leur capacité à hydrolyser le GTP sous forme non assemblées (activité basale) est nettement plus forte avec une constante catalytique de l'ordre de la  $\text{min}^{-1}$  contre environ  $0.02 \text{ min}^{-1}$  pour les petites GTPases. Dans cet état basal bien que le domaine GED et le domaine GTPase de la même molécule interagissent, l'activité GTPase n'est pas stimulée. L'auto-assemblage permet à deux GED de deux dynamines différentes d'interagir entre eux, stimulant ainsi de 50 à 100 fois leur activité GTPase (Sever et al., 1999; Warnock et al., 1997). Des travaux récents suggèrent que cette stimulation implique aussi des interactions entre les domaines GTPase de



**Figure I-4. Assemblage des dynamines.**

(A) Images de microscopie électronique montrant comment les dynamines en solution de faible force ionique (30 mM NaCl) ou en présence de GDP s'auto assemblent en anneaux (pointes de flèches et flèches respectivement) . L'état GDP + Pi induit l'assemblage en spirales des dynamines. (B) Image de microscopie électronique montrant des liposomes contraints en tubules en présence de dynamines. Au centre est schématisée par reconstruction 3D l'organisation des dynamines autour du tubule lipidique (gris). L'unité de base de l'assemblage est un dimère de dynamine en forme de T représenté sur la carte de densité à droite. Les lignes continues et pointillées représentent la position de chaque monomère. Celle des domaines est indiquée par le code couleur utilisé précédemment. (C) Le modèle propose un déplacement composé d'une rotation et d'une translation des domaines du domaine GTPase (vert) suite à la liaison du GTP, transmise à la membrane par la tige Middle-GED et permettant de diminuer le diamètre des tubules. D'après, Carr - 1997 - J. Biol. Chem., Danino - 2004 - J. Struct. Biol., Mears - 2007 - Structure, Warnock - 1997 - Mol. Biol. Cell, Zhang - 2001 - Nat. Cell Biol.

dynamines voisines (Chappie et al., 2010). Le retour à l'état lié au GDP suite à l'hydrolyse du GTP entraîne le désassemblage des oligomères de dynamines.

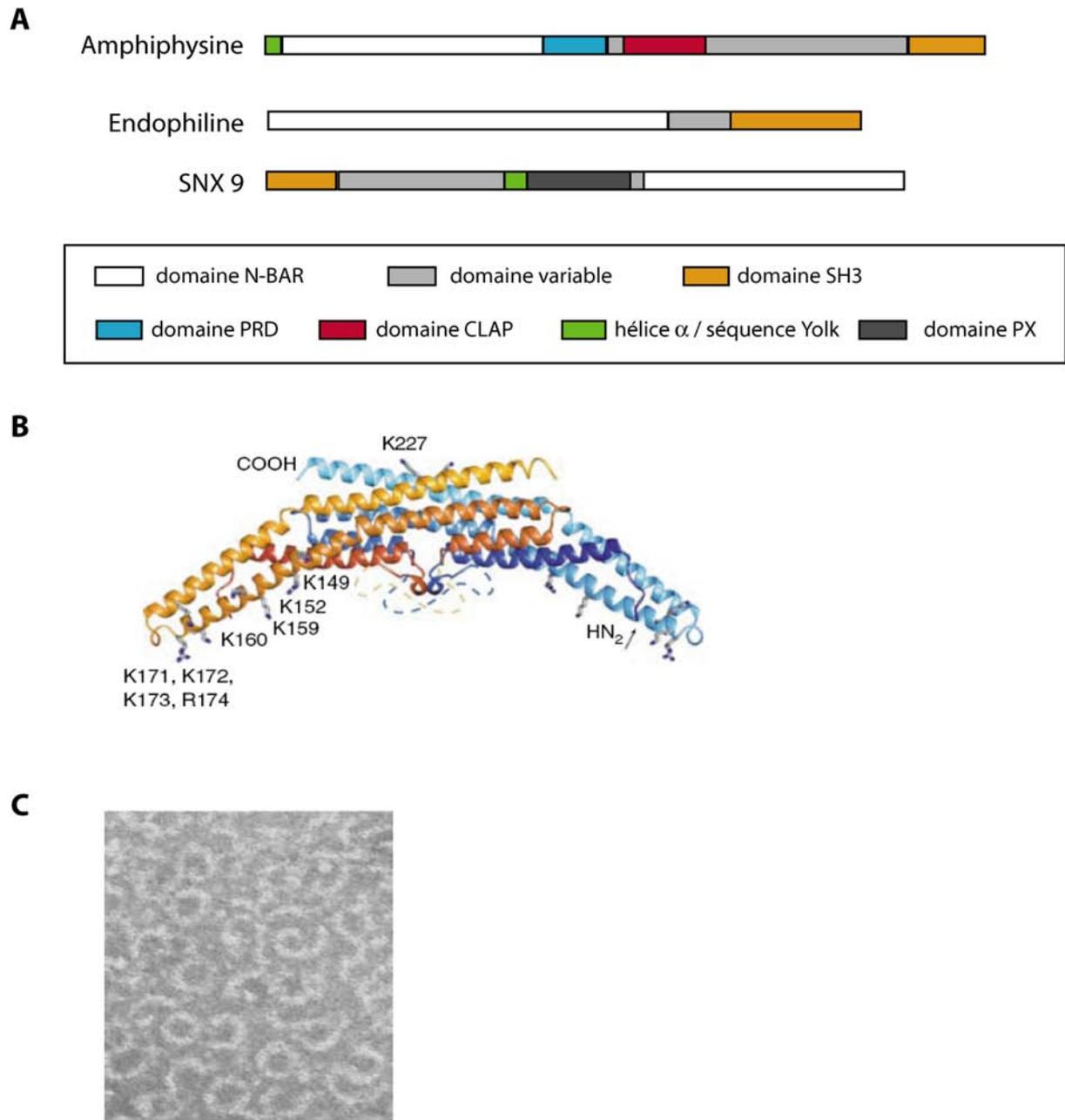
La forte activité catalytique des dynamines et leur capacité à s'auto-assembler a suggéré qu'elles fonctionnent comme mécano-enzymes par opposition aux petites GTPase qui ne possèdent pas ces propriétés et agissent comme des commutateurs moléculaires.

### *c – Rôle des dynamines dans la fission membranaire: mode d'action*

Plusieurs modèles sont proposés pour expliquer l'action des dynamines conventionnelles dans la fission membranaire. Ces modèles reposent sur l'auto-assemblage des dynamines au cou des vésicules émergente, propriété qui *in vitro* leur permet de contraindre des liposomes en tubules. Le recrutement des dynamines à la membrane dépend à la fois de l'affinité du domaine PH pour les phospholipides acides (Lee et al., 1999), et de la courbure des membranes (Roux et al., 2010), ce qui suggère que les dynamines sont recrutées après le début du bourgeonnement des vésicules. Les dynamines associées à la membrane s'organisent en une spirale composée d'unités d'assemblage qui sont des dimères ayant une forme de T; les domaines PH sont au contact de la membrane, les domaines GED et Middle forment une tige radiale et le domaine GTPase se retrouve à l'extérieur (figures I-4, B) (Chen et al., 2004; Mears et al., 2007; Zhang and Hinshaw, 2001). Il est proposé que ces dimères interagissent entre eux par le domaine GTPase mais aussi par la tige formée par les domaines GED et Middle (Chappie et al., 2010; Gao et al., 2010).

Dans le premier modèle, l'action serait purement mécanique avec un changement de conformation du domaine GTPase suite à la liaison et l'hydrolyse du GTP. L'énergie produite serait transmise par la tige GED/Middle et le domaine PH, et serait suffisante pour contraindre et déstabiliser la membrane jusqu'à la fission. Certaines observations suggèrent qu'une rotation d'environ 10° et un glissement de chaque dimère suite à l'hydrolyse du GTP permettraient un resserrement de l'hélice (figure I-4, C). Un tour d'hélice comporte alors 13 dynamines au lieu de 14 (Mears et al., 2007), ce qui entraîne une constriction de la membrane. D'autres observations suggèrent que l'hydrolyse du GTP entraîne une augmentation du pas de l'hélice (Stowell et al., 1999) et donc l'étirement et la déstabilisation du cou de la vésicule.

Le deuxième modèle passe par une réorganisation lipidique induite par le domaine PH qui en interagissant avec le PI4,5P2 provoquerait une augmentation de sa concentration locale au niveau du cou des vésicules. Ce modèle s'appuie sur les résultats obtenus pour des mutations dans ce domaine qui inhibent l'endocytose, mais n'empêchent pas la localisation de la dynamine 1 à la membrane (Bethoney et al., 2009). Il faut noter que le PI4,5P2 interagit avec



**Figure I-5. Les partenaires des dynamines.**

(A) Organisation des domaines structuraux de l'amphiphysine, l'endophiline et SNX9. (B) Vue de profil d'un dimère de domaine N-BAR (un monomère jaune-orange et un bleu) montrant la forme en croissant impliquée dans la formation ou le maintien d'une courbure membranaire. Les résidus lysines indiqués sont potentiellement importants pour la liaison à la membrane. (C) Image de microscopie électronique montrant des anneaux de dynamines et d'amphiphysine en solution. D'après Gallop - 2006 - EMBO J., Huttner - 2000 - Cur. Opin. Neurobiol., Wu - 2009 - Acta Med. okayama, Yoshida - 2004 - EMBO J.

la plupart des protéines impliquées dans la formation des vésicules recouvertes de clathrine et donc sa concentration est déjà forte au niveau du cou de ces vésicules. Il est proposé que l'hydrolyse du GTP et le changement de conformation de la dynamine associé élèverait la concentration locale de PI4,5P2 au-dessus du seuil nécessaire à la déstabilisation de la membrane (Bethoney et al., 2009).

Le dernier modèle consiste en un rôle de régulateur moléculaire similaire à celui des petites GTPases, où la conformation GTP-liée serait la conformation active et la forme GDP-liée serait inactive. Ce modèle s'appuie sur l'étude d'une mutation *shibire* qui induit une diminution de l'affinité pour le GTP, et de ses suppresseurs qui n'ont pas d'effet sur l'affinité mais réduisent l'activité catalytique (Narayanan et al., 2005). Ces suppresseurs prolongeraient l'état GTP-lié pour permettre un retour au phénotype sauvage.

Pour le moment il est impossible de discriminer entre ces modèles. Cependant aucune fission n'a jamais été observée *in vitro* en incubant seulement des liposomes avec des dynamines et du GTP, suggérant donc l'intervention de partenaires dans la fission membranaire.

#### *d - Partenaires des dynamines*

La Sorting Nexin 9 (SNX9) interagit avec les dynamines 1 et 2 grâce à un domaine SH3 et s'associe à la membrane par un domaine PX (Phox homology) d'interaction avec les phospho-inositides (figure I-5, A). Elle possède également un domaine BAR qui adopte une forme de croissant en dimérisant et lui permet d'induire et de stabiliser des courbures de la membrane (figure I-5, B). Outre ce rôle dans la formation de courbures membranaires, SNX9 stimule l'activité GTPase des dynamines en retardant le désassemblage des oligomères suite à l'hydrolyse du GTP. Il a donc été proposé que SNX9 favorise le recrutement de la dynamine au niveau des vésicules d'endocytose puis, en stabilisant les oligomères de dynamine, permette une succession de cycles GTPase et donc de constriction jusqu'à la rupture de la membrane (Bashkirov et al., 2008; Lundmark and Carlsson, 2009).

L'amphiphysine possède un domaine BAR qui jouerait le même rôle que celui de SNX9 (Peter et al., 2004), un domaine PRD, un domaine de liaison à la clathrine et d'un domaine SH3 en C-terminal (figure I-5, A) qui lui permet d'interagir avec le PRD de la dynamine. Cette dernière interaction aboutit à la formation d'anneaux constitués d'amphiphysine et de dynamine (figure I-5, C) dans lesquels l'hydrolyse du GTP est stimulée. Cette stimulation est dépendante de la courbure membranaire (Yoshida et al., 2004) (Wu et al., 2009), ce qui confère à l'amphiphysine un rôle de senseur de ces courbures dans la régulation du trafic vésiculaire.

Les endophilines interviennent dans l'endocytose des vésicules synaptiques (Verstreken et al.,

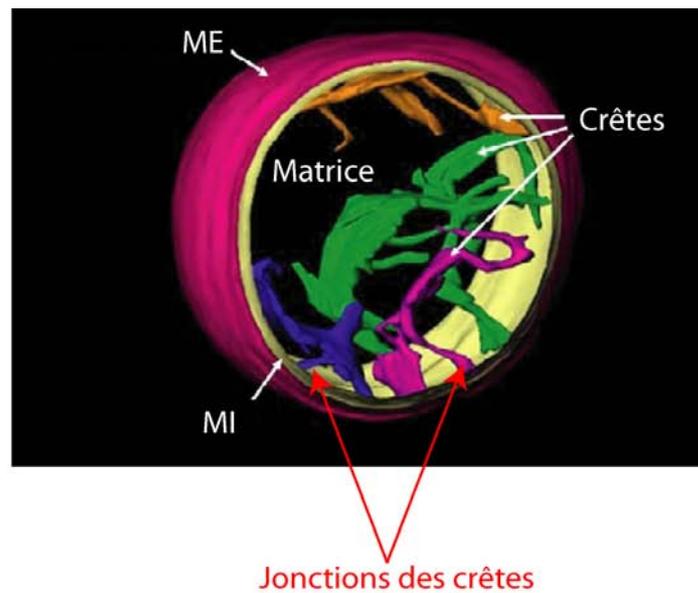
2002) en induisant des courbures membranaires grâce à leur domaine BAR N-terminal et en étant une plateforme de recrutement des constituants de la machinerie d'endocytose par un domaine SH3 C-terminal (figure I-5, A) (Bai et al., 2010; Gallop et al., 2006). Les premières études sur les endophilines purifiées suggéraient qu'elles avaient une activité acyl-transférase (Schmidt et al., 1999) (Huttner and Schmidt, 2000) qui s'est en fait avérée être co-purifiée avec ces protéines (Gallop et al., 2005). Cette activité est cependant également co-purifiée avec le domaine PH des dynamines ce qui pourrait suggérer qu'un des partenaires des dynamines soit une acyl-transférase, potentiellement impliquée dans le remodelage lipidique au site d'action des dynamines.

Deux phospholipases ont été identifiées comme partenaires des dynamines dans l'endocytose du récepteur à l'EGF. La phospholipase C $\gamma$  interagit avec le PRD de la dynamine par un domaine SH3 et joue le rôle de facteur d'échange en favorisant la dissociation du GDP et donc de nouveaux cycles d'hydrolyse du GTP (Choi et al., 2004). La phospholipase D s'associe avec la membrane grâce à un domaine PH et un domaine PX. Elle interagit avec le domaine GTPase de la dynamine liée au GTP et induit une stimulation de l'activité catalytique mais pas de l'autoassemblage (Lee et al., 2006). Dans les deux cas, la stimulation du récepteur à l'EGF induit l'interaction phospholipase/dynamine 1, ce qui provoque l'endocytose du récepteur. En plus de leur rôle dans la stimulation de l'activité GTPase des dynamines, les phospholipases, en produisant un di-glycérade ou un acide phosphatidique, peuvent modifier la composition lipidique locale de la membrane et probablement favoriser une courbure négative au niveau du cou des vésicules d'endocytose.

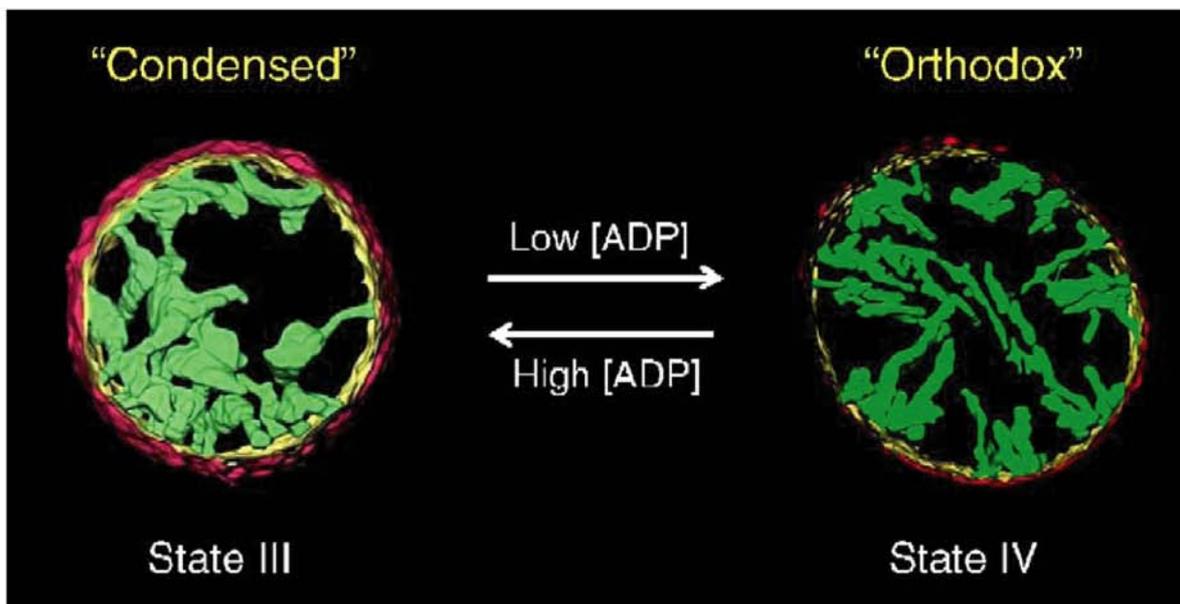
**Les dynamines sont donc des grandes GTPases qui interviennent dans de nombreuses fonctions cellulaires et dont les mécanismes d'action reposent sur un remodelage membranaire impliquant leur d'auto-assemblage et l'hydrolyse du GTP. Cependant le débat sur le mode d'action des dynamines est toujours d'actualité : s'agit-il de mécano-enzymes ou jouent-elles plutôt un rôle de commutateur moléculaire ? Il est clairement établi que la dynamine à elle seule est capable *in vitro* de contraindre mécaniquement les membranes mais pas de les faire fissionner. Le recrutement de partenaires pourrait amplifier ces contraintes en stimulant ou en s'ajoutant à l'activité des dynamines, mais aussi en diminuant les barrières énergétiques grâce à la modification de la composition lipidique membranaire locale.**

**Notre équipe s'intéresse au rôle et aux mécanismes d'action de la dynamine OPA1 et de son homologue Msp1 chez *S. pombe* qui interviennent dans la fusion des mitochondries. Je vais donc maintenant décrire les mitochondries et leurs principales fonctions.**





**B**



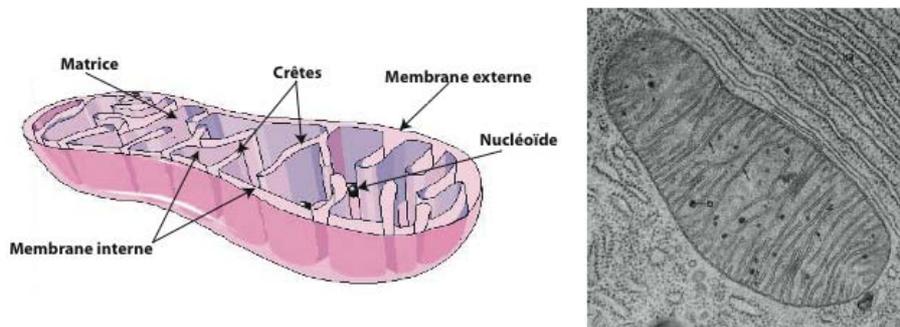
**Figure I-7. Les crêtes mitochondriales.**

(A) La reconstruction en 3D par tomographie électronique d'une mitochondrie de cellule de foie de rat montre la membrane externe (ME, rose), la membrane interne (MI, jaune) et les crêtes mitochondriales. Les crêtes sont reliées à la membrane interne par des structures tubulaires, les jonctions des crêtes, indiquées par les flèches rouges. (B) Reconstruction en 3D par tomographie électronique de mitochondries de foie de souris observées dans les états respiratoires III et IV. Dans l'état condensé les crêtes ont une forme de saccule élargi ayant plusieurs jonctions avec la MI. Dans l'état orthodoxe, les crêtes sont tubulaires et ont généralement une seule jonction avec la MI. D'après Manella - 2006 - BBA

## I-II. Les mitochondries

### I-II.1 Ultra-structure mitochondriale

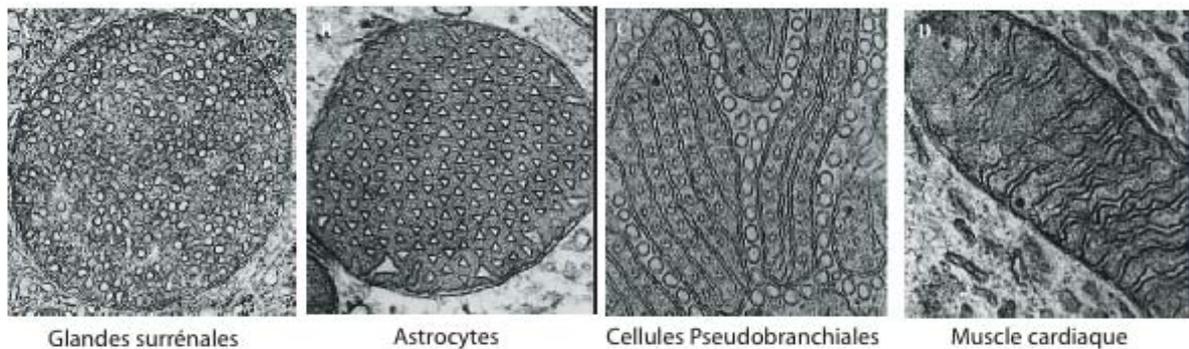
Le modèle de Palade, issu d'observations en microscopie électronique, définit les mitochondries comme des organites entourés d'une membrane externe (ME) et d'une membrane interne (MI) délimitant l'espace inter-membranaire (IMS) et la matrice (Palade, 1953). Dans ce modèle, les crêtes mitochondriales étaient perçues comme des saccules plus ou moins aplatis formés de repliements de la MI à l'intérieur de la matrice, s'ouvrant sur la longueur de leur base au niveau de la ME (figure I-6). La tomographie électronique a cependant permis de préciser que les jonctions des crêtes à la ME sont des structures tubulaires étroites avec un diamètre allant de 10 à 50 nm (Mannella, 2006; Sjostrand, 1953) (figure I-7, A). Ces structures et la composition protéique particulière des crêtes, enrichies en complexes de la chaîne respiratoire, ont conduit à les définir comme un compartiment à part entière. Ces jonctions constituent une barrière de diffusion membranaire entre la MI des crêtes et la MI sous-jacente à la ME. Elles semblent aussi limiter la diffusion de solutés entre l'IMS intra-crêtes et l'IMS sous-jacent à la ME.



**Figure I-6. Ultrastructure mitochondriale.**

Dès 1966, deux états morphologiques des crêtes ont été définis (figure I-7, B) selon l'état respiratoire de la cellule (Hackenbrock, 1966). L'état orthodoxe est observé lorsque l'ADP peu concentré limite la respiration et la production d'ATP (état respiratoire IV). L'état condensé correspond à une forte concentration d'ADP dans les crêtes et à une production accrue d'ATP (état respiratoire III). Dans l'état orthodoxe, le volume intra-crête diminue de manière concomitante à un gonflement de la matrice, permettant d'ajuster la concentration en ADP et par conséquent la production d'ATP. À l'inverse dans l'état condensé, les crêtes sont gonflées diminuant la concentration en ADP et limitant la production d'ATP (figure I-7, B). Par la suite, la morphologie des crêtes mitochondriales s'est avérée hautement variable selon le type et le métabolisme de la cellule, pouvant par exemple être triangulaires dans les

astrocytes ou tubulaires avec une vésicule à leur extrémité dans les cellules corticales des glandes surrénales (figure I-8). Cette variabilité de la morphologie des crêtes en fonction de l'activité énergétique ou du type cellulaire suggère un rôle de l'organisation de la MI dans l'adaptation métabolique.



**Figure I-8. Diversité de la morphologie des crêtes.**  
 Images en microscopie électronique de mitochondries issues de différents types cellulaires.  
 D'après Zick - 2009 - BBA.

### ***I-II.2 Le protéome mitochondrial***

La particularité des mitochondries est l'existence de deux membranes qui pourrait s'expliquer d'un point de vue évolutif par l'endo-symbiose entre une  $\alpha$  protéo-bactérie ancêtre des mitochondries et un eucaryote primitif. Le génome bactérien a été conservé dans la mitochondrie au cours de l'évolution, mais a subi des modifications conduisant à une perte et/ou un transfert vers le noyau d'une grande partie de l'information. Les protéines mitochondriales sont donc issues très largement de gènes nucléaires et pour quelques-unes du génome mitochondrial qui code pour une part importante de la machinerie de transcription/traduction mitochondriale et des complexes respiratoires.

#### *a - Composante mitochondriale*

La taille du génome mitochondrial et le nombre de gènes qu'il porte sont variables selon les espèces: de 17 kb chez l'homme à plus de 700 kb chez le maïs et de quelques dizaines de gènes chez les métazoaires à quelques centaines chez les plantes. L'ADN mitochondrial (ADNmt) est localisé dans la matrice des mitochondries, dans une structure nucléoprotéique, ou nucléoïde, dans laquelle il est notamment associé avec Abf2, une protéine du groupe de haute mobilité (HMG) homologue fonctionnels des histones, et des facteurs impliqués dans la transcription, la réplication et la réparation de l'ADN (Cheng and Ivessa, 2010; Garrido et al., 2003). L'association des nucléoïdes à la MI semble essentielle à l'intégrité de l'ADNmt (Boesch et al.).

L'ADN mitochondrial humain code pour 13 ARNm, 22 ARN de transfert et 2 ARN

ribosomiques. Les ORF codant pour les protéines sont séparées entre elles par les séquences codant les ARNt. Les 13 ARNm codent pour des composants de la chaîne de transport d'électron de la phosphorylation oxydative:

- ND1 à 6 et ND4L qui font partie du complexe I
- Le cytochrome b qui appartient au complexe III
- Les cytochromes oxydase 1 à 3 du complexe IV
- Les sous unités ATP6 et 8 du complexe V.

Les protéines sont adressées à la MI juste après leur traduction dans la matrice mitochondriale.

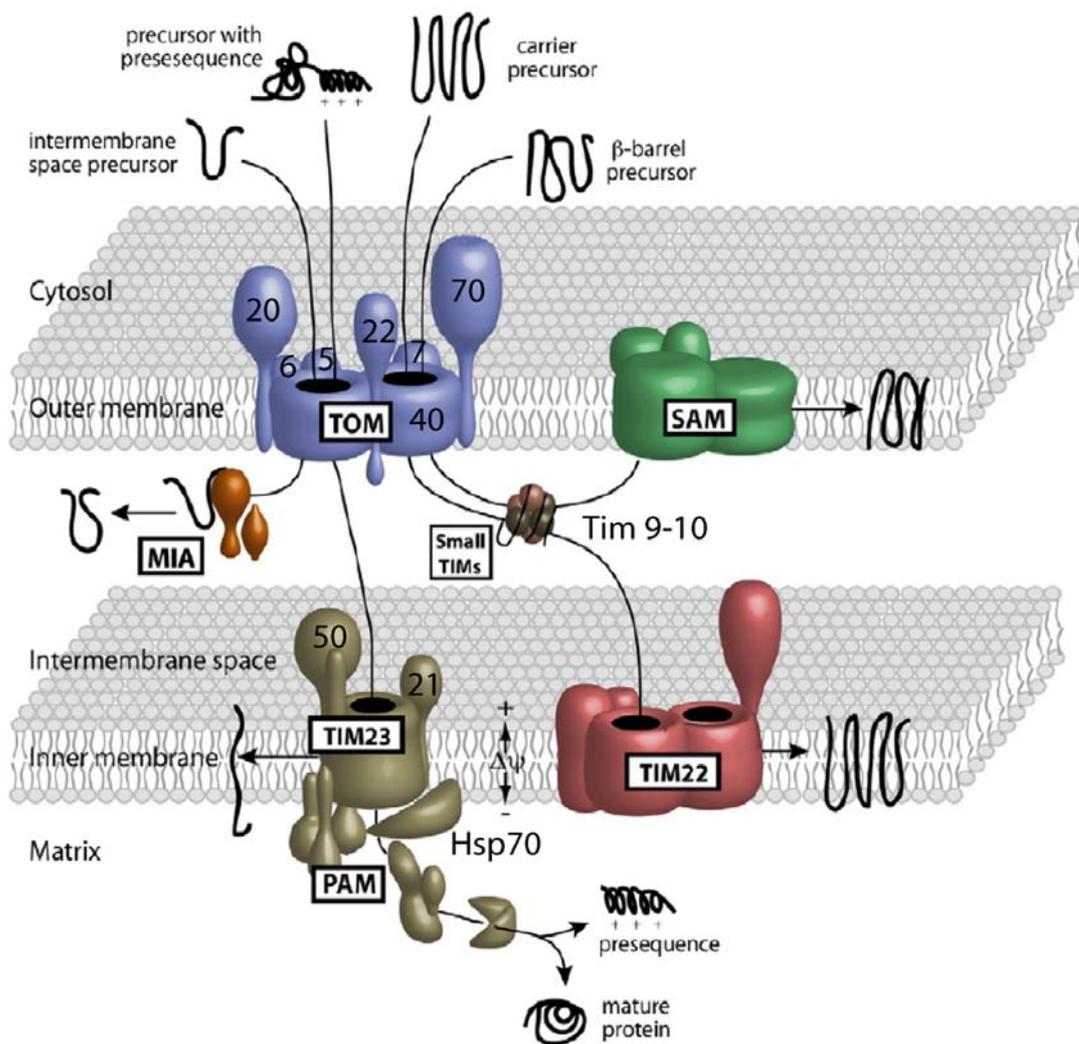
Dans le cas de *Schizosaccharomyces pombe*, le génome mitochondrial (19 kb) code pour 8 ARNm, 25 ARNt et le grand et le petit ARN ribosomique. Les ARNm codent pour la protéine ribosomique mitochondriale *rps3* et pour 7 des protéines de la chaîne de la phosphorylation oxydative:

- l'apocytochrome b du complexe III
- les cytochromes oxydase 1 à 3 du complexe IV
- les sous unités ATP6, 8 et 9 de la sous-unité F0 du complexe V

Par opposition à *S.cerevisiae* qui est dite « petite positive » et capable de vivre sans son génome mitochondrial en poussant sous forme de petites colonies, la levure *S.pombe* est « petite négative » : la perte de son ADNmt lui est létale. Cette différence peut être expliquée par la capacité de la sous-unité F1 du complexe V de *S. cerevisiae* d'hydrolyser l'ATP (fourni par la glycolyse) en absence de la sous-unité F0. L'ADP issu de cette réaction est redirigé vers l'IMS par la translocase ATP/ADP, permettant ainsi de maintenir le potentiel de membrane (Clark-Walker and Chen, 2001). Cette capacité est absente chez *S. pombe* et chez les eucaryotes supérieurs. Sans potentiel de membrane, l'import des protéines dans les mitochondries s'arrête ce qui empêche la mitochondrie d'assurer ses fonctions cellulaires et notamment celle de la biogénèse des protéines à noyaux fer/soufre qui sont essentielles à la vie cellulaire (Lill and Muhlenhoff, 2008).

#### *b – Composante nucléaire*

La plupart des protéines mitochondriales sont d'origine nucléaire et doivent donc être importées. L'import des protéines dans les mitochondries nécessite un potentiel de membrane qui est principalement maintenu par le flux de protons vers l'IMS dû au couplage entre la phosphorylation oxydative et la synthèse d'ATP (voir paragraphe II-3-a). Les protéines traduites dans le cytosol, parfois au contact de la mitochondrie, peuvent se retrouver à la ME,



**Figures I-9. Les complexes d'import mitochondriaux TOM et TIM.**

Représentation schématique des complexes d'import de la membrane externe TOM et de la membrane interne TIM décrites dans le texte. D'après Becker - 2008 - BBA.

dans l'IMS, à la MI ou dans la matrice et doivent donc pour cela traverser une ou deux membranes. Les précurseurs des protéines mitochondriales d'origine nucléaire contiennent un signal d'import à la mitochondrie chargé positivement qui peut être situé en N-terminal ou réparti dans l'ensemble de la séquence. Pour franchir la ME, le précurseur passe par un complexe de 450 kDa, TOM (translocase de la membrane externe) composé de TOM20, TOM70 et TOM22 qui sont les récepteurs des précurseurs (Abe et al., 2000; Young et al., 2003); TOM5, TOM6, TOM7 et TOM40 qui forment le canal permettant le passage des précurseurs (figure I-9). Les protéines de la ME ayant un domaine transmembranaire y sont alors insérées directement. Les protéines ayant une conformation en tonneau  $\beta$ , telles que VDAC ou TOM40, sont insérées dans la ME par le complexe SAM (Sorting and Assembly Machinery). Les protéines de l'IMS sont libérées puis prises en charge par des chaperonnes qui assurent leur repliement (Chacinska et al., 2009; Becker et al., 2008).

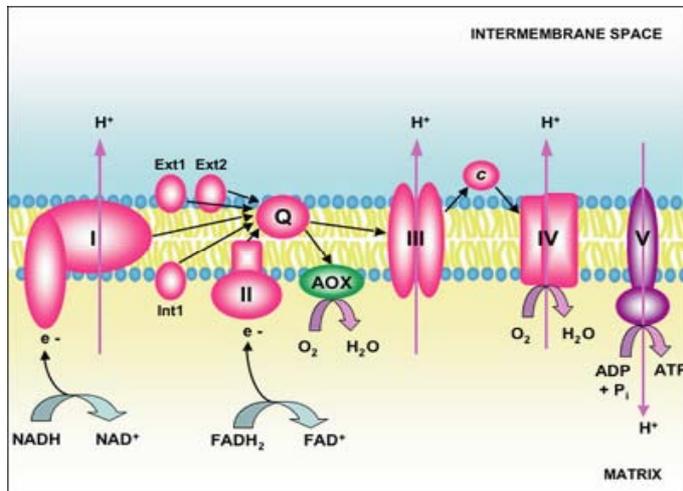
Les protéines de la MI passent par le complexe TIM (translocase de la membrane interne) composé des sous-unités TIM50 qui reconnaît dans l'IMS les séquences signal d'import (Mokranjac et al., 2003), TIM23 qui est le canal et TIM21 qui couple la machinerie d'import à la chaîne respiratoire (van der Laan et al., 2006) car le passage de la MI nécessite le potentiel de membrane (figure I-9). Les trois sous-unités TIM interagissent avec le complexe TOM pour faciliter le passage des protéines de la ME vers la MI. La présence d'un domaine hydrophobe dans la séquence de la protéine constitue un signal d'arrêt de transfert induisant le clivage de la séquence signal et la diffusion latérale des protéines dans la MI. Si la protéine est matricielle, le transfert dépendant de l'ATP se poursuit grâce au complexe PAM (Presequence Associated translocase Motor) constitué de l'ATPase Hsp70 mitochondrial (Hsp70mt) et TIM44 qui reconnaît le peptide signal d'import du côté matriciel. Dans le cas de protéines intégrales de la MI, le précurseur est pris en charge par le complexe TIM9-10 qui le transfère vers TIM22 pour l'insérer dans la MI (Chacinska et al., 2009).

### ***I-II.3 Fonctions cellulaires***

#### *a – Phosphorylation oxydative*

La mitochondrie est le principal pourvoyeur d'énergie cellulaire grâce à la phosphorylation oxydative. Ce processus métabolique est réalisé par la chaîne respiratoire couplée à l'ATP synthase. La chaîne respiratoire mitochondriale est composée de 4 complexes protéiques membranaires ainsi que des protéines mobiles permettant le transport d'électrons, le coenzyme Q ou ubiquinone et le cytochrome c (figure I-10). Les électrons sont transportés le long de la chaîne respiratoire, couplés à un transport de protons de la matrice vers l'IMS, ce

qui crée un gradient électrochimique à l'origine du potentiel de membrane. La force protomotrice produite par le retour des protons vers la matrice permet la synthèse d'ATP par l'ATP synthase (complexe V, figure I-10).

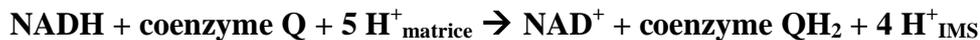


**Figure I-10. La chaîne respiratoire mitochondriale.**

Le schéma résume le flux d'électrons ( $e^-$ , flèches noires), à partir des substrats (NADH et  $FADH_2$ ), le long des différents complexes respiratoires (I à V) via les coenzymes Q et le cytochrome c. Le fonctionnement des complexes respiratoires entraîne un flux de protons ( $H^+$ , flèches mauves) vers l'espace intermembranaire, dont le retour vers la matrice permettra la production d'ATP par le complexe V.

Les 5 complexes sont des sites de réaction d'oxydo-réduction:

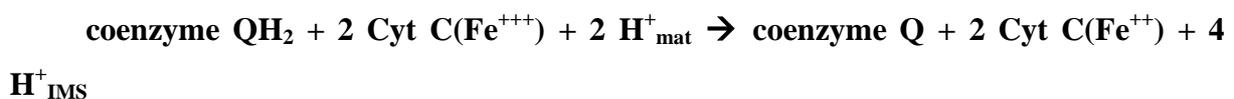
-le complexe I est la NADH-coenzyme Q réductase qui est le plus gros complexe (environ 1.000 kDa) de la CRM avec 45 sous-unités dont 7 proviennent de l'ADNmt (ND1 à 6 et ND4L). Le transfert d'électron se fait par l'oxydation du NADH et la réduction du coenzyme Q, avec un passage concomitant de 4 protons vers l'IMS.



-le complexe II est la succinate déshydrogénase, également impliquée dans le cycle de Krebs. Il catalyse l'oxydation du succinate en fumarate et transfère les électrons issus de cette réaction au pool de quinone. Le complexe II lie donc le cycle de Krebs à la respiration mitochondriale.



-le complexe III est le complexe bc1 ou cytochrome c réductase. Il réduit le cytochrome c en transférant l'électron issu de l'oxydation du coenzyme Q réduit. Cette réaction est couplée à un transfert de proton de la matrice vers l'IMS.



-le complexe IV est la cytochrome c oxydase qui catalyse la réduction de l'oxygène moléculaire en eau, avec une translocation de protons vers l'IMS. C'est un gros complexe de 200 kDa comptant 13 sous-unités, dont 3 constituent le cœur du complexe: Cox I, II et III.



-le complexe V est l'ATP synthase composée de deux parties: la F0, protéine intégrale de la MI, et la F1 associée à la F0. Le retour des protons vers la matrice en suivant le gradient électrochimique fournit l'énergie nécessaire à la synthèse d'ATP.



Le fonctionnement de cette protéine peut être réversible: elle peut hydrolyser l'ATP pour transporter des protons contre le gradient électrochimique.

#### *b – Rôle métabolique: cycle de Krebs, β-oxydation des acides gras, le fer*

Outre cette fonction de production d'ATP, les mitochondries ont aussi un rôle métabolique en abritant notamment le cycle de Krebs, l'hélice de Lynen, les étapes finales de la synthèse de l'hème et la biogénèse des centres Fer/Soufre. Le cycle de Krebs ou cycle des acides tricarboxyliques est l'étape finale de l'oxydation des lipides, glucides et acides aminés dont le catabolisme donne de l'acétyl CoA intervenant lors de la première réaction du cycle. Ce cycle est un processus aérobie qui métabolise l'acétyl CoA (à deux carbones) en deux CO<sub>2</sub> par une série de huit réactions. Il produit certains composants utilisables dans d'autres réactions métaboliques, comme le FADH<sub>2</sub> dans la phosphorylation oxydative.

L'hélice de Lynen ou β-oxydation des acides gras est la voie du catabolisme des acides gras en acétyl CoA utilisable dans le cycle de Krebs. Il s'agit d'un processus aérobie qui produit des coenzymes réduits, NADH+H<sup>+</sup> et FADH<sub>2</sub>, utilisable dans la synthèse d'ATP.

La mitochondrie est également impliquée dans la synthèse de l'hème dont les trois dernières enzymes sont localisées au niveau de la MI. La biogénèse des centres Fer/Soufre, importants pour nombre d'enzymes cellulaires dont des enzymes de la chaîne respiratoire, sont synthétisés dans la mitochondrie puis utilisés sur place ou exportés vers le cytosol.

#### *c – Apoptose*

Chez les eucaryotes supérieurs, la mitochondrie joue un rôle central dans le processus de mort cellulaire programmée car de nombreux facteurs pro-apoptotiques sont séquestrés dans l'IMS. Parmi ceux-ci, le cytochrome c qui participe à l'activation des caspases, le facteur inducteur d'apoptose (AIF), Smac/Diablo un inhibiteur de l'inhibiteur des caspases, la sérine protéase Omi/Htra2 et l'endonucléase G responsable de la fragmentation de l'ADN nucléaire dans les

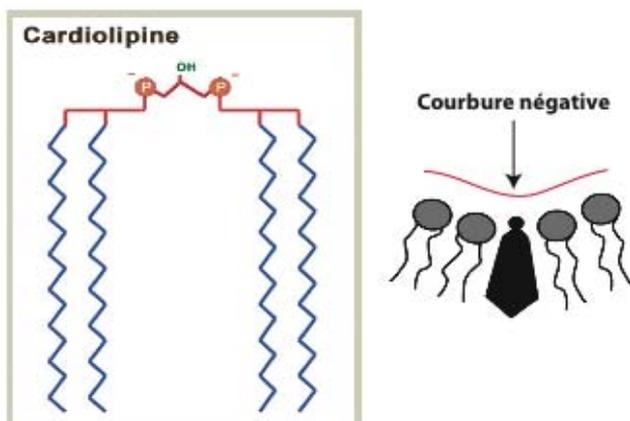
phases tardives de l'apoptose. Dans des conditions apoptotiques, la ME est perméabilisée et ces facteurs sont libérés dans le cytosol, aboutissant au déclenchement de la cascade apoptotique.

Deux voies de perméabilisation de la membrane sont connues: MPT (Mitochondrial Permeability Transition) qui passe par une ouverture non sélective du PTP (Permeability Transition Pore) de 2,3 nm de diamètre dans la MI (Crompton and Costi, 1990). Un gonflement du compartiment matriciel s'en suit et induit la rupture de la ME. La composition du PTP est mal connue, mais il semblerait que le transporteur de nucléotide ANT, la cyclophiline D, le canal voltage dépendant VDAC ainsi que la créatine kinase et l'hexokinase II en fassent partie. Cependant des études récentes ont remis en cause la nécessité de l'ANT et de VDAC dans la perméabilisation due au PTP (Baines, 2007; Kokoszka et al., 2004). Le deuxième système de perméabilisation passe par Bax/Bak dont l'activation a lieu lors de l'interaction avec le BH3-only Bid tronqué (Lovell et al., 2008). Cette activation induit leur homo-oligomérisation et la formation d'un pore dans la ME. *In vitro* il a été montré que 4 molécules de Bax oligomérisées suffisent pour perméabiliser des liposomes (Saito et al., 2000). L'activation des facteurs apoptotiques Bid, Bax et Bak ainsi que la mobilisation du cytochrome c dans l'IMS semblent impliquer un phospholipide particulier, et spécifique de la mitochondrie, la cardiolipine (cf. paragraphe II-4-c).

#### ***I-II.4 La cardiolipine, un phospholipide spécifique de la mitochondrie***

##### *a – Un phospholipide unique*

La cardiolipine, ou 1,3-bis(sn-3'-phosphatidyl)-sn-glycerol, est un phospholipide unique du fait de sa structure dimérique issue de la condensation de 2 phosphatidyl-glycérols et qui comporte donc 4 chaînes acyles et 2 groupements phosphate (figure I-11).



**Figure I-11. Cardiolipine et courbure des membranes.**

Schéma de la structure d'une molécule de cardiolipine, avec 4 chaînes d'acides gras et une tête polaire portant 2 résidus phosphates à charges négatives (gauche). Sa petite tête polaire produit un encombrement inférieur à celui des 4 chaînes d'acides gras, lui conférant une forme de cône favorisant la formation de courbures négatives dans le feuillet où elle est insérée (droite).

Sa forme globale est celle d'un cône, ce qui favorise la formation de courbures membranaires et de phase hexagonale inverse au sein de la bicouche. La cardiolipine possède en effet une

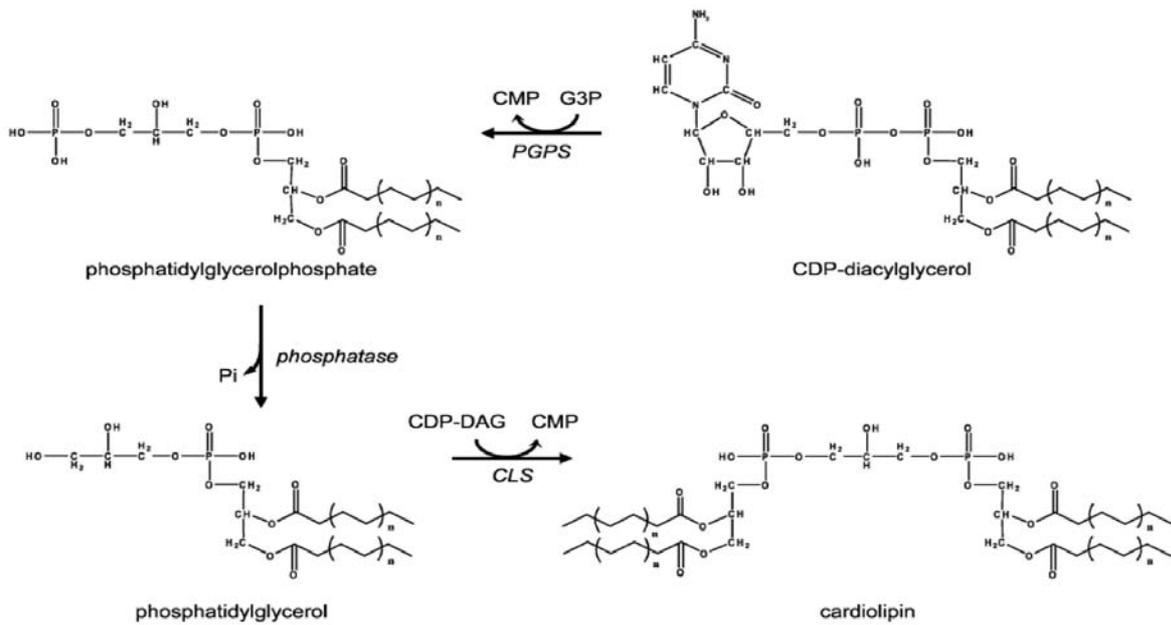
courbure négative spontanée, c'est-à-dire que sa présence au sein d'un feuillet diminue l'énergie nécessaire à la formation de courbures concaves (figure I-11). L'organisation de la cardiolipine en phase hexagonale inverse joue un rôle dans la formation des points de contacts entre la ME et la MI (Ardail et al., 1990) et dans la fusion membranaire (Cullis et al., 1986). Il est cependant suggéré qu'au sein des membranes mitochondriales la majorité de la cardiolipine soit organisée en bicouche (Schlame, 2008).

La présence de 4 chaînes acyles suggère un grand nombre de combinaisons d'acides gras et donc une grande variété d'espèces de cardiolipine. Cependant, si la composition en acides gras de la cardiolipine d'un tissu peut varier selon les espèces (Schlame et al., 2005), ou selon les tissus au sein d'un même organisme (Han et al., 2006), il n'existe que peu d'espèces de cardiolipine dans un tissu donné d'un organisme donné. Elles sont en majorité composées de molécules symétriques (avec les deux mêmes groupes phosphatidyl-glycérols). Cette composition uniforme et la symétrie moléculaire observée a certainement une importance dans les organisations membranaires induites par la cardiolipine et les fonctions des mitochondries dans les cellules considérées.

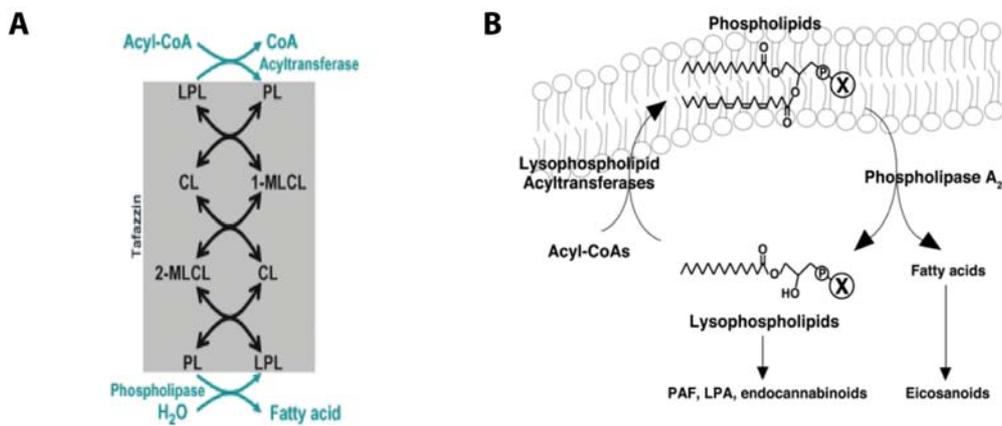
#### *b – Biosynthèse et remodelage de la cardiolipine*

Les premières étapes de la néo-synthèse de la cardiolipine sont communes avec celles de la voie de biosynthèse de tous les phospholipides et aboutissent à la synthèse d'un cytosine-diphosphate-di-acyl-glycérol (CDP-Diacylglycérol). La formation de la cardiolipine a lieu dans la mitochondrie et nécessite l'action de la phosphatidyl-glycérol-phosphate synthase (PGPS) sur le CDP-Diacylglycérol pour donner un phosphatidyl-glycérol phosphate. Une phosphatase encore inconnue déphosphoryle le phosphatidyl-glycérol phosphate en phosphatidyl-glycérol qui est finalement condensé avec un CDP-Diacylglycérol par la cardiolipine synthase (CLS) pour donner la cardiolipine (figure I-12). La CLS est localisée dans le feuillet interne de la MI (Schlame and Haldar, 1993) et ne possède pas de spécificité de substrat. La symétrie observée dans les molécules de cardiolipine ne provient donc pas d'une incorporation préférentielle d'un type de phosphatidyl-glycérol et/ou de CDP-Diacylglycérol, mais résulte d'un remodelage ultérieur des molécules néo-synthétisées.

La tafazzin a été impliquée *in vivo* dans ce processus en catalysant le transfert direct d'un acide gras entre un phospholipide, fourni par un cycle de déacylation-réacylation dépendant de l'acyl-coenzyme A (le cycle de Lands, figure I-13, A), et une lyso-cardiolipine (Schlame, 2008). Cette enzyme est localisée dans le feuillet externe de la MI ou le feuillet interne de la ME, impliquant que la cardiolipine synthétisée du côté matriciel doit être transférée du côté



Représentation schématique de la voie de biosynthèse de la cardioline à partir du CDP-diacylglycérol. Cette synthèse fait intervenir les enzymes suivantes : la phosphatidyl-glycérol-phosphate synthase (PGPS), une phosphatase inconnue et la cardioline synthase (CLS). D'après Houtkooper - 2008 - Cell Mol Life Sci.



(A) Le remodelage de la cardioline pourrait se faire grâce à des trans-acylations successives réalisées par la tafazzin et produisant des molécules de cardioline (CL) et de mono-lyso-cardiolipine (MLCL). Dans cette voie des phospholipases et des acyl transférases interviendraient pour fournir à la tafazzin des lyso-phospholipides (LPL) et des phospholipides (PL) nécessaires aux trans-acylations. (B) Une autre voie passerait par l'action successive de la phospholipase A2 produisant des lysophospholipides qui seront ensuite ré-acylés grâce à l'action de lyso-phospholipides-acyl-transférases. D'après Schlame - 2009 - J. Lipid Res.

IMS de la MI. Le mécanisme de redistribution n'est pas identifié et pourrait faire intervenir la Phospholipide Scramblase 3 (Liu et al., 2003), la créatine kinase mitochondriale ou la nucléoside di-phosphate kinase localisées dans l'IMS (Epanand et al., 2007). Il est proposé que la tafazzin remodèle la cardiolipine par une action sur les quatre résidus acyles au cours de plusieurs réactions de trans-acylation (figure I-13, A) (Schlame, 2008). L'expression de la tafazzin humaine dans *S.cerevisiae* conduit à la production de cardiolipine ayant le profil de celle de levure (Vaz et al., 2003), ce qui suggère que la tafazzin permette un remodelage complet et uniforme de la cardiolipine en incorporant les acides gras présents dans l'environnement cellulaire. Des mutations de la tafazzin entraînent un remodelage altéré et une accumulation de lyso-cardiolipine, aboutissant au syndrome de Barth (Xu et al., 2006).

Un autre mécanisme de remodelage de la cardiolipine a été proposé et comprendrait une succession de réactions de désacylation par des phospholipases, produisant de la monolyso-cardiolipine qui serait ensuite réacylée par des acyl-transférases (figure I-13, B) (Schlame and Rustow, 1990). La phospholipase A2 indépendante du calcium pourrait assurer la désacylation de la cardiolipine néo-synthétisée (Mancuso et al., 2007; Zachman et al., 2010). Deux acyl-transférases, ALCAT1 (AcylCoA lyso-cardiolipin acyl transferase) et MLCL-AT (monolyso-cardiolipin acyl transferase), interviendraient alors pour réacyler la monolyso-cardiolipine (Cao et al., 2004; Taylor and Hatch, 2009). MLCL-AT présente une spécificité d'incorporation d'acide linoléique dans la mono-lysocardiolipine (Taylor and Hatch, 2009). Son expression dans des cellules mutées pour le gène de la tafazzin permet de limiter la diminution de cardiolipine et l'accumulation de monolyso-cardiolipine

#### *c – Importance cellulaire de la cardiolipine*

Les premières études sur des levures *S.cerevisiae* invalidées pour le gène de la cardiolipine synthase ont montré que l'absence de cardiolipine avait un impact sur la respiration, la phosphorylation oxydative et l'import mitochondrial (Jiang et al., 2000). Bien que la présence de la cardiolipine ne soit pas absolument essentielle, puisque les levures sont viables, elle semble nécessaire à un fonctionnement optimal de la mitochondrie. Au-delà de ses rôles dans la vie de la cellule, il apparaît depuis quelques années que la cardiolipine agit aussi dans le processus de mort cellulaire programmée chez les eucaryotes supérieurs.

#### **Métabolisme mitochondrial**

La cardiolipine interagit avec de nombreuses protéines mitochondriales (figure I-14) (Joshi et al., 2009) dont elle module l'activité. Elle est nécessaire à la bonne conformation du transporteur ATP/ADP (ANT) (Pebay-Peyroula et al., 2003), des complexes IV et V de la

chaîne respiratoire (Eble et al., 1990; Robinson et al., 1990) et stabilise les supercomplexes respiratoires (Zhang et al., 2005), permettant un meilleur couplage des réactions de la phosphorylation oxydative et une production d'ATP plus efficace. La cardiolipine favorise aussi le maintien du potentiel de membrane grâce à sa charge négative qui servirait de guide aux protons de la face interne vers la face externe de la MI où elle pourrait agir comme un piège à protons (Haines and Dencher, 2002). Une étude montrant la formation d'invagination membranaires suite à une acidification locale la surface externe de vésicules unilamellaires géantes contenant de la cardiolipine, a conduit à proposer que ce processus soit impliqué dans la formation des crêtes (Khalifat et al., 2008).

<i>Chaîne respiratoire</i>	<i>Transporteurs</i>	<i>Métabolisme</i>
Complexe I	Translocase ATP/ADP	Cardiolipine synthase
Complexe III	Transporteur du phosphate	Créatine kinase
Complexe IV	Transporteur du pyruvate	Glycérol-3-phosphate déshydrogénase
Complexe V	Transporteur de la carnitine	Carbamyl-phosphate synthétase I
Cytochrome c		Cytochrome P450

**Figure I-14. La cardiolipine est nécessaire au fonctionnement d'un ensemble de protéines mitochondriales.**

D'après Joshi - 2008 - BBA

L'importance de la cardiolipine dans l'ensemble des fonctions mitochondriales pourrait d'autre part impliquer sa capacité à initier la formation des microdomaines membranaires (Domenech et al., 2007; Matsumoto et al., 2006). L'accumulation locale de domaines enrichis en cardiolipine permet en effet de diminuer l'énergie nécessaire au maintien d'une forte courbure membranaire (Schlame and Ren, 2009) comme celle qui est présente à la jonction et à l'apex des crêtes mitochondriales. D'autres propriétés de la cardiolipine, comme son affinité pour les protons ou les cations divalents ( $Ca^{2+}$ ) et sa capacité à former des structures hexagonales inverses permettant de moduler la structure de ces domaines en fonction de l'environnement local, aboutiraient au recrutement et à l'organisation des composants de complexes protéiques à activité définie.

### **Apoptose**

La cardiolipine constitue un acteur majeur de l'apoptose par ses relations avec le cytochrome c (Kagan et al., 2009; Kagan et al., 2005) et par son rôle dans le recrutement de tBid, l'oligomérisation de Bax/Bak et l'activation de la caspase 8 (Gonzalvez et al., 2005; Gonzalvez et al., 2008; Kim et al., 2004; Manara et al., 2009). Dans la mitochondrie, le cytochrome c est associé à la MI par des interactions électrostatiques avec les complexes respiratoires III et IV, et par des interactions électrostatiques et hydrophobes avec la cardiolipine. Dans ce dernier cas, une chaîne acyle de la cardiolipine interagit avec des

régions non polaires du cytochrome c (Tuominen et al., 2002) entraînant la rupture d'un pont Fe/S proche de la poche de l'hème (Belikova et al., 2006). L'hème, alors accessible aux équivalents oxydants comme H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, développe une activité peroxydase qui produit de la cardiolipine peroxydée. Cette dernière est une source beaucoup plus efficace d'équivalents oxydants et permet l'auto-alimentation et l'amplification de la réaction. Elle est ensuite hydrolysée en mono-lyso-cardiolipine pour laquelle le cytochrome c a peu d'affinité, permettant donc sa mobilisation dans l'IMS intra-crêtes. Au cours de ce processus, les propriétés redox du cytochrome c diminuent et son rôle dans l'apoptose est favorisé par rapport à celui de transporteur d'électrons.

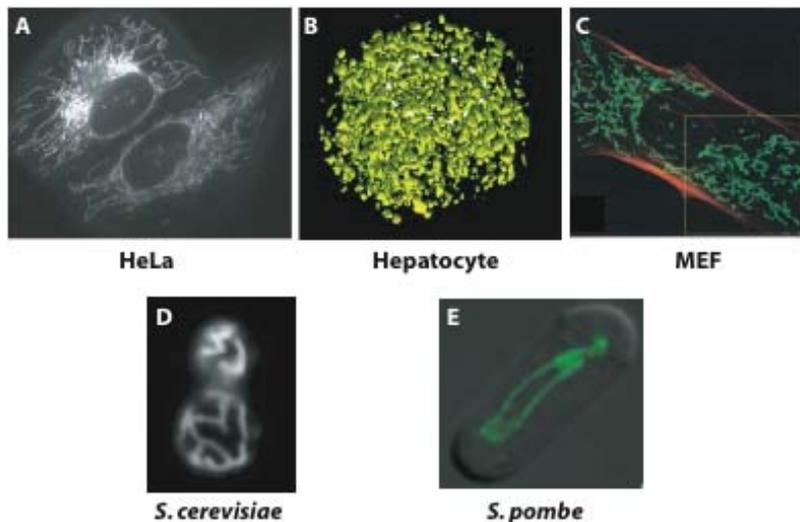
Le développement de cette activité peroxydase représente une étape précoce de l'apoptose qui devient irréversible si le cytochrome c est libéré dans le cytosol. Cette libération implique le facteur apoptotique t-Bid agissant à deux niveaux; il favorise la libération du cytochrome c de l'IMS intra-crêtes vers l'IMS sous-jacent à la ME et induit l'oligomérisation de Bax/Bak à la ME pour former un pore par lequel le cytochrome c a accès au le cytosol (Frezza et al., 2006). L'action de t-Bid et celle de Bax semble favorisée par leur interaction avec la cardiolipine et/ou ses lyso-dérivés (Crimi and Esposti, 2010). Puisqu'en conditions physiologiques, la majorité de la cardiolipine est localisée dans la MI, dont 60% dans le feuillet interne, une relocalisation de la cardiolipine vers le feuillet externe de la MI ou vers la ME, doit donc intervenir pour que ces interactions puissent avoir lieu. Une telle redistribution aurait donc des effets majeurs sur la structure des microdomaines à cardiolipine assurant le fonctionnement normal des mitochondries et pourrait aboutir à la formation de «nouveaux» domaines servant de plateforme de réception et d'activation d'effecteurs de l'apoptose (Gonzalvez et al., 2008; Sorice et al., 2009).

**La plupart des fonctions des mitochondries sont fortement dépendantes de l'intégrité des membranes de l'organelle, en particulier de la MI, puisqu'elles dépendent de produits de gènes nucléaires dont l'import dans la mitochondrie requiert un potentiel de membrane intact. D'autre part, cette membrane joue un rôle majeur dans le maintien de l'ADNmt et dans l'activité de nombreuses enzymes mitochondriales grâce à la cardiolipine qu'elle contient. La modulation spatiotemporelle de la structure et des propriétés de cette membrane pourrait donc avoir des répercussions majeures sur un ensemble de fonctions mitochondriales déterminant la vie ou la mort de la cellule. Je vais maintenant récapituler les connaissances sur cette modulation, ou dynamique mitochondriale, qui implique plusieurs dynamines apparentées, en particulier la dynamine Opa1/Msp1 dont l'étude a constitué mon travail de thèse.**



### I-III. Morphologie et dynamique mitochondriale

La morphologie des mitochondries varie selon le type des cellules et leur état métabolique. Elles sont en effet retrouvées en tant qu'entités isolées dans le cytoplasme des fibroblastes embryonnaires murins ou dans les hépatocytes (Collins et al., 2002) alors qu'elles forment un réseau de filaments plus ou moins interconnectés dans les cellules HeLa, les cardiomyocytes ou les levures *S.pombe* et *S.cerevisiae* (figure I-15) (Guillou et al., 2005; Landes et al., 2010a).



**Figure I-15. Morphologie mitochondriale et type cellulaire.**

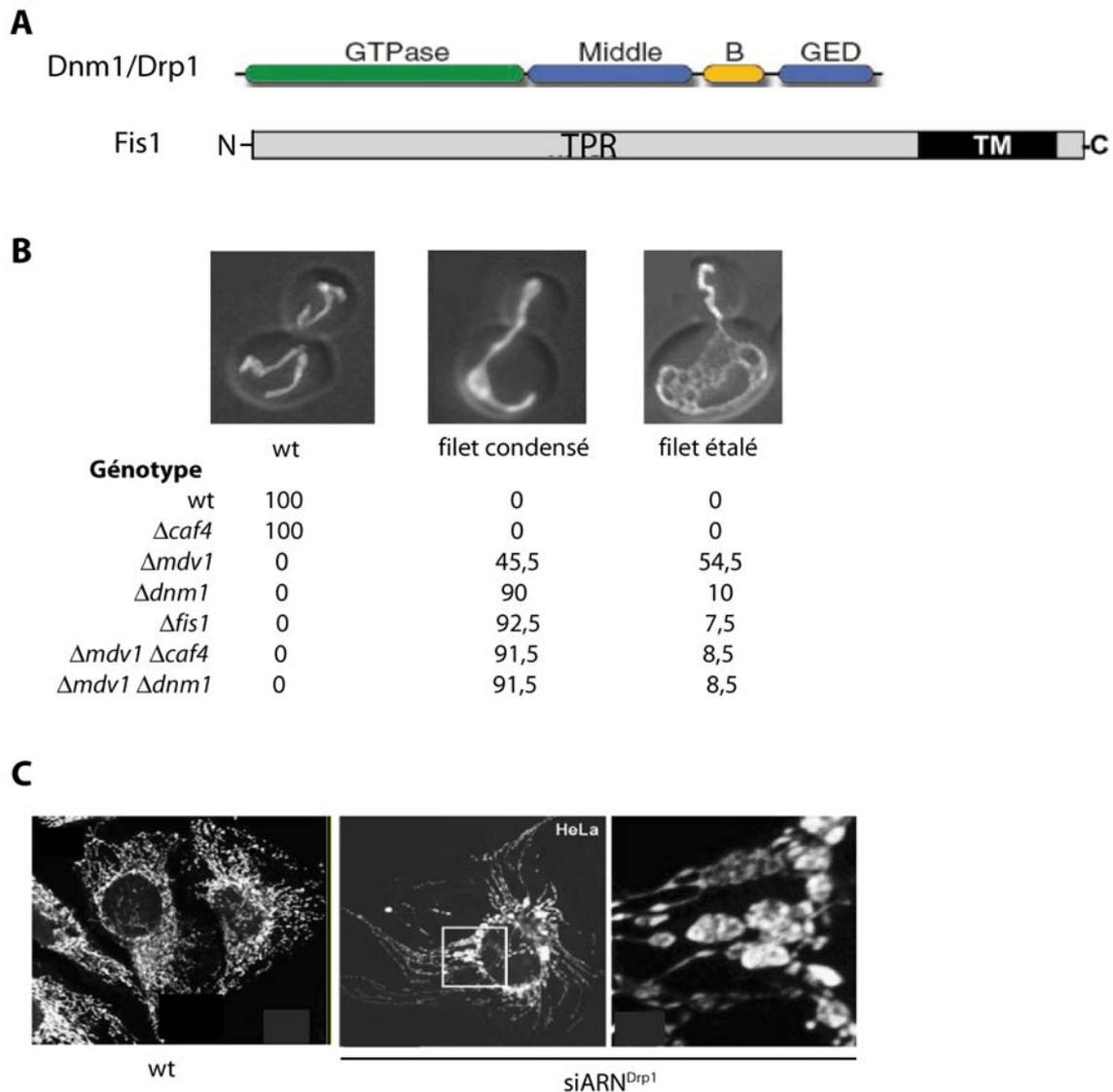
Le réseau mitochondrial est filamenteux dans les cellules HeLa (A), les fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) (C) et les levures *S.cerevisiae* (D) et *S.pombe* (E). Dans les hépatocytes, les mitochondries forment plutôt des grains répartis dans le cytoplasme (B). D'après Landes - 2010- EMBO rep, Collins - 2002 - EMBO J. Chen - 2003 - JCB. Sesaki, 2001 - JCB. Guillou - 2005 - FEBS lett.

Cette variabilité de formes résulte de mécanismes extrinsèques qui contrôlent la distribution et la mobilité des mitochondries sur le cytosquelette, et intrinsèques, la dynamique mitochondriale, qui font intervenir des événements continus de fusion et de fission des membranes de l'organelle. La morphologie des mitochondries résulte de l'équilibre qui s'établit entre ces événements (Sesaki and Jensen, 1999). Lorsque la fusion prédomine, les mitochondries forment des tubules fins et interconnectés. Lorsque la fission l'emporte, les mitochondries apparaissent comme des grains répartis dans le cytoplasme. Les acteurs essentiels de la dynamique mitochondriale ont été identifiés dans la levure *S. cerevisiae* et sont conservés des levures aux eucaryotes supérieurs. D'autres acteurs de la fission et de la fusion ont ensuite été décrits, qui ne se retrouvent pas nécessairement dans tous les organismes étudiés.

#### ***I-III.1 Les acteurs de la fission mitochondriale***

##### *a – Les acteurs essentiels ; Dnm1/Drp1 et Fis1*

L'un des principaux acteurs de la fission est une dynamine apparentée appelée Dnm1 chez la



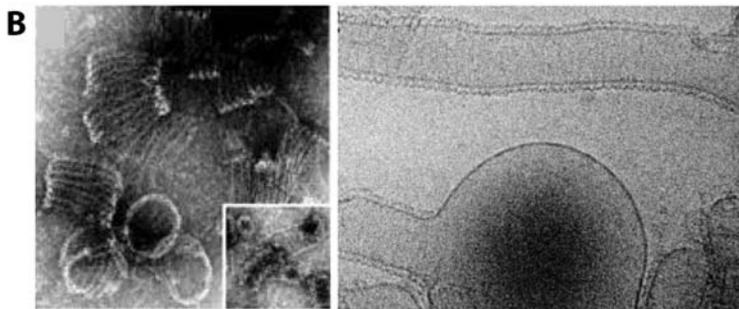
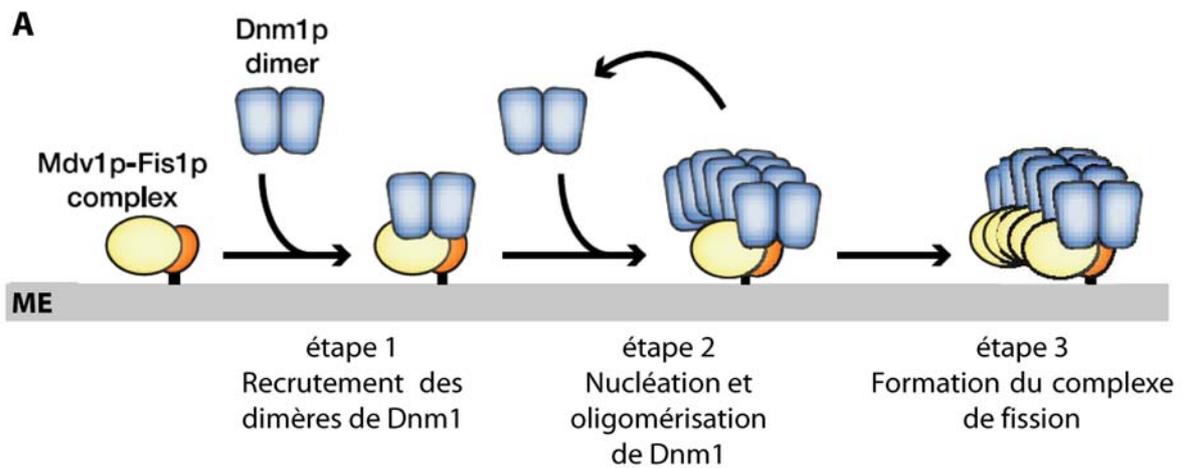
**Figure I-16. Les acteurs essentiels de la fission Dnm1/Drp1 et Fis1.**

(A) Représentation schématique de l'organisation des domaines de Dnm1/DRP1 (haut) et de Fis1 (bas). (B) Observations en microscopie à fluorescence du réseau mitochondrial de levures *S.cerevisiae*. Pour chaque génotype, le pourcentage de cellules ayant un réseau mitochondrial sauvage (wt), en filet condensé ou en filet étalé est indiqué. (C) Observation en microscopie confocale du réseau mitochondrial de cellules HeLa sauvages (wt) ou traitées par des siARN dirigés contre Drp1 (siARN<sup>Drp1</sup>). Dans ces cellules, l'augmentation de la fusion aboutit à l'hyperfilamentation (centre) et dans les régions où la densité est élevée, à la fusion en "amas" de ces filaments (agrandissement à droite). D'après Ingerman - 2005 - J. Cell Biol., Möpert - 2009 - Exp. Cell Res., Mears - 2010 - Nat. Struct. Mol. Biol., Griffin - 2005 - J. Cell Biol.

levure ou Drp1/Dlp1 chez *C.elegans* et les mammifères (Bleazard et al., 1999; Labrousse et al., 1999; Lee et al., 2004; Mopert et al., 2009; Pitts et al., 1999; Sesaki and Jensen, 2004). Dnm1/Drp1 possède un domaine GTPase N-terminal, un domaine Middle et un domaine GED C-terminal (figure I-16, A). Dans la levure, Dnm1 est répartie entre le cytoplasme et des structures punctiformes sur la mitochondrie. Chez les mammifères, Drp1 est majoritairement cytoplasmique; elle est recrutée à la ME lors de la fission. L'association de Drp1 avec la ME nécessite la protéine Fis1, hFis1 chez l'homme, qui est localisée de manière homogène à la surface des mitochondries. Lors de la fission, Fis1 colocalise avec les structures punctiformes où l'on retrouve Drp1. Ces deux protéines sont essentielles à la fission mitochondriale ; la délétion de l'une ou l'autre produit un phénotype identique ; le réseau mitochondrial apparaît sous la forme d'un "filet condensé" constitué de filaments très fins et interconnectés (figure I-16, B et C). Fis1 est ancrée dans la ME par un segment transmembranaire C-terminal et possède un domaine cytoplasmique contenant six hélices dont quatre sont organisées en domaines TPR (Tétratricopeptide Repeat, figure I-16, A) impliqués dans les interactions avec des partenaires protéiques (Dohm et al., 2004; Suzuki et al., 2005).

#### *b – Autres acteurs de la fission mitochondriale*

Un de ces partenaires est Mdv1 qui interagit aussi avec Dnm1 et constitue un adaptateur entre Fis1 et cette dernière (Cervený et al., 2001; Fekkes et al., 2000; Tieu and Nunnari, 2000; Tieu et al., 2002). Mdv1 possède un domaine coiled-coil central impliqué dans son homo-oligomérisation qui est nécessaire à son association avec des dimères de Dnm1 liés au GTP (Koirala et al., 2010; Lackner et al., 2009). Il est proposé que le rôle de Mdv1 soit de recruter et de stabiliser ces dimères de dynamine liée au GTP pour favoriser sa nucléation (figure I-17, étape 1) et son auto-assemblage au point de fission (figure I-17, étape 2), induisant de façon concomitante l'oligomérisation de Mdv1 (figure I-17, étape 3) et la constriction de la membrane (Bhar et al., 2006). L'hydrolyse du GTP par Dnm1, probablement associée à un changement de conformation transmis par Fis1 et Mdv1 à la membrane, fournirait l'énergie nécessaire aux étapes finales de la fission. Un second partenaire de Dnm1 est Caf4 qui interagit avec Fis1 et Mdv1 par sa région N-terminale, et par un domaine WD40 C-terminal avec Dnm1. Caf4 peut recruter Dnm1 à la ME, *via* Fis1, même en absence de Mdv1 (Griffin et al., 2005). Bien que des levures  $\Delta caf4$  ne présentent pas de défaut de morphologie du réseau mitochondrial et que celles  $\Delta mdv1$  ont un réseau en filet condensé ou étalé, la double délétion  $\Delta caf4/\Delta mdv1$  entraîne un phénotype en filet condensé identique à celui des cellules  $\Delta dnm1$  ou  $\Delta fis1$  (figure I-16, B) (Griffin et al., 2005). Ces observations ont conduit à proposer



**Figure I-17. Le mécanisme de fission mitochondriale.**

(A) Le modèle proposé fait intervenir Fis1 (orange) et Mdv1 (jaune) associés sur la membrane externe (ME) mitochondriale, et exposés dans le cytosol, qui initie la nucléation d'un complexe de fission comprenant des dimères de Dnm1. Cette étape initiale induit alors l'auto-assemblage de Dnm1 et Mdv1 et la constriction de la membrane. (B) Dnm1 s'auto-assemble en spirales en solution en présence d'analogues non-hydrolysables du GTP ( $GTP\gamma S$ ) ou sur des liposomes qu'elle contraint en tubules. D'après Bhar - 2006 - J. Biol. Chem., Ingerman - 2005 - J. Cell Biol.

que Caf4 puisse avoir un rôle redondant à celui de Mdv1 dans le recrutement de Dnm1 à la ME et un rôle facilitateur des étapes ultérieures de la fission (Griffin et al., 2005).

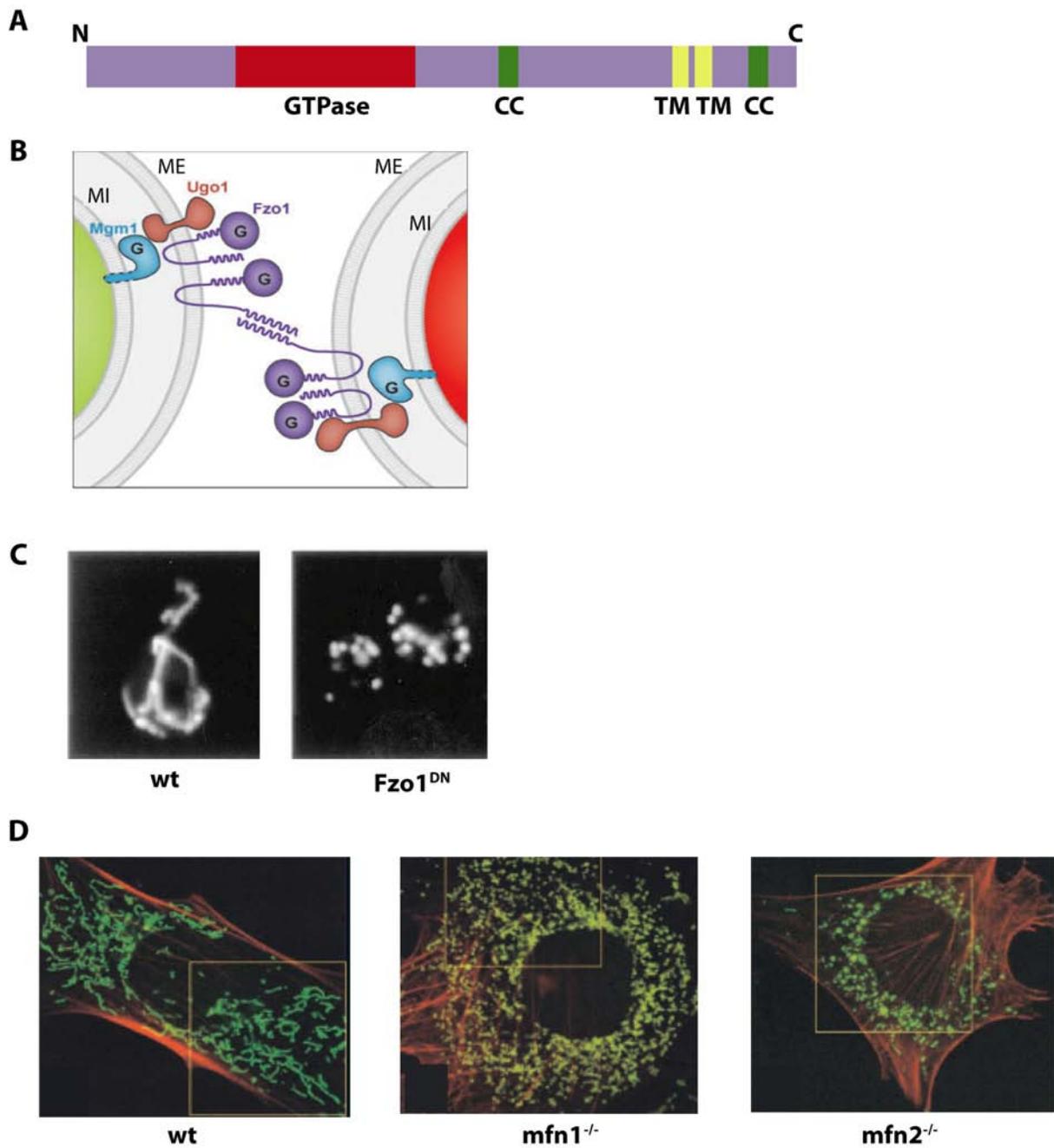
Chez les mammifères, hFis1 est nécessaire à la fission (James et al., 2003; Yoon et al., 2003) mais sa surexpression ou sa délétion n'a pas d'effet sur la distribution et le recrutement mitochondrial de Drp1 (Lee et al., 2004; Suzuki et al., 2003). Une interaction entre les deux protéines a cependant été montrée (Yoon et al., 2003). D'autre part, aucun homologue structural de Mdv1 et Caf4 n'a été identifié chez les eucaryotes supérieurs. Bien que le mécanisme global de la fission mitochondriale impliquant Drp1 et hFis1 soit conservé, le recrutement de Drp1 et son action à la ME pourraient se faire par l'intermédiaire d'autres facteurs (Lee et al., 2004; Suzuki et al., 2003). Parmi ceux-ci on peut citer la GDAP1 (Ganglioside-induced Differentiation Associated Protein 1) (Niemann et al., 2005; Niemann et al., 2009) dont les mutations entraînent la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 4A (Cuesta et al., 2002) et l'endophiline B1 (Karbowski et al., 2004).

#### *c – Mécanismes d'action de Dnm1/Drp1*

Le mode d'action de Dnm1/Drp1 est proche de celui des dynamines conventionnelles au cours de l'endocytose. Il implique son oligomérisation et l'hydrolyse du GTP, donc le GED et le domaine GTPase. Dnm1/Drp1 s'auto-assemble en effet en spirales suite à son association avec des liposomes (figure I-17, B). Ces spirales sont capables de contraindre les vésicules en tubules qui se désassemblent suite à l'hydrolyse du GTP (Ingerman et al., 2005; Smirnova et al., 2001; Yoon et al., 2001), probablement par un changement de conformation de la dynamine. Un mutant de Dnm1 incapable d'hydrolyser le GTP induit *in vitro* l'organisation en spirales et *in cellulo* la formation des complexes de fission sur la ME mais ne permet pas la fission des mitochondries (Naylor et al., 2006), indiquant que la fission nécessite l'hydrolyse du GTP.

#### *d – Existe-t-il une machinerie de fission de la membrane interne ?*

Les protéines impliquées dans la fission mitochondriale identifiées jusqu'à présent sont localisées à la ME ce qui suggère que la fission de la ME entraîne celle de la MI. On peut supposer que la constriction de la ME induite par l'assemblage de Dnm1/Drp1 et de ses partenaires induise une constriction similaire de la MI sous-jacente. Les modifications ainsi engendrées permettraient alors le recrutement de facteurs facilitant la fission coordonnée de cette dernière. L'observation de la désynchronisation de la fission de la ME et de la MI dans des cellules exprimant un mutant de Drp1 (Labrousse et al., 1999) ou déplétées en endophiline B1 (Karbowski et al., 2004) suggèrent que ces protéines jouent effectivement un



**Figure I-18. Les mitofusines.**

(A) Schéma de la structure des mitofusines avec les domaines coiled-coil (CC), le domaine GTPase et les domaines transmembranaires (TM). (B) Les mitofusines, ici Fzo1, traversent 2 fois la ME. Elles peuvent interagir entre elles par leur domaine coiled coil C-terminal, et avec l'adaptateur Ugo1 qui les relie à Mgm1 sur la MI. (C) Réseau mitochondrial de levures sauvages (wt) ou surexprimant un dominant négatif de Fzo1 qui entraîne la fragmentation du réseau mitochondrial. (D) Réseau mitochondrial de fibroblastes embryonnaires (MEF) sauvages (wt) et délétées pour *mfn1* (*mfn1*<sup>-/-</sup>) ou *mfn2* (*mfn2*<sup>-/-</sup>). Le cytosquelette d'actine est visualisé en rouge. La perte de fonction de l'une ou l'autre des mitofusines entraîne la fragmentation du réseau mitochondrial. Daprès Chen - 2003 - J. Cell Biol., Hermann - 1998 - J. Cell Biol., Hoppins - 2007 - Ann. Rev. Biochem.

rôle dans la coordination de la fission des deux membranes. De plus, trois protéines ayant un rôle encore mal compris dans la fission mitochondriale ont été identifiées à l'intérieur de la mitochondrie. MTGM (Mitochondrial Targeting GxxxG Motif) est ancrée à la MI par un domaine transmembranaire central contenant le motif GxxxG et apparaît comme un régulateur de la morphologie mitochondriale (Zhao et al., 2009). MTP18 (Mitochondrial Protein 18 kDa) localisée dans l'IMS est un acteur de la fission induite par Drp1 dont elle contrôle la distribution sur les mitochondries (Tondera et al., 2005). Mdm33 (Mitochondrial Distribution and Morphology) localisée sur la MI a été proposée comme un modulateur de la structure de cette membrane et impliqué dans sa fission (Messerschmitt et al., 2003).

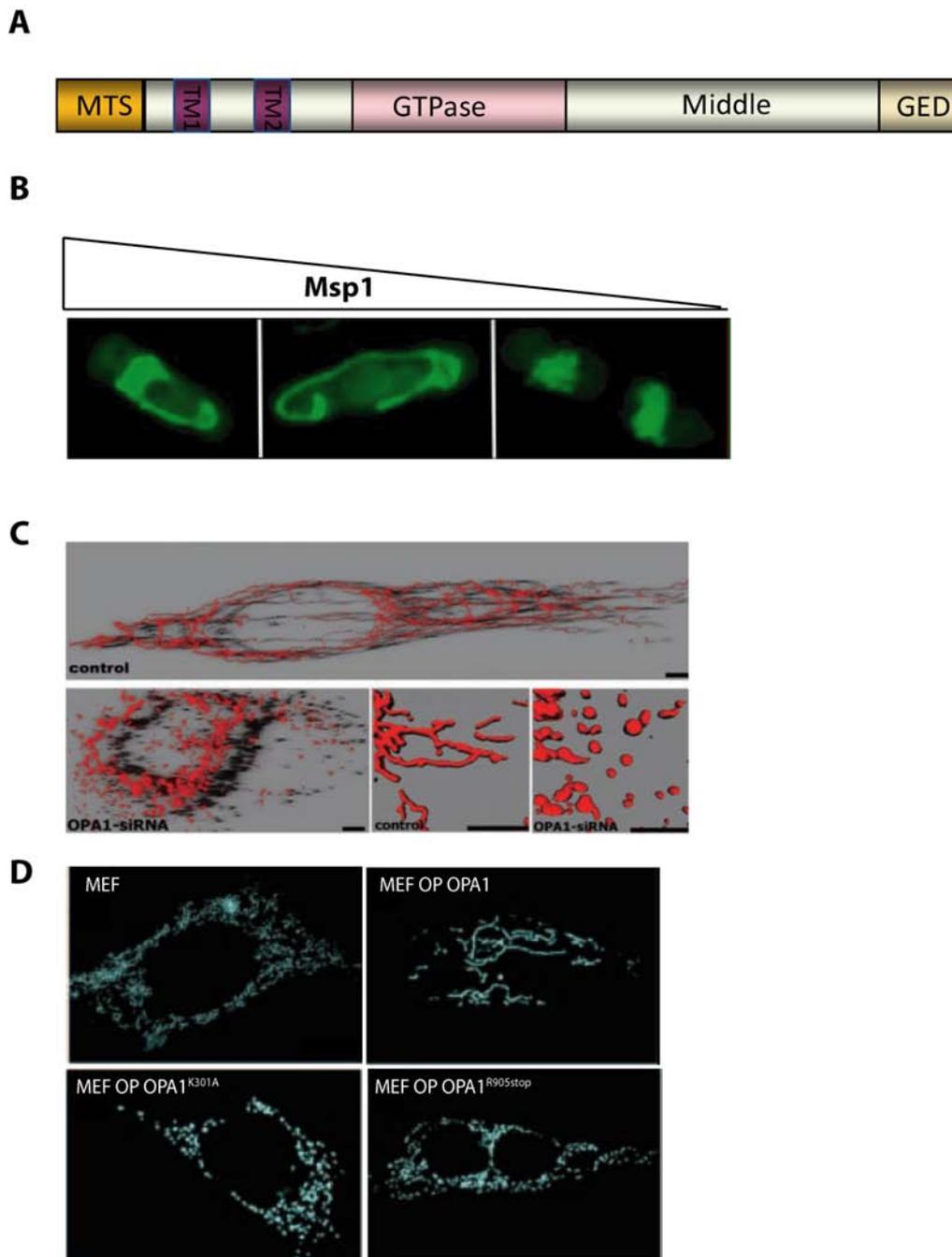
### ***I-III.2 Les acteurs de la fusion mitochondriale***

En ce qui concerne la fusion des mitochondries deux machineries différentes ont été mises en évidence, qui doivent agir de concert pour coordonner la fusion de la ME avec celle de la MI.

#### *a – Les acteurs essentiels de la fusion de la ME; les mitofusines Fzo1/Mfn1/Mfn2*

La fusion de la ME fait intervenir des dynamines apparentées qui sont les mitofusines, Fzo1 dans la levure, et Mfn1 et Mfn2 chez les mammifères (Chen et al., 2003; Eura et al., 2003; Hermann et al., 1998; Hoppins et al., 2007; Santel and Fuller, 2001). Les mitofusines possèdent un domaine GTPase N-terminal, une région coiled-coil, deux domaines transmembranaires et une dernière région coiled-coil C-terminale. Elles traversent deux fois la ME et leurs extrémités C- et N-terminales sont exposées dans le cytoplasme (figure I-18, A et B) (Hermann et al., 1998; Rojo et al., 2002). Les domaines coiled-coil C-terminaux de deux mitofusines portées par des mitochondries adjacentes peuvent former des dimères antiparallèles (figure I-18, B) permettant l'ancrage de deux mitochondries au cours de la fusion (Chen et al., 2003; Koshiha et al., 2004). L'hydrolyse du GTP fournirait alors l'énergie nécessaire à la fusion des deux ME (Ishihara et al., 2004; Meeusen et al., 2004) qui serait aussi favorisée par l'action d'une phospholipase D mitochondriale (Choi et al., 2006) (cf. paragraphe III-2-c). Une oligomérisation des mitofusines en structure d'ordre supérieur à ces dimères n'a jamais été rapportée.

La perte de fonction des mitofusines entraîne la fragmentation des mitochondries en grains isolés dans le cytoplasme (figure I-18, C et D). La perte de fonction de Mfn1 ou de Mfn2 peut être en partie compensée par le gain de fonction de l'autre ce qui suggère un rôle redondant dans la fusion (Chen et al., 2003). Il existe cependant des différences, notamment en ce qui concerne leurs patrons d'expression: *mfn1* est exprimé à des niveaux comparables dans de



**Figure I-19. La dynamine OPA1/Mgm1/ Msp1.**

(A) Représentation schématique de la structure générale de OPA1/Mgm1/Msp1. (B) Des levures *S.pombe* invalidées pour *msp1* surexpriment de manière ectopique la dynamine. Après différents temps de répression de l'expression de *msp1*, le réseau mitochondrial observé en microscopie à fluorescence est initialement hyperfilamenteux (panneau de gauche) puis passe par un état sauvage (panneau du centre) et se fragmente (panneau de droite) parallèlement à la diminution des quantités de Msp1 (schématisées au dessus des photos). (C) Reconstruction en 3D du réseau mitochondrial de cellules HeLa sauvages (control) ou déplétées en OPA1 (OPA1-siRNA) qui induit la fragmentation du réseau. (D) Observation au microscope à fluorescence du réseau mitochondrial de fibroblastes embryonnaires de souris (MEF) sauvages, surexprimant OPA1 (MEF OP OPA1) ou des mutants du domaine GTPase (OPA1<sup>K301A</sup>) ou déléétés du GED (OPA1<sup>R905stop</sup>). La surexpression d'opa1 entraîne une augmentation de la filamentation du réseau alors que celle de mutants des domaines GTPase et GED induit la fragmentation. D'après, Guillou - 2005 - FEBS lett., Olichon - 2003 - J. Biol. Chem., Cipolat - 2004 - PNAS.

nombreux tissus, tandis que *mfn2* est essentiellement exprimé dans le cœur et le muscle squelettique (Santel et al., 2003). L'étude de leur activité GTPase révèle que celle de Mfn1 est plus élevée que celle de Mfn2 mais avec une affinité pour le GTP plus faible (Ishihara et al., 2004). Mfn1 serait préférentiellement impliquée dans la fusion des mitochondries alors que Mfn2 pourrait jouer un rôle dans la formation des points de contacts entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique (Ishihara et al., 2004).

*b – Les acteurs essentiels de la fusion de la MI; la dynamine OPA1/Mgm1/Msp1*

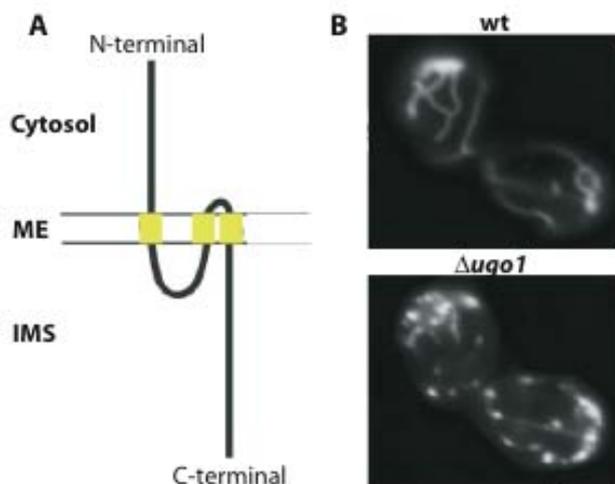
La fusion de la MI fait intervenir la dynamine Mgm1 chez *S. cerevisiae* (Shepard and Yaffe, 1999) et ses orthologues Msp1 chez *S. pombe* (Pelloquin et al., 1999) et OPA1 chez les mammifères (Delettre et al., 2000). Ces trois dynamines apparentées ont une structure semblable, composée du N- vers le C-terminal, de domaines GTPase, Middle et GED (figure I-19, A). Leur adressage à la mitochondrie se fait grâce à une séquence signal (MTS) située à l'extrémité N-terminale. Elles sont localisées dans l'IMS et associées à la MI certainement par le biais de deux régions hydrophobes potentiellement transmembranaires (TM1 et TM2) qui sont situés entre le MTS et le domaine GTPase. Le rôle de cette dynamine dans la fusion mitochondriale a été fermement établi dans l'ensemble des modèles étudiés (Cipolat et al., 2004; Griparic et al., 2004; Guillou et al., 2005; Olichon et al., 2003; Song et al., 2007; Song et al., 2009); son inactivation s'accompagne de la fragmentation du réseau mitochondrial alors que sa surexpression induit la tubulation des mitochondries (figure I-19, B, C, D). Il est à noter cependant qu'une forte surexpression de la dynamine, en particulier dans des cellules ayant un réseau filamenteux, provoque la fragmentation et l'agrégation des mitochondries (Griparic, 2004 #4364; Misaka, 2002 #4081 }.

Dans les cellules de mammifères, la fusion des mitochondries, c'est-à-dire de la ME et de la MI, repose à la fois sur les mitofusines et sur OPA1. L'expression d'OPA1 dans des cellules déficientes en Mfn1 est en effet incapable d'induire la fusion des mitochondries, montrant que l'activité d'OPA1 dans ce processus nécessite celle de Mfn1 (Cipolat et al., 2004). A l'inverse, la fusion de la ME n'est pas compromise dans des cellules où OPA1 a été inactivé, mais ne progresse pas vers la fusion de la MI (Song et al., 2009). La situation est différente chez *S. cerevisiae* où l'inactivation de Mgm1 empêche à la fois la fusion de la ME et celle de la MI (Sesaki et al., 2003b). Ces résultats suggèrent un couplage beaucoup plus étroit entre la fusion de la ME et celle de la MI chez cette levure par rapport aux eucaryotes supérieurs. Une telle différence pourrait refléter celles qui semblent exister entre ces deux type d'organismes dans les mécanismes et les acteurs impliqués dans la coordination de la fusion des deux

membranes. Chez *S. cerevisiae*, un contact plus étroit entre les deux MI rapprochées après fusion de la ME est obtenu par des interactions en *trans* de Mgm1 qui doit donc être présente sur les deux membranes (Meeusen et al., 2006). De telles interactions ne sont pas nécessaires chez les eucaryotes supérieurs puisque la présence d'OPA1 n'est requise que sur une seule des deux MI apposées (Song et al., 2009). D'autre part, les acteurs moléculaires impliqués dans la coordination des deux événements diffèrent aussi entre ces organismes.

#### *c – Les autres acteurs de la fusion*

Un adaptateur entre les machineries de fusion de la ME et celle de la MI a été identifié chez *S. cerevisiae*. Ugo1 est une protéine ancrée dans la ME par trois domaines transmembranaires (Hoppins et al., 2009), dont l'extrémité N-terminale est localisée dans le cytoplasme et l'extrémité C-terminale fait face à l'IMS (figure I-20, A).



#### **Figure I-20. Topologie et fonction d'Ugo1.**

(A) Représentation schématique de la topologie d'Ugo1 dans la membrane externe (ME) des mitochondries de *S. cerevisiae*. Ses 3 domaines transmembranaires (jaune) lui permettent de traverser 3 fois la ME, exposant sa partie N-terminale dans le cytosol et sa partie C-terminale dans l'IMS. (B) Le réseau mitochondrial est filamenteux dans les cellules sauvages (wt) et se fragmente lors de la délétion d'*ugo1* ( $\Delta$ *ugo1*).

Ugo1 est nécessaire à la fois à la fusion de la ME et à celle de la MI puisque certaines de ses mutations induisent des défauts de fusion de la ME et de la MI (Hoppins et al., 2009). Ugo1 relie la machinerie de fusion de la ME avec celle de la MI en interagissant dans l'IMS par son domaine C-terminal avec Mgm1 et par son domaine N-terminal cytoplasmique avec Fzo1 (figure I-18, B) (Sesaki and Jensen, 2004). Aucun homologue structural d'Ugo1 a été identifié chez les eucaryotes supérieurs, mais des expériences de co-immunoprécipitation ont montré que Mfn1, Mfn2 et OPA1 entrent dans la composition d'un même complexe (Guillery et al., 2008). L'organisation de ce complexe, impliquant des interactions directes entre OPA1 et les mitofusines ou un homologue fonctionnel d'Ugo1, reste inconnue.

MICS1 (Mitochondrial morphology and Cristae Structure) est une protéine ancrée par 7 domaines transmembranaires à la MI, probablement impliquée dans la fusion mitochondriale

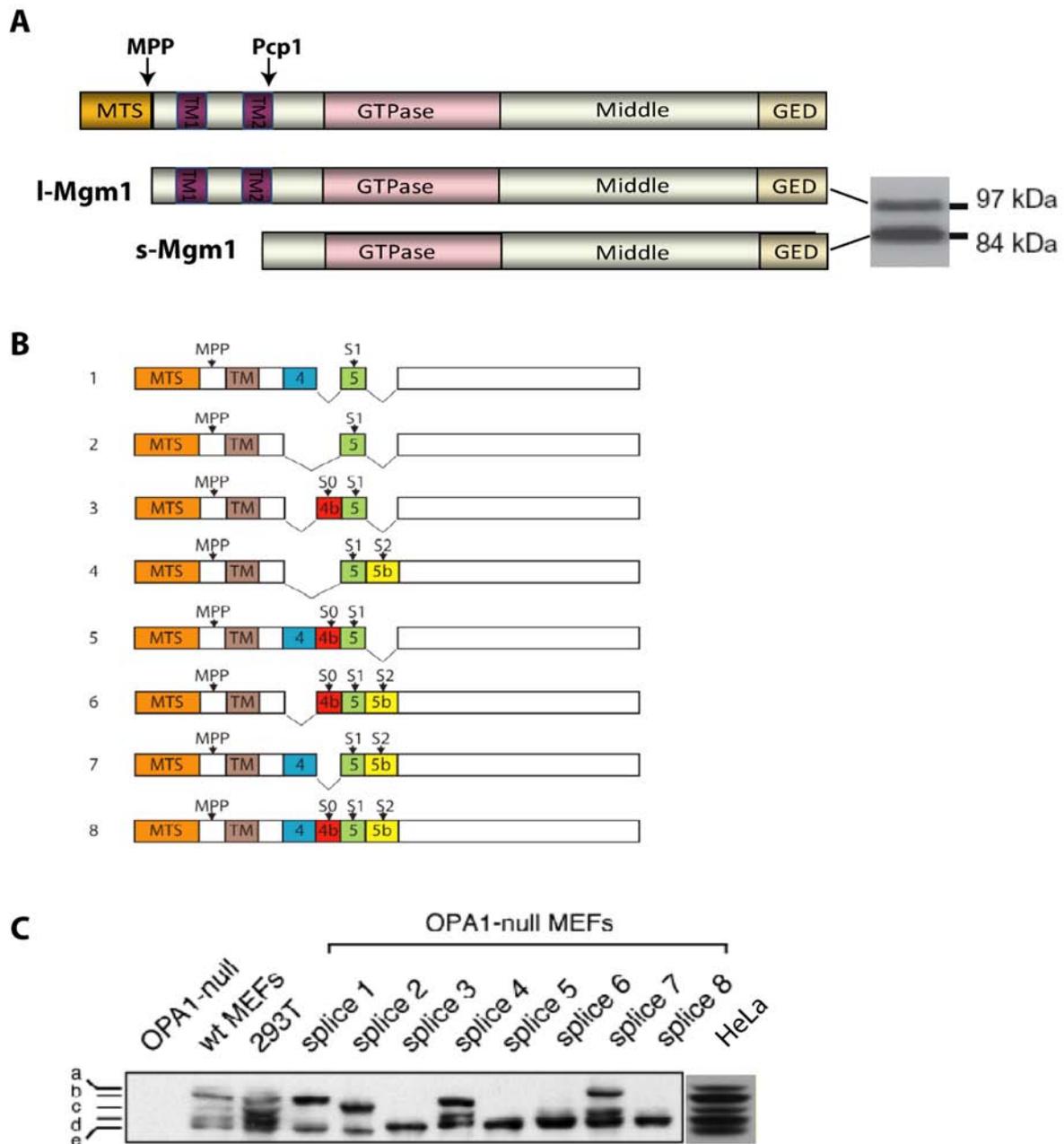
en modulant l'organisation de la MI (Oka et al., 2008). Une phospholipase D mitochondriale, ancrée dans la ME et qui possède une activité d'hydrolyse de la cardiolipine en acide phosphatidique, favoriserait la fusion des ME après leur accolement par les mitofusines en modulant leur composition lipidique et leur courbure (Choi et al., 2006).

#### *d – Mécanismes d'action de la dynamine OPA1/Msp1/Mgm1*

Les mécanismes moléculaires par lesquels la dynamine OPA1/Msp1/Mgm1 exerce ses effets dans la fusion des membranes mitochondriales et en particulier de la MI ont été peu étudiés. La majorité des études sur ce sujet reposent sur l'analyse des phénotypes cellulaires induits par des modifications des différents domaines structuraux de la dynamine. Des mutations des domaines GTPase et des motifs coiled-coil contenus dans le GED C-terminal et dans le domaine Middle, entraînent la fragmentation du réseau mitochondrial (Cipolat et al., 2004; Guillou et al., 2005; Olichon et al., 2003). Pour OPA1 humain, ceci est confirmé par la présence de nombreuses mutations pathogènes réparties dans l'ensemble de ces domaines (voir paragraphe III-3-e).

L'oligomérisation de Mgm1 et d'OPA1 a été suggérée par des expériences indirectes (Frezza et al., 2006; Wong et al., 2003; Yamaguchi et al., 2008; Zick et al., 2009) qui souvent ne distinguent pas entre l'oligomérisation de la protéine et sa présence dans des complexes multi-protéiques. Les complexes mis en évidence ont de plus un poids moléculaire relativement faible qui ne correspond pas avec celui des dynamines classiques assemblées en multimères d'ordre élevé. Des travaux *in vitro* ont été présentés très récemment pour appuyer ces conclusions (Ban et al., 2010; DeVay et al., 2009; Meglei and McQuibban, 2009; Rujiviphat et al., 2009); ils seront analysés dans la discussion après présentation de nos résultats.

L'ensemble de ces données ont toujours été interprétées au regard de deux propriétés primordiales des dynamines classiques; leur auto-assemblage qui implique le GED et le domaine Middle, et stimule l'activité GTPase. Le fonctionnement des dynamines conventionnelles pourrait cependant différer de celui d'OPA1/Msp1/Mgm1 puisque les unes sont résidentes à la membrane et induisent la fusion alors que les autres y sont recrutées et en favorisent la fission. D'autre part, les systèmes de fusion connus n'impliquent pas l'oligomérisation en structures multimériques d'ordre élevé mais l'action concertée d'un nombre limité de composants (Kozlov, 2001). Ceci semble d'ailleurs être le cas pour la fusion de la ME qui n'implique que la dimérisation en *trans* des mitofusines et le recrutement ultérieur de partenaires comme la phospholipase D.



**Figure I-21. Les isoformes longues et courtes d'OPA1/Mgm1/Msp1.**

(A) La figure illustre le mode de production des deux isoformes de Mgm1 chez *S. cerevisiae*. La situation est similaire chez *S. pombe*. La forme longue (l-Mgm1) est issue du clivage par MPP et la forme courte (s-Mgm1) d'un clivage dans le TM2 par la protéase rhomboïde Pcp1. La photo à droite montre l'immunodétection des deux isoformes de Mgm1 à partir d'un extrait protéique de *S. cerevisiae*. (B) Représentation schématique des 8 variants d'épissage d'OPA1 qui diffèrent par la distribution des exons 4, 4b et 5b. Le TM2 n'est pas toujours présent car il est codé par les exons 4b ou 5b. Les sites de clivage par la MPP produisant les formes longues et les sites S0, S1 et S2 générant les formes courtes sont indiqués. (C) Immunodétection réalisée sur des MEF sauvages (wt MEFs), des cellules HEK (293T) et des cellules HeLa montrant la production de 5 isoformes (a à e). Des MEF invalidées pour OPA1 (OPA1-null) ont été transfectées par chacun des variants d'épissage d'OPA1 et l'immunodétection montre la production d'1 à 3 isoformes par variants. D'après, Landes - 2010 - Sem. Cell. Dev. Biol., Song - 2007 - J. Cell Biol.

Une seconde problématique concernant les mécanismes d'action de la dynamine OPA1/Mgm1/Msp1 est due à l'existence d'isoformes longues et courtes générées par maturation post-traductionnelle (figure I-21). Chez la levure *S. cerevisiae*, le MTS est clivé par la peptidase matricielle mitochondriale MPP pendant l'import du précurseur protéique lors d'un arrêt de transfert qui se produit quand le TM1 s'insère dans la membrane. Après ce clivage, la forme longue ainsi produite, l-Mgm1, diffuse latéralement dans la MI à laquelle elle reste ancrée. Alternativement, le transfert vers la matrice se poursuit après clivage du MTS, et la forme courte s-Mgm1 est produite lorsque le TM2 atteint la MI (Herlan et al., 2004). Le TM2 contient en effet en C-terminal un site de clivage par Pcp1 (Herlan et al., 2004; McQuibban et al., 2003), une protéase de type rhomboïde de la MI dont le site actif fait face à l'IMS. La différence structurale essentielle entre ces deux formes de la dynamine réside dans la présence des domaines TM1 et TM2 uniquement dans la forme longue. Le transfert vers la matrice après clivage du MTS, c'est-à-dire la synthèse de s-Mgm1 semble dépendre des niveaux d'ATP matriciels (Herlan et al., 2004) ainsi que de ceux de cardiolipine et de phosphatidyl-éthanolamine (Osman et al., 2009; Sesaki et al., 2006). Chez la levure *S. pombe* deux isoformes de Msp1 existent aussi (l-Msp1 et s-Msp1). L'étude de leur biogenèse et de leur rôle dans la morphologie du réseau mitochondrial a constitué une partie de mon travail de thèse (voir paragraphe R-I-4 et annexe 2).

Pour OPA1, un niveau de complexité supplémentaire est dû à l'existence de huit variants d'épissage (Delettre et al., 2001) (figure I-21, B) pouvant théoriquement produire 8 formes l-OPA1 et 5 formes s-OPA1 grâce à l'existence de 3 sites de maturation protéolytiques (S0, S1 et S2). En fait, 4 formes seulement l-OPA1 seraient produites puisque les précurseurs contenant l'exon alternatif 4b sont systématiquement clivés en formes courtes ((Song et al., 2007), figure I-21, B). En ce qui concerne le nombre de formes s-OPA1, l'analyse est compliquée par des différences de tailles trop faibles pour être visualisées à l'aide d'immunoblots qui révèlent cependant au moins trois formes s-OPA1 (figure I-21, C). La maturation protéolytique d'OPA1 fait intervenir trois sites de clivage: S0 dans l'exon 4b, S1 dans l'exon 5 et S2 dans l'exon 5b (Griparic et al., 2007; Ishihara et al., 2006). La paraplégine et l'AFGL deux métallo-protéases ATP-dépendante matricielles (mAAA protéases), interviendraient dans le clivage du site S1 (Duvezin-Caubet et al., 2007; Guillery et al., 2008; Ishihara et al., 2006) alors que Yme1L, une iAAA protéase de l'IMS, permettrait le clivage du site S2 et probablement du site S0 (Griparic et al., 2007; Guillery et al., 2008; Song et al., 2007). Deux autres protéases, PARL (Presenilin Associated Rhomboid Like protease) et la métallo-protéase ATP indépendante OMA1, sont aussi impliquées dans la production de

formes s-OPA1. PARL génère une forme courte d'OPA1 soluble dans l'IMS (Cipolat et al., 2006) et OMA1 joue un rôle dans le clivage des isoformes longues d'OPA1 en isoformes courtes lors de dysfonctions mitochondriales s'accompagnant d'une chute du niveau d'ATP ou du potentiel de membrane (Ehse et al., 2009). Contrairement à la situation chez *S. cerevisiae* les formes courtes s-OPA1 peuvent être issues de la protéolyse des formes longues préexistantes (Ishihara et al., 2006, Song, 2007 #4832).

L'existence de plusieurs isoformes des dynamines OPA1/Mgm1/Msp1 pose la question de leurs fonctions respectives et de leurs mécanismes d'action. Chez *S. Cerevisiae*, l'expression séparée de l-Mgm1 ou de s-Mgm1 dans des cellules où la fission des mitochondries a été provoquée par la délétion du gène *Mgm1* ne suffit pas à rétablir la morphologie tubulaire et filamenteuse du réseau mitochondrial (Herlan et al., 2003). Pour cela, la présence des deux isoformes dans des proportions relatives proches de celles qui existent dans les cellules sauvages est nécessaire (Herlan et al., 2004; Herlan et al., 2003). La délétion de la protéase Pcp1 responsable de la formation de s-Mgm1 induit aussi la fragmentation des mitochondries qui ne récupèrent leur état filamenteux que grâce à l'expression ectopique de s-Mgm1 (Herlan et al., 2003). Ces travaux sur Mgm1 complétés et étendus à l'orthologue OPA1 ont conduit à proposer que les formes longues de la dynamine puissent être responsables de son activité fusogène mais que les formes courtes exerceraient un effet régulateur nécessaire au développement de cette activité (Cipolat et al., 2006; Guillery et al., 2008; Ishihara et al., 2006; Sesaki et al., 2003a; Song et al., 2007). Les propriétés particulières des isoformes longues et courtes de la dynamine à la base d'éventuelles différences de fonctionnalité restent à déterminer.

### ***I-III.3 Pertinence fonctionnelle de la dynamique mitochondriale***

Pour la clarté de l'exposé, je n'ai exposé ci-dessus que les effets des acteurs de la dynamique mitochondriale sur la morphologie globale du réseau mitochondrial. Il est cependant rapidement apparu qu'ils modulaient un ensemble de fonction mitochondriales.

#### *a – Le maintien du génome mitochondrial*

Dans les levures, la perte de fonction d'un des acteurs de la fusion, que ce soit Fzo1, Ugo1 ou Msp1/Mgm1, outre la fragmentation des mitochondries induit aussi la perte de l'ADNmt (Guillou et al., 2005; Hermann et al., 1998; Jones and Fangman, 1992; Rapaport et al., 1998; Sesaki and Jensen, 2001; Zick et al., 2009). D'un point de vue métabolique, ceci se traduit par

l'incapacité des cellules à pousser sur milieu respiratoire. Cette propriété fait de *msp1* chez *S.pombe* un gène essentiel car cette levure est "petite négative" c'est-à-dire qu'elle ne tolère pas la perte de l'ADNmt. Ceci pourrait s'expliquer par la perte des complexes respiratoires dont une partie des composants sont codés par le génome mitochondrial, induisant la chute du potentiel de membrane (Chen and Clark-Walker, 2000) et donc de l'import des protéines mitochondriales d'origine nucléaire. La mitochondrie ne peut plus alors assurer ses fonctions cellulaires, notamment la biogénèse des noyaux fer/soufre qui sont essentiels à la vie cellulaire (Lill and Muhlenhoff, 2008). Chez les eucaryotes supérieurs, des mutations faux-sens d'OPA1 ont été reliées à une forme syndromique de l'ADOA-1 qui corrèle avec l'accumulation de délétions dans l'ADNmt des muscles squelettiques (Amati-Bonneau et al., 2008; Hudson et al., 2008), suggérant qu'OPA1 est aussi impliquée dans le maintien de l'ADNmt. Une étude récente a montré que les formes l-OPA1 issues de variants d'épissage intégrant l'exon 4b où se trouve le site de maturation S0 (figure I-21, B et C) sont clivées pour produire s-OPA1 et un peptide de 10 kDa. Celui-ci présente deux régions hydrophobes, l'une contenue dans l'exon 4b et la seconde constituée du domaine TM en N-terminal, séparées par une boucle de quelques dizaines d'acides aminés. Il est proposé que l'insertion de ce peptide dans la MI avec la boucle faisant face à la matrice soit essentielle à la réplication et au maintien de l'ADNmt (Elachouri et al., 2010).

Dans la levure, la perte de l'ADNmt, associée à la perte de fonction d'un des acteurs de la fusion peut être compensée par la perte simultanée de la fission; les doubles délétants  $\Delta mgm1/\Delta dnm1$ ,  $\Delta fzo1/\Delta dnm1$ , ou  $\Delta ugo1/\Delta dnm1$  récupèrent une morphologie filamenteuse du réseau mitochondrial et sont capables de maintenir leur ADNmt (Bleazard et al., 1999; Guillou et al., 2005; Sesaki and Jensen, 1999; Sesaki and Jensen, 2001). La croissance sur milieu respiratoire est aussi restaurée. Cette observation surprenante suggère que le maintien de l'intégrité des nucléoïdes est en relation étroite avec la structuration de la MI à laquelle ils sont associés.

#### *b – Structure des crêtes et apoptose*

Un autre effet de la perte d'activité de Mgm1 ou d'OPA1 est la désorganisation des crêtes mitochondriales parfois accompagnée d'une diminution plus ou moins importante de leur nombre (Amutha et al., 2004; Cipolat et al., 2006; Frezza et al., 2006; Olichon et al., 2003; Sesaki et al., 2003b). Dans le cas de Mgm1, cette déstructuration des crêtes, comme la fragmentation des mitochondries et la perte de l'ADNmt est supprimée par la délétion de Dnm1 concomitante à l'inactivation de Mgm1 (Sesaki et al., 2003b).

Chez les eucaryotes supérieurs, la désorganisation des crêtes induite par une perte de fonction d'OPA1 s'accompagne d'une sensibilité accrue à l'apoptose (Olichon et al., 2003). En règle générale, la fission des mitochondries - obtenue par inactivation d'acteurs de la fusion tels qu'OPA1 et Mfn1 ou par stimulation d'acteurs de la fission tels que Dnm1 et Fis1 - augmente la sensibilité à l'apoptose alors que leur fusion - obtenue par les manipulations inverses - la diminue (Lee et al., 2004; Sugioka et al., 2004). Ces effets de la dynamique mitochondriale sur la sensibilité à l'apoptose passent par le remaniement de la structure des membranes modifiant les interactions qu'elles ont avec un ensemble de facteurs pro- ou anti-apoptotique (Landes et al., 2010b; Otera and Mihara, 2010; Sheridan and Martin, 2011). Ici encore, les actions antagonistes de la fusion et de la fission des mitochondries suggèrent un rôle des acteurs de la dynamique mitochondrial sur l'organisation des membranes, se répercutant sur un ensemble de fonction de l'organelle.

Un mécanisme d'action d'OPA1 dans l'apoptose a récemment été suggéré. La dynamine, en particulier des formes s-OPA1, entrerait dans la composition d'un complexe protéique à la jonction des crêtes, qui assurerait le maintien de leur structure (Cipolat et al., 2006; Darshi et al., 2010; Frezza et al., 2006). En conditions physiologiques, la jonction adopterait une position «fermée» apte à retenir le cytochrome c dans l'IMS intra-crêtes où il est normalement concentré et joue son rôle de transporteur d'électrons. Les stimuli apoptotiques ou la perte d'activité d'OPA1 entraîneraient la dissociation des complexes et l'ouverture de la jonction des crêtes (Cipolat et al., 2006; Frezza et al., 2006; Landes et al., 2010a). D'autres travaux montrent cependant que le diamètre de la jonction rétrécirait plutôt au cours de l'apoptose (Yamaguchi et al., 2008). De plus, le diamètre des jonctions dites fermées (10 à 50 nm) est largement suffisant pour laisser passer une molécule de cytochrome c dont le diamètre hydrodynamique est de 3,4 nm (Mirkin et al., 2008). L'interprétation de ces résultats doit donc faire appel à d'autres mécanismes. OPA1 pourrait par exemple être impliqué dans la structuration des crêtes en assurant la mise en place d'une barrière de diffusion membranaire à leurs jonctions. Ceci rendrait compte de la composition protéique particulière des crêtes (Wurm and Jakobs, 2006) et pourrait favoriser l'organisation des supra-complexes respiratoires et leur interaction avec le cytochrome c, limitant ainsi sa diffusion dans l'IMS.

#### *c – L'adaptation métabolique*

L'importance de la dynamique mitochondriale dans l'organisation de la MI se reflète par ses actions sur le métabolisme énergétique. Une augmentation de la filamentation est en effet observée chez les levures cultivées en milieu respiratoire (Jakobs et al., 2003). Chez les

eucaryotes supérieurs, la perte de fonction de Mfn2 ou d'OPA1 se traduit par une diminution de la respiration et une perte du potentiel de membrane, pouvant être accompagnés d'une diminution de la synthèse d'ATP dans le cas de certaines mutations entraînant l'ADOA-1 (Chen et al., 2005; Zanna et al., 2008). Dans le cas de Mfn2, on observe la diminution de l'expression de sous-unités des complexes respiratoires I, II, III et V qui s'accompagne d'un ralentissement de l'activité du cycle de Krebs, compensé par une augmentation de la glycolyse parallèle à une diminution de la synthèse de glycogène (Bach et al., 2003; Pich et al., 2005). Inversement, la surexpression de Mfn2 induit une élévation du potentiel de membrane et une augmentation de l'expression de sous-unités des complexes I, IV et V (Chen et al., 2005; Pich et al., 2005). La présence au sein d'une cellule de mitochondries ayant des morphologies variables, corrélées avec des différences d'état redox, de potentiel de membrane, de respiration et de sensibilité au stress photo-oxydant, reflète très certainement des réorganisations membranaires, impliquant les acteurs de la dynamique mitochondriale, en adaptation aux besoins propres à des régions particulières de la cellule (Kuznetsov and Margreiter, 2009).

La dynamique mitochondriale est également impliquée dans la régulation de l'homéostasie calcique: de faibles quantités de Mfn2 sont associées au réticulum endoplasmique (RE) et seraient impliquées dans des points de contact du RE avec les mitochondries. L'absence de Mfn2 entraînerait la perte des contacts entre les deux organelles et induirait une fragmentation du RE et une perturbation de l'homéostasie calcique (de Brito and Scorrano, 2008).

#### *d – Distribution cellulaire des mitochondries*

Les défauts de la dynamique mitochondriale affectent essentiellement le tissu nerveux du fait de la taille et de la polarité importante des neurones. Les zones synaptiques demandent en effet une grande quantité d'ATP et une forte capacité à tamponner le calcium. La dynamique mitochondriale dans les neurones est donc importante pour répondre aux forts besoins énergétiques de ces cellules et pour une bonne distribution des mitochondries là où elles sont nécessaires (Chang et al., 2006). Chez la drosophile, une inactivation de Drp1 entraîne l'inhibition des transmissions synaptiques de la jonction neuromusculaire, due à l'absence de mitochondries dans cette zone, qui empêche la mobilisation dépendante de l'ATP des vésicules de réserve (Verstreken et al., 2005). Dans des neurones hippocampaux de rat, la perte de fonction de Drp1 entraîne la déplétion en mitochondries dans les dendrites et une diminution de ces structures. Sa surexpression conduit par contre à une augmentation du nombre de mitochondries dans les dendrites (Li et al., 2004).

Dans les cellules HeLa qui ont un réseau tubulaire en interphase, la fragmentation des mitochondries est observée en début de mitose puis le réseau redevient tubulaire dans les cellules filles (Taguchi et al., 2007). Dans ce cas, la fission des mitochondries faciliterait leur répartition homogène dans le cytoplasme et leur transmission équitable aux cellules filles. Un mécanisme similaire a été suggéré dans les levures où la protéine Num1, impliquée dans la migration des noyaux au cours de la mitose, favorise la fission des mitochondries en interagissant avec Dnm1 (Cervený et al., 2007). Une relation entre la morphologie du réseau mitochondrial et la progression du cycle cellulaire a aussi été mise en évidence: le réseau devient filamenteux à la transition G1/S. L'inhibition de cette filamentation bloque les cellules en G1 indiquant que ce changement est nécessaire à la progression dans le cycle cellulaire (Mitra et al., 2009).

#### *e – Neuro-dégénérescence et développement*

L'importance fonctionnelle de la dynamique mitochondriale est finalement soulignée par l'implication de mutations de ses acteurs dans des pathologies neuro-dégénératives. Des mutations du gène *opa1* sont responsables de l'atrophie optique dominante de type I (ADOA-1) qui se traduit par une dégénérescence des cellules ganglionnaires de la rétine (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000). Des mutations de *mfn2* sont responsables de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 2A qui est une forme axonale à transmission autosomique dominante. Cette maladie entraîne une amyotrophie distale parfois accompagnée de troubles sensitifs due à une atteinte évolutive des nerfs périphériques. Des mutations dans le gène *GDAP1* sont elles responsables du développement de la maladie de Charcot-Marie-Tooth de type 4A, une forme démyélinisante autosomique récessive (Cuesta et al., 2002).

Dans des modèles animaux les pertes de fonction des gènes *mfn1*, *mfn2*, *opa1* ou *drp1* conduisent toutes à une létalité embryonnaire à mi-gestation (Chen et al., 2003; Frezza et al., 2006; Ishihara et al., 2009). Dans des souris délétées pour *mfn1* ou *mfn2* la létalité est due à des défauts placentaires (Chen et al., 2003; Chen et al., 2007). L'ablation conditionnelle de *mfn1* dans la totalité de l'embryon, à l'exception des cellules du placenta, permet aux souriceaux d'arriver à terme et donne des souris *mfn1*<sup>-/-</sup> viables et fertiles pendant au moins un an. La même délétion conditionnelle pour *mfn2* donne des souris *mfn2*<sup>-/-</sup> qui présentent des défauts de développement du cervelet, de mouvement et dans les cellules de Purkinje (Chen et al., 2007), montrant l'importance de Mfn2 dans le développement cérébral post-natal des souris. Des mutations troncatives dans les exons 8 et 10 d'*opa1* conduisent à la létalité embryonnaire à l'état homozygote. Elles sont viables à l'état hétérozygote mais les souriceaux

présentent une neuropathie optique progressive (Alavi et al., 2007; Davies et al., 2007).

**La morphologie du réseau mitochondrial est donc le résultat d'évènements continus de fission et de fusion membranaire impliquant des grandes GTPases, dont la dynamine apparentée OPA1/Mgm1/Msp1. Au-delà de leurs effets sur la morphologie des mitochondries, les acteurs de la dynamique mitochondriale jouent un rôle prépondérant dans le maintien de l'ADNmt, la structure des crêtes et l'apoptose, la respiration et le potentiel de membrane et d'autres voies du métabolisme mitochondrial nécessaires à l'homéostasie cellulaire. La diversité de ces activités suggère une action sur l'organisation des membranes modulant en retour cet ensemble de fonctions dont une majorité dépend effectivement de l'association avec les membranes des protéines qui y participent. Cette possibilité est renforcée par les observations récurrentes que les effecteurs de la fusion et de la fission ont des actions antagonistes sur ces fonctions, l'inactivation concomitante des uns et des autres aboutissant souvent à la restauration d'un phénotype sauvage.**

#### **I-IV. Thématique et développements de la recherche**

Notre hypothèse de travail est donc que la dynamine OPA1/Mgm1/Msp1 module l'ensemble des fonctions mitochondriales dans lesquelles elle est impliquée grâce à un rôle plus général dans l'organisation de la MI. Les propriétés de la dynamine à la base de cette activité restent cependant à définir. Elles s'appuient certainement comme pour les dynamines classiques (cf. I-3-c), sur une action mécanique due à son association avec les membranes, promouvant des changements locaux de la courbure, la fluidité ou la composition en phospholipides. Les microdomaines membranaires ainsi formés pourraient alors moduler l'activité de protéines résidentes de la membrane et permettre le recrutement/détachement de protéines périphériques, initiant l'élaboration de complexes protéiques en fonction des partenaires présents et des besoins cellulaires.

Pour étudier ces possibilités, nous avons choisi comme modèle expérimental la levure où l'existence de seulement deux isoformes de la dynamine simplifie la situation par rapport aux multiples isoformes d'OPA1. Notre choix s'est porté sur *S. pombe* dont le fonctionnement mitochondrial paraît moins éloigné de celui des eucaryotes supérieurs que celui de *S. cerevisiae* (Chiron et al., 2007). La distribution des mitochondries dans la cellule et leur ségrégation au cours de la mitose sont assurées par le cytosquelette microtubulaire plutôt que par celui d'actine chez *S. cerevisiae*. D'autre part, la taille et la structure de l'ADNmt de *S.*

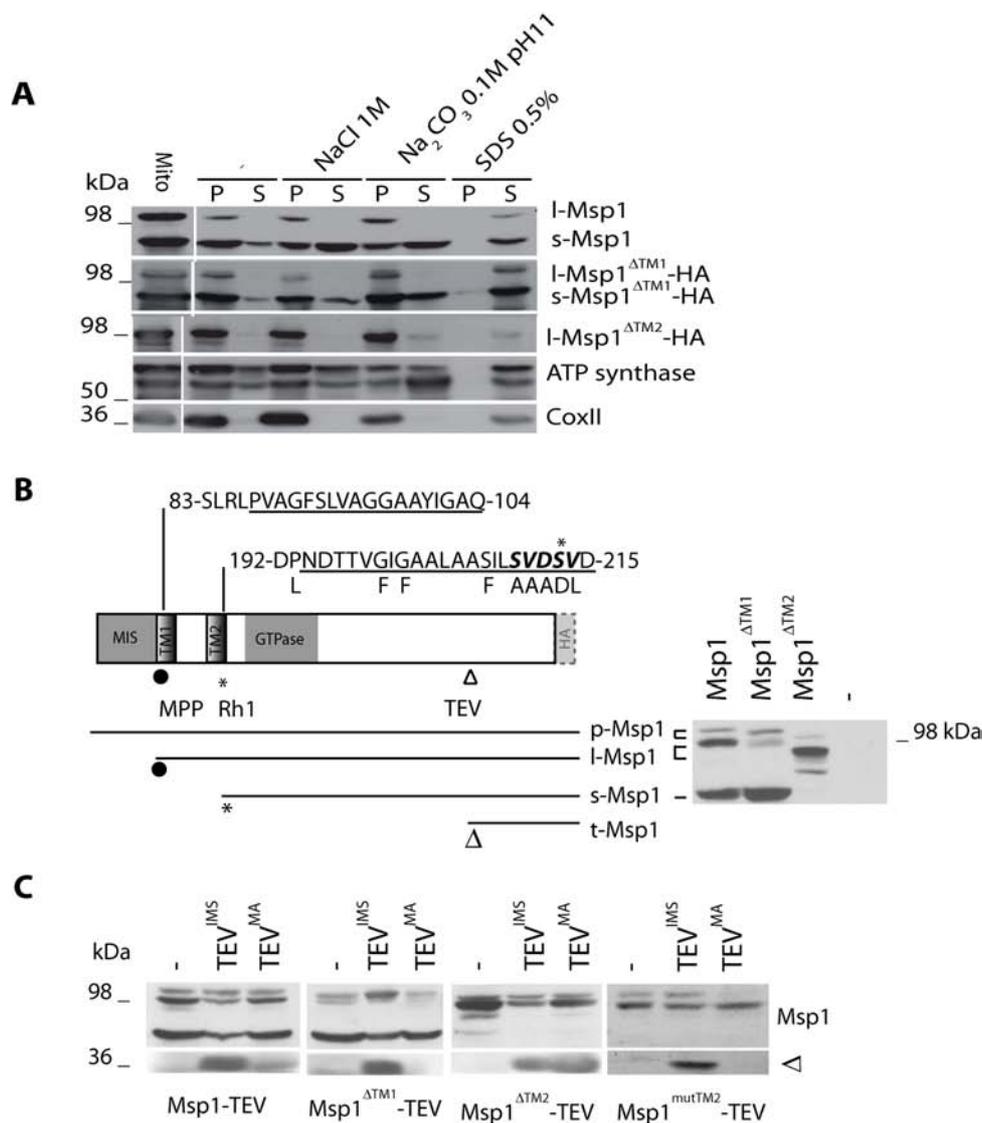
*pombe* et de l'homme sont plus semblables entre eux qu'avec celui de la levure de boulanger, ce que se traduit peut-être par des similitudes plus fortes dans les modes de maturation et de traduction des ARNm (Chiron et al., 2005). Enfin, comme nous l'avons vu dans l'introduction (paragraphe I-II.2.a) les cellules de mammifères et de *S. pombe*, sont “petites négatives“, c'est-à-dire incapables de survivre à la perte de leur ADNmt.

Dans un premier temps, j'ai caractérisé les domaines d'association de l-Msp1 et s-Msp1 avec les membranes et analysé leur influence sur la morphologie du réseau mitochondrial et le maintien des nucléoïdes. J'ai aussi participé à l'identification des voies de maturation des isoformes l-Msp1 et s-Msp1 et à l'étude des effets de la modulation de leurs quantités respectives sur la morphologie des mitochondries.

Deux voies de recherche ont alors été développées pour étudier nos hypothèses sur le mode d'action de Msp1. Etant donné les relations souvent suggérées entre les dynamines et les enzymes du remodelage des phospholipides, j'ai analysé les éventuelles liens fonctionnels entre ces enzymes et Msp1. Une telle éventualité pouvait expliquer la spécificité rétinienne de l'ADOA-1. Les membranes neuronales, en particulier celles de la rétine, sont enrichies en acides gras poly-insaturés, comme l'acide docosahexaénoïque (DHA). Ce type de phospholipides est important pour les fonctions neuronales et constitue un précurseur de la neuroprotectin D1 (Bazan, 2006). En modulant l'activité de phospholipases et d'acyl transférase, OPA1 pourrait favoriser l'incorporation de DHA dans les mitochondries qui semblent constituer un réservoir de ce phospholipide (Brenna and Diau, 2007). Dans le génome de *S.pombe* (<http://old.genedb.org/genedb/pombe/>), deux gènes correspondent à des phospholipases mitochondriales; SPAC20G8.02 que nous avons appelé mtPLase, et SPBC32F12.01c, une phospholipase C que nous avons appelée mtPLaseC. Nous avons également choisi d'étudier ACP6 (SPBC4.06), une phosphatase acide à activité acyl-transférase potentielle, qui avait été identifiée dans l'équipe comme un partenaire de Msp1 en co-immunoprécipitation *in organello* (Guillou, 2005, Thèse UPS - Toulouse III).

Le troisième axe de recherche a consisté à purifier les isoformes l-Msp1 et s-Msp1, ainsi que des mutants de ses domaines structuraux, pour les incorporer dans des liposomes unilamellaires ayant une composition en phospholipides proche de celle de la membrane interne des mitochondries. J'ai commencé par caractériser l'influence de la dynamine sur la formation de bicouches supportées planes, mettant en évidence sa capacité à favoriser leur étalement sur le support. Le système de liposome a alors été mis à profit pour étudier les effets directs de Msp1 sur la fusion des membranes, en relation avec son activité GTPase et son éventuelle oligomérisation.





**Figure R-1. Rôle de TM1 et TM2 dans l'association et la localisation de Msp1 à la membrane.**

(A) Des mitochondries (Mito) sont préparées à partir de levures exprimant des plasmides codant pour Msp1<sup>ΔTM1</sup> ou Msp1<sup>ΔTM2</sup> étiquetées en C-terminal avec l'épitope HA. Après sonication en tampon hypotonique, les membranes mitochondriales sont sédimentées, reprises dans du tampon seul (-) ou contenant 1M NaCl, 0.1M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH11 ou 0.5% SDS, incubées pendant 30 min. et centrifugées à 100,000 x g. Le culot (P) et le surnageant (S) sont analysés par SDS-PAGE et immunodétection avec un anticorps dirigé contre Msp1 ou HA et la F1-ATP synthase et CoxII pour les protéines contrôles périphériques et intégrales, respectivement. (B) Schéma de la structure de Msp1. Les séquences des TM1 et TM2 sont indiquées avec les résidus délétés dans Msp1<sup>ΔTM1</sup> et Msp1<sup>ΔTM2</sup> soulignés et les substitutions dans Msp1<sup>mutTM2</sup> indiquées sous la séquence du TM2. Le précurseur (p-Msp1) contenant le MIS est schématisé ainsi que les sites et les produits de clivage par la peptidase matricielle mitochondriale (MPP, ●, l-Msp1), la protéase Rh1 (\*, s-Msp1) et la protéase TEV (Δ, t-Msp1). Le tag HA est représenté par une boîte en C-terminal. La photo de droite représente l'immunodétection avec des anticorps anti-Msp1 des formes présentes dans des cellules transfectées ou non (-) par un plasmide codant pour Msp1, Msp1<sup>ΔTM1</sup> ou Msp1<sup>ΔTM2</sup>. (C) Des levures ont été transfectées par les constructions Msp1, Msp1<sup>ΔTM1</sup>, Msp1<sup>ΔTM2</sup> ou Msp1<sup>mutTM2</sup> contenant le site TEV et le tag HA, seules (-) ou en combinaison avec un plasmide permettant l'expression de la protéase TEV à l'IMS (TEV<sup>IMS</sup>) ou à la matrice (TEV<sup>MA</sup>). Après 24H d'expression, les extraits protéiques sont analysés par SDS-PAGE et immunodétection avec des anticorps anti-HA. Le produit de clivage par TEV est indiqué par Δ.

## Résultats

### R-I. Interactions de Msp1 avec les membranes: rôle dans le contrôle de la morphologie des mitochondries et le maintien de leur génome

*La caractérisation des déterminants structuraux et du rôle de l'association de Msp1 avec la membrane interne, ainsi que celle de la biogénèse des formes l-Msp1 et s-Msp1 a fait l'objet de 2 publications dont les résultats sont résumés ici.*

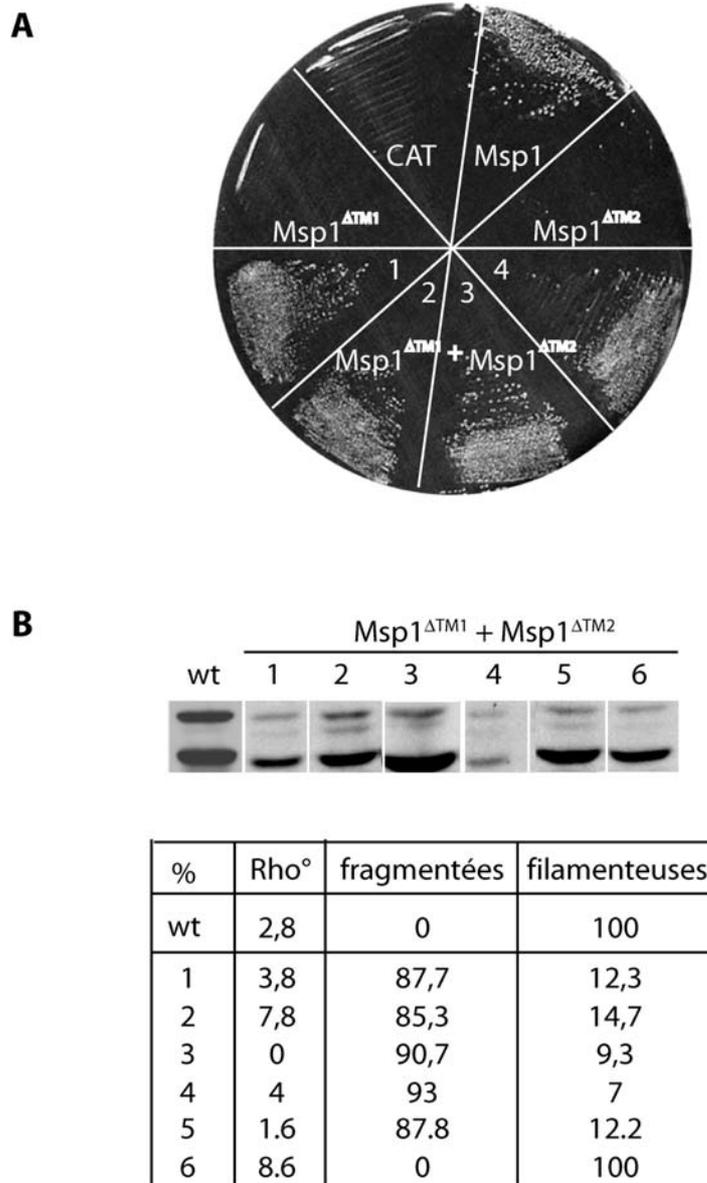
**Article 1.** Diot, A., E. Guillou, M. Daloyau, L. Arnaune-Pelloquin, L. J. Emorine and P. Belenguer (2009). "Transmembrane segments of the dynamin Msp1p uncouple its functions in the control of mitochondrial morphology and genome maintenance." **J Cell Sci** **122**: 2632-9. (Voir Annexe I, p. )

#### ***R-I.1 Déterminants structuraux des interactions de Msp1 avec les membranes***

Il a souvent été suggéré que les deux isoformes de Msp1, la forme longue (l-Msp1) et la forme courte (s-Msp1), ont des fonctions différentes. La différence principale entre les deux isoformes est la présence dans l-Msp1 de deux domaines hydrophobes TM1 et TM2 qui n'existent pas dans s-Msp1. Nous avons analysé les comportements respectifs de l-Msp1 et de s-Msp1 vis-à-vis des membranes lors d'extractions par des traitements salins et alcalins qui déstabilisent préférentiellement les interactions ioniques et les ponts hydrogènes, respectivement. Dans ces expériences (figure R-1, A), l-Msp1 reste associée aux membranes quelles que soient les conditions; elle se comporte comme Cox2, une protéine intégrale de la MI. La forme s-Msp1 est en partie extraite par ces traitements; elle se comporte comme la sous-unité  $\alpha$  de la F<sub>1</sub>-ATPase, associée à la MI *via* son interaction avec F<sub>0</sub>.

Pour évaluer les rôles respectifs de TM1 et TM2 dans l'association de l-Msp1 à la membrane, nous avons construit deux formes,  $msp1^{\Delta TM1}$  et  $msp1^{\Delta TM2}$ , amputées respectivement de l'un ou l'autre de ses segments hydrophobes. L'expression de  $msp1^{\Delta TM1}$  entraîne la production d'une forme longue sans TM1, l-Msp1 <sup>$\Delta TM1$</sup> , et d'une forme courte sauvage (figure R-1, B). Le site de clivage permettant la production de la forme courte étant localisé dans le TM2, l'expression de  $msp1^{\Delta TM2}$  donne uniquement une forme longue amputée du TM2, l-Msp1 <sup>$\Delta TM2$</sup>  (figure R-1, B). Les formes l-Msp1 <sup>$\Delta TM1$</sup>  et l-Msp1 <sup>$\Delta TM2$</sup>  restent associées aux membranes lors des traitements salins ou alcalins (figure R-1, A).

Ces résultats montrent que chacun des deux segments hydrophobes contribue à l'ancrage de



**Figure R-2. Les domaines TM1 et TM2 sont essentiels à la fonction de Msp1.**

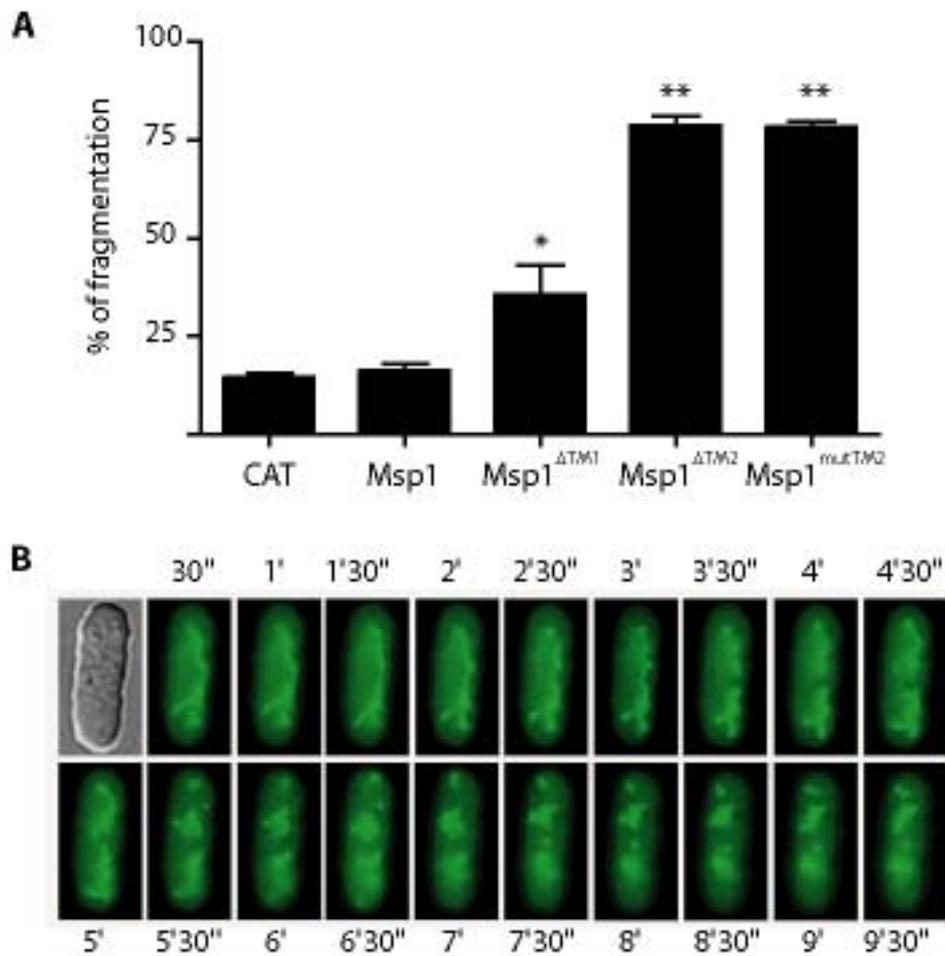
(A) Une souche diploïde *msp1*<sup>+</sup>/*Dmsp1* a été transfectée avec des plasmides codant pour CAT ou les versions taggées HA de *msp1*, *msp1*<sup>ΔTM1</sup> ou *msp1*<sup>ΔTM2</sup> sous le contrôle du promoteur modéré *nmt1*. Des spores issues des souches transfectées sont étalées sur milieu minimum sans thiamine pour induire l'expression des constructions et tester leur capacité à compléter la perte de *msp1*. Les 4 clones de la moitié inférieure (1 à 4) co-expriment *Msp1*<sup>ΔTM1</sup> et *Msp1*<sup>ΔTM2</sup>. (B) Les extraits protéiques totaux d'un clone  $\Delta$ *msp1* complémenté par la surexpression de *msp1* (wt) ou de 6 clones complémentés par la co-expression de *msp1*<sup>ΔTM1</sup> et *msp1*<sup>ΔTM2</sup> sont analysés par SDS-PAGE et immunodétection avec un anticorps anti *Msp1*. La proportion de cellules ayant perdu leur génome mitochondrial (Rho°) et la morphologie (fragmentées ou filamenteuses) des mitochondries de ces différents clones est indiquée dans le tableau.

l-Msp1 à la MI en contactant avec cette dernière des interactions fortes, peut-être de type hydrophobe. La topologie de la protéine, exposée dans l'IMS (Guillou et al., 2005), suggère que TM1 est transmembranaire alors que TM2 s'associe à la surface de la membrane. La persistance d'une association de s-Msp1 avec la membrane indique qu'il existe, en plus des segments TM1 et TM2 propres à l-Msp1, un troisième site d'interaction commun aux deux isoformes. Ce dernier, bien que de type périphérique, reste relativement fort et pourrait aussi impliquer des interactions de surface de type ioniques et hydrophobes. Par commodité, ce site sera appelé SIM3 (Site d'Interaction Membranaire 3) par la suite.

### ***R-I.2 Implication de TM1 et TM2 dans les fonctions de Msp1***

La localisation intra-mitochondriale de l-Msp1<sup>ΔTM1</sup> et l-Msp1<sup>ΔTM2</sup> a été vérifiée avant d'étudier leur fonctionnalité. Pour cela, nous avons introduit en C-terminal de Msp1 un site de clivage par la protéase TEV qui, si la topologie est respectée, ne sera accessible que de l'IMS. La co-expression du gène sauvage *Msp1* avec une protéase TEV ciblée soit à l'IMS soit à la matrice confirme que l-Msp1 et s-Msp1 ne sont accessibles à TEV que lorsque celle-ci est exprimée dans l'IMS (figure R-1, C). Il en est de même pour l-Msp1<sup>ΔTM1</sup>. Ces trois formes sont donc correctement localisées dans l'IMS. l-Msp1<sup>ΔTM2</sup> est par contre accessible à la protéase adressée à l'IMS ou à la matrice, donc une partie de l-Msp1<sup>ΔTM2</sup> est délocalisée dans la matrice (figure R-1, C). Ceci peut s'expliquer par la perte du TM2 dont l'hydrophobicité constitue un signal d'arrêt de transfert (Herlan et al., 2004). En effet, l'expression de *msp1<sup>mutTM2</sup>*, où le TM2 a été muté tout en restant hydrophobe (figure R-1, B), produit une forme longue l-Msp1<sup>mutTM2</sup> orientée correctement dans l'IMS (figure R-1, C).

Nous avons alors étudié la fonctionnalité de *msp1<sup>ΔTM1</sup>* et *msp1<sup>ΔTM2</sup>* en déterminant leur capacité à compléter la perte du gène *msp1* qui est létale pour *S. pombe*. L'expression séparée de *msp1<sup>ΔTM1</sup>* ou *msp1<sup>ΔTM2</sup>* ne permet pas la complémentation (figure R-2, A). L'expression du gène *msp1<sup>ΔTM1</sup>* produit une forme longue l-Msp1<sup>ΔTM1</sup> et une forme courte normale mais dans un rapport l/s inférieur à celui qui est observé dans des souches sauvages (figure R-1, B). Comme la localisation de ce mutant est correcte, son manque de complémentation peut provenir d'une perte de fonctionnalité de l-Msp1<sup>ΔTM1</sup> ou d'un trop fort déséquilibre du rapport l/s qui est néfaste à la fonction de la dynamine (Herlan et al., 2004; Herlan et al., 2003). Les mutants *msp1<sup>ΔTM2</sup>* et *msp1<sup>mutTM2</sup>*, qui ne produisent qu'une forme longue, représentent un cas extrême de ce déséquilibre (figure R-1, B). Ces résultats sont en accord avec ceux obtenus chez *S.cerevisiae* qui montrent que la perte de fonction de *mgm1* ne peut être complétement par une seule des isoformes de la dynamine (Herlan et al., 2003). La



**Figure R-3. Msp1<sup>ΔTM1</sup> et Msp1<sup>ΔTM2</sup> ou Msp1<sup>mutTM2</sup> ont un effet dominant négatif sur la morphologie du réseau mitochondrial.**

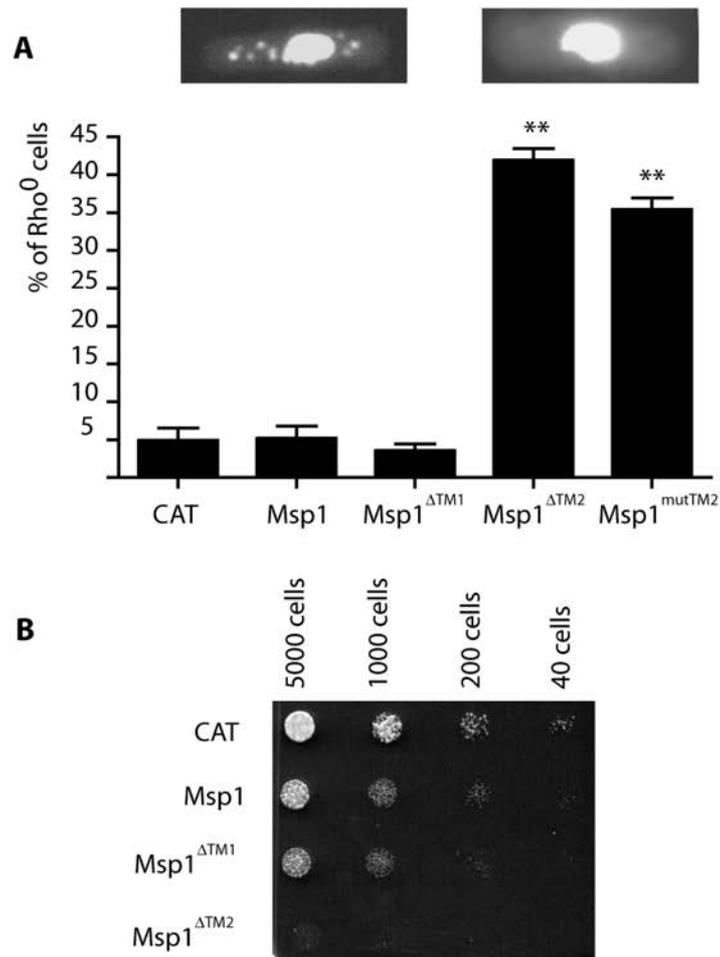
Une souche exprimant une protéine mitochondriale étiquetée par la mCherry a été transfectée par un plasmide codant pour CAT, Msp1, Msp1<sup>ΔTM1</sup>, Msp1<sup>ΔTM2</sup> ou Msp1<sup>mutTM2</sup>. Les cellules sont observées en microscopie à fluorescence après 24H d'expression et fixation à la formaldéhyde pour compter celles ayant des mitochondries tubulaires ou fragmentées (300 cellules par conditions). (A) Le graphique représente le pourcentage de cellules avec un réseau fragmenté. Test ANOVA de Tukey; \*p<0.05 et \*\*p<0.001 pour Msp1<sup>ΔTM1</sup> et Msp1<sup>ΔTM2</sup>/Msp1<sup>mutTM2</sup> vs Msp1 ou CAT, respectivement. (B) Exemple de fragmentation au cours du temps d'une cellule exprimant Msp1<sup>ΔTM2</sup> et une GFP adressée à la mitochondrie.

complémentation de la délétion du gène *msh1* est cependant réalisée par la co-expression de *msh1*<sup>ΔTM1</sup> avec *msh1*<sup>ΔTM2</sup> (figure R-2 A) qui donne naissance à une forme s-Msh1 normale et un mélange de formes l-Msh1<sup>ΔTM1</sup> et l-Msh1<sup>ΔTM2</sup>. Les niveaux d'expression relatifs des formes longues et courtes dans les clones complémentés (figure R-2, B) montrent que des variations limitées du rapport l/s influencent la morphologie des mitochondries et le maintien de l'ADNmt (figure R-2, B), contrairement à des variations plus drastiques qui induisent la létalité. Cette dernière observation suggère donc que l'absence de complémentation de la délétion de *msh1* par *msh1*<sup>ΔTM1</sup> est due à une perte de fonctionnalité de la forme l-Msh1<sup>ΔTM1</sup> plutôt qu'au déséquilibre du rapport l-Msh1/s-Msh1. Cette perte de fonctionnalité n'est que partielle puisqu'elle peut être compensée par la présence de la forme l-Msh1 produite par *msh1*<sup>ΔTM2</sup>.

### ***R-1.3 Effets dominants négatifs des mutants des domaines TM1 et TM2 de Msh1***

La complémentation intragénique observée par la co-expression des mutants *msh1*<sup>ΔTM1</sup> et *msh1*<sup>ΔTM2</sup> suggère qu'il existe des interactions fonctionnelles entre des molécules différentes de Msh1. Nous avons donc analysé les effets de ces mutants et de *msh1*<sup>mutTM2</sup> sur la morphologie et le maintien de l'ADN des mitochondries de levures exprimant *Msh1* endogène. Après 24H d'expression de *msh1*<sup>ΔTM1</sup> et *msh1*<sup>ΔTM2</sup> ou *msh1*<sup>mutTM2</sup>, respectivement 35% et 80% des levures présentent un réseau fragmenté (figure R-3, A). Après 36H d'expression de l'un ou l'autre des mutants, 95% des cellules ont un réseau fragmenté, indiquant que les mutants du TM1 ou du TM2 ont un effet similaire mais avec des cinétiques différentes. Dans ces conditions la forme sauvage ne modifie pas la morphologie du réseau mitochondrial.

La perte du génome mitochondrial nécessite la dilution des nucléoïdes préexistants au cours des divisions successives. Elle a donc été visualisée, par coloration au DAPI, après cinq jours d'expression des mutants dans des levures maintenues en phase exponentielle de croissance par dilutions journalières. Les levures transformées avec *msh1*<sup>ΔTM1</sup> possèdent un nombre de nucléoïdes comparable à celui de cellules exprimant un plasmide contrôle (CAT ou Msh1) et sont viables (figure R-4, A et B). Les levures transformées par *Msh1*<sup>ΔTM2</sup> ou *Msh1*<sup>mutTM2</sup> perdent leurs nucléoïdes (figure R-4, A) et sont incapables de croître (figure R-4, B), traduisant certainement l'absence de génome mitochondrial qui n'est pas toléré chez la levure *S. pombe* petite négative. L'expression de mutants des domaines TM1 et TM2 exerce donc des effets dominants négatifs sur la morphologie du réseau mitochondrial et, dans le cas du mutant du TM2 un effet létal pour *S.pombe* sur le maintien de l'ADNmt. Ces effets dominants



**Figure R-4. Msp1<sup>ΔTM2</sup> et Msp1<sup>mutTM2</sup> exercent un effet dominant négatif sur le maintien du génome mitochondrial.**

Une souche sauvage a été transfectée par un plasmide codant pour CAT, Msp1, Msp1<sup>ΔTM1</sup>, Msp1<sup>ΔTM2</sup> ou Msp1<sup>mutTM2</sup>. Pour permettre la dilution des nucléoïdes, les cellules sont cultivées pendant 5 jours avec un changement de milieu quotidien puis fixées à la formaldéhyde et colorées au DAPI pour visualiser l'ADN en microscopie à fluorescence. (A) Les panneaux supérieurs montrent, à gauche, des cellules sauvages avec leurs nucléoïdes qui apparaissent sous forme de petits points blancs et à droite des cellules Rho<sup>0</sup> les ayant perdus. Le graphique du dessus montre le pourcentage de cellules Rho<sup>0</sup> pour chaque condition (n=3, >350 cellules ont été comptées, test ANOVA de Tukey; \*\*p<0.001, Msp1<sup>ΔTM2</sup> ou Msp1<sup>mutTM2</sup> vs CAT, Msp1 ou Msp1<sup>ΔTM1</sup>). (B) Dans chaque condition, des gouttes de culture contenant le nombre indiqué de cellules sont prélevées au cinquième jour, déposées sur milieu minimum et cultivées pendant 8 jours à 25°C.

négatifs étant dissociables expérimentalement, nous suggérons que TM1 et TM2 assurent des rôles différents.

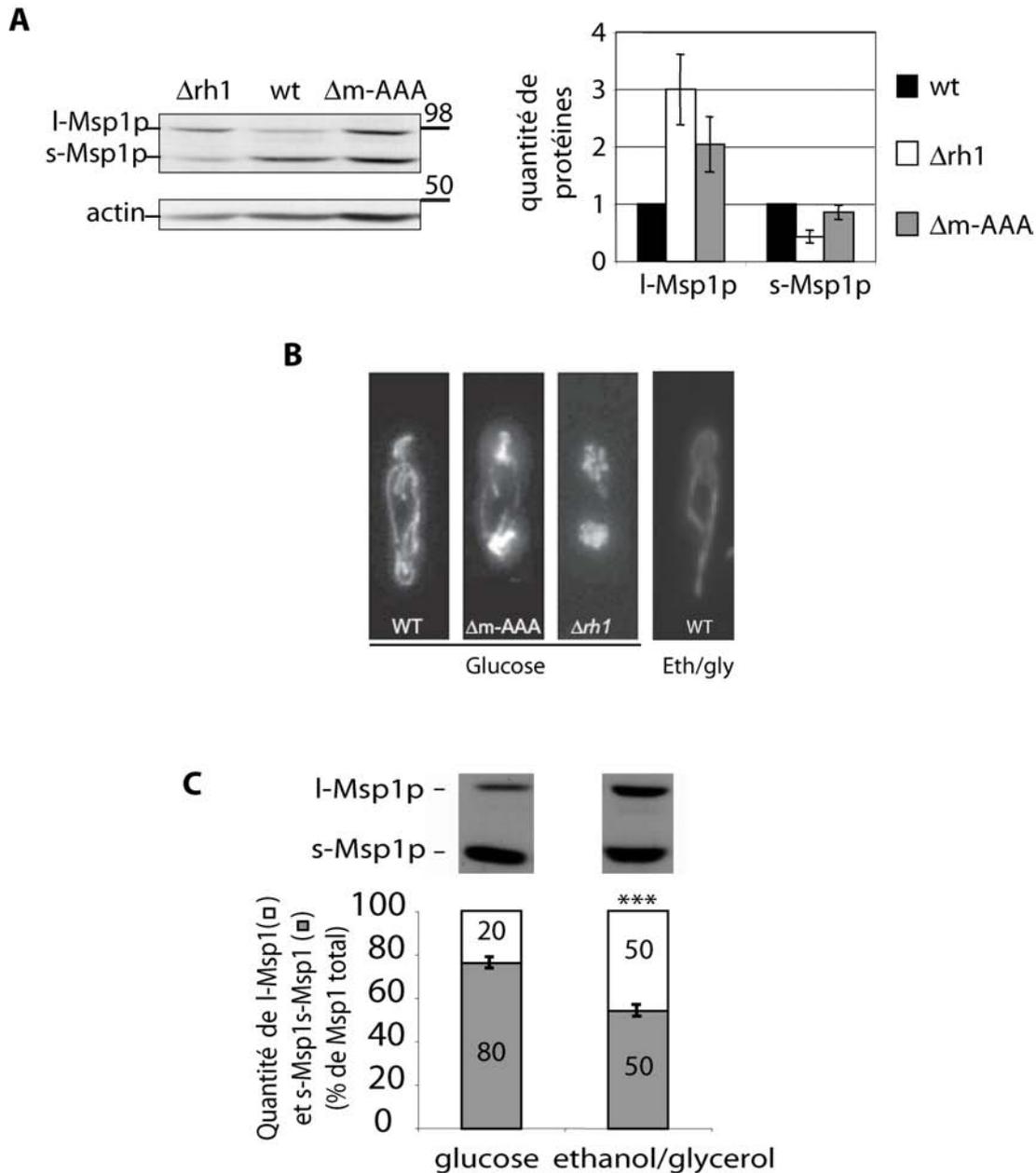
L'ensemble de ces résultats montrent un rôle important de TM1 et TM2 dans les interactions avec la MI, interactions qui conditionnent la biogenèse de l-Msp1 et s-Msp1 dans des proportions relatives définies. En plus de son incapacité à générer s-Msp1, les effets de  $msp1^{\Delta TM2}$  pourraient aussi provenir de la production d'une forme longue l-Msp1 $^{\Delta TM2}$  partiellement fonctionnelle, comme nous l'avons envisagé pour l-Msp1 $^{\Delta TM1}$ . Cette perte de fonctionnalité de l-Msp1 $^{\Delta TM1}$  et l-Msp1 $^{\Delta TM2}$  pourrait refléter des défauts dans l'organisation membranaire normalement induite par les interactions de TM1 et TM2 avec la membrane. Les organisations membranaires induites par TM1 et TM2 seraient cependant différentes puisque  $msp1^{\Delta TM2}$  a un effet dominant négatif sur le maintien de l'ADNmt que ne possède pas  $msp1^{\Delta TM1}$ . Etant donné que Msp1 est associé à la MI par l'intermédiaire de TM1, TM2 et SIM3, nous suggérons que l'organisation locale de la membrane est dictée par le rapport des interactions entre (TM1+TM2) portés par l-Msp1 et SIM3 commun aux deux isoformes. Selon cette proposition les effets des mutants  $msp1^{\Delta TM1}$  et  $msp1^{\Delta TM2}$  résulteraient des variations de ce rapport induites à la fois par l'absence du TM1 ou du TM2 dans les formes longues produites et par les modifications des quantités de SIM3 dues au déséquilibre des proportions relatives de l-Msp1/s-Msp1.

#### ***R-I.4 Biogenèse et expression des isoformes l-Msp1 et s-Msp1***

**Résumé de l'article 2.** Leroy, I., F. Khosrobakhsh, A. Diot, M. Daloyau, L. Arnaune-Pelloquin, C. Cavelier, L. J. Emorine and P. Belenguer (2010). "Processing of the dynamin *Msp1p* in *S. pombe* reveals an evolutionary switch between its orthologs *Mgm1p* in *S. cerevisiae* and *OPA1* in mammals." **FEBS Lett** **584**: 3153-7. (Voir Annexe II, p. )

Au cours de ce travail nous avons caractérisé les protéases impliquées dans la génération des formes l-Msp1 et s-Msp1 et les effets de variations des quantités respectives de ces dernières sur la morphologie du réseau mitochondrial.

La délétion par recombinaison homologue de différentes protéases mitochondriales a mis en évidence un rôle de rhomboïde-1 (RH1) et d'une mAAA-protéase (m-AAA) dans la maturation des formes l-Msp1 et s-Msp1. L'inactivation de RH1 provoque une accumulation importante de l-Msp1 et une diminution proportionnelle de s-Msp1 (figure R-5, A), corrélées à la fragmentation du réseau mitochondrial (figure R-5, B). L'inactivation de m-AAA



**Figure R-5. Importance du rapport l-Msp1/s-Msp1 dans le contrôle de la morphologie du réseau mitochondrial.**

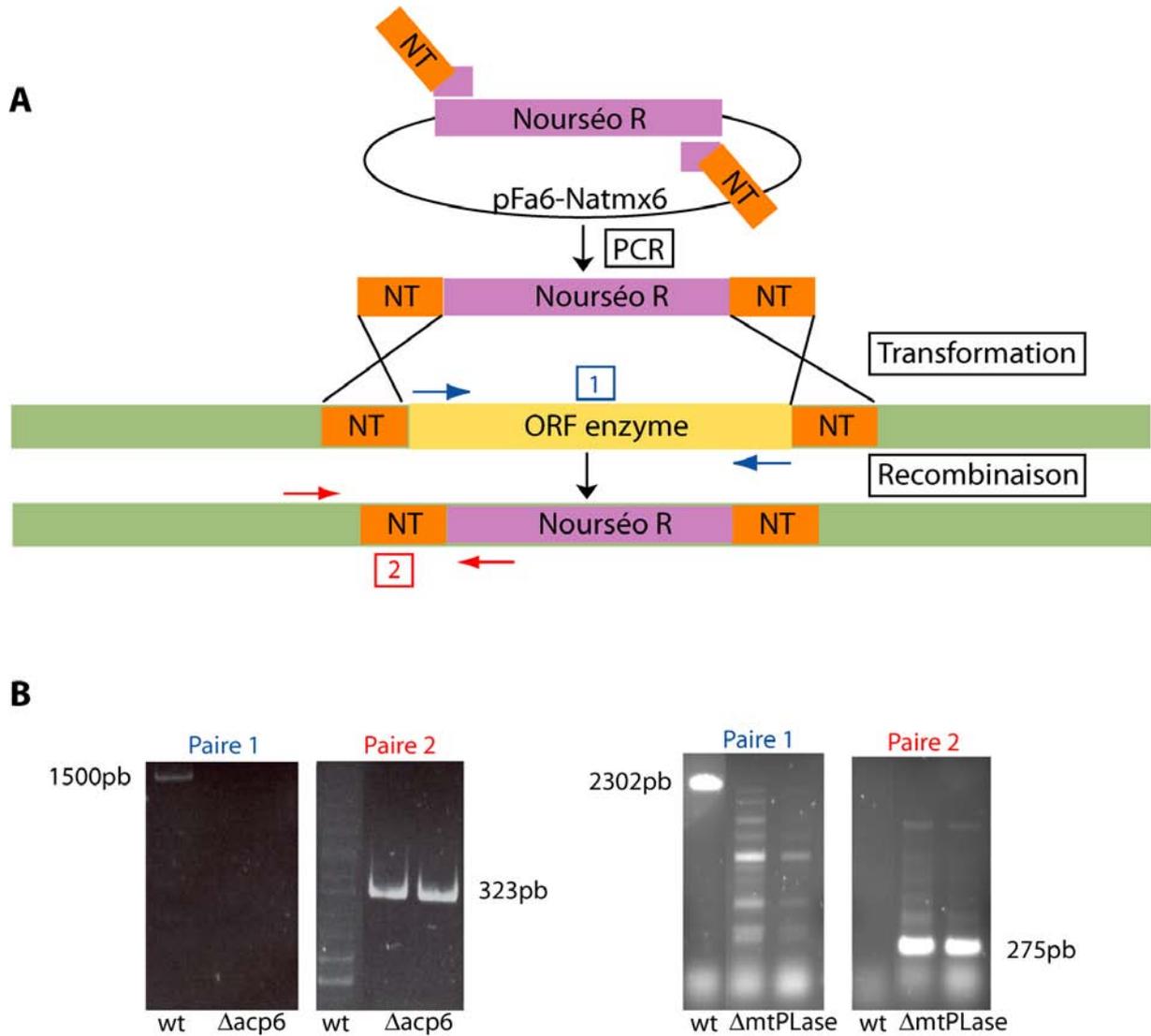
(A) Les niveaux d'expression de Msp1 dans des souches sauvages (wt), délétées pour rhomboïde 1 ( $\Delta rh1$ ) ou pour la m-AAA protéase ( $\Delta m-AAA$ ) cultivées sur milieu glycolytique ont été analysés par immunodétection avec un anticorps anti Msp1. Les quantités de chaque isoforme ont été mesurées par densitométrie puis normalisées par rapport au contrôle actine. Le graphique indique pour chaque souche les quantités de l-Msp1 et s-Msp1 normalisées par rapport à la souche sauvage (n=3). (B) Les cellules de souches WT,  $\Delta rh1$  et  $\Delta m-AAA$  exprimant Arg11-mCherry mitochondriale ont été cultivées en milieu glycolytique (glucose) ou respiratoire (eth/gly), fixées et observées en microscopie à fluorescence. (C) Les niveaux d'expression de Msp1 ont été analysés par immunodétection avec un anticorps anti Msp1 dans des souches sauvages cultivées en milieu riche (glucose) puis en milieu respiratoire (éthanol/glycérol) pendant 6H. Les quantités de chaque isoforme ont été mesurées par densitométrie puis normalisées par rapport à Msp1 total et sont représentées sur le graphique du dessous (n=3, \*\*\* p<0.005).

provoque une légère accumulation de l-Msp1 sans effet sur le taux de s-Msp1 (figure R-5, A) et induit une agrégation des mitochondries aux pôles de la cellule sans modification majeure de leur morphologie qui reste filamenteuse (figure R-5, B).

Au cours de l'adaptation des levures d'un milieu glycolytique à un milieu respiratoire éthanol-glycérol, une modulation des quantités de l-Msp1 semblable à celle observée lors de l'inactivation de m-AAA a été observée (figure R-5, C). Dans ce cas, la distribution des mitochondries dans la cellule n'est pas modifiée et leur morphologie reste tubulaire mais avec des filaments plus fins et plus interconnectés (figure R-5, B).

Ces résultats suggèrent que face à une quantité stable de s-Msp1, une augmentation légère de l-Msp1 conserve (cas  $\Delta mAAA$ ) ou stimule légèrement (cas adaptation respiratoire) les propriétés fusogènes de Msp1. Par contre, si la concentration de s-Msp1 devient trop faible devant l'augmentation de l-Msp1 (cas  $\Delta rh1$ ), le réseau se fragmente. Ceci pourrait indiquer qu'une légère variation du rapport entre les isoformes l-Msp1 et s-Msp1 constitue une réponse à des situations physiologiques en modulant la structure des mitochondries. Ces observations et l'implication des domaines TM1 et TM2 dans la morphologie du réseau mitochondrial suggèrent que l'activité fusogène de Msp1 est portée par la forme longue l-Msp1 et est régulée positivement par la forme s-Msp1.

**Au cours de ces deux études nous avons mis en évidence que Msp1 interagit avec la membrane interne de la mitochondrie par l'intermédiaire de trois domaines distincts - TM1, TM2 et SIM3 - qui pourraient induire des modifications locales particulières de la MI. L'organisation globale de cette dernière serait modulée par les proportions relatives des sites (TM1 + TM2) / SIM3, qui sont le reflet du rapport l-Msp1/s-Msp1. Ce dernier semble régulé par les conditions physiologiques qui pourraient induire la protéolyse ou au contraire la néo-synthèse de l'une ou l'autre des isoformes. Des variations non contrôlées de ce rapport, dans des conditions pathologiques ou expérimentales, seraient par contre délétères pour la cellule.**



**Figure R-6. Délétion des gènes *acp6* et *mtPLase*.**

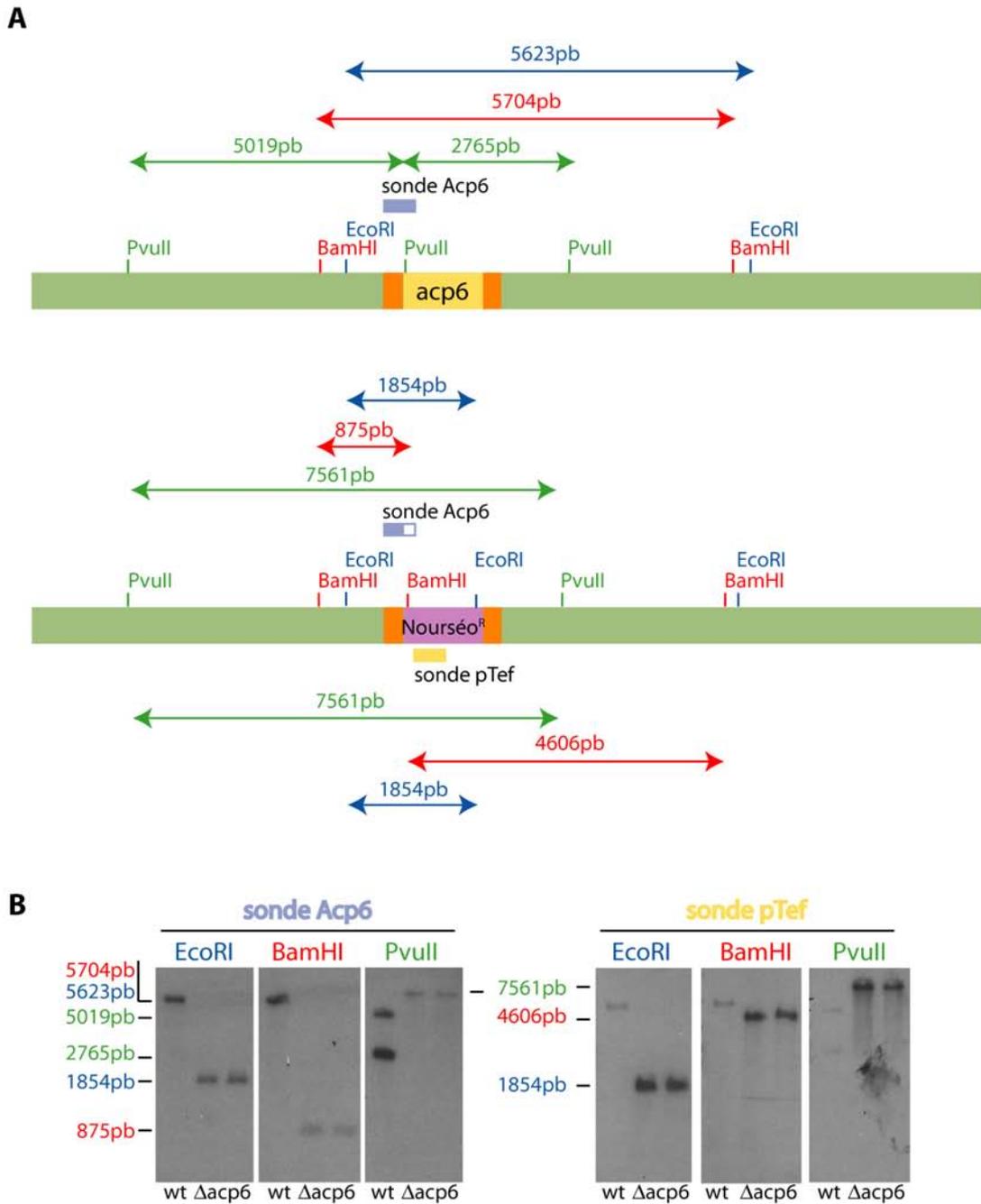
(A) Représentation schématique de la construction par PCR de la cassette de recombinaison homologue contenant le gène de résistance à la nouséothricine. La partie 5' de chaque amorce contient 80 pb des régions 5' et 3' non traduites (boîtes oranges NT) du gène à délétér et la partie 3' contient 20 pb du promoteur ou du terminateur pTef (boîte violette) portés par le plasmide pFa6-NatMx6 qui sert de matrice. Après amplification, cette cassette est transformée dans des levures *S.pombe*. (B) La délétion des gènes est vérifiée par PCR avec la paire d'amorces 1 (flèches bleues en A) qui doit produire un fragment de 1500 ou de 2302 pb respectivement si *acp6* ou *mtPLase* n'ont pas été délétés et ne rien amplifier si la délétion a eu lieu. Une seconde paire d'amorces (flèches rouges en A) est utilisée pour tester la présence de la cassette de recombinaison au bon locus; elle doit produire un fragment de 323 ou de 275 pb, respectivement, lorsque la cassette a recombinaison au locus d'*acp6* ou *mtPLase*.

## R-II. Msp1 et enzymes du remodelage des phospholipides membranaires

De nombreux liens ont été décrits entre les dynamines et différentes enzymes (acyl transférases, phospholipases) impliqués dans le remodelage des lipides membranaires (cf. Introduction paragraphe I-3-d et III-2-c). Nous avons voulu vérifier si les effets de Msp1 sur la morphologie des mitochondries et le maintien de l'ADNmt, c'est-à-dire selon notre hypothèse sur l'organisation de la MI, pouvaient passer par la modification de la composition phospholipidique de la membrane, reflétant la stimulation ou l'inhibition de ce type d'enzymes par Msp1. Deux phospholipases prédites pour être mitochondriales (mtPLase et mtPLaseC) et une phosphatase acide mitochondriale (ACP6), partenaire potentiel de Msp1 (thèse d'E. Guillou, UPS Toulouse III, 2005), ont été choisies pour étudier si un gain ou une perte de leur fonction affectaient la morphologie du réseau mitochondrial et le maintien des nucléoïdes.

Le gain de fonction a été réalisé par surexpression des gènes correspondants dans le vecteur pRep42 sous le contrôle d'un promoteur modéré répressible par la thiamine. La perte de fonction a été obtenue par délétion des gènes par recombinaison homologue au locus d'*acp6*, *mtPLase* et *mtPLaseC*, avec une cassette portant un gène de résistance à la nourséothricine. Cette cassette a été construite par PCR en utilisant la stratégie schématisée dans la figure R-6, A. Après avoir transformé des levures sauvages avec ces cassettes de recombinaison, les transformants ont été étalés sur milieu sélectif. Les clones résistant à la nourséothricine ont été criblés pour l'absence du gène d'intérêt par PCR sur colonies en utilisant des amorces contenues dans le cadre de lecture. La présence de la cassette de résistance au bon locus a été vérifiée en utilisant une amorce dans le promoteur *pTef* et une amorce dans la région en amont de l'extrémité 5' du gène cible (figure R-6, A et B). Aucun clone  $\Delta$ *mtPLaseC* recombinant homologue n'a pu être isolé sur la centaine de clones testés, par cette stratégie. Ceci pourrait indiquer un rôle essentiel de ce gène dans la vie cellulaire. Nous avons obtenu 2 recombinants homologues  $\Delta$ *acp6* et  $\Delta$ *mtPLase* sur respectivement 2 et 4 clones résistants à la nourséothricine (figure R-6, B). Dans le cas de  $\Delta$ *acp6*, la délétion a été vérifiée et nous nous sommes assuré de la présence d'une seule copie de la cassette en réalisant un Southern Blot avec une sonde correspondant au promoteur *pTef* et une localisée dans la région 5' d'*acp6* (figure R-7, C).

La morphologie du réseau mitochondrial a été observée grâce à une protéine GFP ciblée à la mitochondrie. La perte de fonction d'ACP6 ou de la mtPLase ne paraît pas avoir d'effet



**Figure R-7. Vérification de la délétion du gène *acp6*.**

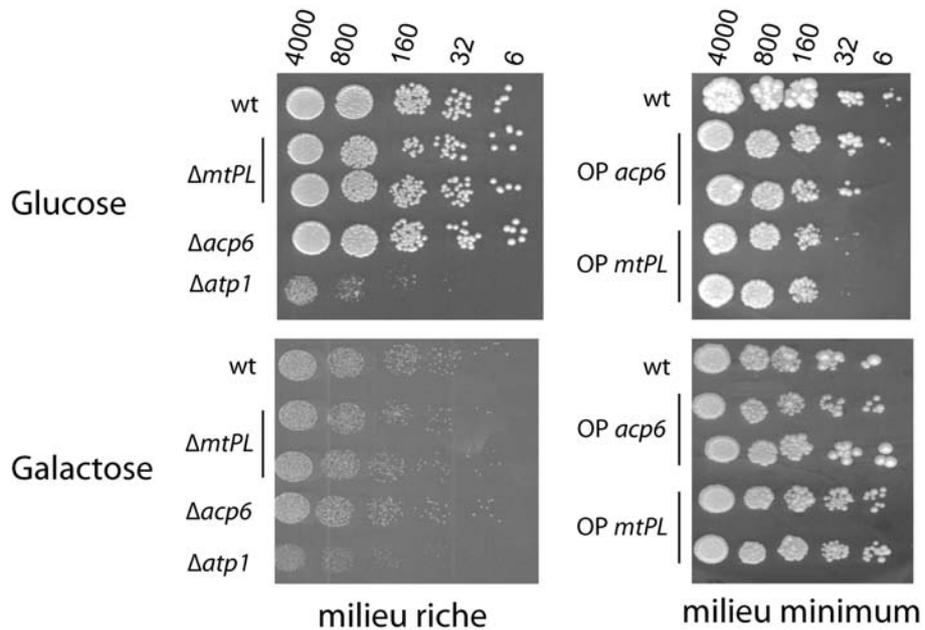
(A) Représentation schématique du locus *acp6* avant (haut) et après (bas) recombinaison homologue avec le fragment portant le gène de résistance à la nouséthricine (NourséoR). Les tailles des fragments attendus avec les enzymes de restriction utilisées sont indiquées au-dessus de chaque locus pour la sonde Acp6 (boîte bleue) en dessous pour la sonde pTef (boîte jaune). (B) L'ADN génomique des souches parentales et délétées pour *acp6* a été digéré par EcoRI, BamHI ou PvuII. Un Southern Blot a été réalisé et révélé à l'aide de la sonde Acp6 hybridant en partie avec la région 5' non traduite, et d'une sonde pTef correspondant au promoteur pTef. Pour chaque souche, ces sondes révèlent des fragments aux tailles attendues. La sonde pTef ne révèle aucun fragment dans les souches parentales.

drastique sur la morphologie mitochondriale (non montré), mais le bruit de fond généré par une localisation cytoplasmique diffuse de la GFP surexprimée, rend difficiles des observations plus fines. Le gain de fonction semble quant à lui induire une légère fragmentation du réseau, après 20H d'expression d'ACP6 ou de la mtPLase. L'observation d'un effet plus important nécessiterait l'augmentation de leur temps d'expression. Ceci est cependant impossible à réaliser car au-delà de 22H d'expression, la GFP finit par être toxique pour les cellules et induit la fragmentation des mitochondries (Guillou et al., 2005). Des expériences similaires sont en cours en utilisant des souches de levures exprimant la protéine mitochondriale Arg11 endogène étiquetée par la mCherry.

L'obtention de clones haploïdes  $\Delta acp6$  et  $\Delta mtPLase$  viables suggère que ces cellules ne perdent pas totalement leur génome mitochondrial. La fonction respiratoire des mitochondries a donc été évaluée en comparant la croissance sur un milieu glycolytique (3% glucose) à celle sur un milieu contenant 2% de galactose sur lequel *S.pombe* n'est pas capable de pousser en cas de dysfonctionnement de la chaîne respiratoire pouvant refléter des défauts de l'ADNmt. Un mutant  $\Delta atp1$  du complexe V sert de contrôle. Les expériences sont réalisées à 30°C, température optimale de croissance pour *S.pombe*, et à 37°C pour accentuer un éventuel phénotype non visible à 30°C. La délétion des gènes *acp6* et *mtPLase* n'entraîne ni arrêt ni retard de croissance dans aucune de ces conditions alors que le mutant  $\Delta atp1$  ne montre qu'une croissance résiduelle (fig. R-8). Les mêmes expériences ont été réalisées après transformation et induction des vecteurs d'expression de *mtPLase* et *acp6* dans les levures. La surexpression modérée de ces gènes n'a pas non plus d'effet sur la croissance, quels que soient le milieu et la température (fig. R-8). La perte de fonction de ces enzymes ne semble donc pas avoir d'effets majeurs sur la respiration mitochondriale et donc probablement sur le maintien du génome mitochondrial.

**L'étude du gain ou de la perte de fonction d'enzymes mitochondriales du remodelage des phospholipides membranaires n'a montré aucun effet sur la croissance des levures en milieu respiratoire, indication de l'intégrité du génome mitochondrial. Dans nos conditions expérimentales, les effets de Msp1 sur le maintien de l'ADNmt n'auraient donc pas de liens évidents avec ceux de la mtPLase et d'ACP6 sur le remodelage des lipides membranaires. Il nous est pour le moment difficile de conclure quant aux effets du gain ou de la perte de fonction de la mtPLase et d'ACP6 sur la morphologie du réseau mitochondrial.**

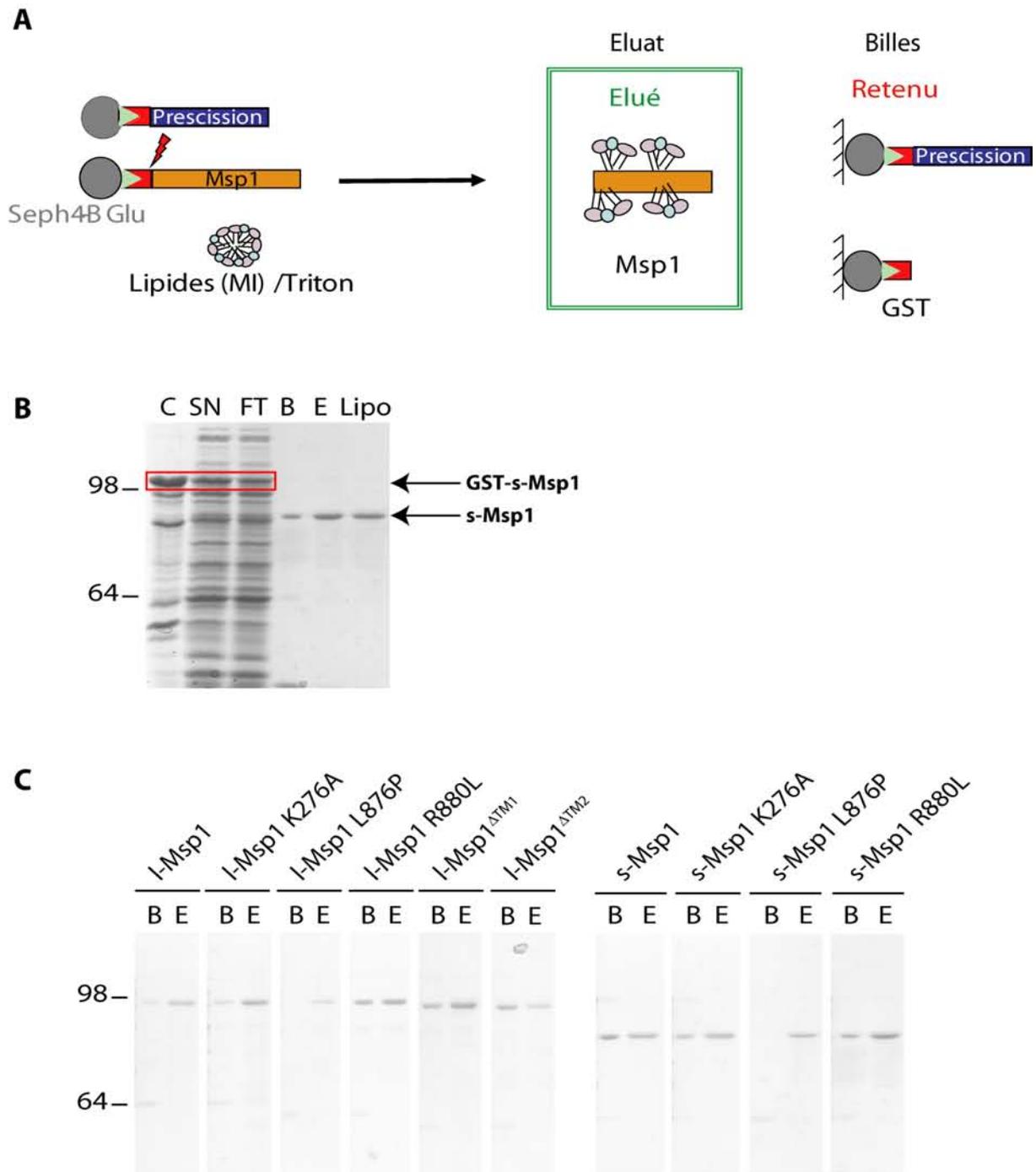




**Figure R-8. La perte ou le gain de fonction des gènes *mtPL* et *Acp6* n'a pas d'effet sur la croissance des levures *S. pombe*.**

Les levures sauvages (wt) et délétées pour *acp6* ( $\Delta acp6$ ), *mtPL* ( $\Delta mtPL$ ) ou *ATP1* ( $\Delta atp1$ ) sont cultivées en milieu riche contenant de la nouséothricine permettant la sélection des délétants. Pour la surexpression, les levures sauvages sont transfectées avec un plasmide permettant l'expression de *msp1* (wt), *Acp6* (OP *acp6*) ou *mtPL* (OP *mtPL*) sous le contrôle du promoteur modéré *nmt1* et cultivées en milieu minimum sélectif. Le nombre indiqué de cellules est déposé en goutte sur un milieu riche (gauche) fermentescible (glucose 3%) ou respiratoire (galactose 2%) pour les souches délétées et sur un milieu minimum (droite) fermentescible (glucose 3%) ou respiratoire (galactose 2%) pour les surexpression.

Les boîtes sont incubées à 30°C pendant 3 jours.



**Figure R-9. Purification de l-Msp1 et de s-Msp1 et de leurs mutants.**

(A) Après production par expression hétérologue dans *Escherichia coli*, les protéines de fusion GST-Msp1 solubles sont fixées sur une colonne de Sépharose4B-glutathion. Les protéines sont éluées dans un tampon contenant des micelles mixtes de lipides et de triton X-100, par clivage à la protéase Precission dont le site est situé entre la GST et la protéine, permettant de retirer le tag GST et de purifier Msp1 en une étape. (B) Analyse en SDS-PAGE puis coloration au bleu de Coomassie des différentes fractions de la purification de s-Msp1: non-soluble (C), soluble déposée sur la colonne d'affinité (SN), non fixée sur la colonne (FT), éluee (E), liposomes (Lipo) et la colonne d'affinité après élution (B). (C) La fraction éluee (E) et celle restant sur les billes (B) sont analysées par SDS PAGE coloré au bleu de Coomassie, pour chacun des variants de Msp1 construits.

### **R-III. Propriétés biochimiques de Msp1**

Pour étudier plus directement le rôle de Msp1 dans l'organisation des membranes nous avons entrepris la mise au point d'un système *in vitro*. La protéine est produite dans *Escherichia coli* et purifiée puis incorporée dans une membrane artificielle dont la composition en phospholipides mime celle de la membrane interne mitochondriale.

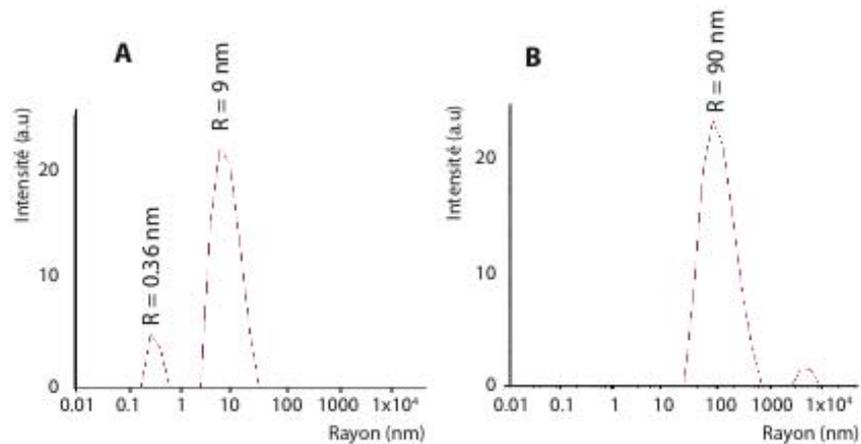
#### ***R-III.1 Mise au point et caractérisation du système in vitro***

##### *a - Production, purification et incorporation de Msp1 dans des liposomes*

Msp1 est produite dans une souche d'*E.coli* optimisée pour la synthèse de protéines eucaryotes (BL21 codon<sup>+</sup>RIL), en fusion N-terminale avec la GST et sous le contrôle d'un promoteur *pTac* inductible par l'IPTG. Après la lyse des bactéries, la protéine de fusion est solubilisée dans un tampon contenant 150 mM NaCl et 0.1% triton X-100. La purification est faite en une étape par chromatographie d'affinité sur Sépharose 4B–glutathion puis élution par clivage par la *Prescission*<sup>®</sup> qui est elle même en fusion avec la GST et qui clive entre la GST et Msp1 (figure R-9, A). Cependant une fois la GST clivée, la majorité de la protéine précipite dans la matrice même en présence de détergent. Nous avons résolu ce problème en éluant Msp1 en présence de micelles mixtes de phospholipides (0.25 mg/ml) et de triton X-100. La composition en lipides est similaire à celle de la membrane interne mitochondriale : PC 41% ; PE 35% ; CL 20% ; PS 2.5% ; PI 1.5% en rapport molaire. Dans ces conditions le meilleur rendement d'élution est obtenu avec une concentration de NaCl de 20 mM. La pureté est estimée à plus de 90% par analyse des gels colorés au bleu de Coomassie (figure R-9, B).

Nous avons ainsi purifié les deux isoformes l-Msp1 et s-Msp1 sauvages ou présentant des mutations du domaine GTPase (K276A) et du coiled-coil C-terminal (L876P, R880L) ainsi que les formes délétées des domaines TM1 et TM2, l-Msp1<sup>ΔTM1</sup> et l-Msp1<sup>ΔTM2</sup> (figure R-9, C). En fonction des expériences et des formes purifiées, nous obtenons entre 150 µg et 2 mg de protéine par litre de culture, à des concentrations qui varient entre 0,05 et 0,5 µM.

La purification de Msp1 se faisant en présence de détergent, de grands liposomes unilamellaires sont alors formés en retirant lentement le triton à l'aide de billes de polystyrène Bio Beads SM2<sup>™</sup> (BioRad) (Rigaud and Levy, 2003). L'analyse en diffusion dynamique de la lumière (DLS) montre que les vésicules ainsi formées ont effectivement un rayon moyen de 90 nm (figure R-10).



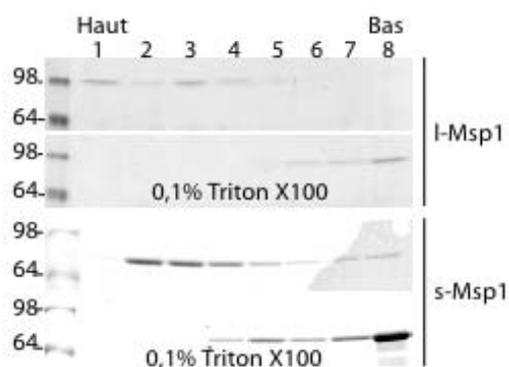
**Figure R-10. Analyse en DLS des liposomes.**

Le graphique représente la quantité de particules en fonction de leur rayon. (A) Analyse en DLS du tampon contenant les lipides solubilisé au triton X-100. Le premier pic correspond aux micelles de Triton X-100 (rayon moyen, 0.36 nm) alors que le second correspond aux micelles mixtes lipides/Triton X-100 (rayon moyen, 9 nm). (B) Après élimination du Triton X-100, la solution contient majoritairement des liposomes (rayon moyen, 90 nm). Le détergent a été entièrement éliminé puisque les micelles mixtes lipides/Triton X-100 ont totalement disparus.

*b - Caractérisation de l'interaction de Msp1 avec les liposomes*

Msp1 est associée aux liposomes

Nous avons analysé par un test de flottaison si Msp1 était ou non associée aux liposomes. Ces derniers sont déposés dans les couches denses inférieures d'un gradient discontinu de sucrose puis centrifugés à 100 000 x g. Les formes l-Msp1 et s-Msp1 sont retrouvées dans les fractions supérieures du gradient et ont donc "flotté" avec les liposomes (figure R-11). Dans un contrôle où les protéoliposomes ont été préalablement dissociés avec du détergent, les deux isoformes de Msp1 sont par contre restées au fond du gradient. l-Msp1 et s-Msp1 sont donc associées aux liposomes dont la composition mime celle de la membrane interne mitochondriale.



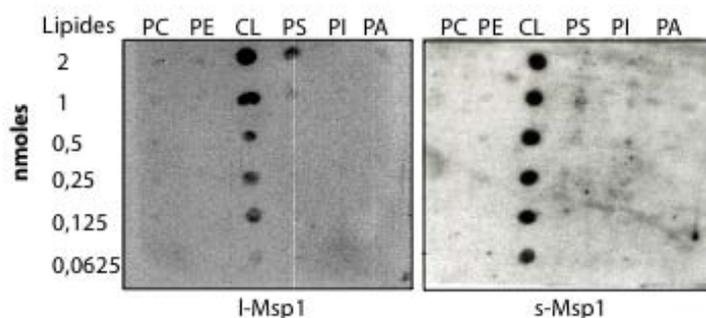
**Figure R-11. l-Msp1 et s-Msp1 sont associées aux liposomes mimant la membrane interne.**

Les liposomes sont déposés au fond d'un gradient discontinu de sucrose et centrifugés à 100.000 x g. Huit fractions sont alors prélevées du haut vers le bas du gradient et analysées par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie. Le contrôle consiste à dissocier préalablement les liposomes avec 0.1% de Triton X-100. Les résultats sont représentatifs d'au moins 3 expériences.

Msp1 a une affinité préférentielle pour la cardiolipine

L'affinité de l-Msp1 et s-Msp1 pour les différents phospholipides constitutifs de la MI a ensuite été analysée par la méthode de «protein-lipid overlay» (Dowler et al., 2002). Des

quantités données de chaque lipide sont déposées sur une membrane de nylon qui est ensuite incubée avec les protéines purifiées. Nous avons utilisé les protéines en fusion avec la GST, éluées par le glutathion car les formes clivées ne sont solubles qu'en présence de lipides qui interféreraient avec le test. Les résultats, révélés par immunodétection avec des anticorps anti-Msp1, montrent que l-Msp1 et s-Msp1 ont une affinité préférentielle pour la cardiolipine, phospholipide spécifique de la membrane interne mitochondriale (figure R-12). Cette propriété pourrait impliquer SIM3 puisque les deux isoformes montrent une interaction semblable avec la cardiolipine.

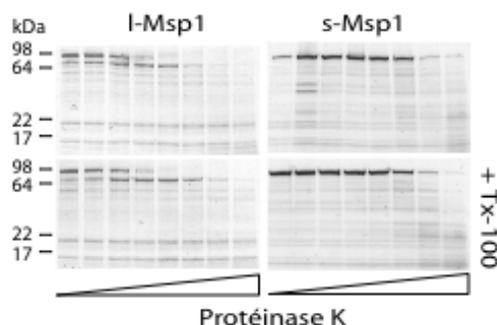


**Figure R-12. l-Msp1 et s-Msp1 ont une affinité préférentielle pour la cardiolipine.**

Les protéines de fusion GST-l-Msp1 ou GST-s-Msp1 sont incubées avec des membranes de nylon sur lesquelles les quantités indiquées de lipides représentatifs de la membrane interne (PC, PE, CL, PS, PI) ont été déposées. La révélation se fait par immunodétection avec des anticorps anti-Msp1. La figure est représentative de 2 expériences indépendantes

Msp1 est exposée sur la face externe des liposomes

La méthode utilisée pour la formation des liposomes peut selon les propriétés de la protéine conduire à une répartition symétrique ou asymétrique de cette dernière entre l'intérieur et l'extérieur des vésicules. Ceci a été analysé par un test d'accessibilité à la protéinase K qui ne peut digérer que les protéines exposées à l'extérieur de liposomes imperméables. L'imperméabilité des liposomes a été vérifiée ci-après (cf. partie RIII-3-c). Un contrôle d'accessibilité totale et d'activité de la protéase est réalisé en dissociant les liposomes avant la digestion. Dans ces expériences, les formes l-Msp1 et s-Msp1 montrent un profil de digestion identique en absence et en présence de détergent (figure R-13).



**Figure R-13. l-Msp1 et s-Msp1 sont exposées sur la face externe des liposomes.**

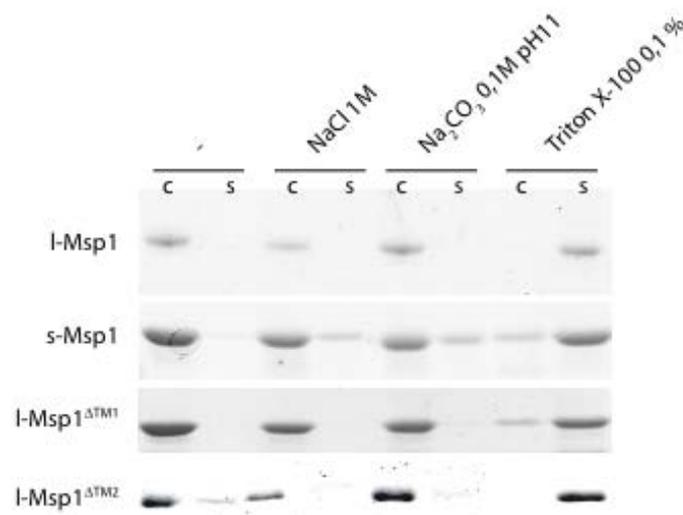
Les liposomes portant l-Msp1 ou s-Msp1 sont incubés avec des concentrations croissantes de protéinase K en absence (panneaux du haut) ou en présence (panneaux du bas) de 0,1% Triton X-100. Les résultats sont analysés par SDS PAGE et coloration au bleu de Coomassie

Msp1 n'est donc pas protégée de la digestion par la protéinase K, montrant que les deux formes sont totalement exposées sur la face externe des liposomes. Nos analyses en SDS-

PAGE ne permettent pas d'identifier de peptide de ~ 6 kDa qui correspondrait au TM1 inséré dans la membrane et à la queue N-terminale plongeant à l'intérieur des vésicules.

L'association de Msp1 aux liposomes reflète celle observée *in vivo* avec les membranes mitochondriales

Nous avons testé le type d'association de Msp1 aux liposomes par des expériences similaires à celles réalisées sur des mitochondries isolées de levure (paragraphe RI-1). Après traitements salins ou alcalins, les protéines extraites sont séparées de celles associées aux liposomes par sédimentation à 100 000 x g. Les formes l-Msp1, l-Msp1<sup>ΔTM1</sup> et l-Msp1<sup>ΔTM2</sup> restent associées aux liposomes quel que soit le traitement alors que la forme courte s-Msp1 en est partiellement extraite (figure R-14).



**Figure R-14. L'association de Msp1 avec les liposomes reproduit celle observée avec les membranes mitochondriales *in vivo*.**

Des liposomes portant les formes indiquées (gauche) de Msp1 sont incubés en tampon seul (-) ou en présence de haute force ionique (NaCl 1M), de pH élevé (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1 M pH11) ou de détergent (Triton X-100 0,1 %). Le culot (C) et le surnageant (S) d'une centrifugation à 100.000 x g sont analysés par SDS-PAGE et coloration au bleu de Coomassie.

Chacune de ces 4 formes de Msp1 purifiées et incorporées dans des liposomes mimant la membrane interne mitochondriale ont de ce point de vue un comportement identique à celui des formes correspondantes exprimées dans *S. pombe* (cf. figure R-1).

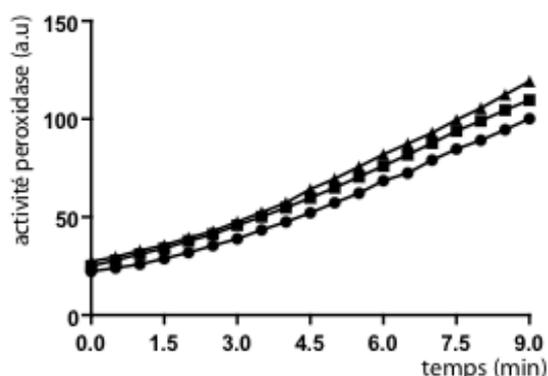
**Ce système *in vitro* semble donc être représentatif de la situation *in organello* avec l-Msp1 (et ses deux mutants l-Msp1<sup>ΔTM1</sup> et l-Msp1<sup>ΔTM2</sup>) et s-Msp1 se comportant respectivement comme des protéines membranaires intégrales et périphériques, toutes deux faisant face à l'extérieur de la membrane. Puisque les protéoliposomes ont été formés *de novo* à partir de micelles mixtes détergent/protéine/phospholipides, cette particularité suggère que Msp1 a la capacité soit d'induire, soit de s'associer à, une courbure positive de la membrane.**

### R-III.2 Organisation de domaines membranaires

Nous avons alors utilisé ce système *in vitro* pour explorer les effets de Msp1 sur la structure membranaire. Une réorganisation de la membrane peut affecter sa fluidité et modifier l'activité de protéines résidentes. Nous avons choisi de mesurer les effets de l'association de Msp1 avec la membrane sur l'activité peroxydase que le cytochrome c peut développer, notamment lors de l'initiation de l'apoptose (cf. introduction paragraphe I-II-3-c). En parallèle, nous avons formé des bicouches supportées planes pour analyser la fluidité membranaire en présence et en absence de la dynamine.

#### a - Msp1 et activité peroxydase du cytochrome c

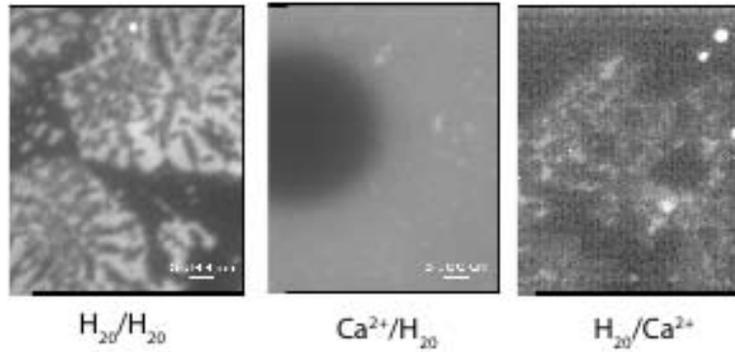
Des liposomes vides ou portant l-Msp1 ou s-Msp1 sont incubés avec du cytochrome c pour qu'il s'y associe. L'activité peroxydase est mesurée grâce à une sonde, l'Amplex Red, qui fluoresce lorsqu'elle est oxydée par l' $H_2O_2$ . Dans ces conditions l'activité du cytochrome c n'est pas affectée par la présence de l'une ou l'autre des isoformes de Msp1 (figure R-15).



**Figure R-15. Msp1 n'influence pas l'activité peroxydase du cytochrome c associé aux liposomes de composition lipidique similaire à la MI.**

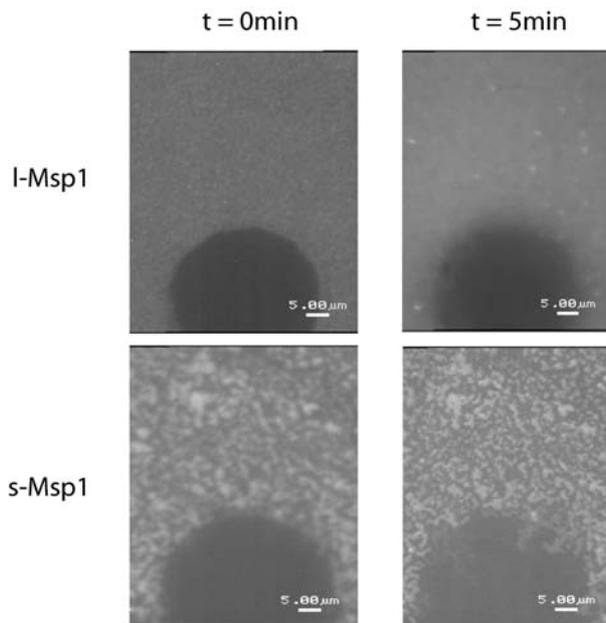
Le cytochrome c (50nM) est incubé avec des liposomes vides (ronds), ou portant l-Msp1 (carrés) ou s-Msp1 (triangles). Le rapport cytochrome c/cardiolipine est de 1%. L'activité peroxydase du cytochrome c est mesurée pendant 9 minutes après ajout de 50  $\mu$ M d' $H_2O_2$  et 5nM d'Amplex Red. Les différences entre les 3 courbes ne sont pas significatives (n=3).

Il reste cependant possible que la régulation de l'activité peroxydase du cytochrome c par Msp1 ne puisse se faire sentir que dans des domaines de la MI ayant une composition particulière en phospholipides que l'on ne reproduit pas ici. Nous avons donc mesuré comment cette activité pouvait être modulée par son association à des liposomes de composition lipidique variée. Avec des liposomes formés de 50% PC et 50% CL (figure R-16, lipo 5), le cytochrome c développe une activité peroxydase largement supérieure à celle qu'il a sur les liposomes mimant la MI. Cette activité est indépendante de la présence de PS ou de PI, mais diminue lorsque les proportions relatives de PC/PE augmentent par rapport à celle de CL. La comparaison des effets obtenus sur les liposomes 3 et 4 où la PC varie peu, suggère que l'augmentation de l'activité peroxydase serait plutôt due à l'augmentation de la CL ou à la diminution de la PE (figure R-16). Il sera donc intéressant d'étudier les effets de



**Figure R-17. Le calcium favorise la formation de bicouches en absence de Msp1.**

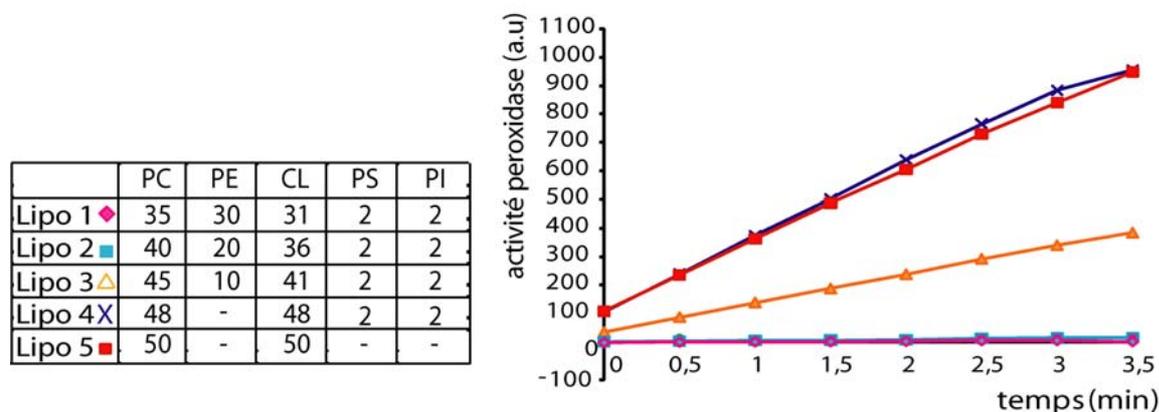
Les bicouches supportées sont formées en tampon  $H_{20}$  avec des liposomes vides en absence (gauche et droite) ou en présence de 10 mM  $Ca^{2+}$  (centre) puis lavées et observées en tampon  $H_{20}$  en absence (gauche et centre) ou en présence de 10 mM  $Ca^{2+}$  (droite).



**Figure R-18. Msp1 favorise l'étalement de bicouches supportées.**

Les bicouches supportées sont formées en absence de calcium à partir de liposomes chargés en l-Msp1 ou s-Msp1. Les photos de gauche montrent les bicouches étalées juste après qu'une zone ait été photoblanchie et celle de droite la même zone 5 minutes après. On observe un retour de fluorescence, indiquant qu'il s'agit bien d'une membrane continue étalée sur le support.

Msp1 sur ces différents types de liposomes pouvant mimer des éventuels domaines de la MI.



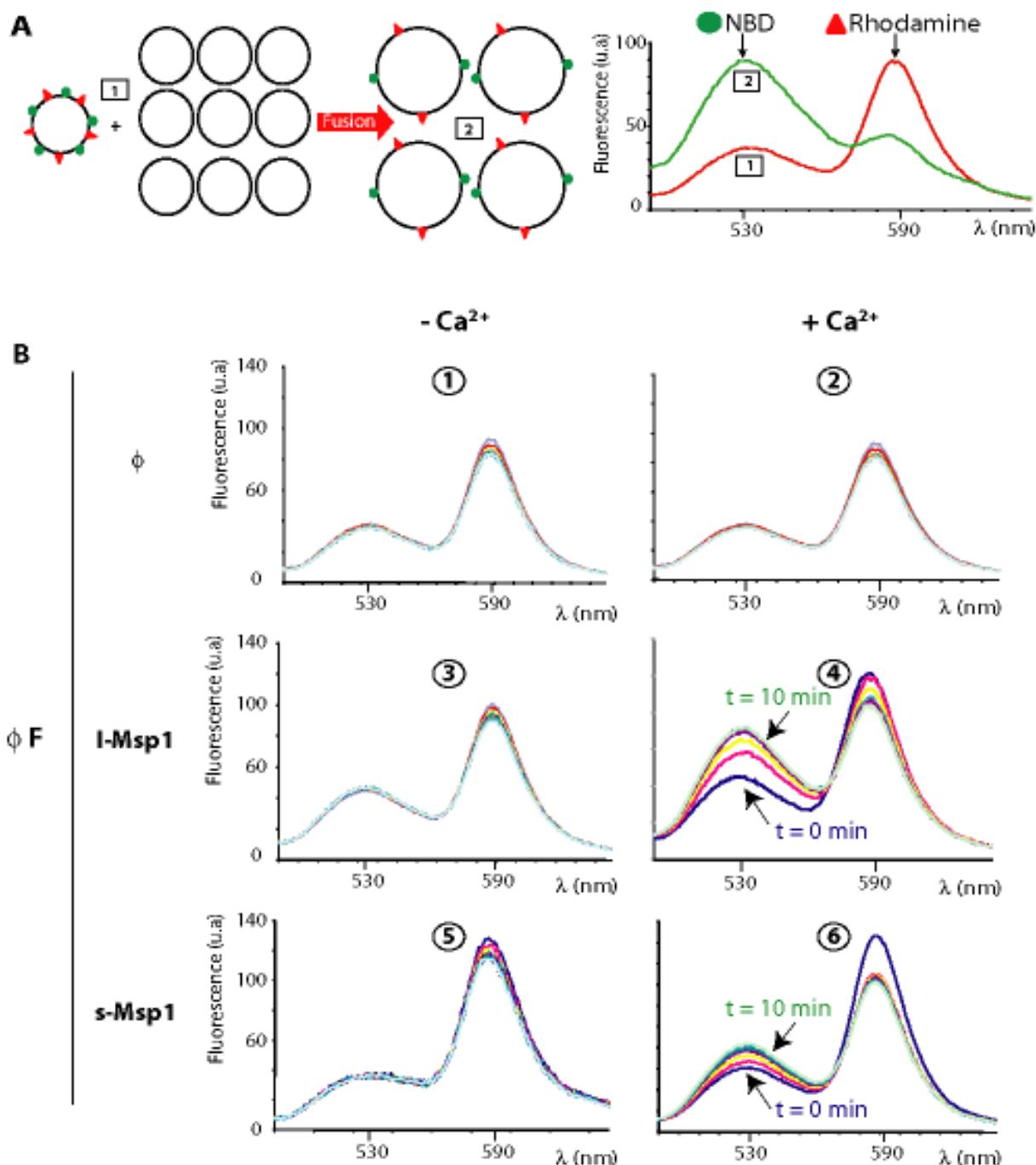
**Figure R-16. L'environnement lipidique module l'activité peroxidase du cytochrome c.**

Le cytochrome c est incubés pendant 15 minutes avec des liposomes dont la composition est indiquée dans le tableau. L'activité peroxidase du cytochrome c est mesurée pendant le temps indiqué par l'oxydation de 5 nM d'Amplex Red en présence de 50  $\mu$ M d' $H_2O_2$ .

#### *b - Effets de Msp1 sur la formation de bicouches planes supportées*

*Collaboration avec les Dr A. Lopez et L. Salomé (Organisation et dynamique des biomembranes; IPBS, UMR CNRS-UPS 5089, Toulouse).*

Pour étudier les actions de Msp1 sur l'organisation des membranes, des bicouches lipidiques supportées planes (SPB) ont été formées pour mesurer, par retour de fluorescence après photo-blanchiment (FRAP), le coefficient de diffusion latérale de la NBD-PC incorporée aux liposomes. Des liposomes non chargés ou portant l-Msp1 ou s-Msp1 sont déposés dans une chambre formée entre une lame et une lamelle et incubés 15 min avant de rincer la chambre et de réaliser des observations au microscope à fluorescence. L'étalement de liposomes vides montre une répartition hétérogène du traceur fluorescent (figure R-17, gauche), évoquant soit une organisation en domaines dans lesquels la NBD-PC n'est pas répartie de façon homogène, soit un étalement irrégulier des liposomes sur le support. Des images similaires ont été observées quel que soit le lipide fluorescent utilisé (NBD-PC, NBD-PE, Dansyl-PE, NBD-PG) favorisant donc la dernière hypothèse. La présence de calcium pendant la formation des bicouches induit par contre une répartition homogène du traceur fluorescent (figure R-17, milieu), suggérant soit qu'il déstabilise les éventuels domaines, soit qu'il favorise l'étalement des liposomes. Cette dernière possibilité est la plus probable puisque le calcium n'a pas d'effet lorsqu'il est ajouté après l'étape de formation des bicouches (figure R-17, droite). De plus, le calcium est connu pour favoriser la fusion de liposomes anioniques (Jass et al., 2000; Puu and Gustafson, 1997).



**Figure R-19. Msp1 favorise la fusion de liposomes en présence d'une dose suboptimale de calcium.**

(A) Schéma du test de fusion: de la NBD-PE (●) et de la rhodamine-PE (▲) sont incorporées dans des liposomes à une concentration surfacique appropriée pour entraîner après excitation du NBD, le transfert vers la rhodamine de son énergie d'émission de fluorescence (courbe 1). La fusion de ces liposomes avec des liposomes non fluorescents provoque la dilution des marqueurs, donc une diminution du transfert et de l'émission de la rhodamine parallèle à une augmentation de celle du NBD (courbe 2). (B) Des liposomes vides fluorescents ( $\phi$  F) sont incubés pendant 10 minutes en présence ( $+Ca^{2+}$ ; spectres 2, 4, 6) ou non ( $-Ca^{2+}$ ; spectres 1, 3, 5) de 0.25mM calcium soit avec des liposomes vides non fluorescents ( $\phi$ ; spectres 1 et 2), soit avec des liposomes non fluorescents portant l-Msp1 (spectres 3 et 4) ou s-Msp1 (spectres 5 et 6) et les spectres de fluorescence sont enregistrés toutes les 2 minutes. Une augmentation de la fluorescence du NBD corrélée à une diminution de celle de la rhodamine est observée uniquement sur les spectres 4 et 6, c'est-à-dire en présence de l-Msp1 ou s-Msp1.

L'utilisation de liposomes portant l-Msp1 ou s-Msp1 donne une fluorescence plus uniforme que les liposomes dépourvus de la dynamine (fig. R-18). Après photo-blanchiment, on observe un retour de fluorescence de la zone illuminée confirmant qu'il s'agit bien d'une bicouche étalée sur le support et donc que la présence de Msp1 sur les liposomes favorise leur fusion sur le support.

**L'étude détaillée de cette activité de Msp1, rappelant sa propriété fusogène *in vivo*, a donc été privilégiée.**

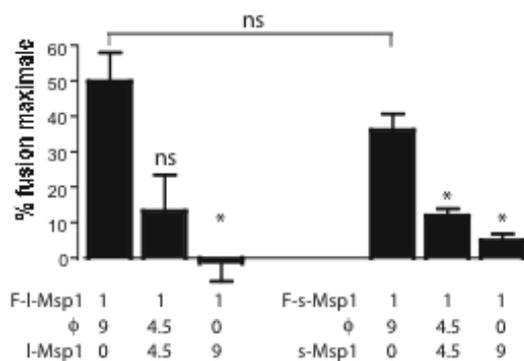
### ***R-III.3 Activité fusogène de Msp1***

#### *a - Msp1 favorise le mélange des phospholipides*

Le test pour étudier la fusion des liposomes (Struck et al., 1981) est schématisé dans la figure R-19-A. Lors des mises au point, nous avons induit la fusion des liposomes par l'addition de 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  et établi la quantité optimale de chaque traceur (0.8% NDB-PE et Rhodamine-PE) pour observer le transfert d'énergie et sa diminution liée à la fusion. Nous avons alors défini le meilleur rapport entre liposomes fluorescents et non fluorescents (1/9) pour un signal de fusion maximal. Dans ces conditions, aucune fusion n'est détectée en absence de  $\text{Ca}^{2+}$  que Msp1 soit présent ou absent sur les liposomes (figure R-19, B spectres 1, 3 et 5). En présence de 0.25 mM  $\text{Ca}^{2+}$ , les liposomes vides ne fusionnent toujours pas entre eux (figure R-19, B spectres 2), mais le font avec des liposomes portant l-Msp1 ou s-Msp1 (figure R-19, B spectres 4 et 6). Ces résultats indiquent que les deux isoformes de Msp1 favorisent la fusion des liposomes en étant présentes sur une seule des membranes qui fusionnent. Ces conditions - 0.8% NDB-PE et Rhodamine-PE, liposomes fluorescents/non-fluorescents = 1/9 et  $[\text{Ca}^{2+}] = 0.25 \text{ mM}$  - ont été utilisées dans la suite de nos études des propriétés fusogènes de Msp1.

#### *b - La présence de Msp1 sur deux liposomes opposés inhibe le mélange des phospholipides*

Pour étudier les effets de Msp1 lorsqu'elle est présente sur les deux membranes, nous avons réédité l'expérience précédente avec des liposomes fluorescents portant l-Msp1 ou s-Msp1. Lorsque les uns ou les autres de ces derniers sont opposés à des liposomes vides non fluorescents, la fusion atteint environ, et ne dépasse jamais, 50% de la fusion maximale obtenue avec 10 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (figure R-20).



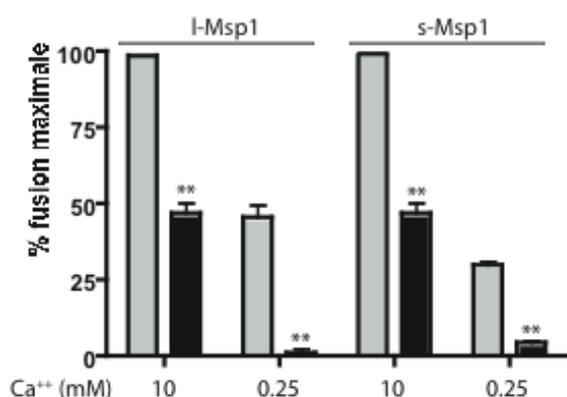
**Figure R-20. Msp1 favorise la fusion des liposomes quand elle est présente sur une des deux membranes apposées mais l'inhibe quand elle est présente sur les deux membranes.**

Des liposomes fluorescents portant l-Msp1 (F-l-Msp1) ou s-Msp1 (F-s-Msp1) sont incubés en présence de 0.25mM Ca<sup>++</sup> avec un mélange dans les proportions indiquées de liposomes vides (φ) et de liposomes portant l-Msp1 ou s-Msp1. Le signal de fusion mesuré est exprimé en pourcentage de fusion maximale (test t de student non apparié, \* p<0.05, ns=non significatif; n=3).

De façon surprenante, lorsque les liposomes fluorescents portant l-Msp1 ou s-Msp1 sont opposés à des quantités croissantes de liposomes l-Msp1 ou s-Msp1, on note que la fusion est inhibée progressivement jusqu'à être totalement abolie lorsque la totalité des liposomes portent Msp1 (figure R-20). La présence de Msp1 sur une des deux vésicules opposées favorise donc leur fusion alors que sa présence sur les deux l'inhibe.

#### *c - Msp1 induit l'hémifusion des liposomes*

Au cours des expériences précédentes, nous avons remarqué que la fusion mesurée ne dépasse jamais 50% de la fusion maximale théorique (figure R-20). Ceci indique soit que Msp1 n'est pas efficace sur tous les liposomes soit qu'elle induit la fusion d'un seul des deux feuillet de la bicouche. Pour distinguer ces possibilités nous avons utilisé le chlorure de cobalt, un « quencher » collisionnel qui inhibe la fluorescence du NBD et de la rhodamine auxquels il a accès (Scaglione and Rintoul, 1989), c'est-à-dire incorporés dans le feuillet externe de liposomes imperméables. En présence de 2 mM de CoCl<sub>2</sub>, la fusion des liposomes induite par 10 mM Ca<sup>2+</sup> est inhibée à 50%, que les liposomes portent l-Msp1 ou s-Msp1 (figure R-21).



**Figure R-21. Msp1 induit l'hémifusion des membranes.**

Des liposomes fluorescents portant l-Msp1 ou s-Msp1 sont incubés comme indiqué avec des liposomes vides non fluorescents en présence de 10 mM ou 0.25 mM Ca<sup>++</sup> et en absence (□) ou en présence (■) de 2mM CoCl<sub>2</sub>. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fusion maximale (test t de student non apparié, \*\*p<0.05; n=3).

Ces résultats montrent que le  $\text{CoCl}_2$  n'a accès qu'au feuillet externe dont il inhibe la fluorescence, donc que les liposomes sont bien imperméables aux ions  $\text{Co}^{++}$ . L'inhibition atteint par contre 100% quand la fusion est stimulée par l-Msp1 ou par s-Msp1 en présence de 0.25 mM  $\text{Ca}^{2+}$  (figure R-21), prouvant que l-Msp1 et s-Msp1 ne provoquent que le mélange des phospholipides du feuillet externe, c'est-à-dire l'hémifusion.

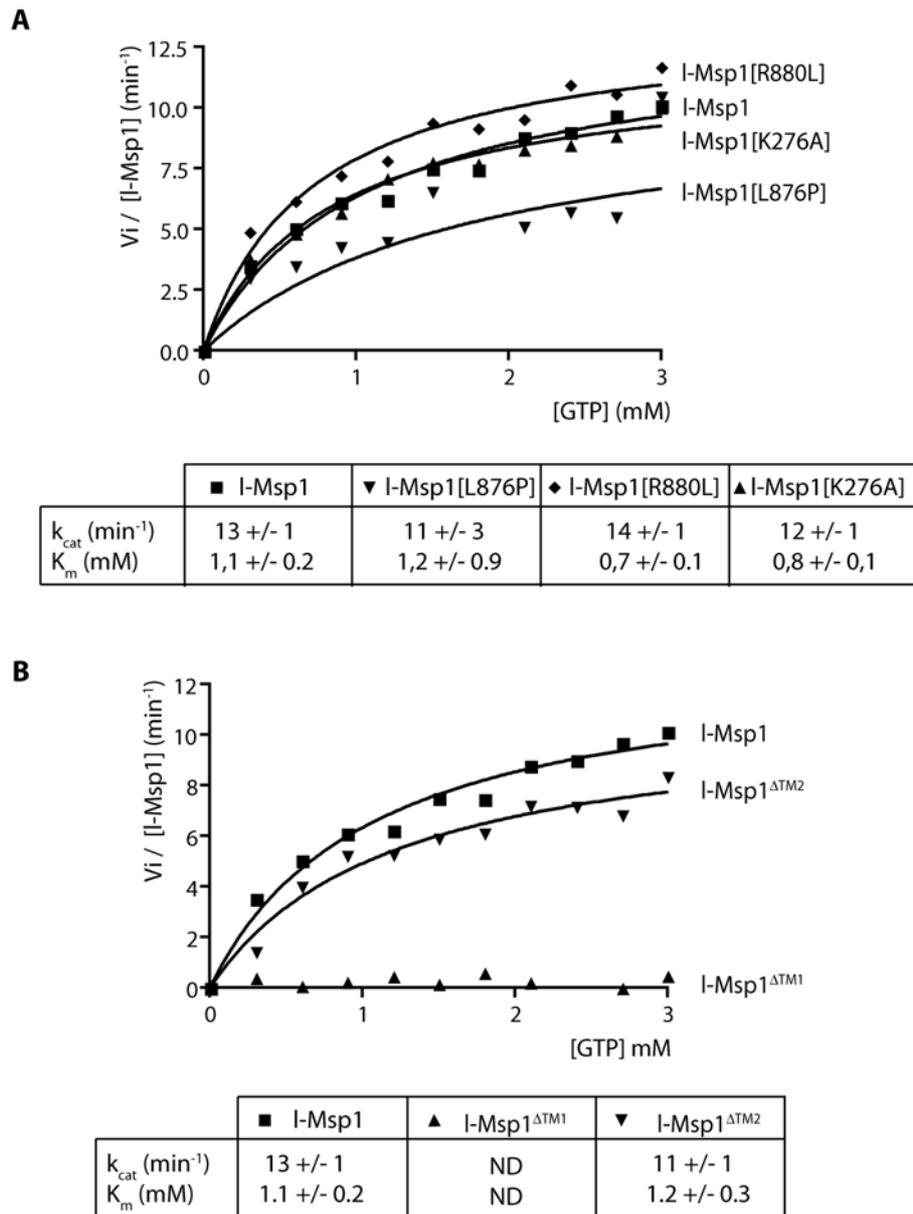
**Grâce à ce système expérimental, nous avons pu montrer pour la première fois que Msp1 intervient directement sur l'organisation des membranes pour favoriser l'hémifusion, étape précoce du processus de fusion membranaire. Les deux isoformes l-Msp1 et s-Msp1 ayant des propriétés d'hémifusion identiques, les domaines TM1 et TM2 ne sont pas nécessaires à cet effet qui fait donc intervenir un autre domaine qui pourrait être SIM3.**

#### ***R-III.4 Activité GTPase de Msp1***

L'hémifusion pourrait progresser vers la fusion totale grâce à l'énergie fournie par hydrolyse du GTP. Cette hypothèse est en accord avec le fait que des mutations affectant l'hydrolyse du GTP induisent la fragmentation du réseau mitochondrial *in vivo*. Nous avons donc étudié l'activité GTPase de l-Msp1 et s-Msp1 et ses relations avec leurs propriétés fusogènes. L'hydrolyse du GTP par Msp1 a été mesurée en déterminant les vitesses initiales de réaction en fonction de la concentration en GTP par quantification en colorimétrie du phosphate inorganique produit.

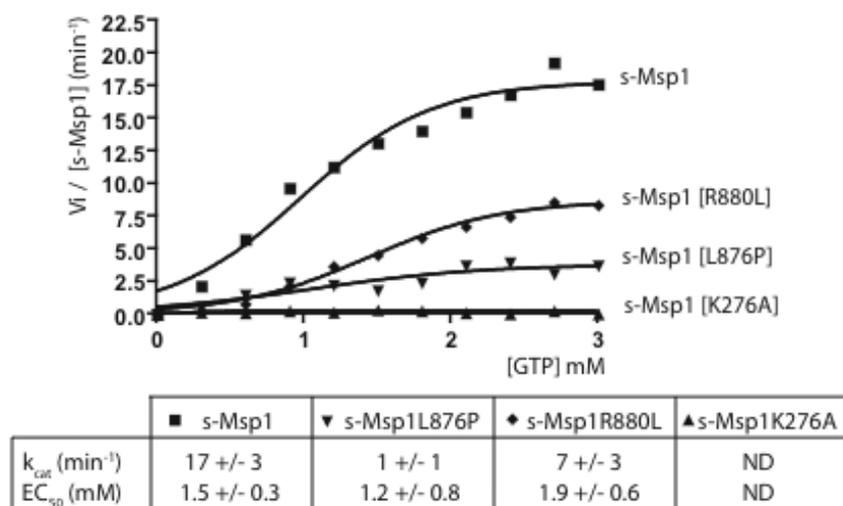
##### *a - La forme s-Msp1 possède une activité GTPase*

Pour l'isoforme s-Msp1, les relations entre les vitesses initiales d'hydrolyse du GTP et la concentration en substrat sont représentées par une équation sigmoïdale plutôt que par celle de Michaelis-Menten (figure R-22). Ceci suggère que la liaison du GTP induit des changements de conformation favorables à l'activité de la dynamine. Les paramètres enzymatiques déterminés (figure R-22) montrent une relativement faible affinité apparente pour le GTP ( $\text{EC}_{50} = 1.5 \text{ mM}$ ) mais une activité catalytique élevée ( $k_{\text{cat}} = 17 \text{ min}^{-1}$ ), de l'ordre de celle des dynamines oligomérisées (Ingerman et al., 2005; Warnock et al., 1997).



**Figure R-23. Activité GTPase de I-Msp1.**

(A) Des liposomes portant I-Msp1 ou des mutants du domaine GTPase (I-Msp1[K276A]) ou du domaine GED (I-Msp1[L876P] et I-Msp1[R880L]), ou (B) amputés des domaines TM1 (I-Msp1 $\Delta$ TM1) ou TM2 (I-Msp1 $\Delta$ TM2) ont été incubés avec des quantités de GTP allant de 0 à 3mM. Des aliquots ont été prélevés toutes les 5 minutes et le phosphate inorganique produit a été quantifié et les vitesses initiales de réaction ont été calculées pour chaque concentration de GTP et ramenées à la concentration en I-Msp1. Le graphique est représentatif de 3 expériences et montre les vitesses initiales rapportées à la concentration en I-Msp1 tracées en fonction de la concentration initiale en GTP qui pour tous les variants est de type Michaelis-Menten. L'activité catalytique ( $k_{cat}$ ) et l'affinité apparente ( $K_m$ ) ont été déterminées et reportées dans le tableau (ND : non déterminable).



**Figure R-22. s-Msp1 développe une activité GTPase dépendante de son domaine GED.**

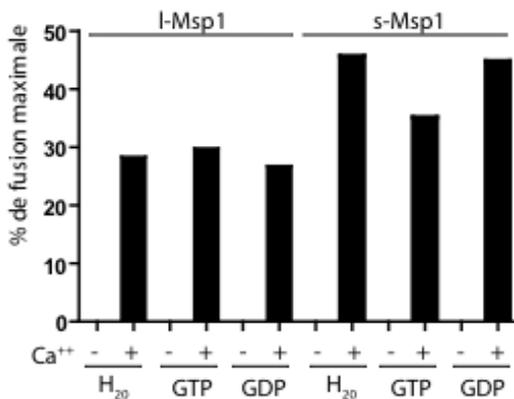
Des liposomes portant s-Msp1 ou des mutants du domaine GTPase (s-Msp1[K276A]) ou du domaine GED (s-Msp1[L876P] et s-Msp1[R880L]) ont été incubés avec des quantités de GTP allant de 0 à 3 mM. Des aliquotes ont été prélevés toutes les 5 minutes et le phosphate inorganique produit quantifié. Les vitesses initiales de réaction ( $V_i$ ) ont été calculées pour chaque concentration de GTP et ramenées à la concentration de s-Msp1. Le graphique, représentatif de 3 expériences, montre une relation sigmoïdale entre les vitesses initiales et la concentration en GTP. L'activité catalytique ( $k_{cat}$ ) et la concentration de GTP efficace à 50% ( $EC_{50}$ ) ont été déterminées pour chaque forme de s-Msp1 et reportés dans le tableau (ND : non déterminable).

L'activité mesurée est bien due à s-Msp1 puisque que la mutation (s-Msp1[K276A]) d'un résidu conservé dans toutes les GTPases et ATPases (cf. motif G1, figure I-2) et impliqué dans la coordination des résidus phosphates des nucléotides, inactive la dynamine (figure R-22). Les mutations s-Msp1[L876P] et s-Msp1[R880L], affectant les motifs coiled-coil du domaine C-terminal, altèrent l'activité de s-Msp1; celle de s-Msp1[L876P] est fortement inhibée ( $k_{cat} = 1 \text{ min}^{-1}$ ) alors que celle de s-Msp1[R880L] est diminuée ( $k_{cat} = 7 \text{ min}^{-1}$ ). L' $EC_{50}$ , reflet de l'affinité apparente pour le GTP, n'est pas affecté. Ces résultats confirment que l'extrémité C-terminale de Msp1 joue bien le rôle d'effecteur de l'activité GTPase ou GED (GTPase Effector Domain).

Les analyses cinétiques effectuées pour la forme l-Msp1 montrent une activité enzymatique de type Michaelis-Menten avec un  $K_m$  de 1 mM et un  $k_{cat}$  de  $13 \text{ min}^{-1}$  (figure R-23, A). Cependant le mutant l-Msp1[K276A] présente une activité similaire à l-Msp1 (figure R-23, A). De fait, tous les mutants étudiés, l-Msp1[L876P], l-Msp1[R880L], l-Msp1 <sup>$\Delta$ TM2</sup> ont la même activité GTPase, hormis l-Msp1 <sup>$\Delta$ TM1</sup> qui est incapable d'hydrolyser le GTP (figure R-23, B). Ces résultats, en particulier l'activité du mutant l-Msp1[K276A], suggèrent que nous co-purifions une GTPase bactérienne lorsque le domaine TM1 est présent.

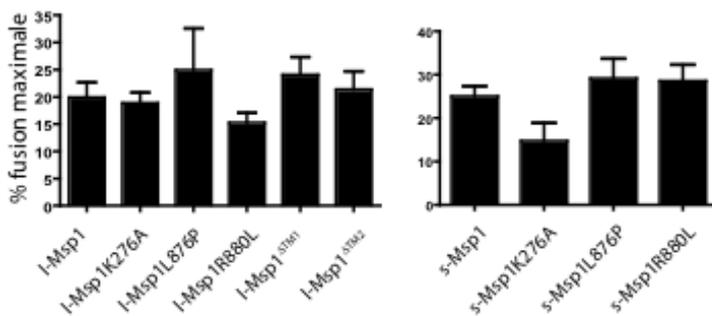
*b - Relation entre hémifusion et activité GTPase*

Pour étudier l'effet des nucléotides à guanine sur l'hémifusion induite par Msp1, nous avons d'abord réalisé un test de fusion en absence de  $Ca^{2+}$  mais en présence de GTP ou de GDP. Aucune fusion n'est mesurée dans ces conditions (figure R-24). L'ajout de 0,25 mM calcium en présence de nucléotides donne des résultats similaires à ceux obtenus en leur absence (figure R-24). Les nucléotides à guanine n'induisent pas la fusion totale et n'ont pas d'effets sur l'hémifusion qui est donc indépendante de l'hydrolyse du GTP.



**Figure R-24. Les nucléotides à guanine n'ont pas d'effet sur l'hémifusion induite par Msp1.** Des liposomes vides fluorescents sont incubés avec un mélange en proportions égales de liposomes vides et de liposomes l-Msp1 ou s-Msp1 seuls (H<sub>2</sub>O) ou en présence de GDP ou de GTP (2 mM). En absence de Ca<sup>2+</sup> (-), aucune fusion n'est observée. L'ajout simultané de 0,25mM Ca<sup>2+</sup> (+) et de GTP ou de GDP donne un signal de fusion identique à celui obtenu en présence de Ca<sup>2+</sup> seul. Les résultats sont exprimés en pourcentage de fusion maximale.

De plus, les mutations K276A, L876P et R880L ne modifient les propriétés d'hémifusion ni de l-Msp1 ni de s-Msp1 (figure R-25). Ces résultats montrent que l'intégrité des domaines GTPase et GED n'est pas non plus nécessaire à l'activité d'hémifusion de Msp1.

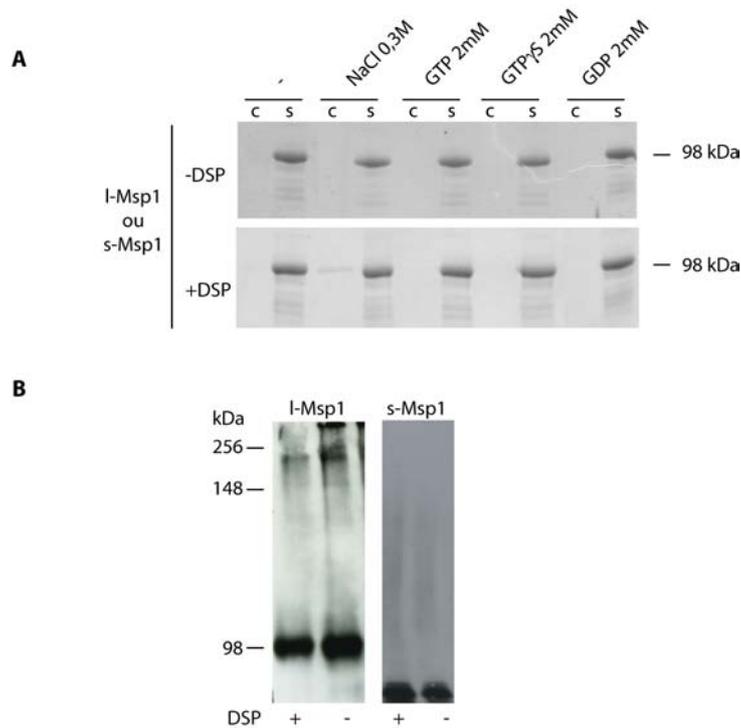


**Figure R-25. L'hémifusion induite par Msp1 ne dépend pas des domaines GTPase ou GED.** Le test de fusion est réalisé avec les mutants indiqués de l-Msp1 et s-Msp1 qui ne montrent aucune différence significative dans leur capacité à induire l'hémifusion. (test t de student non apparié; n=3).

*c - Auto-assemblage de Msp1*

Par homologie avec les dynamines classiques, nous avons voulu vérifier si l'hémifusion induite par Msp1 pouvait impliquer son oligomérisation. Un test de sédimentation basé sur celui qui est employé pour les dynamines a été développé pour étudier l'auto-assemblage de Msp1. Après pontage chimique des éventuels oligomères de Msp1, les liposomes sont

dissociés par 0.1% de Triton X-100 et une centrifugation à 100.000 x g est réalisée pour sédimenter les complexes de haut poids moléculaire. Aucun auto-assemblage des formes l-Msp1 ou s-Msp1 n'a pu être mis en évidence (figure R-26, A).



**Figure R-26. Msp1 ne s'autoassemble pas dans notre système expérimental.**

(A) Les liposomes portant l-Msp1 ou s-Msp1 sont incubés en présence (+DSP) ou non (-DSP) d'un agent pontant, puis dissociés. Le culot (C) et le surnageant (S) d'une centrifugation à 100.000 x g sont analysés sur SDS PAGE en conditions réductrices, puis les protéines sont colorées au bleu de Coomassie. L'ajout de nucléotides à guanine (GTP, GTP $\gamma$ S, GDP) ou la force ionique (0.3M NaCl) du milieu ne favorisent pas l'oligomérisation de Msp1. (B) Des liposomes portant l-Msp1 ou s-Msp1 sont incubés avec (+) ou sans (-) DSP et la formation de petits oligomères analysée par SDS PAGE en conditions non réductrices, suivi d'une immunodétection à l'aide d'un anticorps anti-Msp1.

Ni la présence de nucléotides (GTP, GTP $\gamma$ S, GDP) ni la force ionique ne modifie ces résultats. Pour vérifier l'existence éventuelle de petits oligomères de Msp1 ne sédimentant pas à 100.000 x g, les produits de pontage ont été analysés en SDS-PAGE en conditions non réductrices. Aucun dimère ou petit oligomère n'est détectable dans ces conditions (figure R-26, B).

**Nos résultats démontrent que s-Msp1 possède une activité GTPase modulée par le domaine coiled-coil C-terminal, qui agit donc bien comme un GED. L'hydrolyse du GTP n'induit pas la fusion totale des membranes. Aucune figure d'oligomérisation n'ayant été détectée, nous pouvons conclure que Msp1 agit sur les membranes pour induire l'hémifusion indépendamment de son oligomérisation et de son activité GTPase.**



## Discussion

De nombreux travaux réalisés au cours des dix dernières années ont décrit en détail les effets cellulaires de la dynamine mitochondriale OPA1/Mgm1/Msp1 et les partenaires avec lesquels elle module ces réponses. Cette dynamine est impliquée dans la fusion de la MI et module la morphologie du réseau mitochondrial et la structure des crêtes. Sa perte de fonction entraîne également la perte du génome mitochondrial. Cette propriété est certainement liée à son effet sur la structure de la MI à laquelle les nucléoïdes mitochondriaux sont associés puisque l'ADNmt n'est plus perdu quand l'inactivation de la fusion est concomitante à celle de la fission. Les modifications de la MI induites par la dynamine se répercutent également sur un ensemble de fonctions mitochondriales (respiration, synthèse d'ATP, homéostasie calcique) avec des conséquences majeures sur la viabilité cellulaire. Chez les eucaryotes supérieurs, OPA1 a évolué pour contrôler les processus apoptotiques. Au vu de cette pléiotropie, notre hypothèse est que la dynamine Msp1/OPA1 module ces différentes fonctions grâce à un rôle plus général dans l'organisation de la membrane interne des mitochondries.

Mon travail de thèse a été initié pour appréhender les propriétés biochimiques de la dynamine Msp1 qui sous-tendent ses effets et les bases structurales de ces propriétés. Nous avons montré l'importance pour les fonctions de la dynamine de ses interactions avec les membranes qui impliquent trois régions de la protéine, TM1, TM2 et SIM3. Les deux isoformes l-Msp1 et s-Msp1 sont capables d'induire l'hémifusion de membranes artificielles dans lesquelles elles sont incorporées. Cette propriété, certainement à la base de l'activité fusogène de Msp1, est indépendante de l'activité GTPase et de l'oligomérisation de la dynamine. Après discussion et interprétation des résultats, nous proposons un modèle tentant de les intégrer à un ensemble de données sur les activités de la dynamine.

### D-I. Msp1 module l'organisation des membranes

Nos études *in cellulo* ont montré que la dynamine Msp1 est localisée dans l'IMS et interagit avec la membrane par 3 domaines distincts, TM1, TM2 et SIM3. Ces trois domaines sont présents sur l-Msp1 alors que la forme s-Msp1 ne porte que SIM3. L'importance de TM1 et TM2 dans les fonctions de la dynamine est démontrée par les effets dominants négatifs des mutants  $msp1^{\Delta TM1}$  et  $msp1^{\Delta TM2}$  et leur incapacité à compléter la délétion de  $msp1$ . De façon intéressante, le seul polymorphisme trouvé dans les domaines TM1 et TM2 d'OPA1 est une mutation pathogène bien que conservative (A115V dans le TM1) qui induit un phénotype d'atrophie optique aggravé d'ataxie neuromusculaire (Yu-Wai-Man et al., 2010).

Un des effets de la délétion du TM1 ou du TM2 est le déséquilibre des proportions relatives des formes l-Msp1 et s-Msp1, des modifications du TM2 s'accompagnant même de la disparition de la forme s-Msp1. Ce rapport reste relativement stable dans les cellules où la forme courte représente environ 80%, et la forme longue 20%, du total de la dynamine. La nécessité de la présence de chaque isoforme pour les fonctions de Msp1 et l'importance du rapport l/s est en accord avec les données obtenues pour Mgm1 chez *S. cerevisiae* (Herlan et al., 2004; Herlan et al., 2003) et OPA1 chez les mammifères (Song et al., 2007). Cependant nos observations sur les clones complétés par la co-expression de Msp1<sup>ΔTM1</sup> et Msp1<sup>ΔTM2</sup>, et sur les cellules délétées des protéases impliquées dans la maturation de s-Msp1, montrent qu'une variation dans certaines limites de ce rapport n'est pas néfaste pour la cellule. En conditions physiologiques, comme lors de l'adaptation respiratoire, la variation de ce rapport semble servir de signalisation cellulaire.

Les effets dominants négatifs des mutants *msh1*<sup>ΔTM1</sup> et *msh1*<sup>ΔTM2</sup> indiquent que les formes longues produites, l-Msp1<sup>ΔTM1</sup> et l-Msp1<sup>ΔTM2</sup>, interagissent fonctionnellement avec les formes endogènes et inhibent leur activité. Ceci, ajouté à l'incapacité de chaque mutant à compléter la perte de Msp1, alors qu'ils peuvent le faire conjointement, suggère une perte de fonction partielle de ces formes longues. L'expression de chacun des mutants de délétion des domaines TM provoque la fragmentation des mitochondries, suggérant un rôle prépondérant de TM1 et TM2, donc de la forme l-Msp1, dans la fusion. Ce rôle peut être dû à la capacité de ces domaines à induire une organisation particulière de la MI et/ou à recruter des partenaires spécifiques. Une activité fusogène des formes longues de la dynamine a déjà été proposée pour Mgm1 chez *S. cerevisiae* (Sesaki et al., 2003a) et pour OPA1 chez les mammifères (Cipolat et al., 2006; Ishihara et al., 2006). Cette activité de la forme longue nécessite tout de même la présence des isoformes courtes (Duvezin-Caubet et al., 2006; Guillery et al., 2008; Song et al., 2007).

L'expression de *msh1*<sup>ΔTM2</sup>, qui produit seulement une forme longue l-Msp1<sup>ΔTM2</sup>, exerce un effet dominant négatif non seulement sur la morphologie mitochondriale mais aussi sur le maintien de l'ADNmt. Cela pourrait indiquer un rôle particulier du TM2 dans le maintien de l'ADNmt, pouvant passer par la genèse de la forme courte et/ou une structuration de la MI propice à son interaction avec les complexes nucléoprotéiques qui forment les nucléoïdes. Le rôle prépondérant du TM2 dans le maintien des nucléoïdes a récemment été confirmé pour OPA1; la suppression spécifique des formes contenant l'exon alternatif 4b où est située une région hydrophobe potentiellement équivalente au TM2 induit en effet la déplétion de l'ADN mitochondrial dans des cellules Hela (Elachouri et al.).

L'ensemble de ce travail montre que les domaines TM1 et TM2 sont essentiels aux fonctions de la dynamine en permettant la biogenèse des formes l-Msp1 et s-Msp1, et probablement en induisant des modifications membranaires spécifiques agissant sur la morphologie du réseau et le maintien du génome mitochondrial.

## **D-II. Incorporation de Msp1 purifiée dans des liposomes mimant la membrane interne**

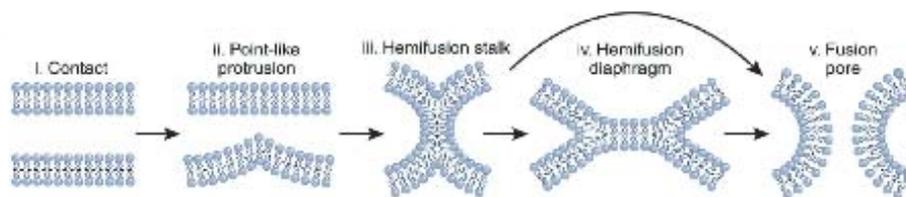
Pour analyser les relations de Msp1 avec les membranes et identifier les propriétés biochimiques à la base de ses fonctions, nous avons purifié les deux isoformes de Msp1 et les avons incorporées dans des liposomes de composition lipidique similaire à celle de la MI où elles sont localisées *in cellulo*. Les formes recombinantes l-Msp1 et s-Msp1 miment les relations des formes endogènes avec la MI; elles s'associent respectivement aux liposomes comme des protéines intégrales et périphériques, et sont entièrement exposées à l'extérieur de la membrane. De plus, les formes l-Msp1<sup>ΔTM1</sup> et l-Msp1<sup>ΔTM2</sup> purifiées interagissent avec les liposomes de la même façon que lors de leur expression dans les levures. Ces résultats montrent que l'association de Msp1 aux liposomes reproduit celle observée *in cellulo*, passant aussi par les 3 domaines d'interaction TM1, TM2 et SIM3.

Comme les liposomes ont été formés *de novo* à partir de micelles mixtes détergent/lipides/protéines, Msp1 aurait pu être exposée en proportions égales entre l'intérieur et l'extérieur des liposomes. Le fait qu'elle soit entièrement à la face externe des vésicules suggère une capacité de la dynamine à induire, ou à s'associer à, des courbures positives de la membrane. Les principaux sites d'action de Msp1 dans les mitochondries, les sites de fusion et la jonction des crêtes présentent effectivement ce type de courbure. Ceci différencie Msp1 des dynamines conventionnelles qui ont une affinité pour les courbures négatives et se retrouvent à la base des vésicules d'endocytose en formation. Msp1 pourrait favoriser les courbures positives par insertion dans la bicouche et/ou en redistribuant sur le feuillet interne des phospholipides comme la CL, ayant une courbure négative spontanée. Dans la MI, la CL est effectivement concentrée (75 %) dans le feuillet interne (Daum, 1985; Gallet et al., 1995).

## **D-III. Msp1 induit l'hémifusion des membranes, une étape précoce de la fusion membranaire**

Nous avons entrepris l'étude des capacités fusogènes de Msp1 dont le rôle dans la fusion des mitochondries est établi. A ce jour cependant aucune donnée ne permettait d'établir si Msp1 agissait directement ou en régulant un effecteur de la fusion membranaire. Nous avons pu

montrer que la dynamine joue un rôle direct dans ce processus. En effet, même si ni l-Msp1 ni s-Msp1 n'induisent spontanément le mélange de lipides entre les liposomes, les deux isoformes favorisent ce mélange en présence d'une concentration de  $\text{Ca}^{2+}$  qui n'a aucun effet sur des liposomes vides. Le calcium a deux effets sur les membranes à CL : il neutralise les charges négatives portées par la CL et induit des changements structuraux favorisant l'agrégation et la fusion de liposomes (Ortiz et al., 1999; Wilschut et al., 1985). L'influence du calcium sur la fusion est cependant observée à des concentrations en  $\text{Ca}^{2+}$  allant de 2 à 10 mM selon la force ionique du milieu (Wilschut et al., 1985). Nous suggérons donc que dans nos conditions (0,25 mM  $\text{Ca}^{2+}$ ) le calcium agit en neutralisant les charges négatives, ce qui permet le rapprochement des membranes. A la différence des mitofusines, Msp1 n'est donc pas impliquée dans le rapprochement des membranes qui *in vivo* doit faire intervenir d'autres protéines (cf. paragraphe D-VII). Le rôle de Msp1 dans la fusion serait donc de réorganiser les membranes pour en induire l'hémifusion. Les modèles courants de fusion membranaire font intervenir une courbure positive localisée de la membrane et la formation d'une structure fusogène à son sommet (Chernomordik and Kozlov, 2003; Efrat et al., 2007; Kozlov et al., 2010). Ils suggèrent qu'une seule des deux membranes apposées présente cette structure, la seconde restant plane (figure D-1).



**Figure D-1. Modèle de fusion membranaire.**

Les deux membranes sont rapprochées et l'hémifusion est induite par une structure appelée "point like protrusion" présente sur une seule des deux membranes. Des intermédiaires d'hémifusion sont alors formés et évoluent jusqu'à la formation du pore de fusion pour terminer le processus de fusion. D'après Chernomordik et Kozlov, 2008.

Ces modèles expliqueraient à la fois la nécessité de Msp1 sur une seule des deux membranes et l'inhibition observée lorsqu'elle est présente sur les deux. La petite taille des liposomes utilisés induit une forte densité surfacique de Msp1 et donc un manque de portion membranaire plane pour favoriser l'hémifusion. Nous pourrions vérifier cette hypothèse en utilisant des vésicules de tailles supérieures (liposomes géants ou multi-lamellaires) pour la même quantité de dynamine. *In vivo*, la densité plus faible permettrait d'avoir plusieurs sites d'initiation de fusion le long des MI. Dans cette optique, il est cependant intéressant de noter qu'une surexpression de la dynamine peut dans certains cas induire la fragmentation du réseau mitochondrial (Griparic et al., 2004; Misaka et al., 2002). Une telle surexpression, en

augmentant la densité de Msp1 à la surface de la MI, pourrait induire le même phénomène que celui observé *in vitro* et l'inhibition de la fusion.

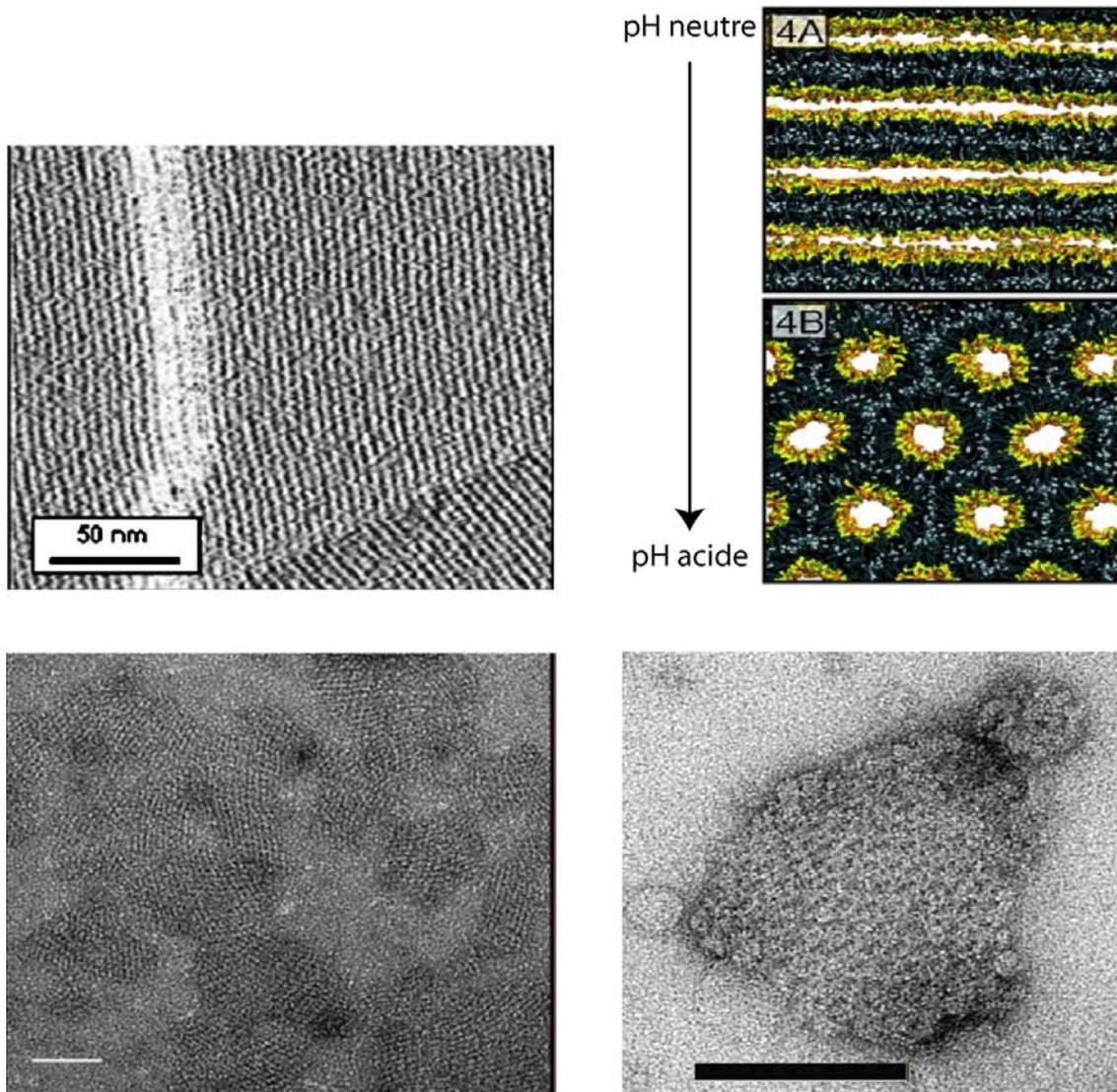
Les deux isoformes l-Msp1 et s-Msp1 sont capables d'organiser la membrane pour en favoriser l'hémifusion. Les interactions avec la membrane nécessaires à cette activité n'impliquent donc ni le TM1 ni le TM2 qui sont absents de la forme courte.

#### **D-IV. L'hémifusion induite par Msp1 est indépendante des domaines GTPase et GED**

Dans des tests de fusion *in vitro* sur mitochondries isolées, il a été montré que la présence de GTP était nécessaire à la fusion de la MI (Meeusen et al., 2004). Nous avons donc vérifié si Msp1 développait une activité GTPase après reconstitution dans les liposomes et si cette activité pouvait modifier les propriétés d'hémifusion de la dynamine. L'isoforme s-Msp1 a une activité catalytique élevée ( $k_{cat} \sim 20 \text{ min}^{-1}$ ) et une affinité apparente pour le GTP assez faible ( $EC_{50} \sim 1,5 \text{ mM}$ ) qui reste cependant dans la gamme des concentrations cellulaires du GTP (1 à 2 mM). Des mutations ponctuelles des domaines GTPase (s-Msp1[K276A]) et GED (s-Msp1[L876P] et s-Msp1[R880L]) abolissent ou inhibent fortement cette activité, prouvant son authenticité.

Les résultats des études sur la forme longue montrent une activité GTPase. Cependant les mutations des domaines GTPase et GED n'ont aucun effet sur l'activité GTPase mesurée pour l-Msp1; seule la délétion du TM1 abolit cette activité. Des travaux récents utilisant Mgm1 purifiée et reconstituée dans le même type de liposomes montrent que s-Mgm1 est capable d'hydrolyser le GTP tandis que l-Mgm1 ne le peut pas (DeVay et al., 2009). Ces résultats corrélerent avec des observations *in vivo* dans lesquelles des mutations introduites dans les motifs G1, G2, G3 ou G4 du domaine GTPase de l-Mgm1 n'ont aucun effet alors qu'elles entraînent la fragmentation des mitochondries et la perte de leur génome quand elles sont introduites dans s-Mgm1 (Zick et al., 2009). Ceci laisse penser que l-Msp1 n'a pas d'activité GTPase mais que nous co-purifions une GTPase bactérienne en interaction avec le TM1.

En tout état de cause, l'hémifusion induite par l-Msp1 et s-Msp1 est indépendante de la liaison et de l'hydrolyse du GTP puisque la présence de nucléotides (GTP ou GDP) ne modifie pas les signaux de fusion obtenus en leur absence. En accord avec ces résultats, les mutations K276A, L876P et R880L n'ont pas d'effets sur l'hémifusion, qu'elles soient introduites dans s-Msp1 ou l-Msp1. L'hémifusion induite par les deux formes est donc indépendante de l'intégrité des domaines GTPase et GED et de l'hydrolyse du GTP par s-Msp1.



**Figure D-2. Mgm1/OPA1 et organisation de la cardiolipine au sein d'une bicouche.**

Les deux panneaux du haut montrent à gauche l'organisation de la cardiolipine sur un support de mica et à droite des modèles issus de simulation informatique d'organisation en bicouche de la cardiolipine, selon le pH local. Les panneaux du bas montrent l'organisation d'OPA1 (gauche, échelle 100 nm) ou de Mgm1 (droite, échelle 200 nm) sur des liposomes contenant de la cardiolipine. D'après, Alessandrini, 2007, Chem. Phys. Lipids, Ban , 2010, Hum. Mol. Genet., DeVay, 2009, J. Cell Biol., Lewis, 2009, BBA.

## **D-V. Oligomérisation de Msp1/Mgm1/OPA1 et activité GTPase basale et stimulée**

La réorganisation des membranes provoquant l'hémifusion pourrait aussi provenir de l'oligomérisation de la dynamine qui a souvent été invoquée pour rendre compte de ses propriétés fusogènes. Nos expériences n'ont cependant pas permis de mettre en évidence une capacité d'auto-assemblage de Msp1. L'oligomérisation en *trans* de Msp1 sur deux membranes adjacentes n'est pas non plus nécessaire à l'hémifusion. C'est aussi le cas pour OPA1 dont la présence sur une des deux mitochondries apposées suffit à induire la fusion (Song et al., 2009). Mgm1 est au contraire nécessaire sur les deux mitochondries (Meeusen et al., 2006), ce qui pourrait être dû à des différences expérimentales ou à une divergence évolutive entre Msp1 et Mgm1 qui placerait Msp1 entre Mgm1 et OPA1 dans l'évolution du processus de fusion mitochondriale.

L'oligomérisation de Mgm1 et d'OPA1 a été suggérée par des études cellulaires qui s'appuient sur des expériences de complémentation intragénique (Wong et al., 2003) et des tests biochimiques qui ne distinguent pas entre l'oligomérisation de la protéine et sa présence dans des complexes multi-protéiques (Frezza et al., 2006; Yamaguchi et al., 2008; Zick et al., 2009). L'interprétation des résultats a de plus toujours été faite en s'appuyant sur le mode d'action des dynamines classiques qui s'auto-assemblent lors de leur recrutement sur la membrane, alors que Msp1/Mgm1/OPA1 est une dynamine résidente de la MI. *In vitro*, l'oligomérisation de Mgm1 et d'OPA1 a été montrée dans des systèmes similaires au nôtre (Ban et al., 2010; DeVay et al., 2009; Meglei and McQuibban, 2009). Les oligomères observés sont cependant assez petits (dimères à hexamères) et représentent une faible proportion de la dynamine. A l'inverse, les images de microscopie électronique montrent une organisation en réseau très dense sur les liposomes (figure D-2). Si cette organisation représentait un autoassemblage, la majorité de la protéine devrait se trouver dans des oligomères de haut poids moléculaire qui sédimentent à 100.000 x g, comme dans le cas des dynamines classiques (Hinshaw, 1999). Les images montrant en fait un arrangement de Mgm1 et d'OPA1 similaire à celui de la cardiolipine capable de s'auto-organiser en absence de protéines (figure D-2 ; (Alessandrini et al., 2007; Lewis and McElhaney, 2009)), nous proposons qu'elles reflètent l'association des dynamines à la cardiolipine plutôt que leur autoassemblage. Les pontages obtenus en utilisant un agent avec un bras de 11,4 angströms seraient dus à la proximité spatiale de Mgm1 ou d'OPA1 associés à la cardiolipine. De plus, l'autoassemblage des dynamines classiques sur des LUV induit la formation de tubules, ce qui n'est pas le cas de Mgm1 (DeVay et al., 2009; Rujiviphat et al., 2009). L'association de Mgm1



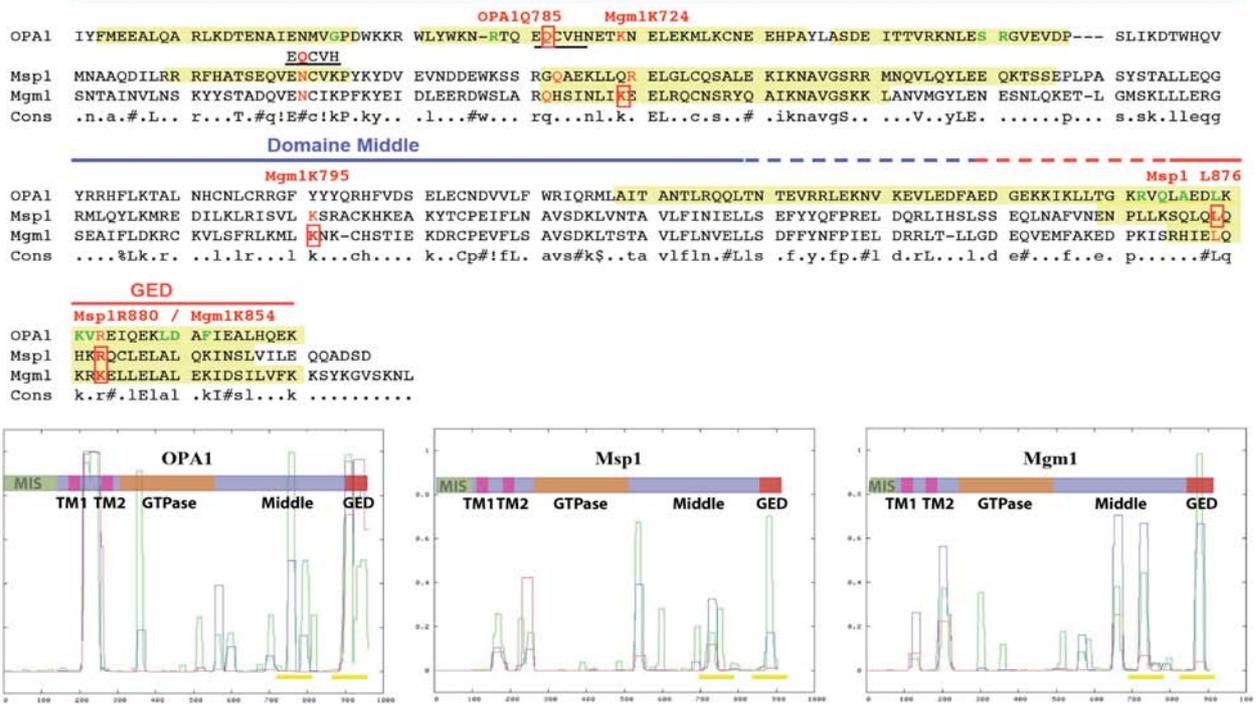
à la cardiolipine sans auto-assemblage ne produirait effectivement pas de force suffisante pour déformer des liposomes déjà assez fortement contraints de par leur petite taille. Dans le cas d'OPA1, des tubules se forment à partir des liposomes (Ban et al., 2010). Ces derniers étant des grands liposomes multi-lamellaires sont moins contraints et peuvent se déformer plus facilement. L'insertion d'OPA1 dans la membrane initierait la formation d'une courbure positive localisée se développant en tubules au fur et à mesure du recrutement d'OPA1.

Un autre argument utilisé pour suggérer l'oligomérisation de Mgm1 et d'Opa1 repose sur les effets de mutations de la région C-terminale qui entraînent la fragmentation des mitochondries (Wong et al., 2003). Toujours en référence aux dynamines conventionnelles dont l'oligomérisation implique le GED C-terminal et s'accompagne d'une forte augmentation de leur pouvoir catalytique, les effets de ces mutations sont interprétés comme un défaut d'oligomérisation qui serait nécessaire à l'activité fusogène en stimulant l'activité GTPase. Dans des expériences *in vitro*, l'activité dite basale de Mgm1 ( $\sim 0,5 \text{ min}^{-1}$ ) est mesurée en solution et l'activité dite stimulée ( $\sim 1,5 \text{ min}^{-1}$ ) après association avec les liposomes (Meglei and McQuibban, 2009). Selon ces observations et les expériences de pontage chimique, les auteurs concluent que l'activité GTPase de Mgm1 est stimulée par son auto-assemblage, lui-même induit par la liaison aux liposomes. Ce raisonnement, pertinent pour les dynamines conventionnelles qui sont recrutées du cytosol à la membrane et y oligomérisent pour assurer leur fonction, peut cependant poser problème pour une protéine membranaire comme Mgm1 qui, selon cette hypothèse, serait constitutivement oligomérisée. Nous proposons que la stimulation de l'activité GTPase de Mgm1 soit due à sa liaison aux liposomes lui conférant une conformation favorable sans nécessairement impliquer son oligomérisation. La faible activité catalytique mesurée pour Mgm1 ( $\sim 1.5 \text{ min}^{-1}$ ) pourrait provenir des conditions expérimentales réalisées en haute force ionique qui déstabiliserait les interactions entre s-Mgm1 et les liposomes. L'activité GTPase de s-Msp1 (non montré) ainsi que celle de s-OPA1 (Ban et al., 2010) est effectivement inhibée par les hautes forces ioniques.

Nos résultats montrent que l'hémifusion induite par Msp1 est indépendante des domaines GTPase et GED et suggèrent que ce n'est pas l'oligomérisation mais les interactions de Msp1 avec les liposomes, peut-être plus spécifiquement avec la CL, qui assurent un repliement optimal permettant aux activités GTPase et d'hémifusion de se développer.

## **D-VI. Le domaine SIM3 d'association à la membrane**

Nos études ont montré que les interactions de Msp1 avec les membranes impliquent 3 domaines distincts TM1 et TM2 spécifiques à l-Msp1, et SIM3 commun aux deux isoformes.



**Figure D-3. Le site d'interaction membranaire SIM3.**

Alignement des séquences d'OPA1, Msp1 et Mgm1 dans les domaines Middle et GED . Les positions des mutations étudiées expérimentalement sont indiquées en rouge au-dessus des séquences et les résidus concernés sont encadrés. Les résidus potentiellement homologues dans les autres séquences sont aussi indiqués en rouge. L'alignement d'un petit motif d'OPA1 (souligné) contenant la position Q785 avec une autre région de Msp1 et Mgm1 est indiqué. Les mutations pathogènes d'OPA1 sont en vert. Les panneaux du bas représentent les prédictions de régions coiled-coil de 14 (vert), 21 (bleu) ou 28 (rouge) résidus. Les régions coiled-coil surlignées en jaune dans les alignements du dessus le sont aussi dans ces panneaux.

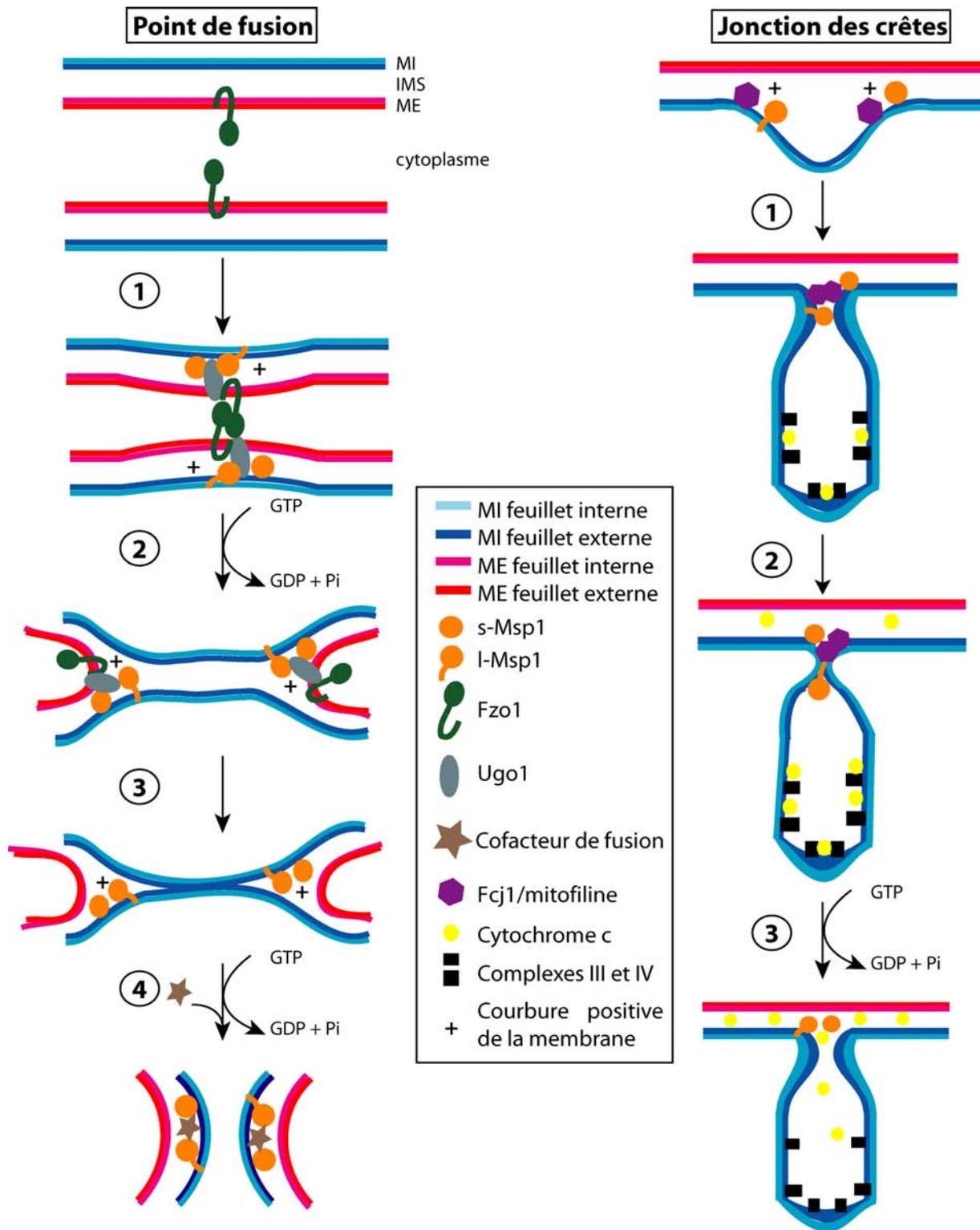
La capacité à induire l'hémifusion est partagée par l-Msp1 et s-Msp1 et ne nécessite ni le TM1 ni le TM2. Elle est d'autre part indépendante des domaines GED et GTPase. SIM3 pourrait donc être, ou contenir, le domaine effecteur de l'hémifusion.

Le rôle de la région C-terminale de Msp1, et de Mgm1 et d'OPA1, dans la fusion a été fermement établi par les effets de mutations induisant la fragmentation des mitochondries. Des résidus localisés dans le domaine Middle, en amont du GED C-terminal, peuvent comme ce dernier former des motifs coiled-coil dans lesquels de nombreuses mutations pathogènes sont retrouvées dans le cas d'OPA1 (figure D-3). Plus récemment, il a été montré que des résidus de Mgm1 (Rujiviphat et al., 2009) et d'OPA1 (Ban et al., 2010) distribués du domaine Middle au GED (figure D-3) participent à l'association avec les liposomes et plus particulièrement avec la CL, mais aussi à la stimulation de l'activité GTPase de leurs formes courtes et à l'agrégation ou la déformation des liposomes. Cependant, les mutations qui abolissent ou réduisent fortement l'association à la CL ou aux liposomes (Q785R pour OPA1 et K724A ou K795A pour Mgm1) se trouvent en amont du GED C-terminal (figure D-3). Les mutations L876P et R880L affectent l'activité du GED de Msp1, mais sont sans effets sur l'incorporation aux liposomes et sur l'hémifusion. Dans Mgm1 la mutation K854A, position homologue à R880 de Msp1, altère également l'activité GTPase de la dynamine mais pas sa liaison aux liposomes (Rujiviphat et al., 2009). Nous proposons donc que le site d'interaction membranaire SIM3 soit composé de résidus du domaine Middle de la dynamine. Les interactions ainsi formées pourraient induire l'hémifusion directement ou en favorisant des repliements particuliers de la protéine comme dans le cas du GED.

### **D-VII. OPA1/Mgm1/Msp1: méchanoenzyme ou commutateur moléculaire?**

Pour conclure cette discussion, nous présentons un modèle d'action de la dynamine tentant d'intégrer les activités biochimiques que nous avons décrites pour Msp1 à un ensemble de données recueillies *in vivo* sur les activités de la dynamine et de ses orthologues Mgm1 et OPA1.

L'existence de deux machineries différentes pour la fusion et le maintien des crêtes a été proposée pour OPA1 (Frezza et al., 2006; Landes et al., 2010a) et est appuyée par l'observation qu'aucune crête n'est localisée à proximité des sites de fusion (Meeusen et al.,



**Figure D-4. Modèle d'action de Msp1.**

La partie gauche montre le processus de fusion faisant intervenir Fzo1 dans la fusion des ME et le rapprochement des MI, impliquant une courbure positive de la membrane (+). L'hydrolyse du GTP par s-Msp1 permet de recruter/activer le complexe effecteur de fusion. La partie droite montre la formation et le maintien de la structure des crêtes après rapprochement des bords, par Fcj1 par exemple, et la formation d'une courbure positive de la MI (+). L'hydrolyse du GTP induit un changement d'organisation membranaire affectant la jonction des crêtes et l'interaction du cytochrome c avec la MI et/ou les complexes III et IV.

2006). Msp1/OPA1/Mgm1 pourrait donc assurer ses fonctions au niveau de chacun de ses sites d'action en entrant dans des complexes multiprotéiques distincts comprenant des proportions définies de chacune des isoformes. Cette hypothèse trouve un fondement dans l'observation que Mgm1 ne semble pas distribuée de façon homogène sur la MI: bien qu'ayant des distributions chevauchantes, les formes longues et courtes de Mgm1 sont respectivement enrichies dans la membrane des crêtes et dans la MI sous-jacente à la ME (Zick et al., 2009). Dans notre modèle l'organisation locale de la MI résulterait des modifications membranaires engendrées par les isoformes longues (donc principalement par TM1 + TM2) d'un côté et par les isoformes courtes (donc principalement par SIM3) de l'autre, et aboutirait au recrutement de partenaires spécifiques. Comme le suggèrent l'aspect sigmoïdal des courbes d'hydrolyse du GTP par s-Msp1 (et par s-Mgm1 (DeVay et al., 2009)), la liaison et/ou l'hydrolyse du GTP induirait alors des changements de conformation de s-Msp1. Cette commutation conformationnelle de s-Msp1 pourrait moduler ses interactions avec la MI, éventuellement en induisant sa libération des complexes (Frezza et al., 2006), aboutissant à la modulation du rapport (TM1 + TM2) / SIM3 donc à des restructurations locales de la MI et à la modification des composants et de l'activité des complexes. Ce mécanisme permet d'expliquer l'importance du rapport l/s mis en évidence pour les trois orthologues de la dynamine, qui reposerait sur une modulation de structures membranaires par i) la quantité de SIM3 apporté spécifiquement par la forme courte et ii) l'activité GTPase de cette dernière.

Au niveau des sites de fusion, le rapprochement des deux membranes internes pourrait impliquer un complexe comprenant les mitofusines Mfn1/Fzo1 (figure D-4 gauche, étape 1) qui sont des protéines de la ME nécessaires à la fusion de la MI médiée par OPA1/Mgm1/Msp1. Elles pourraient coordonner la fusion de la ME et celle de la MI en interagissant avec OPA1 chez les mammifères ou avec Mgm1 chez *S.cerevisiae*, par l'intermédiaire de l'adaptateur Ugo1, et en induisant le rapprochement des deux MI (Cipolat et al., 2004; Hoppins and Nunnari, 2009; Song et al., 2009). Après fusion de la ME suite à l'hydrolyse du GTP par les mitofusines (figure D-4 gauche, étape 2), les deux MI seraient suffisamment proches pour que Msp1 en induise l'hémifusion (figure D-4 gauche, étape 3). La liaison/hydrolyse du GTP par Msp1 aboutirait alors au recrutement d'un cofacteur agissant de concert avec les formes longues de la dynamine et permettant d'achever la fusion des membranes (figure D-4 gauche, étape 4). Cette dernière étape pourrait également être induit par la liaison du GDP localement produit par les mitofusines pendant la fusion de la ME, assurant ainsi la coordination des deux évènements. L'implication des formes longues de la dynamine dans les étapes finales de la fusion est appuyé par notre travail *in vivo* qui a montré

un rôle particulier de l-Msp1, dans la fusion des mitochondries (paragraphe D1, (Diot et al., 2009)). Cela semble aussi être le cas des formes longues d'OPA1 et de Mgm1 (Herlan et al., 2003; Ishihara et al., 2006; Sesaki et al., 2003a). Le cofacteur induisant la fusion totale des intermédiaires d'hémifusion pourrait être recruté par les formes longues des dynamines, éventuellement en interagissant avec le TM1 ou le TM2.

A la jonction des crêtes, des protéines impliquées dans leur formation et leur maintien, comme la mitofiline ou Fcj1 (Bereiter-Hahn and Jendrach, 2010; Rabl et al., 2009), pourraient initier une invagination localisée de la MI (figure D-4 droite, étape 1) et rapprocher suffisamment les bords de cette dernière pour favoriser l'hémifusion du feuillet externe (figure D-4 droite, étape 2). Une telle structure d'hémifusion à la jonction des crêtes formerait une barrière de diffusion à l'origine de la compartimentalisation de la membrane des crêtes et de l'IMS intra-crêtes. Des modifications induites par les changements d'état de s-Msp1 suite à la liaison et à l'hydrolyse du GTP aboutiraient à une restructuration des crêtes, impliquant éventuellement une réorganisation de la CL (figure D-4 droite, étape 3). Ces modifications seraient responsables de la modulation de l'activité des complexes respiratoires et pourraient influencer sur les interactions du cytochrome c avec les complexes III et IV et/ou avec la MI. Chez les eucaryotes supérieurs, ce mécanisme aurait évolué pour que le cytochrome c ainsi "mobilisé" soit, dans des situations apoptotiques, redistribué vers l'IMS sous-jacent et le cytosol grâce au recrutement de facteurs "BH3-only" provoquant la déstabilisation des intermédiaires d'hémifusion à la jonction des crêtes et l'ouverture de pores à la ME.

Ces régulations hautement dynamiques en réponses à des besoins cellulaires ne sont évidemment pas totalement indépendantes les unes des autres. C'est ainsi qu'une augmentation de la fusion mitochondriale semble propice à la respiration et que les phénomènes d'apoptose s'accompagnent souvent de la fragmentation des mitochondries. Cette dernière est aussi observée au cours de la division cellulaire et favoriserait la répartition des mitochondries et de l'ADNmt entre les cellules filles. La perte du génome mitochondrial induite par la perte de fonction de la dynamine est abolie par la perte concomitante de la fission. Comme les complexes impliqués dans le maintien des nucléoïdes ne semblent pas contenir Msp1 (Bogenghagen et al., 2008), ils pourraient être affectés indirectement par les modifications membranaires induites par Msp1, en particulier par le TM2, et aboutir à la perte de l'ADNmt dans des conditions non régulées (pathologiques et expérimentales).

## Perspectives

Pour la suite de ces recherches sur les mécanismes d'action de la dynamine Msp1, nous reprendrons nos travaux sur les liens éventuels entre Msp1 et les enzymes du remodelage lipidique mtPLase et ACP6. En ce qui concerne les activités biochimiques de la dynamine, nous devons dans un premier temps clarifier nos résultats sur l'activité GTPase de l-Msp1. Ensuite, nous devons étudier si la présence des deux isoformes de Msp1 sur la même membrane, comme c'est le cas dans les mitochondries, modifie le pouvoir catalytique et fusogène des isoformes séparées. L'identification du domaine SIM3 et la caractérisation de ses relations avec l'hémifusion et l'activité GTPase de Msp1 permettront de mieux cerner les mécanismes d'action de la dynamine. En reprenant le modèle des bicouches supportées nous pourrons étudier comment Msp1, et le rapport (TM1 + TM2) / SIM3, module l'organisation des phospholipides membranaires. Au cours de ces expériences nous serons amenés à caractériser des mutants des domaines fonctionnels de Msp1 (TM1, TM2, SIM3, GED, hémifusion), certains permettant éventuellement de dissocier les activités de Msp1. L'étude des effets de ces mutants *in vivo* nous renseignera sur les liens entre une activité biochimique particulière et les réponses mitochondriales régulées par la dynamine. Le système de reconstitution *in vitro* pourra aussi être utilisé pour caractériser/identifier des partenaires physiques et/ou fonctionnels de Msp1 qui pourraient être impliqués dans les différents effets de la dynamine. Ces études permettront d'affiner notre modèle selon lequel la dynamine exercerait ses effets en modulant l'activité de complexes multiprotéiques spécifiquement impliqués dans la fusion mitochondriale, le maintien des nucléoïdes, la structuration des crêtes et plus généralement de la membrane interne. À plus long terme, des études structurales bi- ou tridimensionnelles pourront être entreprises.

### **P-I. Msp1 et enzymes du remodelage lipidique**

Les conséquences de la perte ou du gain de fonction d'ACP6 et de la mtPLase sur la morphologie des mitochondries seront réétudiées dans des levures exprimant la protéine mitochondriale endogène Arg11 étiquetée mCherry. Cet outil a maintenant été mis en place au laboratoire. Si des effets sont confirmés, les liens fonctionnels entre ces enzymes et Msp1 seront étudiés en analysant la capacité du gain ou de la perte de fonction d'ACP6 ou de la mtPLase à compléter la délétion de Msp1 ou à moduler les phénotypes obtenus lors de la surexpression de Msp1 ou de ses mutants (Domaines TM1, TM2, GTPase ou GED).

## **P-II. Etude de l'activité GTPase de l-Msp1**

La première question à laquelle nous devons répondre concerne l'activité GTPase de l-Msp1. Nos résultats montrent en effet que le mutant l-Msp1[K276A] a une activité catalytique identique à celle de l-Msp1. Ce résultat est surprenant puisque la mutation affecte un acide aminé impliqué dans la coordination des résidus phosphate des nucléotides, qui est conservé dans toutes les GTPases et ATPases étudiées à ce jour. Pour éliminer le contaminant que nous pensons co-purifier avec Msp1, nous recherchons des conditions dans lesquelles s-Msp1 conservera ses propriétés alors que des mutants de l-Msp1 dans les motifs de liaison et d'hydrolyse du GTP seront négatifs. Dans ce but, la chromatographie d'affinité pourra être réalisée en présence de NaCl 500 mM, suivie de lavages soit dans le même tampon, ou en présence d'autres détergents (CHAPS, n-octyl-glucoside), d'agents chaotropiques (urée, guanidine) ou kosmotropiques (sels de sulfate ou de phosphate).

Si l'absence d'activité GTPase de l-Msp1 se confirmait, cela pourrait provenir du TM1 ou du TM2 qui différencient les deux isoformes de la dynamine. La forme l-Msp1<sup>ΔTM1</sup> ayant une activité nulle avec la purification actuelle, cela suggère qu'il en sera de même dans les nouvelles conditions. Etant donné la proximité du TM2 et du domaine GTPase, ce dernier pourrait être accolé à la membrane, empêchant l'accès du GTP à son site de liaison. Alternativement, les interactions de certains résidus du TM2 avec la membrane pourraient rigidifier Msp1 et/ou la positionner dans une configuration incompatible avec les transitions conformationnelles des boucles contenant les motifs G2 et G3 impliquées dans l'hydrolyse du GTP lié à la dynamine. Ces possibilités pourront être vérifiées en comparant les propriétés de liaison et d'hydrolyse du GTP de s-Msp1, l-Msp1, l-Msp1<sup>ΔTM2</sup> et de mutants ponctuels du TM2.

## **P-III. Identification de SIM3; relations avec l'hémifusion**

SIM3 a été défini comme un troisième Site d'Interaction Membranaire distinct de TM1 et de TM2 mais commun aux isoformes l-Msp1 et s-Msp1. Nous avons proposé que SIM3 puisse être contenu dans la région Middle de Msp1 où des motifs coiled-coils sont conservés entre les trois orthologues Msp1, OPA1 et Mgm1 (cf paragraphe D-VI et figure D-3) et dont certains résidus, dans OPA1 et Mgm1, sont impliqués dans l'association aux membranes (Ban et al., 2010; Rujiviphat et al., 2009). SIM3 n'est pas le GED puisque des mutations des résidus L876 et R880 affectent l'activité GTPase sans modifier l'association de Msp1 aux liposomes. Nous avons vu cependant que les relations entre SIM3 et les propriétés d'hémifusion communes aux deux isoformes restaient à définir; les résidus de SIM3 impliqués dans les

interactions avec la membrane induisent-ils directement l'hémifusion ou d'autres résidus entrent-ils en jeu ? Pour répondre à cette question, nous proposons d'analyser les effets sur l'hémifusion, l'activité GTPase et l'association aux liposomes, de mutations dans la région Middle de Msp1. Dans les deux hypothèses, la modification des interactions avec la MI se répercutera sur les propriétés d'hémifusion. Dans la seconde hypothèse seulement, il sera possible d'identifier des résidus affectant l'hémifusion sans modifier la liaison aux liposomes. Différentes mutations ont déjà été caractérisées après reconstitution d'OPA1 et de Mgm1 dans des liposomes à cardiolipine (Ban et al., 2010; Rujiviphat et al., 2009). Ces travaux n'ont jamais mis en évidence d'activité de fusion ou d'hémifusion mais uniquement l'agrégation des liposomes qui représente certainement une étape précoce de la fusion. Parmi les mutations étudiées, certaines (K795A et K724A de Mgm1 et Q785R d'OPA1, figure D-3) affectent la liaison à la cardiolipine ou aux liposomes, ainsi que l'activité GTPase stimulée et l'agrégation des liposomes (Ban et al., 2010; Rujiviphat et al., 2009). La mutation K804A de Mgm1 affecte seulement l'agrégation des liposomes sans modifier l'activité GTPase stimulée de la dynamine ni sa liaison aux liposomes. Cette dernière observation milite donc en faveur de l'hypothèse selon laquelle les résidus formant SIM3 sont au moins partiellement distincts de ceux qui sont impliqués dans l'hémifusion.

Nous proposons d'analyser ces hypothèses en étudiant la liaison aux liposomes ou à la cardiolipine, l'activité GTPase et le pouvoir fusogène de mutants de Msp1 à des positions homologues à celles mentionnées ci-dessus dans OPA1 et Mgm1. Malgré la faible conservation des séquences entre les trois protéines dans ces régions, certaines de ces positions peuvent être prédites par les alignements de séquences (figure D-4) et seront testées en première intention. Une autre approche consistera à déléter spécifiquement les motifs coiled-coils potentiels de la protéine avant d'en entreprendre la mutagenèse ponctuelle.

#### **P-IV. Propriétés de l-Msp1 et s-Msp1 sur la même membrane**

Les isoformes longues et courtes de la dynamine Msp1/OPA1/Mgm1 sont exprimées dans la MI des mitochondries et leur présence simultanée est nécessaire aux fonctions de la dynamine (Herlan et al., 2004; Herlan et al., 2003; Ishihara et al., 2006). Il est donc probable que cette situation modifie les propriétés respectives des isoformes séparées. Notre modèle repose également sur la modulation de la composition et de l'activité de complexes membranaires par le rapport (TM1 + TM2) / SIM3, reflétant les proportions respectives de l-Msp1 et s-Msp1. Nous incorporerons donc différentes proportions des isoformes de Msp1 dans une seule membrane pour mesurer les effets sur l'hydrolyse du GTP et l'hémifusion. Nous testerons une

éventuelle interaction de l-Msp1 et s-Msp1 en *cis* par pontage chimique et sédimentation. L'importance du rapport (TM1 + TM2) / SIM3 pourra aussi être précisée en combinant des mutants de TM1, TM2 et SIM3 entre eux ou avec les formes sauvages.

## **P-V. Msp1 et organisation membranaire**

Les effets de la dynamine sur l'organisation membranaire peuvent impliquer une distribution hétérogène des phospholipides au sein d'un même feuillet ou entre les deux feuillets et/ou des modifications locales de leur courbure. Ces propriétés affectent la fluidité membranaire donc la diffusion latérale des lipides et des protéines insérées dans les membranes, que nous pourrions étudier sur bicouches supportées. Compte tenu de nos premiers résultats, nous réaliserons les étalements en présence de calcium pour que les liposomes dépourvus de dynamine forment une bicouche. La diffusion latérale de phospholipides et éventuellement de protéines fluorescentes comme le cytochrome c incorporés dans la membrane sera étudiée en FRAP en absence de Msp1 ou en présence de chaque isoforme séparée ou d'un mélange de l'une et l'autre en proportions variables.

La formation de courbures localisées pourra être étudiée plus spécifiquement à l'aide du bleu de Laurdan dont la fluorescence est sensible à la polarité de son environnement (Zhang et al., 2006). Nous avons montré que Msp1 a une affinité particulière pour la CL et qu'elle s'associe préférentiellement à des feuillets de courbure positive. Ce type de courbure peut être obtenu en concentrant la CL qui a une courbure négative intrinsèque sur le feuillet interne. Dans les mitochondries, la CL est effectivement concentrée (70 à 80%) dans le feuillet interne de la MI et un changement de distribution est observé lors de l'adaptation des cellules d'un milieu respiratoire à un milieu glycolytique (Gallet et al., 1997) ou au cours de l'apoptose (Epanand et al., 2003; Garcia Fernandez et al., 2002), deux phénomènes impliquant la dynamine Msp1/OPA1/Mgm1. La distribution de la CL dans des liposomes formés en absence et en présence de Msp1 pourra être étudiée en utilisant le Nonyl Acridine Orange, une sonde fluorescente qui interagit avec la CL (Garcia Fernandez et al., 2002). Une distribution asymétrique de la CL pourrait se refléter sur la distribution des autres phospholipides, que l'on analysera en comparant la fluorescence totale de liposomes marqués avec un phospholipide (PE, PC, PS, PI) fluorescent à celle du feuillet interne mesurée en présence de chlorure de cobalt.

Pour comprendre le rôle de chacun des domaines d'interaction avec la MI dans son organisation, ces expériences seront effectuées en présence de l'une ou l'autre ou des deux

isoformes de Msp1, sauvages ou mutées dans les domaines TM1, TM2 et SIM3.

## **P-VI. Relation structure/fonctions de Msp1; effets des mutants in vivo**

Les études précédentes conduiront à identifier des mutants modifiant sélectivement l'une des propriétés biochimiques de Msp1. Pour établir les liens entre ces propriétés et les réponses mitochondriales modulées par Msp1, ces mutants pourront être analysés *in vivo* dans des expériences de complémentation ou de dominance négative (cf. paragraphes R-I-2 et 3), seuls ou en combinaison, portés par s-Msp1 ou par l-Msp1. Dans ce but, nous pourrions utiliser les constructions  $msp1^{\Delta TM1}$  et  $msp1^{mutTM2}$  qui donnent respectivement naissance à s-Msp1 et l-Msp1.

Nous pourrions par exemple étudier le rôle de l'hémifusion induite par s-Msp1 ou par l-Msp1 en comparant les phénotypes obtenus en insérant une mutation abolissant l'hémifusion (Hem<sup>-</sup>) dans l'une ou l'autre des constructions ( $Msp1^{\Delta TM1/Hem^-}$  générant s-Msp1<sup>Hem<sup>-</sup></sup> vs  $Msp1^{mutTM2/Hem^-}$  donnant l-Msp1<sup>Hem<sup>-</sup></sup>). Selon notre modèle, la perte d'hémifusion par s-Msp1 entraînera une déstructuration des crêtes et des modifications de l'activité de certains complexes de la phosphorylation oxydative, pouvant se traduire par des défauts de croissance sur milieu respiratoire. Des mutations équivalentes d'OPA1 augmenteraient le pool de cytochrome c libre et la sensibilité des cellules à l'apoptose. La perte d'hémifusion par l-Msp1 entraînerait quant à elle un défaut de fusion et la fragmentation du réseau mitochondrial.

Des mutations du TM2 permettant à l-Msp1 de développer une activité GTPase (éventuellement  $Msp1^{\Delta TM2}$ ) pourront être utilisées en co-expression avec  $Msp1^{\Delta TM1}[K276A]$  (générant s-Msp1[K276A]) pour vérifier si l'activité GTPase de l-Msp1 peut se substituer à celle de s-Msp1. Dans le cas contraire, cela pourrait signifier que s-Msp1 porte une fonction supplémentaire à l'activité GTPase, peut-être la modulation de la structure membranaire par le rapport (TM1 + TM2) / SIM3. Cette hypothèse pourrait aussi être analysée en co-exprimant l-Msp1 avec s-Msp1 portée par des plasmides avec des promoteurs de force variable.

## **P-VII. Recherche et caractérisation de partenaires de Msp1**

Le modèle d'action que nous avons proposé pour Msp1 repose sur sa capacité à réguler l'activité de complexes multi-protéiques en interagissant avec eux et/ou en modulant localement l'organisation des membranes auxquelles ils sont associés. Afin de mieux comprendre le fonctionnement de ces complexes, nous pouvons donc envisager d'utiliser notre système *in vitro* pour identifier et caractériser certains de ces partenaires physiques et fonctionnels de la dynamine.

Une première approche pour cela sera de former des liposomes en présence de Msp1 purifiée et d'un solubilisât total, ou de sous-compartiments (ME, MI, IMS, matrice), de mitochondries de *S. pombe*. La comparaison entre les activités fusogènes et GTPase mesurées pour des liposomes formés dans ces conditions avec les formes sauvages de Msp1 et avec des mutants de Msp1 inactifs pour ces activités, nous renseignera sur la présence de partenaires modulant la fusion ou l'hydrolyse du GTP. Ces derniers seront identifiés par spectrométrie de masse après pontage chimique et chromatographie d'affinité avec des anticorps anti-Msp1 s'il s'agit de partenaires physiques. Les partenaires fonctionnels seront identifiés en recherchant l'activité modulatrice dans des fractions, obtenues par des méthodes classiques de biochimie (filtration moléculaire, colonne de lectines, échange d'ions) des solubilisâts utilisés initialement.

Les relations entre Msp1 et des partenaires supposés ou déjà identifiés pourront être caractérisées en intégrant les deux protéines dans les liposomes *in vitro*. En premier lieu, nous pourrions reprendre nos études sur les effets de Msp1 sur l'activité du cytochrome c. Notre hypothèse est que Msp1 pourrait organiser la membrane de manière à empêcher les interactions hydrophobes avec la CL. Nos résultats préliminaires ont montré que l'activité peroxydase du cytochrome c est dépendante de la composition en PE et en CL de la membrane à laquelle il est associé. Nous devons réitérer nos expériences en analysant l'effet de Msp1 sur l'activité peroxydase et l'association du cytochrome c dans des liposomes de composition variable en PE et en CL, pouvant mimer d'éventuels domaines de la MI non reproduits dans notre système.

Si des liens fonctionnels entre Msp1 et les enzymes du remodelage lipidique ACP6 ou mtPLase étaient montrés, nous pourrions envisager de produire et purifier ces protéines pour les incorporer dans notre système de liposomes et y étudier les effets de Msp1 sur leur activité.

Notre équipe est en train d'identifier un mutant de *S.pombe* permettant la survie des levures ayant perdu leur génome mitochondrial. Ce mutant (*ptp2* pour petite positive) permet le maintien de la morphologie et du génome mitochondrial dans des souches  $\Delta Msp1$ . Cette propriété étant semblable à celle qui est observée quand la fission est abolie en même temps que la fusion ( $\Delta Dnm1/\Delta Msp1$  ou  $\Delta Fis1/\Delta Msp1$ ), nous avons séquencé les gènes *Dnm1* et *Fis1* des souches *ptp2*; aucune mutation n'y a été trouvée. De plus, les souches *ptp2* parentales présentent un réseau mitochondrial filamenteux typique; le gène *ptp2*, suppresseur de la létalité induite par la délétion de Msp1, pourrait donc être un nouvel acteur de la dynamique mitochondriale. Après identification de ce gène, son produit sera incorporé dans des

liposomes avec Msp1 pour analyser les répercussions sur l'activité GTPase, l'hémifusion et l'organisation des membranes induites par la dynamine.

### **P-VIII. Conclusions**

À plus long terme ce système pourrait permettre de modéliser la dynamine Msp1 associée à la membrane, en combinant de la microscopie électronique (2D) sur des bicouches portant la dynamine et de la cristallographie (3D) sur la protéine purifiée. Ces études menées sur les mutants fonctionnels que nous aurons identifiés nous indiqueront les répercussions des mutations sur la conformation de Msp1. Jointe aux études *in vivo*, cette modélisation permettra d'établir les relations entre la structure et les fonctions de Msp1. Ces études sur Msp1 permettront d'établir un mode d'action de l'orthologue OPA1 et de mieux appréhender le processus physiopathologique aboutissant à l'Atrophie Optique dominante de type 1.



# Matériel et méthodes

## I. Méthodes *in vitro*

### *I.1 Production et purification des protéines*

#### *a-Culture des bactéries et production des protéines*

Msp1 est produite grâce au vecteur pGex6p1<sup>®</sup> (Amersham) dans la souche BL21 codon+ RIL d'*Escherichia coli*. L'avantage de ce vecteur réside dans la présence d'un site de clivage par la *Prescission*<sup>®</sup> (Amersham). Cette protéase reconnaît un site de 8 acides aminés, la rendant donc très spécifique et permettant une purification de la protéine en une seule étape.

À partir de stock glycérol, les bactéries sont réveillées sur boîte LB + Ampicilline + Oxacilline + Tétracycline + Chloramphenicol à 37°C.

Le lendemain, une colonie est prélevée et mise en culture dans 10 mL de milieu LB + ampicilline 100 µg/mL + Tétracycline 100 µg/mL + Chloramphenicol 100 µg/mL, pendant la nuit à 37°C sous agitation (220 rpm).

Le lendemain 200 mL de milieu LB + ampicilline 100 µg/mL sont inoculés à une DO<sub>600</sub>=0.05 puis mis à pousser à 37°C sous agitation (220 rpm) jusqu'à une DO<sub>600</sub>=1.

La production des protéines est alors induite en présence de 1 mM IPTG pendant 4H à 25°C.

#### *b-Solubilisation des protéines*

Les bactéries sont lavées dans 200 mL de tampon H (25mM Hepes pH7.2 ; 0,1 mM MgCl<sub>2</sub>) contenant 150 mM NaCl (H<sub>150</sub>).

Le culot est repris dans 20 mL de tampon H<sub>150</sub> supplémenté par 10 mM DTT, un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche) et du lysozyme à 0,1 mg/mL puis incubé 30 minutes sur la glace.

Les bactéries sont ensuite lysées par sonification (5 min; 10s ON/20s OFF; amplitude 50%) avec un sonificateur de 130 watts de puissance.

Du Triton X-100 est ajouté (0.1% final) et le mélange agité doucement pendant 30 min à 4°C.

Une centrifugation (30 000 x g - 30 min - 4°C) est effectuée et un aliquote de 10 µL du surnageant et du culot (repris par 20 mL de tampon Tris-Glycine-SDS) sont analysés par SDS-PAGE coloré à l'Imperial Stain Protein (Pierce).

#### *c-Purification*

On utilise 200 µL (volume du gel) de billes sépharose 4B-glutathion lavées 3 fois en tampon H<sub>150</sub>.

Le surnageant de solubilisation est déposé sur les billes et la liaison se fait à 4°C pendant la

nuit, sous agitation douce.

Le matériel non-fixé est récupéré par centrifugation (800 x g - 2 min - 4°C) et un aliquote de 10 µL est prélevé pour analyse.

Les billes sont ensuite lavées 3 fois (800 x g - 2 min - 4°C) en tampon d'éluion H<sub>2</sub>O (20 mM NaCl) contenant des lipides à 0.25 mg/mL et 0.1% de Triton X-100. La composition lipidique du tampon mime la composition de la membrane interne mitochondriale (% mol/mol : 41% phosphatidylcholine, 35% phosphatidyléthanolamine, 20% cardiolipine, 2,5% phosphatidylsérine, 1,5% phosphatidylinositol).

L'éluion est faite à 30°C, en 2 étapes de 2H30 dans 2 mL de ce tampon contenant 10 unités de protéase *Préscission* (Amersham Biosciences), sous agitation douce. Un lavage de 30 minutes est enfin réalisé avec 1 mL de ce tampon à 30°C. Les fractions d'éluion sont récupérées (800 x g - 2 min - 4°C) à chaque étape puis poolées et un aliquote de 20 µL est prélevé pour analyse.

Les billes sont reprises dans 5 mL de H<sub>2</sub>O et un aliquote de 10 µL est prélevé.

Les différents aliquotes sont analysés sur gel SDS-PAGE 8%.

## ***1.2 Liposomes***

Les protéines sont incluses dans les liposomes en éliminant lentement le détergent selon la méthode décrite (Rigaud et al., 1997). Pour cela l'éluât est incubé avec des biobeads SM2 (Biorad) dans un rapport pondéral billes / détergent = 10, deux fois une heure à température ambiante puis deux heures à température ambiante avec un rapport billes / détergent = 20.

Les liposomes sans protéine sont réalisés de la même manière à partir du tampon H<sub>2</sub>O contenant 0.1% Triton X100 et 0.25mg/mL de lipides, aboutissant à des liposomes MI.

## ***1.3 Test de flottaison des liposomes***

Un gradient discontinu de saccharose est réalisé sur trois couches.

Le premier niveau correspond à un coussin de 125 µL de saccharose 1.25 M en tampon H<sub>2</sub>O dans lequel sont inclus les liposomes (5 µg de protéines), en présence d'un cocktail d'inhibiteurs de protéases (Roche).

Le deuxième niveau est une couche de 100 µL de saccharose 0.75 M dans laquelle il y a également un cocktail d'inhibiteurs de protéases.

Enfin, le niveau supérieur est composé de 25 µL de tampon H<sub>2</sub>O. Un contrôle est réalisé en

dissociant les liposomes avec 0.1% de Triton TX-100, dans la première couche.

Ce gradient est centrifugé dans un rotor TLS55 à 100 000 x g pendant 2H à 4°C.

8 fractions de 32 µL sont collectées manuellement à partir du haut puis analysées en SDS PAGE 8%.

#### ***1.4 Test d'oligomérisation***

La protéine purifiée incluse dans les liposomes (1 à 2 µg) est incubée pendant 15 min à 25°C en absence ou en présence de GTP ou d'un de ses analogues non hydrolysables (2 mM).

Un agent pontant, le DiSuccinimidylPropionate (DSP), est ajouté ou non en excès molaire 40 fois et l'incubation se poursuit pendant 30 minutes à 25°C.

La réaction est arrêtée et les liposomes dissociés en ajoutant un mélange de Tris 0.2 M et de SDS 0.2% pendant 15 minutes à 25°C.

Une ultracentrifugation (100 000 x g - 30 min - 25°C) est réalisée, et le culot et le surnageant sont analysés par SDS-PAGE 8%.

Pour la recherche de petits oligomères, la réaction est arrêtée avec du Tris 0,2 M puis le mélange est analysé sur gel en conditions non réductrices (tampon de charge sans β-mercaptoéthanol).

#### ***1.5 Test d'association aux liposomes***

Les liposomes contenant les protéines purifiées (2.5 à 5 µg) sont incubés dans des conditions de haute force ionique (NaCl 1 M), de pH basique (Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH11) pendant 30 minutes à 4°C et en vortexant régulièrement.

Une ultracentrifugation est ensuite réalisée (100 000 x g - 4°C - 1H) et le culot et le surnageant sont analysés en SDS PAGE, après avoir réalisé une précipitation TCA-acétone.

Des contrôles sont réalisés en incubant les liposomes seuls ou en présence de détergent pour les dissocier.

#### ***1.6 Digestion à la protéinase K***

Les liposomes contenant les protéines purifiées (1 à 2 µg) sont incubés en présence de différentes quantités de protéinase K (0-0.1-0.25-0.5-1-2.5-5-10 ng) en présence ou non de

Triton X-100 0.1%, pendant 30 minutes à 4°C.

La réaction est arrêtée en ajoutant un cocktail d'inhibiteurs de protéases pendant 15 minutes, puis les échantillons sont analysés sur gradient (4 - 20%) d'acrylamide.

### ***1.7 Test de fusion***

40µL de liposomes sans protéine contenant 0.8% NBD et 0.8% rhodamine-phosphatidyléthanolamine (VF), 180 µL de liposomes sans protéine (VNF) et 180 µL de liposomes contenant Msp1 (Msp1 NF) sont mélangés dans une micro cuve en quartz. (VF/VNF/Msp1 NF = 1/4.5/4.5)

Un premier spectre d'émission de fluorescence est réalisé entre 480 et 650 nm ( $t_0$ ), après excitation à 460 nm.

0.25 mM  $Ca^{++}$  sont ajoutés et un spectre est réalisé après 10 minutes d'incubation ( $t_{10}$ ).

Le signal de fusion est calculé par la différence entre l'émission du NBD (moyenne des signaux mesurés entre 525 et 535 nm) à  $t_0$  et à  $t_{10}$ .

Le contrôle de fusion est réalisé en ajoutant un volume identique à celui du  $Ca^{++}$  de tampon  $H_{20}$ .

Le maximum de fusion est calculé par ajout de 10 mM  $Ca^{++}$  en fin d'expérience, ainsi que par des liposomes « 100% fusion » dans lesquels les traceurs fluorescents sont dilués au 1/10.

Les signaux de fusion mesurés sont corrigés par ceux obtenus en absence de calcium :

$$\text{Fusion } Ca^{++} - \text{Fusion } H_{20} = \text{Fusion réelle}$$

La fusion réelle est ensuite rapportée au maximum de fusion pour être exprimée en % de fusion maximum : **(Fusion réelle/Fusion maximale) x 100 = % de fusion maximum.**

### ***1.8 Test d'activité GTPase***

Le GTP est dilué à une concentration égale à 5 fois sa concentration finale (GTP 5X) dans la réaction (gamme de 0,25 à 3 mM), dans le tampon suivant :

$$25 \text{ mM Hepes pH7.2 ; } 20 \text{ mM NaCl ; } 10 \text{ mM MgCl}_2 ; 5 \text{ mM DTT.}$$

Le test est réalisé en plaque 96 puits : 50 µL de GTP 5X sont ajoutés à 200 µL de liposomes sur lesquels Msp1 est associée pour démarrer la réaction (tampon réactionnel : 25 mM Hepes pH7.2 ; 20 mM NaCl ; 2 mM  $MgCl_2$  ; 1 mM DTT).

Des aliquotes de 20 µL sont prélevées à différents temps (de 5 à 40 min) et mises dans des puits contenant 5 µL de EDTA 0.5M pour arrêter la réaction.

Pour chaque concentration de GTP, un point 0 est réalisé avant le début de la cinétique en mélangeant 4  $\mu\text{L}$  de GTP5X avec 16  $\mu\text{L}$  de liposomes Msp1 dans un puits contenant l'EDTA. À la fin de la réaction, 150  $\mu\text{L}$  de solution de Vert de Malachite est ajoutée dans les puits et l'absorbance à 650 nm lue.

Une gamme de standard phosphate (de 1 à 200  $\mu\text{M}$ ) est réalisée en parallèle.

Les contrôles réalisés sont des points sans GTP et des points sans protéine (liposomes sans Msp1).

#### Solution de Vert de Malachite :

34.6 mg de Vert de Malachite et 1.24 g de Molybdate d'ammonium sont dissous dans 100 mL de HCl 1 M. La solution est ensuite filtrée à 0.45  $\mu\text{m}$ .

### ***1.9 Test « Protein-lipid overlay »***

Dans ce test les protéines de fusion GST-Msp1 sont utilisées et obtenues par une élution avec une solution de glutathion réduit contenant 0.025% Triton X-100, 0.1 mM  $\text{MgCl}_2$  et 150 mM NaCl.

Les lipides sont dilués à 2 mM dans une solution méthanol:chloroforme:acide chlorhydrique (2:1:0.8). La gamme de concentration de lipides est obtenue par 5 dilutions successives au demi: 2 mM / 1 mM / 0.5 mM / 0.25 mM / 0.125 mM / 0.0625 mM. Des gouttes de 1  $\mu\text{L}$  (2 nM / 1 nM / 0.5 nM / 0.25 nM / 0.125 nM / 0.0625 nM) sont déposées sur une membrane de nylon et laissées sécher pendant 1 H à température ambiante dans le noir.

Les membranes sont saturées pendant 1 H à température ambiante avec une solution de TBS contenant 0.02% Triton X-100 et 1% de BSA sans acide gras, avant d'être incubées dans la même solution contenant 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  de protéine de fusion GST-Msp1 pendant la nuit à 4°C.

Le lendemain, les membranes sont lavées 3 fois pendant 15 minutes avec une solution de TBS contenant 0.02% de Triton X-100 et 1% BSA sans acide gras puis incubées 2H à température ambiante avec un anticorps primaire anti-Msp1 dilué au 1/500 dans du TBS contenant 0.02% de Triton X-100 et 1% BSA sans acide gras.

Les membranes sont ensuite lavées 3 fois pendant 15 minutes avec du TBS contenant 0.02% Triton X-100, puis incubées 1H à température ambiante avec un anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps anti-Msp1 dilué dans du TBS contenant 0.02% de Triton X-100 et 1% de BSA sans acide gras.

La révélation se fait après 3 lavages de 15 minutes en TBS contenant 0.02% de Triton X-100,

par chimioluminescence (ECL, PerkinElmer Life Sciences).

### ***1.10 Activité peroxydase du cytochrome c***

50 nM de cytochrome c sont incubés pendant 15 minutes avec une quantité de liposomes vides ou portant l-Msp1 ou s-Msp1 correspondant à 5  $\mu$ M de cardiolipine dans le test (rapport cytochrome c / cardiolipine = 1 %). 5 nM d'Amplex red et 50  $\mu$ M d' $H_2O_2$  sont alors ajoutés et l'activité peroxydase qui se développe est mesurée par l'oxydation de l'Amplex red qui fluoresce à 595 nm. Des cinétiques sont réalisées sur 3 ou 9 minutes en prenant des points toutes les 30 s.

## II. Méthodes spécifiques à *S.pombe*

### II.1 Maintien et croissance des souches

#### *a-Milieux*

Les levures *S.pombe* sont cultivées sous agitation (200 rpm) à 25 ou 30°C en milieux liquides ou en boîtes de Pétri sur milieux solides (avec ajout d'Agar à 20g/L).

Le milieu riche (YE/YES – Formedium PCM0401) est composé de :

-extrait de levure	5 g/L
-glucose	30 g/L
-adénine	225 mg/L
-suppléments	
-antibiotiques (si sélection)	100 mg/mL

Le milieu galactose pour tester la fonctionnalité des mitochondries (YEPG – Formedium PCM0401) est composé de :

-extrait de levure	10 g/L
-glucose	1 g/L
-galactose	20 g/L
-adénine	225 mg/L
-bactopeptone	20 g/L
-suppléments	

Le milieu minimum permettant de sélectionner des souches en fonction de leur prototrophie (EMM – Bio 101 – 4110 – 022) est composé de :

-Potassium hydrogen phtalate	3 g/L
-Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.2 g/L
-NH <sub>4</sub> Cl	5 g/L
-Glucose	20 g/L
-Sels	2.1 g/L
-Vitamines	0.02 g/L

et selon la prototrophie, on ajoute :

-adénine	225 mg/mL
-uracile	225 mg/mL

-leucine 225 mg/mL

Le milieu minimum pour tester la fonctionnalité des mitochondries (EMM – Bio 101 – 4110 – 022) est composé de :

-Potassium hydrogen phtalate	3 g/L
-Na <sub>2</sub> PO <sub>4</sub>	2.2 g/L
-NH <sub>4</sub> Cl	5 g/L
-Sels	2.1 g/L
-Vitamines	0.02 g/L

complémenté par :

-glucose	1 g/L
-galactose	20 g/L

#### *b-Culture et conservation des souches*

Les levures sont cultivées dans un milieu liquide en phase exponentielle de croissance à une densité cellulaire de  $1 \times 10^7$  cellules/mL. Cette densité est déterminée par comptage dans une cellule de Neubauer et les cellules sont ensemencées en appliquant le calcul suivant :

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

Les levures sont conservées à  $-80^{\circ}\text{C}$  dans leur milieu de culture + 25% glycérol. Après décongélation, les cellules sont repiquées hebdomadairement sur boîte de Pétri contenant le milieu solide.

#### *c-Test en goutte*

Après 24H de culture en milieu liquide, les levures sont diluées à des densités de  $1 \times 10^6$ ,  $2 \times 10^5$ ,  $4 \times 10^4$ ,  $8 \times 10^3$  et  $1.6 \times 10^3$  cellules/mL. Des gouttes de  $4 \mu\text{L}$  sont déposées sur les boîtes de milieu solide et incubées à 30 et  $37^{\circ}\text{C}$  pendant 3 jours.

## **II.2 Transformation**

### *a-Vecteurs utilisés*

Pour exprimer des protéines dans *S.pombe*, nous utilisons les vecteurs navettes pRep. Ils sont amplifiables dans *E.coli* car ils possèdent une origine de répllication bactérienne et le gène de résistance à l'ampicilline permettant la sélection des bactéries. Pour la levure, ils possèdent

une séquence de réplication autonome (ars) et un marqueur de sélection (*LEU2* pour pRep1, 3, 41 ou 81 / *ura4<sup>+</sup>* pour pRep2, 4, 42 ou 82) complétant l'auxotrophie des levures pour la leucine et l'uracile. Les gènes à exprimer sont placés sous le contrôle d'un promoteur *nmt1* (no message in thiamine ; (Maundrell, 1993)) répressible par 4µM de thiamine dans le milieu de culture. L'induction de l'expression se fait par 3 lavages des cellules dans de l'eau et il est considéré que la dé-répression est effective après 16H de culture à 28°C (Maundrell, 1993).

#### *b-Transformation par électroporation*

Le protocole utilisé pour transformer par électroporation les levures est le suivant :

- Cultiver un volume *v* de cellules à une densité de  $1 \times 10^7$  cellules/mL dans le milieu approprié (25 mL/transformation)
- Centrifuger à 800 x g pendant 5min à 20°C
- Reprendre le culot par *v* d'eau stérile glacée
- Centrifuger à 800 x g pendant 5 min à 4°C
- Reprendre le culot par *v* de Sorbitol 1M stérile et glacé
- Centrifuger à 800 x g pendant 5 min à 4°C
- Resuspendre les cellules à une densité de  $5 \times 10^7$  cellules/mL dans du Sorbitol 1M
- Prélever 50 µL de cellules et y ajouter 1 µg d'ADN, à 4°C
- Passer le mélange dans une cuve à électroporation froide (4°C)
- Electroporer avec le Gene Pulseur™ (BIORAD) réglé sur 1.5kV, 200Ω, 25µF
- Ajouter immédiatement après l'électroporation 900 µL de Sorbitol 1 M froid (4°C)
- Centrifuger à 800 x g pendant 5 min à 4°C
- Resuspendre le culot avec 100 µL de milieu minimum et étaler rapidement sur boîtes de milieu sélectif

#### *c-Chimio-transformation pour recombinaison homologue*

Le protocole utilisé pour transformer chimiquement les levures est le suivant :

- Prévoir 20 mL de culture à  $1 \times 10^7$  cellules/mL pour une chimio-transformation
- Centrifuger à 800 x g pendant 5 min à 4°C
- Reprendre le culot dans 20 mL d'eau stérile froide (4°C)
- Centrifuger à 800 x g pendant 5 min à 4°C
- Reprendre le culot par 500 µL d'eau stérile froide et passer dans un tube eppendorf
- Centrifuger à 800 x g pendant 5 min à 4°C
- Reprendre le culot dans 500 µL de LiAc/TE 1X

- Centrifuger à 800 x g pendant 5 min à 4°C
- Reprendre le culot par du LiAc/TE 1X pour être à une densité cellulaire de  $2 \times 10^9$  cellules/mL ( $V_f=100\mu\text{L}$ )
- Ajouter 1  $\mu\text{L}$  d'ADN de sperme de saumon et 10  $\mu\text{L}$  d'ADN contenant la cassette de recombinaison
- Incuber 10 min à température ambiante
- Ajouter 260  $\mu\text{L}$  de 40% PEG/LiAc/TE (préparé ex-temporaneamente) et reprendre doucement au pipetman
- Incuber 45 min à 30°C en agitant de temps en temps
- Ajouter 43  $\mu\text{L}$  de DMSO
- Faire un choc thermique de 5 min à 42°C
- Centrifuger à 800 x g pendant 5 min à température ambiante
- Reprendre par 1 mL d'eau stérile
- Centrifuger à 800 x g pendant 5 min à température ambiante
- Reprendre par 500  $\mu\text{L}$  d'eau stérile et étaler sur boîte de milieu riche
- Incuber environ 18H à 30°C
- Répliquer sur milieu sélectif contenant 50  $\mu\text{g/L}$  de Nourséothricine ou 100 mg/L d'hygromycine, selon la sélection.
- Incuber les boîtes à 30°C pendant 3 jours.

Le LiAc/TE 1X est réalisé en mélangeant :

- LiAc 10X : 1 M d'acétate de lithium ajusté à pH 7.5 avec de l'acide acétique
- TE 10X : 0,1 M Tris-HCl, 0.01M EDTA à pH 7.5

Le 40% PEG/LiAc/TE est réalisé ainsi : soit dissoudre 8g de PEG 4000 dans 2 mL de LiAc 10X, 2 mL de TE 10X et 9.25mL d'eau stérile ; puis filtrer stérilement.

soit mélanger 8 mL de solution de PEG 50%

avec 1mL de LiAc 10X et 1mL de TE 10X.

### ***II.3 PCR sur colonie***

Pour réaliser des PCR sur colonies, un mélange réactionnel est préparé comme suit:

	Par tube	Concentration finale
H <sub>2</sub> O	30 µL	
BSA (1mg/mL)	2 µL	40 µg/mL
MgCl <sub>2</sub> (25mM)	5 µL	2.5 mM
GoTaq buffer 5X	10 µL	1X
Primer 1(25µM)	1 µL	0.5 µM
Primer 2 (25µM)	1 µL	0.5 µM
dNTP (25mM)	0.5 µL	0.25 mM
GoTaq (5u/µL)	0.5 µL	2.5 u

Le volume réactionnel par tube est de 50 µL et une pointe de cône de levures est ajoutée (mélanger à l'aide du pipetman).

-Le programme PCR utilisé est :

Dénaturation	94°C - 3min	} 35 cycles
Dénaturation	94°C – 30s	
Hybridation	45°C – 30s et rampe de 2 min jusqu'à 55°C – maintien 30s	
Elongation	72°C – 1min	
Elongation	72°C – 5min	

L'amplification est ensuite vérifiée sur gel d'agarose. Au cours des délétions des gènes *acp6* et *mtPLase*, les amorces utilisées sont :

	paire1	paire2
<i>acp6</i>	MC163+MC164	MC87+MC162
<i>mtPLase</i>	MC166+MC167	MC87+MC165

#### ***II.4 Observation des levures en microscopie à fluorescence***

Les levures sont fixées dans leur milieu de culture avec 3.7% de formaldéhyde, pendant 30min à température ambiante et sous agitation douce.

Les cellules sont ensuite lavées avec du PBS 1X et conservées à 4°C dans du PBS 1X contenant 0.02% d'azide de sodium.

Une goutte de suspension cellulaire est déposée et étalée sur une lamelle de verre.

Quand la suspension est sèche, une goutte de 2 µL de Mowiol avec ou sans DAPI (1 µg/mL) est déposée et une lamelle est fixée sur les cellules.

### **III. Techniques relatives à l'ADN**

#### ***III.1 Préparation d'ADN plasmidique***

Les kits Midi ou MaxiPrep *Nucleobond*, commercialisés par *Macherey-Nagel* ont été utilisés en suivant les recommandations du fournisseur.

#### ***III.2 Digestion enzymatique***

Les plasmides ont été digérés selon le protocole du fabricant (*New England Biolabs*) puis les profils de digestion analysés sur gel d'agarose 0.8% révélés aux UV après coloration au BET.

#### ***III.3 Préparation d'ADN génomique de *S.pombe* (protocole de Nurse)***

Les cellules sont cultivées dans un milieu liquide jusqu'à une densité cellulaire de  $1 \times 10^8$  cellules/mL, puis centrifugées.

Les culots sont repris dans 1ml de :

- 50 mM Citrate pH 5.6
- 1.2 M Sorbitol
- 40 mM EDTA pH8
- 1 mg / 10 mL de culture d'enzyme lytique
- 3 mg / 10 mL de culture de zymolyase-20T

Puis incubés 1H à 37°C.

La lyse est suivie par observation au microscope de 2µL de préparation dans de l'eau (8 µL). Quand on voit des sphéroplastes et des fantômes, les cellules lysées sont centrifugées à 4000 x g pendant 5 min.

Le culot est repris dans 500 µL de TE (50 mM Tris pH 8 / 10 mM EDTA) + 1% SDS, puis incubé 20 min à 65°C.

200 µL d'acétate de Potassium 5 M sont ajoutés, suivi d'une incubation de 30 min à 4°C.

La suspension est ensuite centrifugée à 5000 x g pendant 15 min à 4°C.

Le surnageant clarifié est récupéré.

L'ADN est extrait avec 400 µL de phénol/chloroforme et centrifugation à 12000 x g pendant 5 minutes à 25°C. La phase aqueuse est de nouveau traitée avec 400 µL de phénol/chloroforme et centrifugation à 12000 x g pendant 5 min à 25°C.

La phase aqueuse est ensuite traitée avec 400 µL de chloroforme et une centrifugation à 25°C

de 5 min à 12000 x g est réalisée.

La phase aqueuse est lavée avec 1 volume d'éthanol 100% et centrifugation à 12000 x g pendant 5 min à 25°C.

Le surnageant est éliminé et le culot séché puis repris dans 300 µL de TE.

Une fois le culot repris, 1 µL de RNase A à 50 µg/µL est ajouté. Le mélange est incubé à 37°C pendant 1h30.

500 µL d'isopropanol sont alors ajoutés et mélangés jusqu'à précipitation de l'ADN.

Le culot d'ADN obtenu après une centrifugation à 15000xg pendant 10 minutes à 4°C est lavé avec 1 volume d'éthanol 70% (15000 x g - 10min - 4°C).

Le culot est repris dans 50 µL de TE puis dosé.

### ***III.4 Southern Blot***

#### *a-Digestion de l'ADN génomique et préparation des sondes*

40µg d'ADN génomique sont digérés dans un volume final de 50µL en présence de 20 unités d'enzyme, à la température appropriée pendant 3H.

La sonde pTef (387 pb) permettant de révéler les fragments issus de la recombinaison homologue est obtenue en digérant le vecteur Pfa6-Natmx6 avec BglIII et NcoI, en suivant les recommandations du fabricant. La sonde Acp6 est obtenue par PCR sur le vecteur pFa6-Natmx6 en utilisant les amorces MC162 et MC239.

Les produits sont analysés sur gel d'agarose et le fragment d'intérêt est purifié avec le kit Nucléospin Extract II (Macherey-Nalgen).

#### *b-Migration de l'ADN digéré sur gel d'agarose et transfert sur filtre*

Les fragments d'ADN issus de la digestion enzymatique sont séparés sur gel d'agarose 0.8% dans du tampon TAE 1X.

2 µg de marqueurs de taille sont déposés (BioRad, 1kb).

La migration se fait sur la journée à voltage constant, 50V.

Le gel est incubé dans une solution de BEt puis observé sous UV et les marqueurs de taille sont repérés à l'encre de Chine.

Le gel est incubé 1h30 dans de la soude 0.4M.

Puis le montage pour le transfert est réalisé :

un support surélevé qui portera le sandwich est placé dans une cuve.

une solution NaOH 0.4M est mise dans le bac

un wathman fin trempé dans de la NaOH 0.4M est mis sur le support et en dépasse pour tremper dans le bac ; il forme le pont

les bulles sont chassées en faisant rouler une pipette et du tampon NaOH 0.4M est redéposé dessus.

le gel d'agarose est placé sur le wathman

les bulles sont chassées en faisant rouler une pipette et du tampon NaOH 0.4M est redéposé dessus.

la membrane de Nylon (Hybond N+) préalablement marquée (orientée) et trempée dans le tampon NaOH 0.4M est déposée sur le gel.

les bulles sont chassées en faisant rouler une pipette et du tampon NaOH 0.4M est remis dessus.

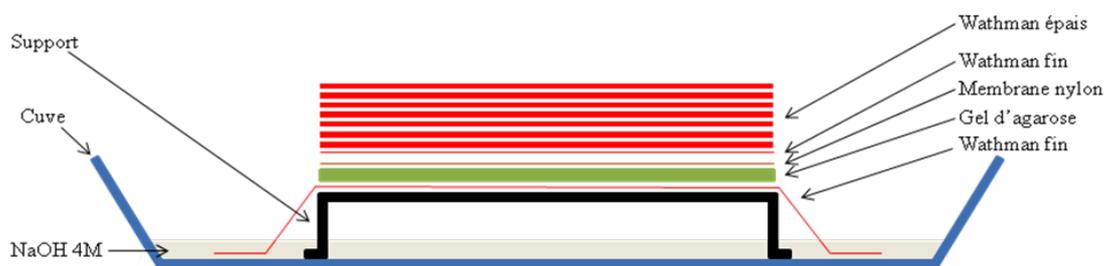
un wathman fin préalablement trempé puis égoutté dans le tampon NaOH 0.4M est déposé.

les bulles sont chassées en faisant rouler une pipette.

enfin 7 à 8 buvards épais secs sont ajoutés par dessus

une plaque de verre est ajoutée sur le montage pour aplatir le tout avec un poids léger (une bouteille de 100 ml mi-remplie)

laisser diffuser pendant une nuit à température ambiante.



### *c-Marquage des sondes*

Les sondes (25 à 50 ng dans 45  $\mu$ L) sont dénaturées en chauffant à 95°C pendant 10 minutes.

Elles sont ensuite placées dans la glace pendant 5 minutes puis centrifugées rapidement pour descendre la condensation.

Par sonde, prendre un tube « Ready to GO » (Kit Amersham) : ajouter 45  $\mu$ L de sonde et 5  $\mu$ L de ( $\alpha$ -<sup>32/33</sup>P) dCTP.

Bien mélanger et incuber 30 minutes à 37°C.

Les sondes marquées sont ensuite passées sur colonne Séphadex G-25 ou G-50 après élimination du tampon de la colonne par gravité puis centrifugation à 1100 x g pendant 2 minutes, dans un rotor swinging.

La sonde est déposée au centre de la colonne puis récupérée dans un tube neuf par centrifugation à 1100 x g pendant 4 minutes, dans un rotor swinging.

La radioactivité est comptée sur un aliquote.

#### *d-Hybridation*

Le tampon d'hybridation (tampon Church) est réalisé en ajoutant dans l'ordre (Vf = 100 mL):

4.8 mL d'eau

10 mL de BSA 10% fraction IV (1% final)

35 mL de SDS 20% (7% final)

24.5 mL de Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 1M }  
25.5 mL de NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1M } 0.5M Phosphate Buffer pH6.8

200 µL EDTA 0.5M (1mM final)

Les filtres sont pré-hybridés 30 minutes à 65°C et les sondes sont dénaturées avant l'hybridation.

Mélanger dans l'ordre :

500 µL d'ADN de saumon à 2mg/mL

50 µL de sonde

500 µL de NaOH 1M puis vortexer

140 µL de Tris-HCl 2M pH7.5 puis mélanger

500 µL de HCl 1M puis mélanger.

La préparation est ensuite ajoutée au tampon d'hybridation.

L'hybridation se fait à 65°C sous agitation pendant la nuit.

Les filtres sont ensuite lavés 3 fois 20 minutes avec du SSC 2X + 0.1% SDS à température ambiante.

Puis 3 fois 20 minutes avec du SSC 0.1X + 0.05% SDS à 60°C.

Les filtres sont ensuite exposés plusieurs heures ou la nuit avant d'être révélés.

Les filtres peuvent être conservés dans du film plastique pour ne pas qu'ils sèchent.

### III.5 Amorces utilisées

Nom	Séquence (de 5' en 3')	Utilisation
MC239	TCTGGTAGTAACACGCCC	Sonde 5' Acp6 du Southern Blot
MC87	CGAGGCAAGCTAACAG	Amorce 5' pour la vérification de la recombinaison homologue dans la délétion de Acp6 et mtPL
MC158	TGTCGTTTCGTTAATATTCAGTAATTCATATTTTAT ATGAGCTTTGCGATGATGTTCAAGCATTGAGACC TTAGTTGACACGGATCCCCGGGTTAATTAA	Amorce 5' pour le fragment de recombinaison homologue de Acp6, contenant 80pb correspondant au locus Acp6 et 20pb au vecteur MC59.
MC159	TCGATCGCATTACAAATTCAGTGACACAGTTTTTC TGATTATATTAAGAAATTTAATTCTAACGTGTGCA ACAAAACGCCGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Amorce 3' pour le fragment de recombinaison homologue de Acp6, contenant 80pb correspondant au locus Acp6 et 20pb au vecteur MC59.
MC160	TAAACAACATTGAATTTCCAAATTATAACATTAG ATTGAAAATTTGAATCTTATTTATCCCTTTTTATTA TCCTTTTTATCGGATCCCCGGGTTAATTAA	Amorce 5' pour le fragment de recombinaison homologue de mtPL, contenant 80pb correspondant au locus mtPL et 20pb au vecteur MC59.
MC161	AAAAGGTAAAACATTAAAATAAAATTTAGATAAG AAAAGGAAGGAAAGAATGTTTACCATTGCATTAA TTCGAAAAAGTAGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	Amorce 3' pour le fragment de recombinaison homologue de mtPL, contenant 80pb correspondant au locus mtPL et 20pb au vecteur MC59.
MC162	ATAGTTTTGGTGGTTGCGTCTT	Amorce 3' pour la vérification de la délétion de Acp6
MC163	CCTAGCCGCCATGTCTC	Amorce 5' pour le clonage de Acp6, à cheval sur le codon ATG.
MC164	TCGCATTACAAATTCAGTG	Amorce 3' pour le clonage de Acp6.
MC165	TAAAATTTGCCCAAAGAGGCTA	Amorce 3' pour la vérification de la délétion de mtPL
MC166	TCCTTTTTATATGATTTTA	Amorce 5' pour le clonage de mtPL, à cheval sur le codon ATG.
MC167	CATTAATTCGAAAAAGT	Amorce 3' pour le clonage de mtPL.

## IV. Techniques relatives aux protéines

### IV.1 Extraits Protéiques totaux de levure *S.pombe*

Il faut prévoir 50 mL de levures à  $1 \times 10^7$  cellules/mL.

Après une centrifugation à 1600 x g pendant 5 minutes, le culot est repris par 1 à 2 mL de LB, puis transvaser dans un tube eppendorf.

Un culot est obtenu après une centrifugation à 2000 x g pendant 5 minutes et congelé dans de l'azote liquide (à cette étape, la conservation est possible à  $-80^{\circ}\text{C}$ ).

Une fois le culot décongelé, 200  $\mu\text{L}$  de LB+ et un volume de 500 $\mu\text{L}$  de billes de verre froide (SIGMA diamètre 425-600  $\mu\text{m}$ , conservées à  $-20^{\circ}\text{C}$ ) sont ajoutés.

La lyse se fait mécaniquement à  $4^{\circ}\text{C}$  avec un agitateur FastPrep (FP120, Bio 101), par 5 cycles de 30s d'agitation et 30s de repos (vérifier que les échantillons ne chauffent pas trop et les remettre dans la glace avant une nouvelle agitation, si besoin).

La lyse est vérifiée au microscope.

Quand les cellules sont lysées, le fond du tube est percé avec une aiguille chauffée et le tube est remis immédiatement sur un tube eppendorf neuf.

Les deux tubes l'un sur l'autre sont centrifugés jusqu'à 6000 x g puis la centrifugeuse est arrêtée. Cette étape est répétée une fois.

Le tube contenant l'extrait est gardé et centrifugé à 14000 x g pendant 10 minutes à  $4^{\circ}\text{C}$ . Cette étape est répétée une fois.

L'extrait protéique (surnageant) est alors récupérer et dosé par la méthode de Bradford.

#### Tampon utilisés :

##### LB (lysis buffer)

50 mM Tris HCl pH7.4

250 mM NaCl

5 mM EDTA

5 mM EGTA

1 mM DTT

0,1% Triton X-100

##### LB+

idem LB plus 1% Triton X-100

1% NP40

0.1% SDS

1% DOC

inhibiteurs de protéases (Boehringer)

Pepstatine 1  $\mu\text{g}/\text{mL}$

### IV.2 SDS PAGE

Les protéines sont séparées par électrophorèse sur gel polyacrylamide 8%, en présence de

SDS. Pour l'analyse des différentes fractions de purification, les tests de flottaison, d'association et de digestion à la protéinase K, les gels sont colorés à l'Imperial Stain (Pierce) selon les recommandations du fabricant.

Pour les expériences analysées en immunodétection, les protéines sont transférées sur membrane de Nitrocellulose. Les membranes sont ensuite saturées dans du TBS 1X, 0.2% Tween, 5% Lait (TBST-Lait) pendant 30 minutes, puis incubées avec les anticorps primaires dilués dans du TBST-Lait, sur la nuit, à 4°C, sous agitation. Le lendemain, les membranes sont lavées 3 fois 20 minutes en TBST puis incubées 1 heure à température ambiante avec des anticorps secondaires couplés à HRP dilués dans TBST-Lait. La révélation se fait par chimioluminescence (ECL, PerkinElmer Life Sciences).

### ***IV.3 Précipitation TCA-acétone***

De l'acide tri-chloro-acétique est ajouté à 20% final dans la solution de protéines à précipiter. Après avoir mélangé au vortex la solution est incubée 1H à 4°C, puis centrifugée pendant 30 minutes à 20 000 x g et à 4°C. Les surnageant est éliminé et le culot lavé avec 1 volume d'acétone froide (-20°C). Une centrifugation à 20 000 x g pendant 10 minutes est alors réalisée à 4°C et le surnageant éliminé. Le culot est séché jusqu'à élimination totale des traces d'acétone, puis repris dans 50 mL de LSB 2X par des cycles alternant un mélange au vortex et un chauffage à 90°C pendant 5 minutes.

## Bibliographie

**Abe, Y., Shodai, T., Muto, T., Mihara, K., Torii, H., Nishikawa, S., Endo, T. and Kohda, D.** (2000). Structural basis of presequence recognition by the mitochondrial protein import receptor Tom20. *Cell* **100**, 551-60.

**Alavi, M. V., Bette, S., Schimpf, S., Schuettauf, F., Schraermeyer, U., Wehrl, H. F., Ruttiger, L., Beck, S. C., Tonagel, F., Pichler, B. J. et al.** (2007). A splice site mutation in the murine *Opal* gene features pathology of autosomal dominant optic atrophy. *Brain* **130**, 1029-42.

**Alessandrini, A., Valdre, G., Valdre, U. and Muscatello, U.** (2007). Defects in ordered aggregates of cardiolipin visualized by atomic force microscopy. *Chem Phys Lipids* **146**, 111-24.

**Alexander, C., Votruba, M., Pesch, U. E., Thiselton, D. L., Mayer, S., Moore, A., Rodriguez, M., Kellner, U., Leo-Kottler, B., Auburger, G. et al.** (2000). OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet* **26**, 211-5.

**Amati-Bonneau, P., Valentino, M. L., Reynier, P., Gallardo, M. E., Bornstein, B., Boissiere, A., Campos, Y., Rivera, H., de la Aleja, J. G., Carroccia, R. et al.** (2008). OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain* **131**, 338-51.

**Amutha, B., Gordon, D. M., Gu, Y. and Pain, D.** (2004). A novel role of Mgm1p, a dynamin-related GTPase, in ATP synthase assembly and cristae formation/maintenance. *Biochem J* **381**, 19-23.

**Ardail, D., Privat, J. P., Egret-Charlier, M., Levrat, C., Lerme, F. and Louisot, P.** (1990). Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics. *J Biol Chem* **265**, 18797-802.

**Arnoult, D., Rismanchi, N., Grodet, A., Roberts, R. G., Seeburg, D. P., Estaquier, J., Sheng, M. and Blackstone, C.** (2005). Bax/Bak-dependent release of DDP/TIMM8a promotes Drp1-mediated mitochondrial fission and mitoptosis during programmed cell death. *Curr Biol* **15**, 2112-8.

**Bach, D., Pich, S., Soriano, F. X., Vega, N., Baumgartner, B., Oriola, J., Dugaard, J. R., Lloberas, J., Camps, M., Zierath, J. R. et al.** (2003). Mitofusin-2 determines mitochondrial network architecture and mitochondrial metabolism. A novel regulatory mechanism altered in obesity. *J Biol Chem* **278**, 17190-7.

**Bai, J., Hu, Z., Dittman, J. S., Pym, E. C. and Kaplan, J. M.** (2010). Endophilin functions as a membrane-bending molecule and is delivered to endocytic zones by exocytosis. *Cell* **143**, 430-41.

**Baines, C. P.** (2007). The mitochondrial permeability transition pore as a target of cardioprotective signaling. *Am J Physiol Heart Circ Physiol* **293**, H903-4.

**Ban, T., Heymann, J. A., Song, Z., Hinshaw, J. E. and Chan, D. C.** (2010). OPA1 disease alleles causing dominant optic atrophy have defects in cardiolipin-stimulated GTP hydrolysis and membrane tubulation. *Hum Mol Genet* **19**, 2113-22.

**Bashkirov, P. V., Akimov, S. A., Evseev, A. I., Schmid, S. L., Zimmerberg, J. and Frolov, V. A.** (2008). GTPase cycle of dynamin is coupled to membrane squeeze and release, leading to spontaneous fission. *Cell* **135**, 1276-86.

**Bazan, N. G.** (2006). Cell survival matters: docosahexaenoic acid signaling, neuroprotection and photoreceptors. *Trends Neurosci* **29**, 263-71.

**Becker, T., Vogtle, F. N., Stojanovski, D. and Meisinger, C.** (2008). Sorting and assembly of mitochondrial outer membrane proteins. *Biochim Biophys Acta* **1777**, 557-63.

**Belikova, N. A., Vladimirov, Y. A., Osipov, A. N., Kapralov, A. A., Tyurin, V. A.,**

- Potapovich, M. V., Basova, L. V., Peterson, J., Kurnikov, I. V. and Kagan, V. E.** (2006). Peroxidase activity and structural transitions of cytochrome c bound to cardiolipin-containing membranes. *Biochemistry* **45**, 4998-5009.
- Bereiter-Hahn, J. and Jendrach, M.** (2010). Mitochondrial dynamics. *Int Rev Cell Mol Biol* **284**, 1-65.
- Bethoney, K. A., King, M. C., Hinshaw, J. E., Ostap, E. M. and Lemmon, M. A.** (2009). A possible effector role for the pleckstrin homology (PH) domain of dynamin. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**, 13359-64.
- Bhar, D., Karren, M. A., Babst, M. and Shaw, J. M.** (2006). Dimeric Dnm1-G385D interacts with Mdv1 on mitochondria and can be stimulated to assemble into fission complexes containing Mdv1 and Fis1. *J Biol Chem* **281**, 17312-20.
- Binns, D. D., Barylko, B., Grichine, N., Atkinson, M. A., Helms, M. K., Jameson, D. M., Eccleston, J. F. and Albanesi, J. P.** (1999). Correlation between self-association modes and GTPase activation of dynamin. *J Protein Chem* **18**, 277-90.
- Bleazard, W., McCaffery, J. M., King, E. J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J. and Shaw, J. M.** (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat Cell Biol* **1**, 298-304.
- Boesch, P., Ibrahim, N., Dietrich, A. and Lightowers, R. N.** Membrane association of mitochondrial DNA facilitates base excision repair in mammalian mitochondria. *Nucleic Acids Res* **38**, 1478-88.
- Bogenhagen, D. F., Rousseau, D. and Burke, S.** (2008). The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. *J Biol Chem* **283**, 3665-75.
- Brenna, J. T. and Diau, G. Y.** (2007). The influence of dietary docosahexaenoic acid and arachidonic acid on central nervous system polyunsaturated fatty acid composition. *Prostaglandins Leukot Essent Fatty Acids* **77**, 247-50.
- Cao, J., Liu, Y., Lockwood, J., Burn, P. and Shi, Y.** (2004). A novel cardiolipin-remodeling pathway revealed by a gene encoding an endoplasmic reticulum-associated acyl-CoA:lysocardiolipin acyltransferase (ALCAT1) in mouse. *J Biol Chem* **279**, 31727-34.
- Carr, J. F. and Hinshaw, J. E.** (1997). Dynamin assembles into spirals under physiological salt conditions upon the addition of GDP and gamma-phosphate analogues. *J Biol Chem* **272**, 28030-5.
- Cerveny, K. L., McCaffery, J. M. and Jensen, R. E.** (2001). Division of mitochondria requires a novel DMN1-interacting protein, Net2p. *Mol Biol Cell* **12**, 309-21.
- Cerveny, K. L., Studer, S. L., Jensen, R. E. and Sesaki, H.** (2007). Yeast mitochondrial division and distribution require the cortical num1 protein. *Dev Cell* **12**, 363-75.
- Chacinska, A., Koehler, C. M., Milenkovic, D., Lithgow, T. and Pfanner, N.** (2009). Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell* **138**, 628-44.
- Chang, D. T., Honick, A. S. and Reynolds, I. J.** (2006). Mitochondrial trafficking to synapses in cultured primary cortical neurons. *J Neurosci* **26**, 7035-45.
- Chappie, J. S., Acharya, S., Leonard, M., Schmid, S. L. and Dyda, F.** (2010). G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity. *Nature* **465**, 435-40.
- Chen, H., Chomyn, A. and Chan, D. C.** (2005). Disruption of fusion results in mitochondrial heterogeneity and dysfunction. *J Biol Chem* **280**, 26185-92.
- Chen, H., Detmer, S. A., Ewald, A. J., Griffin, E. E., Fraser, S. E. and Chan, D. C.** (2003). Mitofusins Mfn1 and Mfn2 coordinately regulate mitochondrial fusion and are essential for embryonic development. *J Cell Biol* **160**, 189-200.
- Chen, H., McCaffery, J. M. and Chan, D. C.** (2007). Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum. *Cell* **130**, 548-62.
- Chen, X. J. and Clark-Walker, G. D.** (2000). The petite mutation in yeasts: 50 years

on. *Int Rev Cytol* **194**, 197-238.

**Chen, Y. J., Zhang, P., Egelman, E. H. and Hinshaw, J. E.** (2004). The stalk region of dynamin drives the constriction of dynamin tubes. *Nat Struct Mol Biol* **11**, 574-5.

**Cheng, X. and Ivessa, A. S.** (2010). Association of the yeast DNA helicase Pif1p with mitochondrial membranes and mitochondrial DNA. *Eur J Cell Biol* **89**, 742-7.

**Chernomordik, L. V. and Kozlov, M. M.** (2003). Protein-lipid interplay in fusion and fission of biological membranes. *Annu Rev Biochem* **72**, 175-207.

**Chernomordik, L. V. and Kozlov, M. M.** (2008). Mechanics of membrane fusion. *Nat Struct Mol Biol* **15**, 675-83.

**Chiron, S., Suleau, A. and 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**, 1891-901.

**Chiron, S., Gaisne, M., Guillou, E., Belenguer, P., Clark-Walker, G. D. and Bonnefoy, N.** (2007). Studying Mitochondria in an Attractive Model: *Schizosaccharomyces pombe*.

**Choi, J. H., Park, J. B., Bae, S. S., Yun, S., Kim, H. S., Hong, W. P., Kim, I. S., Kim, J. H., Han, M. Y., Ryu, S. H. et al.** (2004). Phospholipase C-gamma1 is a guanine nucleotide exchange factor for dynamin-1 and enhances dynamin-1-dependent epidermal growth factor receptor endocytosis. *J Cell Sci* **117**, 3785-95.

**Choi, S. Y., Huang, P., Jenkins, G. M., Chan, D. C., Schiller, J. and Frohman, M. A.** (2006). A common lipid links Mfn-mediated mitochondrial fusion and SNARE-regulated exocytosis. *Nat Cell Biol* **8**, 1255-62.

**Cipolat, S., de Brito, O. M., Dal Zilio, B. and 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. et al.** (2006). Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell* **126**, 163-75.

**Clark-Walker, G. D. and Chen, X. J.** (2001). Dual mutations reveal interactions between components of oxidative phosphorylation in *Kluyveromyces lactis*. *Genetics* **159**, 929-38.

**Collins, T. J., Berridge, M. J., Lipp, P. and Bootman, M. D.** (2002). Mitochondria are morphologically and functionally heterogeneous within cells. *Embo J* **21**, 1616-27.

**Cook, T., Mesa, K. and Urrutia, R.** (1996). Three dynamin-encoding genes are differentially expressed in developing rat brain. *J Neurochem* **67**, 927-31.

**Cook, T. A., Urrutia, R. and McNiven, M. A.** (1994). Identification of dynamin 2, an isoform ubiquitously expressed in rat tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**, 644-8.

**Crimi, M. and Esposti, M. D.** (2010). Apoptosis-induced changes in mitochondrial lipids. *Biochim Biophys Acta*.

**Crompton, M. and Costi, A.** (1990). A heart mitochondrial Ca<sup>2+</sup>(+)-dependent pore of possible relevance to re-perfusion-induced injury. Evidence that ADP facilitates pore interconversion between the closed and open states. *Biochem J* **266**, 33-9.

**Cuesta, A., Pedrola, L., Sevilla, T., Garcia-Planells, J., Chumillas, M. J., Mayordomo, F., LeGuern, E., Marin, I., Vilchez, J. J. and 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**, 22-5.

**Cullis, P. R., de Kruijff, B., Verkleij, A. J. and Hope, M. J.** (1986). Lipid polymorphism and membrane fusion. *Biochem Soc Trans* **14**, 242-5.

**Damke, H., Baba, T., Warnock, D. E. and Schmid, S. L.** (1994). Induction of mutant dynamin specifically blocks endocytic coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* **127**, 915-934.

- Danino, D., Moon, K. H. and Hinshaw, J. E.** (2004). Rapid constriction of lipid bilayers by the mechanochemical enzyme dynamin. *J Struct Biol* **147**, 259-67.
- Darshi, M., Mendiola, V. L., Mackey, M. R., Murphy, A. N., Koller, A., Perkins, G. A., Ellisman, M. H. and Taylor, S. S.** (2010). ChChd3, an Inner Mitochondrial Membrane Protein, Is Essential for Maintaining Crista Integrity and Mitochondrial Function. *J Biol Chem* **286**, 2918-32.
- Daum, G.** (1985). Lipids of mitochondria. *Biochim Biophys Acta* **822**, 1-42.
- Davies, V. J., Hollins, A. J., Piechota, M. J., Yip, W., Davies, J. R., White, K. E., Nicols, P. P., Boulton, M. E. and 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**, 1307-18.
- de Brito, O. M. and Scorrano, L.** (2008). Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature* **456**, 605-10.
- Delettre, C., Griffoin, J. M., Kaplan, J., Dollfus, H., Lorenz, B., Faivre, L., Lenaers, G., Belenguer, P. and Hamel, C. P.** (2001). Mutation spectrum and splicing variants in the *OPA1* gene. *Human Genetics* **109**, 584-591.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J. M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E. et al.** (2000). Nuclear gene *OPA1*, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet* **26**, 207-10.
- 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.
- Diot, A., Guillou, E., Daloyau, M., Arnaune-Pelloquin, L., Emorine, L. J. and 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**, 2632-9.
- Dohm, J. A., Lee, S. J., Hardwick, J. M., Hill, R. B. and Gittis, A. G.** (2004). Cytosolic domain of the human mitochondrial fission protein fis1 adopts a TPR fold. *Proteins* **54**, 153-6.
- Domenech, O., Redondo, L., Picas, L., Morros, A., Montero, M. T. and Hernandez-Borrell, J.** (2007). Atomic force microscopy characterization of supported planar bilayers that mimic the mitochondrial inner membrane. *J Mol Recognit*.
- Dowler, S., Kular, G. and Alessi, D. R.** (2002). Protein lipid overlay assay. *Sci STKE* **2002**, pl6.
- Duvezin-Caubet, S., Jagasia, R., Wagener, J., Hofmann, S., Trifunovic, A., Hansson, A., Chomyn, A., Bauer, M. F., Attardi, G., Larsson, N. G. et al.** (2006). Proteolytic processing of *OPA1* links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J Biol Chem* **281**, 37972-9.
- Duvezin-Caubet, S., Koppen, M., Wagener, J., Zick, M., Israel, L., Bernacchia, A., Jagasia, R., Rugarli, E. I., Imhof, A., Neupert, W. et al.** (2007). *OPA1* processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria. *Mol Biol Cell* **18**, 3582-90.
- Eble, K. S., Coleman, W. B., Hantgan, R. R. and Cunningham, C. C.** (1990). Tightly associated cardiolipin in the bovine heart mitochondrial ATP synthase as analyzed by <sup>31</sup>P nuclear magnetic resonance spectroscopy. *J Biol Chem* **265**, 19434-40.
- Efrat, A., Chernomordik, L. V. and Kozlov, M. M.** (2007). Point-like protrusion as a prestalk intermediate in membrane fusion pathway. *Biophys J* **92**, L61-3.
- Ehses, S., Raschke, I., Mancuso, G., Bernacchia, A., Geimer, S., Tondera, D., Martinou, J. C., Westermann, B., Rugarli, E. I. and Langer, T.** (2009). Regulation of *OPA1* processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and *OMA1*. *J*

*Cell Biol* **187**, 1023-36.

**Elachouri, G., Vidoni, S., Zanna, C., Pattyn, A., Boukhaddaoui, H., Gaget, K., Yu-Wai-Man, P., Gasparre, G., Sarzi, E., Delettre, C. et al.** OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome Res.*

**Elachouri, G., Vidoni, S., Zanna, C., Pattyn, A., Boukhaddaoui, H., Gaget, K., Yu-Wai-Man, P., Gasparre, G., Sarzi, E., Delettre, C. et al.** (2010). OPA1 links human mitochondrial genome maintenance to mtDNA replication and distribution. *Genome Res.*

**Epand, R. F., Martinou, J. C., Montessuit, S. and Epand, R. M.** (2003). Transbilayer lipid diffusion promoted by Bax: implications for apoptosis. *Biochemistry* **42**, 14576-82.

**Epand, R. F., Schlattner, U., Wallimann, T., Lacombe, M. L. and Epand, R. M.** (2007). Novel lipid transfer property of two mitochondrial proteins that bridge the inner and outer membranes. *Biophys J* **92**, 126-37.

**Estaquier, J. and Arnoult, D.** (2007). Inhibiting Drp1-mediated mitochondrial fission selectively prevents the release of cytochrome c during apoptosis. *Cell Death Differ* **14**, 1086-94.

**Eura, Y., Ishihara, N., Yokota, S. and Mihara, K.** (2003). Two mitofusin proteins, mammalian homologues of FZO, with distinct functions are both required for mitochondrial fusion. *J Biochem (Tokyo)* **134**, 333-44.

**Fekkes, P., Shepard, K. A. and Yaffe, M. P.** (2000). Gag3p, an outer membrane protein required for fission of mitochondrial tubules. *J Cell Biol* **151**, 333-40.

**Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G. V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R. S., Danial, N. N., De Strooper, B. et al.** (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* **126**, 177-89.

**Gallet, P. F., Maftah, A., Petit, J. M., Denis-Gay, M. and Julien, R.** (1995). Direct cardiolipin assay in yeast using the red fluorescence emission of 10-N-nonyl acridine orange. *Eur J Biochem* **228**, 113-9.

**Gallet, P. F., Petit, J. M., Maftah, A., Zachowski, A. and Julien, R.** (1997). Asymmetrical distribution of cardiolipin in yeast inner mitochondrial membrane triggered by carbon catabolite repression. *Biochem J* **324 (Pt 2)**, 627-34.

**Gallop, J. L., Butler, P. J. and McMahon, H. T.** (2005). Endophilin and CtBP/BARS are not acyl transferases in endocytosis or Golgi fission. *Nature* **438**, 675-8.

**Gallop, J. L., Jao, C. C., Kent, H. M., Butler, P. J., Evans, P. R., Langen, R. and McMahon, H. T.** (2006). Mechanism of endophilin N-BAR domain-mediated membrane curvature. *Embo J* **25**, 2898-910.

**Gao, S., von der Malsburg, A., Paeschke, S., Behlke, J., Haller, O., Kochs, G. and Daumke, O.** (2010). Structural basis of oligomerization in the stalk region of dynamin-like MxA. *Nature* **465**, 502-6.

**Garcia Fernandez, M., Troiano, L., Moretti, L., Nasi, M., Pinti, M., Salvioli, S., Dobrucki, J. and Cossarizza, A.** (2002). Early changes in intramitochondrial cardiolipin distribution during apoptosis. *Cell Growth Differ* **13**, 449-55.

**Garrido, N., Griparic, L., Jokitalo, E., Wartiovaara, J., van der Bliek, A. M. and Spelbrink, J. N.** (2003). Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol Biol Cell* **14**, 1583-96.

**Ghosh, A., Praefcke, G. J., Renault, L., Wittinghofer, A. and Herrmann, C.** (2006). How guanylate-binding proteins achieve assembly-stimulated processive cleavage of GTP to GMP. *Nature* **440**, 101-4.

**Gonzalvez, F., Pariselli, F., Dupaigne, P., Budihardjo, I., Lutter, M., Antonsson, B., Dirolez, P., Manon, S., Martinou, J. C., Goubern, M. et al.** (2005). tBid interaction with cardiolipin primarily orchestrates mitochondrial dysfunctions and subsequently activates Bax

and Bak. *Cell Death Differ* **12**, 614-26.

**Gonzalvez, F., Schug, Z. T., Houtkooper, R. H., MacKenzie, E. D., Brooks, D. G., Wanders, R. J., Petit, P. X., Vaz, F. M. and Gottlieb, E.** (2008). Cardiolipin provides an essential activating platform for caspase-8 on mitochondria. *J Cell Biol* **183**, 681-96.

**Griffin, E. E., Graumann, J. and Chan, D. C.** (2005). The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J Cell Biol* **170**, 237-48.

**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**, 757-64.

**Griparic, L., van der Wel, N. N., Orozco, I. J., Peters, P. J. and van der Bliek, A. M.** (2004). Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J Biol Chem* **279**, 18792-8.

**Guillery, O., Malka, F., Landes, T., Guillou, E., Blackstone, C., Lombes, A., Belenguer, P., Arnoult, D. and Rojo, M.** (2008). Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol Cell* **100**, 315-25.

**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**, 1109-16.

**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.

**Haines, T. H. and Dencher, N. A.** (2002). Cardiolipin: a proton trap for oxidative phosphorylation. *FEBS Lett* **528**, 35-9.

**Haller, O., Stertz, S. and Kochs, G.** (2007). The Mx GTPase family of interferon-induced antiviral proteins. *Microbes Infect* **9**, 1636-43.

**Han, X., Yang, K., Yang, J., Cheng, H. and Gross, R. W.** (2006). Shotgun lipidomics of cardiolipin molecular species in lipid extracts of biological samples. *J Lipid Res* **47**, 864-79.

**Herlan, M., Bornhovd, 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**, 167-73.

**Herlan, M., Vogel, F., Bornhovd, 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**, 27781-8.

**Hermann, G. J., Thatcher, J. W., Mills, J. P., Hales, K. G., Fuller, M. T., Nunnari, J. and Shaw, J. M.** (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol* **143**, 359-73.

**Hinshaw, J. E.** (1999). Dynamin spirals. *Curr Opin Struct Biol* **9**, 260-7.

**Hinshaw, J. E.** (2000). Dynamin and its role in membrane fission. *Annu Rev Cell Dev Biol* **16**, 483-519.

**Hoppins, S., Horner, J., Song, C., McCaffery, J. M. and Nunnari, J.** (2009). Mitochondrial outer and inner membrane fusion requires a modified carrier protein. *J Cell Biol* **184**, 569-81.

**Hoppins, S., Lackner, L. and Nunnari, J.** (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu Rev Biochem* **76**, 751-80.

**Hoppins, S. and Nunnari, J.** (2009). The molecular mechanism of mitochondrial fusion. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 20-6.

**Houtkooper, R. H. and Vaz, F. M.** (2008). Cardiolipin, the heart of mitochondrial metabolism. *Cell Mol Life Sci* **65**, 2493-506.

**Hudson, G., Amati-Bonneau, P., Blakely, E. L., Stewart, J. D., He, L., Schaefer, A. M., Griffiths, P. G., Ahlqvist, K., Suomalainen, A., Reynier, P. et al.** (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**, 329-37.

**Huttner, W. B. and Schmidt, A.** (2000). Lipids, lipid modification and lipid-protein interaction in membrane budding and fission--insights from the roles of endophilin A1 and synaptophysin in synaptic vesicle endocytosis. *Curr Opin Neurobiol* **10**, 543-51.

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

**Ishihara, N., Eura, Y. and Mihara, K.** (2004). Mitofusin 1 and 2 play distinct roles in mitochondrial fusion reactions via GTPase activity. *J Cell Sci* **117**, 6535-46.

**Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T. and Mihara, K.** (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *Embo J* **25**, 2966-77.

**Ishihara, N., Nomura, M., Jofuku, A., Kato, H., Suzuki, S. O., Masuda, K., Otera, H., Nakanishi, Y., Nonaka, I., Goto, Y. et al.** (2009). Mitochondrial fission factor Drp1 is essential for embryonic development and synapse formation in mice. *Nat Cell Biol* **11**, 958-66.

**Jakobs, S., Martini, N., Schauss, A. C., Egner, A., Westermann, B. and Hell, S. W.** (2003). Spatial and temporal dynamics of budding yeast mitochondria lacking the division component Fis1p. *J Cell Sci* **116**, 2005-14.

**James, D. I., Parone, P. A., Mattenberger, Y. and Martinou, J. C.** (2003). hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem* **278**, 36373-9.

**Jass, J., Tjarnhage, T. and Puu, G.** (2000). From liposomes to supported, planar bilayer structures on hydrophilic and hydrophobic surfaces: an atomic force microscopy study. *Biophys J* **79**, 3153-63.

**Jiang, F., Ryan, M. T., Schlame, M., Zhao, M., Gu, Z., Klingenberg, M., Pfanner, N. and Greenberg, M. L.** (2000). Absence of cardiolipin in the *crd1* null mutant results in decreased mitochondrial membrane potential and reduced mitochondrial function. *J Biol Chem* **275**, 22387-94.

**Jones, B. A. and Fangman, W. L.** (1992). Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev* **6**, 380-389.

**Joshi, A. S., Zhou, J., Gohil, V. M., Chen, S. and Greenberg, M. L.** (2009). Cellular functions of cardiolipin in yeast. *Biochim Biophys Acta* **1793**, 212-8.

**Kagan, V. E., Bayir, H. A., Belikova, N. A., Kapralov, O., Tyurina, Y. Y., Tyurin, V. A., Jiang, J., Stoyanovsky, D. A., Wipf, P., Kochanek, P. M. et al.** (2009). Cytochrome *c*/cardiolipin relations in mitochondria: a kiss of death. *Free Radic Biol Med* **46**, 1439-53.

**Kagan, V. E., Tyurin, V. A., Jiang, J., Tyurina, Y. Y., Ritov, V. B., Amoscato, A. A., Osipov, A. N., Belikova, N. A., Kapralov, A. A., Kini, V. et al.** (2005). Cytochrome *c* acts as a cardiolipin oxygenase required for release of proapoptotic factors. *Nat Chem Biol* **1**, 223-32.

**Karbowski, M., Jeong, S. Y. and Youle, R. J.** (2004). Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J Cell Biol* **166**, 1027-39.

**Khalifat, N., Puff, N., Bonneau, S., Fournier, J. B. and Angelova, M. I.** (2008). Membrane deformation under local pH gradient: mimicking mitochondrial cristae dynamics. *Biophys J* **95**, 4924-33.

**Kim, T. H., Zhao, Y., Ding, W. X., Shin, J. N., He, X., Seo, Y. W., Chen, J., Rabinowich, H., Amoscato, A. A. and Yin, X. M.** (2004). Bid-cardiolipin interaction at mitochondrial contact site contributes to mitochondrial cristae reorganization and cytochrome C release. *Mol Biol Cell* **15**, 3061-72.

- Klein, D. E., Lee, A., Frank, D. W., Marks, M. S. and Lemmon, M. A.** (1998). The pleckstrin homology domains of dynamin isoforms require oligomerization for high affinity phosphoinositide binding. *J Biol Chem* **273**, 27725-33.
- Koenig, J. H. and Ikeda, K.** (1989). Disappearance and reformation of synaptic vesicle membrane upon transmitter release observed under reversible blockage of membrane retrieval. *J Neurosci* **9**, 3844-60.
- Koirala, S., Bui, H. T., Schubert, H. L., Eckert, D. M., Hill, C. P., Kay, M. S. and Shaw, J. M.** (2010). Molecular architecture of a dynamin adaptor: implications for assembly of mitochondrial fission complexes. *J Cell Biol* **191**, 1127-39.
- Kokoszka, J. E., Waymire, K. G., Levy, S. E., Sligh, J. E., Cai, J., Jones, D. P., MacGregor, G. R. and Wallace, D. C.** (2004). The ADP/ATP translocator is not essential for the mitochondrial permeability transition pore. *Nature* **427**, 461-5.
- Konopka, C. A., Schleede, J. B., Skop, A. R. and Bednarek, S. Y.** (2006). Dynamin and cytokinesis. *Traffic* **7**, 239-47.
- Koshiba, T., Detmer, S. A., Kaiser, J. T., Chen, H., McCaffery, J. M. and Chan, D. C.** (2004). Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science* **305**, 858-62.
- Kozlov, M. M.** (2001). Fission of biological membranes: interplay between dynamin and lipids. *Traffic* **2**, 51-65.
- Kozlov, M. M., McMahon, H. T. and Chernomordik, L. V.** (2010). Protein-driven membrane stresses in fusion and fission. *Trends Biochem Sci.*
- Kuznetsov, A. V. and Margreiter, R.** (2009). Heterogeneity of mitochondria and mitochondrial function within cells as another level of mitochondrial complexity. *Int J Mol Sci* **10**, 1911-29.
- Labrousse, A. M., Zappaterra, M. D., Rube, D. A. and van der Blik, A. M.** (1999). C. elegans dynamin-related protein DRP-1 controls severing of the mitochondrial outer membrane. *Mol Cell* **4**, 815-26.
- Lackner, L. L., Horner, J. S. and Nunnari, J.** (2009). Mechanistic analysis of a dynamin effector. *Science* **325**, 874-7.
- Landes, T., Emorine, L. J., Courilleau, D., Rojo, M., Belenguer, P. and Arnaune-Pelloquin, L.** (2010a). The BH3-only Bnip3 binds to the dynamin Opa1 to promote mitochondrial fragmentation and apoptosis by distinct mechanisms. *EMBO Rep* **11**, 459-65.
- Landes, T., Leroy, I., Bertholet, A., Diot, A., Khosrobakhsh, F., Daloyau, M., Davezac, N., Miquel, M. C., Courilleau, D., Guillou, E. et al.** (2010b). OPA1 (dys)functions. *Semin Cell Dev Biol* **21**, 593-8.
- Lee, A., Frank, D. W., Marks, M. S. and Lemmon, M. A.** (1999). Dominant-negative inhibition of receptor-mediated endocytosis by a dynamin-1 mutant with a defective pleckstrin homology domain. *Curr Biol* **9**, 261-4.
- Lee, C. S., Kim, I. S., Park, J. B., Lee, M. N., Lee, H. Y., Suh, P. G. and Ryu, S. H.** (2006). The phox homology domain of phospholipase D activates dynamin GTPase activity and accelerates EGFR endocytosis. *Nat Cell Biol* **8**, 477-84.
- Lee, Y. J., Jeong, S. Y., Karbowski, M., Smith, C. L. and Youle, R. J.** (2004). Roles of the Mammalian mitochondrial fission and fusion mediators fis1, drp1, and opa1 in apoptosis. *Mol Biol Cell* **15**, 5001-11.
- Lewis, R. N. and McElhaney, R. N.** (2009). The physicochemical properties of cardiolipin bilayers and cardiolipin-containing lipid membranes. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 2069-79.
- Li, Z., Okamoto, K., Hayashi, Y. and Sheng, M.** (2004). The importance of dendritic mitochondria in the morphogenesis and plasticity of spines and synapses. *Cell* **119**, 873-87.
- Lill, R. and Muhlenhoff, U.** (2008). Maturation of iron-sulfur proteins in eukaryotes:

mechanisms, connected processes, and diseases. *Annu Rev Biochem* **77**, 669-700.

**Liu, J., Chen, J., Dai, Q. and Lee, R. M.** (2003). Phospholipid scramblase 3 is the mitochondrial target of protein kinase C delta-induced apoptosis. *Cancer Res* **63**, 1153-6.

**Lovell, J. F., Billen, L. P., Bindner, S., Shamas-Din, A., Fradin, C., Leber, B. and Andrews, D. W.** (2008). Membrane binding by tBid initiates an ordered series of events culminating in membrane permeabilization by Bax. *Cell* **135**, 1074-84.

**Lundmark, R. and Carlsson, S. R.** (2009). SNX9 - a prelude to vesicle release. *J Cell Sci* **122**, 5-11.

**Manara, A., Lindsay, J., Marchioretto, M., Astegno, A., Gilmore, A. P., Esposti, M. D. and Crimi, M.** (2009). Bid binding to negatively charged phospholipids may not be required for its pro-apoptotic activity in vivo. *Biochim Biophys Acta* **1791**, 997-1010.

**Mancuso, D. J., Sims, H. F., Han, X., Jenkins, C. M., Guan, S. P., Yang, K., Moon, S. H., Pietka, T., Abumrad, N. A., Schlesinger, P. H. et al.** (2007). Genetic ablation of calcium-independent phospholipase A2gamma leads to alterations in mitochondrial lipid metabolism and function resulting in a deficient mitochondrial bioenergetic phenotype. *J Biol Chem* **282**, 34611-22.

**Mannella, C. A.** (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim Biophys Acta* **1763**, 542-8.

**Matsumoto, K., Kusaka, J., Nishibori, A. and Hara, H.** (2006). Lipid domains in bacterial membranes. *Mol Microbiol* **61**, 1110-7.

**Maudrell, K.** (1993). Thiamine-repressible expression vectors pREP and pRIP for fission yeast. *Gene* **123**, 127-130.

**McQuibban, G. A., Saurya, S. and Freeman, M.** (2003). Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature* **423**, 537-41.

**Mears, J. A., Ray, P. and Hinshaw, J. E.** (2007). A corkscrew model for dynamin constriction. *Structure* **15**, 1190-202.

**Meusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J. M. and Nunnari, J.** (2006). Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* **127**, 383-95.

**Meusen, S., McCaffery, J. M. and Nunnari, J.** (2004). Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science* **305**, 1747-52.

**Meglei, G. and McQuibban, G. A.** (2009). The Dynamin-Related Protein Mgm1p Assembles into Oligomers and Hydrolyzes GTP To Function in Mitochondrial Membrane Fusion (dagger). *Biochemistry* **48**, 1774-84.

**Messerschmitt, M., Jakobs, S., Vogel, F., Fritz, S., Dimmer, K. S., Neupert, W. and Westermann, B.** (2003). The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *J Cell Biol* **160**, 553-64.

**Mirkin, N., Jaconic, J., Stojanoff, V. and Moreno, A.** (2008). High resolution X-ray crystallographic structure of bovine heart cytochrome c and its application to the design of an electron transfer biosensor. *Proteins* **70**, 83-92.

**Misaka, T., Miyashita, T. and 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**, 15834-42.

**Mitra, K., Wunder, C., Roysam, B., Lin, G. and 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**, 11960-5.

**Mokranjac, D., Paschen, S. A., Kozany, C., Prokisch, H., Hoppins, S. C., Nargang, F. E., Neupert, W. and Hell, K.** (2003). Tim50, a novel component of the TIM23 preprotein translocase of mitochondria. *Embo J* **22**, 816-25.

**Mopert, K., Hajek, P., Frank, S., Chen, C., Kaufmann, J. and Santel, A.** (2009). Loss of Drp1 function alters OPA1 processing and changes mitochondrial membrane

organization. *Exp Cell Res* **315**, 2165-80.

**Narayanan, R., Leonard, M., Song, B. D., Schmid, S. L. and Ramaswami, M.** (2005). An internal GAP domain negatively regulates presynaptic dynamin in vivo: a two-step model for dynamin function. *J Cell Biol* **169**, 117-26.

**Naylor, K., Ingerman, E., Okreglak, V., Marino, M., Hinshaw, J. E. and Nunnari, J.** (2006). Mdv1 interacts with assembled dnm1 to promote mitochondrial division. *J Biol Chem* **281**, 2177-83.

**Niemann, A., Ruegg, M., La Padula, V., Schenone, A. and 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**, 1067-78.

**Niemann, A., Wagner, K. M., Ruegg, M. and Suter, U.** (2009). GDAP1 mutations differ in their effects on mitochondrial dynamics and apoptosis depending on the mode of inheritance. *Neurobiol Dis* **36**, 509-20.

**Oka, T., Sayano, T., Tamai, S., Yokota, S., Kato, H., Fujii, G. and Mihara, K.** (2008). Identification of a novel protein MICS1 that is involved in maintenance of mitochondrial morphology and apoptotic release of cytochrome c. *Mol Biol Cell* **19**, 2597-608.

**Okamoto, P. M., Tripet, B., Litowski, J., Hodges, R. S. and Vallee, R. B.** (1999). Multiple distinct coiled-coils are involved in dynamin self-assembly. *J Biol Chem* **274**, 10277-86.

**Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P. and 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**, 7743-6.

**Ortiz, A., Killian, J. A., Verkleij, A. J. and Wilschut, J.** (1999). Membrane fusion and the lamellar-to-inverted-hexagonal phase transition in cardiolipin vesicle systems induced by divalent cations. *Biophys J* **77**, 2003-14.

**Osman, C., Haag, M., Potting, C., Rodenfels, J., Dip, P. V., Wieland, F. T., Brugger, B., Westermann, B. and Langer, T.** (2009). The genetic interactome of prohibitins: coordinated control of cardiolipin and phosphatidylethanolamine by conserved regulators in mitochondria. *J Cell Biol* **184**, 583-96.

**Otera, H. and Mihara, K.** (2010). Molecular Mechanisms and Physiologic Functions of Mitochondrial Dynamics. *J Biochem*.

**Palade, G. E.** (1953). An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem* **1**, 188-211.

**Pebay-Peyroula, E., Dahout-Gonzalez, C., Kahn, R., Trezeguet, V., Lauquin, G. J. and Brandolin, G.** (2003). Structure of mitochondrial ADP/ATP carrier in complex with carboxyatractyloside. *Nature* **426**, 39-44.

**Pelloquin, L., Ducommun, B. and Belenguer, P.** (1999). Interaction between the fission yeast nim1/cdr1 protein kinase and a dynamin-related protein. *FEBS letters* **443**, 71-74.

**Peter, B. J., Kent, H. M., Mills, I. G., Vallis, Y., Butler, P. J., Evans, P. R. and McMahon, H. T.** (2004). BAR domains as sensors of membrane curvature: the amphiphysin BAR structure. *Science* **303**, 495-9.

**Pich, S., Bach, D., Briones, P., Liesa, M., Camps, M., Testar, X., Palacin, M. and 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**, 1405-15.

**Pitts, K. R., Yoon, Y., Krueger, E. W. and McNiven, M. A.** (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**, 4403-17.

**Praefcke, G. J. and McMahon, H. T.** (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**, 133-47.

- Puu, G. and Gustafson, I.** (1997). Planar lipid bilayers on solid supports from liposomes--factors of importance for kinetics and stability. *Biochim Biophys Acta* **1327**, 149-61.
- Rabl, R., Soubannier, V., Scholz, R., Vogel, F., Mendl, N., Vasiljev-Neumeyer, A., Korner, C., Jagasia, R., Keil, T., Baumeister, W. et al.** (2009). Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcjl and Su e/g. *J Cell Biol* **185**, 1047-63.
- Ramachandran, R., Surka, M., Chappie, J. S., Fowler, D. M., Foss, T. R., Song, B. D. and Schmid, S. L.** (2007). The dynamin middle domain is critical for tetramerization and higher-order self-assembly. *Embo J* **26**, 559-66.
- Rapaport, D., Brunner, M., Neupert, W. and Westermann, B.** (1998). Fzo1p is a mitochondrial outer membrane protein essential for the biogenesis of functional mitochondria in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem* **273**, 20150-5.
- Reubold, T. F., Eschenburg, S., Becker, A., Leonard, M., Schmid, S. L., Vallee, R. B., Kull, F. J. and Manstein, D. J.** (2005). Crystal structure of the GTPase domain of rat dynamin 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* **102**, 13093-8.
- Rigaud, J. L. and Levy, D.** (2003). Reconstitution of membrane proteins into liposomes. *Methods Enzymol* **372**, 65-86.
- Rigaud, J. L., Mosser, G., Lacapere, J. J., Olofsson, A., Levy, D. and Ranck, J. L.** (1997). Bio-Beads: an efficient strategy for two-dimensional crystallization of membrane proteins. *J Struct Biol* **118**, 226-35.
- Robinson, N. C., Zborowski, J. and Talbert, L. H.** (1990). Cardiophilin-depleted bovine heart cytochrome c oxidase: binding stoichiometry and affinity for cardiophilin derivatives. *Biochemistry* **29**, 8962-9.
- Rojo, M., Legros, F., Chateau, D. and Lombes, A.** (2002). Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo. *J Cell Sci* **115**, 1663-74.
- Roux, A., Koster, G., Lenz, M., Sorre, B., Manneville, J. B., Nassoy, P. and Bassereau, P.** (2010). Membrane curvature controls dynamin polymerization. *Proc Natl Acad Sci U S A* **107**, 4141-6.
- Rujviphat, J., Meglei, G., Rubinstein, J. L. and McQuibban, G. A.** (2009). Phospholipid association is essential for dynamin-related protein Mgm1 to function in mitochondrial membrane fusion. *J Biol Chem* **284**, 28682-6.
- Saito, M., Korsmeyer, S. J. and Schlesinger, P. H.** (2000). BAX-dependent transport of cytochrome c reconstituted in pure liposomes. *Nat Cell Biol* **2**, 553-5.
- Santel, A., Frank, S., Gaume, B., Herrler, M., Youle, R. J. and Fuller, M. T.** (2003). Mitofusin-1 protein is a generally expressed mediator of mitochondrial fusion in mammalian cells. *J Cell Sci* **116**, 2763-74.
- Santel, A. and Fuller, M. T.** (2001). Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci* **114**, 867-74.
- Scaglione, B. A. and Rintoul, D. A.** (1989). A fluorescence-quenching assay for measuring permeability of reconstituted lens MIP26. *Invest Ophthalmol Vis Sci* **30**, 961-6.
- Schlame, M.** (2008). Cardiophilin synthesis for the assembly of bacterial and mitochondrial membranes. *J Lipid Res* **49**, 1607-20.
- Schlame, M. and Haldar, D.** (1993). Cardiophilin is synthesized on the matrix side of the inner membrane in rat liver mitochondria. *J Biol Chem* **268**, 74-9.
- Schlame, M. and Ren, M.** (2009). The role of cardiophilin in the structural organization of mitochondrial membranes. *Biochim Biophys Acta* **1788**, 2080-3.
- Schlame, M., Ren, M., Xu, Y., Greenberg, M. L. and Haller, I.** (2005). Molecular symmetry in mitochondrial cardiophilins. *Chem Phys Lipids* **138**, 38-49.
- Schlame, M. and Rustow, B.** (1990). Lysocardiophilin formation and reacylation in

isolated rat liver mitochondria. *Biochem J* **272**, 589-95.

**Schmidt, A., Wolde, M., Thiele, C., Fest, W., Kratzin, H., Podtelejnikov, A. V., Witke, W., Huttner, W. B. and Soling, H. D.** (1999). Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature* **401**, 133-41.

**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**, 651-8.

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

**Sesaki, H. and Jensen, R. E.** (2001). UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J Cell Biol* **152**, 1123-34.

**Sesaki, H. and Jensen, R. E.** (2004). Ugo1p links the Fzo1p and Mgm1p GTPases for mitochondrial fusion. *J Biol Chem* **279**, 28298-303.

**Sesaki, H., Southard, S. M., Hobbs, A. E. and Jensen, R. E.** (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**, 276-83.

**Sesaki, H., Southard, S. M., Yaffe, M. P. and Jensen, R. E.** (2003b). Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol Biol Cell* **14**, 2342-56.

**Sever, S., Muhlberg, A. B. and Schmid, S. L.** (1999). Impairment of dynamin's GAP domain stimulates receptor-mediated endocytosis. *Nature* **398**, 481-6.

**Shepard, K. A. and Yaffe, M. P.** (1999). The yeast dynamin-like protein, Mgm1p, functions on the mitochondrial outer membrane to mediate mitochondrial inheritance. *J Cell Biol* **144**, 711-720.

**Sheridan, C. and Martin, S. J.** (2011). Mitochondrial fission/fusion dynamics and apoptosis. *Mitochondrion* **10**, 640-8.

**Sjostrand, F. S.** (1953). Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. *Nature* **171**, 30-2.

**Smaczynska-de, R., II, Allwood, E. G., Aghamohammadzadeh, S., Hetteema, E. H., Goldberg, M. W. and Ayscough, K. R.** (2010). A role for the dynamin-like protein Vps1 during endocytosis in yeast. *J Cell Sci* **123**, 3496-506.

**Smirnova, E., Griparic, L., Shurland, D. L. and van Der Blik, A. M.** (2001). Dynamin-related protein drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell* **12**, 2245-56.

**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**, 749-55.

**Song, Z., Ghochani, M., McCaffery, J. M., Frey, T. G. and Chan, D. C.** (2009). Mitofusins and OPA1 mediate sequential steps in mitochondrial membrane fusion. *Mol Biol Cell* **20**, 3525-32.

**Sontag, J. M., Fykse, E. M., Ushkaryov, Y., Liu, J. P., Robinson, P. J. and Sudhof, T. C.** (1994). Differential expression and regulation of multiple dynamins. *J Biol Chem* **269**, 4547-54.

**Sorice, M., Manganelli, V., Matarrese, P., Tinari, A., Misasi, R., Malorni, W. and Garofalo, T.** (2009). Cardiolipin-enriched raft-like microdomains are essential activating platforms for apoptotic signals on mitochondria. *FEBS Lett* **583**, 2447-50.

**Stowell, M. H., Marks, B., Wigge, P. and McMahon, H. T.** (1999). Nucleotide-dependent conformational changes in dynamin: evidence for a mechanochemical molecular spring. *Nat Cell Biol* **1**, 27-32.

**Struck, D. K., Hoekstra, D. and Pagano, R. E.** (1981). Use of resonance energy

transfer to monitor membrane fusion. *Biochemistry* **20**, 4093-9.

**Sugioka, R., Shimizu, S. and Tsujimoto, Y.** (2004). Fzo1, a protein involved in mitochondrial fusion, inhibits apoptosis. *J Biol Chem* **279**, 52726-34.

**Suzuki, M., Jeong, S. Y., Karbowski, M., Youle, R. J. and Tjandra, N.** (2003). The solution structure of human mitochondria fission protein Fis1 reveals a novel TPR-like helix bundle. *J Mol Biol* **334**, 445-58.

**Suzuki, M., Neutzner, A., Tjandra, N. and Youle, R. J.** (2005). Novel structure of the N terminus in yeast Fis1 correlates with a specialized function in mitochondrial fission. *J Biol Chem* **280**, 21444-52.

**Taguchi, N., Ishihara, N., Jofuku, A., Oka, T. and Mihara, K.** (2007). Mitotic phosphorylation of dynamin-related GTPase Drp1 participates in mitochondrial fission. *J Biol Chem* **282**, 11521-9.

**Takei, K., Haucke, V., Slepnev, V., Farsad, K., Salazar, M., Chen, H. and De Camilli, P.** (1998). Generation of coated intermediates of clathrin-mediated endocytosis on protein-free liposomes. *Cell* **94**, 131-41.

**Taylor, W. A. and Hatch, G. M.** (2009). Identification of the human mitochondrial linoleoyl-coenzyme A monolysocardiolipin acyltransferase (MLCL AT-1). *J Biol Chem* **284**, 30360-71.

**Thompson, H. M., Skop, A. R., Euteneuer, U., Meyer, B. J. and McNiven, M. A.** (2002). The large GTPase dynamin associates with the spindle midzone and is required for cytokinesis. *Curr Biol* **12**, 2111-7.

**Tietzel, I., El-Haibi, C. and Carabeo, R. A.** (2009). Human guanylate binding proteins potentiate the anti-chlamydia effects of interferon-gamma. *PLoS One* **4**, e6499.

**Tieu, Q. and Nunnari, J.** (2000). Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J Cell Biol* **151**, 353-66.

**Tieu, Q., Okreglak, V., Naylor, K. and 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**, 445-52.

**Tondera, D., Czauderna, F., Paulick, K., Schwarzer, R., Kaufmann, J. and Santel, A.** (2005). The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells. *J Cell Sci* **118**, 3049-59.

**Tuominen, E. K., Wallace, C. J. and Kinnunen, P. K.** (2002). Phospholipid-cytochrome c interaction: evidence for the extended lipid anchorage. *J Biol Chem* **277**, 8822-6.

**van der Blik, A. M.** (1999). Functional diversity in the dynamin family. *Trends Cell Biol* **9**, 96-102.

**van der Blik, A. M., Redelmeier, T. E., Damke, H., Tisdale, E. J., Meyerowitz, E. M. and Schmid, S. L.** (1993). Mutations in human dynamin block an intermediate stage in coated vesicle formation. *J. Cell Biol.* **122**, 553-563.

**van der Laan, M., Wiedemann, N., Mick, D. U., Guiard, B., Rehling, P. and Pfanner, N.** (2006). A role for Tim21 in membrane-potential-dependent preprotein sorting in mitochondria. *Curr Biol* **16**, 2271-6.

**Vaz, F. M., Houtkooper, R. H., Valianpour, F., Barth, P. G. and Wanders, R. J.** (2003). Only one splice variant of the human TAZ gene encodes a functional protein with a role in cardiolipin metabolism. *J Biol Chem* **278**, 43089-94.

**Verstreken, P., Kjaerulff, O., Lloyd, T. E., Atkinson, R., Zhou, Y., Meinertzhagen, I. A. and Bellen, H. J.** (2002). Endophilin mutations block clathrin-mediated endocytosis but not neurotransmitter release. *Cell* **109**, 101-12.

**Verstreken, P., Ly, C. V., Venken, K. J., Koh, T. W., Zhou, Y. and Bellen, H. J.** (2005). Synaptic mitochondria are critical for mobilization of reserve pool vesicles at

*Drosophila* neuromuscular junctions. *Neuron* **47**, 365-78.

**Warnock, D. E., Baba, T. and Schmid, S. L.** (1997). Ubiquitously Expressed Dynamin-II Has a Higher Intrinsic GTPase Activity and a Greater Propensity for Self-assembly Than Neuronal Dynamin-I. *Mol Biol Cell* **8**, 2553-62.

**Warnock, D. E., Hinshaw, J. E. and Schmid, S. L.** (1996). Dynamin self-assembly stimulates its GTPase activity. *J Biol Chem* **271**, 22310-4.

**Wilschut, J., Nir, S., Scholma, J. and Hoekstra, D.** (1985). Kinetics of Ca<sup>2+</sup>-induced fusion of cardiolipin-phosphatidylcholine vesicles: correlation between vesicle aggregation, bilayer destabilization, and fusion. *Biochemistry* **24**, 4630-6.

**Wong, E. D., Wagner, J. A., Scott, S. V., Okreglak, V., Holewinski, T. J., Cassidy-Stone, A. and Nunnari, J.** (2003). The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J Cell Biol* **160**, 303-11.

**Wu, Y., Matsui, H. and Tomizawa, K.** (2009). Amphiphysin I and regulation of synaptic vesicle endocytosis. *Acta Med Okayama* **63**, 305-23.

**Wurm, C. A. and Jakobs, S.** (2006). Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast. *FEBS Lett* **580**, 5628-34.

**Xu, Y., Malhotra, A., Ren, M. and Schlame, M.** (2006). The enzymatic function of tafazzin. *J Biol Chem* **281**, 39217-24.

**Yamaguchi, R., Lartigou, L., Perkins, G., Scott, R. T., Dixit, A., Kushnareva, Y., Kuwana, T., Ellisman, M. H. and Newmeyer, D. D.** (2008). Opa1-mediated cristae opening is Bax/Bak and BH3 dependent, required for apoptosis, and independent of Bak oligomerization. *Mol Cell* **31**, 557-69.

**Yoon, Y., Krueger, E. W., Oswald, B. J. and McNiven, M. A.** (2003). The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol* **23**, 5409-20.

**Yoon, Y., Pitts, K. R. and McNiven, M. A.** (2001). Mammalian dynamin-like protein dlp1 tubulates membranes. *Mol Biol Cell* **12**, 2894-905.

**Yoshida, Y., Kinuta, M., Abe, T., Liang, S., Araki, K., Cremona, O., Di Paolo, G., Moriyama, Y., Yasuda, T., De Camilli, P. et al.** (2004). The stimulatory action of amphiphysin on dynamin function is dependent on lipid bilayer curvature. *Embo J* **23**, 3483-91.

**Young, J. C., Hoogenraad, N. J. and Hartl, F. U.** (2003). Molecular chaperones Hsp90 and Hsp70 deliver preproteins to the mitochondrial import receptor Tom70. *Cell* **112**, 41-50.

**Yu-Wai-Man, P., Griffiths, P. G., Gorman, G. S., Lourenco, C. M., Wright, A. F., Auer-Grumbach, M., Toscano, A., Musumeci, O., Valentino, M. L., Caporali, L. et al.** (2010). Multi-system neurological disease is common in patients with OPA1 mutations. *Brain* **133**, 771-86.

**Zachman, D. K., Chicco, A. J., McCune, S. A., Murphy, R. C., Moore, R. L. and Sparagna, G. C.** (2010). The role of calcium-independent phospholipase A2 in cardiolipin remodeling in the spontaneously hypertensive heart failure rat heart. *J Lipid Res* **51**, 525-34.

**Zanna, C., Ghelli, A., Porcelli, A. M., Karbowski, M., Youle, R. J., Schimpf, S., Wissinger, B., Pinti, M., Cossarizza, A., Vidoni, S. et al.** (2008). OPA1 mutations associated with dominant optic atrophy impair oxidative phosphorylation and mitochondrial fusion. *Brain* **131**, 352-67.

**Zhang, M., Mileykovskaya, E. and Dowhan, W.** (2005). Cardiolipin is essential for organization of complexes III and IV into a supercomplex in intact yeast mitochondria. *J Biol Chem* **280**, 29403-8.

**Zhang, P. and Hinshaw, J. E.** (2001). Three-dimensional reconstruction of dynamin in the constricted state. *Nat Cell Biol* **3**, 922-6.

**Zhang, X. and Hu, J.** (2009). Two small protein families, DYNAMIN-RELATED PROTEIN3 and FISSION1, are required for peroxisome fission in Arabidopsis. *Plant J* **57**, 146-59.

**Zhang, X. and Hu, J.** (2010). The Arabidopsis chloroplast division protein DYNAMIN-RELATED PROTEIN5B also mediates peroxisome division. *Plant Cell* **22**, 431-42.

**Zhang, Y. L., Frangos, J. A. and Chachisvilis, M.** (2006). Laurdan fluorescence senses mechanical strain in the lipid bilayer membrane. *Biochem Biophys Res Commun* **347**, 838-41.

**Zhao, J., Liu, T., Jin, S. B., Tomilin, N., Castro, J., Shupliakov, O., Lendahl, U. and Nister, M.** (2009). The novel conserved mitochondrial inner-membrane protein MTGM regulates mitochondrial morphology and cell proliferation. *J Cell Sci* **122**, 2252-62.

**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**, 2237-43.



## **Annexe I :**

**Diot et al., (2009). Transmembrane segments of the dynamin Msp1p uncouple its functions in the control of mitochondrial morphology and genome maintenance. J. Cell Sci. 122, 2632-39.**



# Transmembrane segments of the dynamin Msp1p uncouple its functions in the control of mitochondrial morphology and genome maintenance

Alan Diot\*, Emmanuelle Guillou\*, Marlène Daloyau, Laetitia Arnauné-Pelloquin, Laurent J. Emorine and Pascale Belenguer<sup>‡</sup>

Université de Toulouse, UPS and CNRS UMR 5241, Laboratoire Métabolisme Plasticité Mitochondries, F-31000, France

\*These authors contributed equally to this work

<sup>‡</sup>Author for correspondence (e-mail: pascale.belenguer@cict.fr)

Accepted 17 April 2009

Journal of Cell Science 122, 2632-2639 Published by The Company of Biologists 2009

doi:10.1242/jcs.040139

## Summary

Mitochondrial morphology depends on the equilibrium between antagonistic fission and fusion forces acting on mitochondrial membranes. Inactivation of fusion induces the loss of mtDNA. When both fusion and fission are simultaneously inactivated, the loss of mtDNA is alleviated, along with mitochondrial fragmentation. Mechanisms involved in mtDNA maintenance thus seem to depend on a coordinated regulation of fusion and fission forces. We have studied the role of the dynamin Msp1p, a fusion effector in mitochondrial morphology, in relation to the maintenance of mtDNA. Two hydrophobic regions of Msp1p, predicted to be transmembrane segments, were shown to anchor the long form of the protein into mitochondrial membranes, whereas the short form, lacking these two domains, behaved as a peripheral membrane protein. Both domains were essential for the fusogenic activity of Msp1p, but deletion of the second domain alone induced loss of mtDNA and thus lethality.

Our results demonstrate that the role of Msp1p in the control of mitochondrial morphology is distinct from that required for genome maintenance, and that only the latter function is essential for cell viability. This parallels recent observations that have distinguished the role of OPA1, the human orthologue of Msp1p, in mitochondrial dynamics from that in cristae organization and apoptosis. Furthermore, our observations may contribute to our understanding of the pathological mechanisms resulting from mutations in OPA1 that give rise to the ADOA syndromes.

Supplementary material available online at <http://jcs.biologists.org/cgi/content/full/122/15/2632/DC1>

Key words: Mitochondrial dynamics, mtDNA, Mitochondria, Msp1, OPA1, Mgm1

## Introduction

The metabolic pathways that occur in the mitochondria have been studied for many years, but it is only recently that the implications of mitochondrial morphology in these processes have been reconsidered. Advances in this domain have been made possible by the isolation of yeast mutants deficient for the transmission, maintenance and organization of the mitochondria. Their characterization has led to the proposal that the morphology of the mitochondrial network depends on the equilibrium between antagonistic fission and fusion forces acting on mitochondrial membranes (Hoppins et al., 2007; Okamoto and Shaw, 2005). Most of the proteins involved in these processes are conserved in higher eukaryotes where they fulfil similar functions. In yeast, the state of the mitochondrial outer membrane is determined by both fission, driven by the dynamin Dnm1p (DRP1 in mammals), and fusion, controlled by the GTPase Fzo1p (mammalian orthologues MFN1 and MFN2). Identification of genetic and biochemical partners of Dnm1p and Fzo1p has led to the characterization of mitochondrial division and fusion machineries. Yeast Fis1p, for which the human orthologue is FIS1, functions as the receptor for cytoplasmic Dnm1p via the peripheral adaptor proteins Mdv1p and Caf4p, which are not conserved in other eukaryotes. The mechanisms that underlie fusion and modeling of the mitochondrial inner membrane, particularly of its dynamic tubular projections that constitute the cristae (Mannella, 2006), are not as well characterized. OPA1

and its counterparts in *Saccharomyces cerevisiae* and *Schizosaccharomyces pombe*, Mgm1p and Msp1p, respectively, are believed to control these processes (Olichon et al., 2006). In addition, mitofilin (John et al., 2005) and ATP synthase (Paumard et al., 2002) have been implicated to be crucial organizers of cristae morphology. Ugo1p is involved in mitochondrial fusion and possibly coordinates the dynamics of the outer and inner membrane by physically linking Fzo1p to Mgm1p. No mammalian homologue of Ugo1p has been found to date, possibly because MFN1 and OPA1 interact directly with each other (Guillery et al., 2008). Furthermore, several mitochondrial-shaping proteins have been identified in mammals and yeast, such as Mdm33p, endophilin B1, MTP18, GDAP1 (Karbowski et al., 2004; Messerschmitt et al., 2003; Niemann et al., 2005; Tondera et al., 2005).

In addition to the crucial role of mitochondrial dynamics in mitochondrial morphology, their involvement in both mitochondrial and cellular functions is beginning to be evaluated. The importance of mitochondrial dynamics has been highlighted by the discovery that inherited human diseases are caused by mutations in mitochondrial fusion and fission genes. Mutations in *MFN2* cause a peripheral motor neuropathy (CMT2A), which presents with progressive distal muscle weakness followed by muscular atrophy (Zuchner et al., 2004). Mutations in *OPA1* are associated with an optic neuropathy (ADOA-1) (Delettre et al., 2000), a leading cause of blindness. Finally, mutations in *GDAP1*, which encodes an

integral protein of the outer membrane involved in mitochondrial division, are associated with CMT4A (Baxter et al., 2002; Cuesta et al., 2002; Niemann et al., 2005).

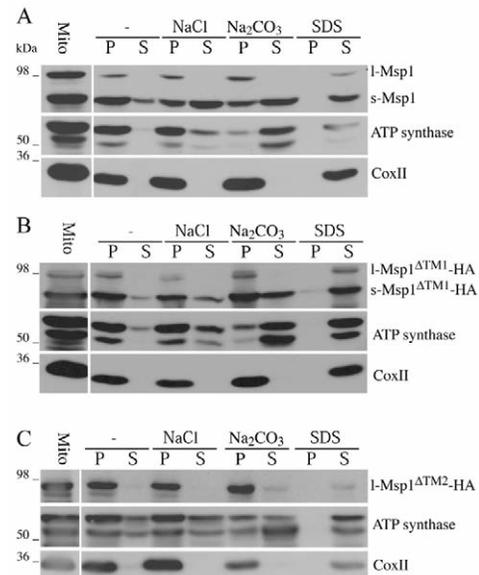
Surprisingly, Fzo1p and Mgm1p/Msp1p, the yeast orthologues of the two human pro-fusion proteins MFN2 and OPA1, are also linked to mtDNA maintenance (Hermann et al., 1998; Jones and Fangman, 1992; Pelloquin et al., 1998). This might not be a coincidence because other yeast genes involved either in mitochondrial membrane dynamics (*UGO1*) or in mitochondrial movement and tethering (*MDM10*, *MDM12* and *MMM1*) also affect nucleoid inheritance in *S. cerevisiae* (Chen and Butow, 2005). Interestingly, the loss of mtDNA observed in fusion mutants is alleviated together with the fragmented mitochondrial phenotype when fission is inactivated (Bleazard et al., 1999; Fekkes et al., 2000; Guillou et al., 2005; Sesaki and Jensen, 2001; Wong et al., 2000). Mechanisms involved in mtDNA maintenance thus seem to depend on a coordinated regulation of fusion and fission forces that control the morphogenesis of the mitochondria.

The question of the nature of the precise links between mitochondrial membrane dynamics and nucleoid inheritance thus arises. Is the loss of mtDNA observed upon dysregulation of membrane dynamics a mere consequence of this primary alteration or is there a specific mechanism linked to membrane structure and involved in mtDNA maintenance? We took advantage of the *S. pombe* model, which is closer to the situation in mammalian cells than the *S. cerevisiae* model (Chiron et al., 2007), to study the role of the dynamin Msp1p in mitochondrial morphology and dynamics with respect to the maintenance of mitochondrial nucleoids. To this end we have characterized mutants of Msp1p deleted for one of its two hydrophobic regions that represent potential transmembrane segments (referred herein as TM1 and TM2). We show that both TM1 and TM2 are involved in the association of the long form of Msp1p with mitochondrial membranes, whereas the short form of the dynamin, lacking the two hydrophobic domains, acts as a peripheral membrane protein. Furthermore, we show that both TM1 and TM2 are involved in the fusogenic activity of Msp1p but that only modifications of TM2 induce a dominant-negative loss of mtDNA and ensuing Rho zero ( $\rho^0$ ) lethality. These results demonstrate for the first time that this dynamin has distinct roles in mitochondrial morphology and in genome maintenance. It further shows that one essential function of Msp1p is to maintain the mitochondrial genome, whereas its function in mitochondrial dynamics has no effect on cell viability.

## Results

### The two isoforms of Msp1p differ in their association with mitochondrial membranes

To gain insight into the association of Msp1p with mitochondrial membranes the susceptibility of the long form of the dynamin (l-Msp1p) to extraction by high ionic strength, basic pH, or detergent was compared with that of the short form (s-Msp1p) (Fig. 1). In buffer-treated mitochondria, the matrix peptidase-matured l-Msp1p (Pelloquin et al., 1999) was associated with membranes, and the association was resistant to extraction by 1 M NaCl or 0.1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 11 (Fig. 1A). The shorter form, probably generated by a mitochondrial rhomboid-like protease (Herlan et al., 2003; McQuibban et al., 2003), was also mostly bound to the membranes in control mitochondria, although a certain percentage was present in the supernatant. This soluble fraction was increased by treatments with high salt or basic pH (Fig. 1A). As expected, CoxIIp, an integral membrane component of the electron transport complex IV, was



**Fig. 1.** TM1 and TM2 anchor l-Msp1p to mitochondrial membranes. Mitochondria (Mito) were prepared from an *msp1*<sup>+</sup> strain (A) or from the same strain expressing C-terminally HA-tagged Msp1p<sup>ΔTM1</sup> (B) or Msp1p<sup>ΔTM2</sup> (C) and disrupted by sonication. Intact organelles were eliminated and membrane-bound (P) and soluble (S) proteins were separated either directly (–) or following treatment with 1 M NaCl, 0.1 M  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , pH 11 or 0.5% SDS. Following SDS-PAGE and western blotting, proteins were visualized with anti-Msp1p, or anti-HA antibodies, and with anti F1-ATP synthase and anti-CoxIIp antibodies for control peripheral or integral membrane proteins, respectively.

fully resistant to extraction by carbonate and salts, whereas the  $\alpha$  and  $\beta$  subunits of the peripheral F1-ATP synthase were partially or readily extracted with NaCl or  $\text{Na}_2\text{CO}_3$ , respectively. Each protein analyzed was totally solubilized by detergent. In these experiments, s-Msp1p and l-Msp1p thus behave as peripheral and membrane-anchored proteins, respectively.

The l-Msp1p form, which is cleaved after the mitochondrial import sequence at residue 59 (Pelloquin et al., 1999), contains the two predicted membrane-spanning segments (residues L86–A103; TM1 and P193–V211; TM2) that probably make it resistant to alkali extraction (Fig. 2A). The N-terminus of s-Msp1p, determined by Edman degradation (TOPLAB) begins with the SVDSV sequence, indicating that the short form of Msp1p is generated by proteolytic cleavage at the end of TM2 after residue L209 (see Fig. 2A). The weaker association of s-Msp1p to membranes could thus relate to its lack of TM1 and TM2.

### The two transmembrane segments of Msp1p contribute to the anchoring of the dynamin to mitochondrial membranes

To investigate the specific roles of TM1 and TM2 in the association of Msp1p with mitochondrial membranes in vivo, we deleted each segment and expressed the corresponding variants in *S. pombe*. Immunoblot analyses were performed using anti-Msp1p antibodies on total protein extracts (Fig. 2B). The precursor (p-Msp1p) and the long and short isoforms of Msp1p were detected in cells expressing either the wild-type (Msp1p) or the TM1-deleted dynamin (Msp1p<sup>ΔTM1</sup>). In the latter case, a diminution of the amount of l-Msp1p<sup>ΔTM1</sup> was reproducibly noticed. Deletion of TM2 (Msp1p<sup>ΔTM2</sup>) yielded a correspondingly shorter form l-Msp1p<sup>ΔTM2</sup> and prevented formation of s-Msp1p because TM2, which contains

the protease maturation site, was absent (Fig. 2A). No signals were detected in non-transfected cells because of the low abundance of endogenous Msp1p.

C-terminally HA-tagged forms of Msp1p, Msp1p<sup>ΔTM1</sup> and Msp1p<sup>ΔTM2</sup> were used to monitor their association with mitochondrial membranes. HA-tagged Msp1p maintained its function, as assessed by its ability to complement the deletion of

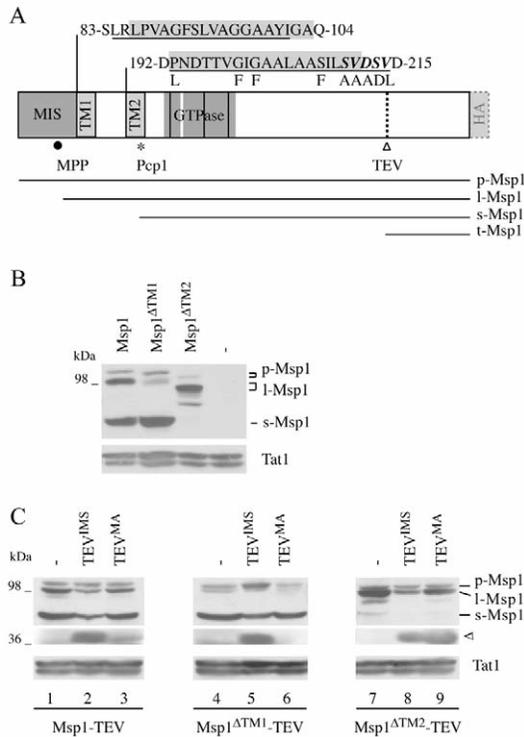
the *msp1*<sup>+</sup> gene (Guillou et al., 2005). Both l-Msp1p<sup>ΔTM1</sup> and l-Msp1p<sup>ΔTM2</sup> remained associated with mitochondrial membranes after treatment with NaCl, or basic pH (Fig. 1B,C). In cells expressing Msp1p<sup>ΔTM1</sup>, the s-Msp1p isoform was identical to the wild-type s-Msp1p and thus behaved similarly (Fig. 1B). These experiments led us to conclude that each of the two hydrophobic domains participate equally in anchoring l-Msp1p to membranes. Removal of these two domains is necessary to produce the peripherally membrane-associated isoform s-Msp1p. Other region(s) of the molecule might also be involved, because a percentage of s-Msp1p was resistant to salt and alkali extraction.

#### Deletion of TM2, but not TM1, alters the sub-mitochondrial localization of Msp1p

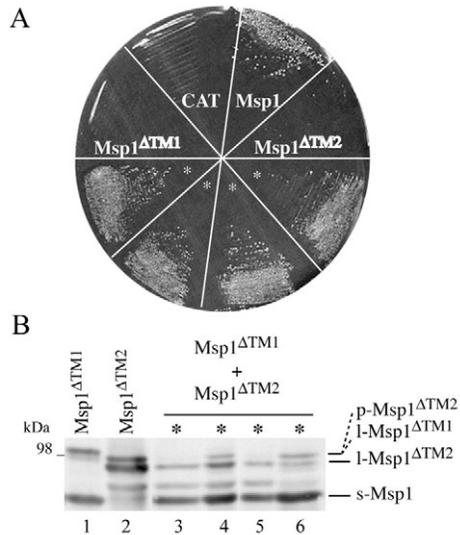
To investigate the role of TM1 and TM2 in the sub-mitochondrial localization of Msp1p we used a method previously applied to Mgm1p (Wong et al., 2003) and Msp1p (Guillou et al., 2005). A TEV protease cleavage site was introduced (Fig. 2A) into the C-terminally HA tagged forms of wild-type (Msp1p-TEV), TM1-deleted (Msp1p<sup>ΔTM1</sup>-TEV) or TM2-deleted (Msp1p<sup>ΔTM2</sup>-TEV) Msp1p. These constructs were co-transfected into *S. pombe* together with the TEV protease targeted either to the inter-membrane space (IMS) (TEV<sup>IMS</sup>) or to the matrix (TEV<sup>MA</sup>). The expected 32 kDa peptide, corresponding to the C-terminal fragment containing the HA tag (Fig. 2A, t-Msp1p), was observed for both Msp1p-TEV and Msp1p<sup>ΔTM1</sup>-TEV when co-expressed with TEV<sup>IMS</sup> (Fig. 2C, lanes 2 and 5), but not with TEV<sup>MA</sup> (Fig. 2C, lanes 3 and 6), or without the protease (Fig. 2C, lanes 1 and 4). The TEV cleavage product of Msp1p<sup>ΔTM2</sup>-TEV was observed in cells co-expressing either TEV<sup>MA</sup> or TEV<sup>IMS</sup> (Fig. 2C, lanes 8 and 9). These results indicate that the C-terminus of wild-type or TM1-deleted Msp1p was accessible only to the IMS-targeted protease, whereas the TM2-deleted dynamin exposed its C-terminal region to the IMS and matrix in equal proportions. Thus, the deletion of TM1 did not alter the sub-mitochondrial localization of Msp1p, and removal of TM2 led to a partial delocalization within the matrix. This delocalization was due to the loss of TM2 hydrophobicity because Msp1p<sup>mutTM2</sup> that only produced a long isoform (as did Msp1p<sup>ΔTM2</sup>) but maintained an hydrophobic TM2 (Fig. 2A), also preserved a correct orientation to the IMS (supplementary material Fig. S1).

#### TM1 and TM2 are essential for the function of Msp1p

As it is a member of the dynamin family, the relationship of Msp1p with the mitochondrial membrane is expected to be crucial for its function (Praefcke and McMahon, 2004). To study this issue, we examined the capacity of Msp1p deleted for either of its two transmembrane segments to complement the deletion of the *msp1*<sup>+</sup> gene, which is essential for viability in *S. pombe* (Pelloquin et al., 1998). Each HA-tagged mutant Msp1p<sup>ΔTM1</sup> and Msp1p<sup>ΔTM2</sup> was transfected into a diploid strain containing a wild-type and a disrupted allele of *msp1*<sup>+</sup>. After sporulation complementation of haploid  $\Delta$ *msp1*<sup>+</sup> cells was assessed by their ability to grow on minimal medium (Fig. 3A). Full complementation was observed upon expression of Msp1p, whereas cells that expressed the bacterial CAT died. TM1 and TM2 deletion mutants failed to complement the *msp1*<sup>+</sup> deletion and thus did not support the function of Msp1p. The lack of complementation of Msp1p<sup>ΔTM2</sup> was not due to its mislocalization because Msp1p<sup>mutTM2</sup> that was correctly exposed to the IMS (supplementary material Fig. S1) also failed to rescue *msp1*<sup>+</sup> gene deletion (not shown). Complementation was, however, obtained when both deletion mutants were co-expressed



**Fig. 2.** Deletion of TM2 but not TM1 alters the maturation of Msp1p and its sub-mitochondrial localization. (A) Schematic representation of the structure of Msp1p showing the mitochondrial import sequence (MIS), the GTPase domain containing the three consensus GTP-binding sequences (black bars), and the dynamin signature (white bar). The sequences surrounding the two predicted hydrophobic transmembrane segments (TM1 and TM2, grey boxes) are shown with the *SVDSV* N-terminal residues determined for s-Msp1p in bold italics. Residues deleted in Msp1p<sup>ΔTM1</sup> and Msp1p<sup>ΔTM2</sup> are underlined and substitutions introduced in Msp1p<sup>mutTM2</sup> (cleavage region and  $\alpha$ -helix-breaking residues important for the activity of Pcp1p) are indicated below the wild-type TM2 sequence. The location of the TEV cleavage sequence introduced in the Msp1p ORF between S665 and P666, and the C-terminal HA tag are indicated by a dotted line and box, respectively. Cleavage sites for the mitochondrial matrix peptidase ( $\bullet$ , MPP), the rhomboid protease ( $\ast$ , Pcp1) and the TEV protease ( $\Delta$ , TEV) are shown. The full-length precursor Msp1p (p-Msp1p), mitochondrial matrix peptidase-matured Msp1p (l-Msp1p), mitochondrial rhomboid protease-matured Msp1p (s-Msp1p) and TEV cleavage product of Msp1p (t-Msp1p) are shown. (B) An *msp1*<sup>+</sup> strain was transfected or not (–) with wild-type Msp1p, or Msp1p<sup>ΔTM1</sup>, or Msp1p<sup>ΔTM2</sup> plasmids under the control of the moderate *nmt1*<sup>+</sup> promoter. Total protein extracts obtained from cells grown for 24 hours without thiamine, were analyzed by SDS-PAGE and western blotting with anti-Msp1p or anti-tubulin (Tat1) antibodies as a loading control. (C) An *msp1*<sup>+</sup> strain was transfected with plasmids containing an Msp1p open reading frame with a C-terminal HA tag and a TEV protease cleavage site – that specified wild-type Msp1p (Msp1p-TEV), Msp1p<sup>ΔTM1</sup> (Msp1p<sup>ΔTM1</sup>-TEV) or Msp1p<sup>ΔTM2</sup> (Msp1p<sup>ΔTM2</sup>-TEV) – either alone (–) or in combination with a TEV protease targeted to the IMS (TEV<sup>IMS</sup>) or to the matrix (TEV<sup>MA</sup>), all under the control of the moderate *nmt1*<sup>+</sup> promoter. Total protein extracts of cells grown for 24 hours without thiamine were analyzed by SDS-PAGE and western blotting with anti-HA antibodies. The arrowhead indicates the t-Msp1p TEV cleavage product.

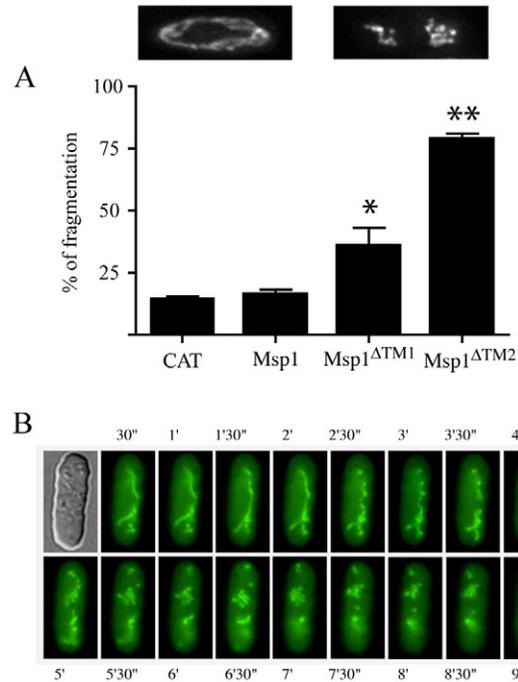


**Fig. 3.** TM1 and TM2 are essential for the function of Msp1p. (A) An *msp1<sup>+</sup>/Δmsp1* diploid strain was transfected with CAT, or C-terminally HA-tagged versions of wild-type Msp1p, Msp1p<sup>ΔTM1</sup> or Msp1p<sup>ΔTM2</sup> plasmids under the control of the moderate *nmt1<sup>+</sup>* promoter. The ability of these constructs to rescue the *msp1<sup>+</sup>* gene deletion was verified by plating spores obtained from the transfected diploids on minimal medium lacking thiamine. Growth of spores obtained from four clones co-transfected with both Msp1p<sup>ΔTM1</sup> and Msp1p<sup>ΔTM2</sup> is shown in the lower half (asterisks). (B) Total protein extracts from four haploid *Δmsp1<sup>+</sup>* strains co-expressing Msp1p<sup>ΔTM1</sup> and Msp1p<sup>ΔTM2</sup> (asterisks, lanes 3-6), and from haploid *msp1<sup>+</sup>* strains expressing either Msp1p<sup>ΔTM1</sup> (lane 1) or Msp1p<sup>ΔTM2</sup> (lane 2) were analyzed by SDS-PAGE and western blotting with anti-HA antibodies.

(Fig. 3A). The presence of the two mutants in haploid rescued *Δmsp1<sup>+</sup>* strains was monitored by immunoblot analysis (Fig. 3B). Anti-HA antibodies revealed different isoforms of Msp1p: s-Msp1p, which was generated by cleavage of l-Msp1p<sup>ΔTM1</sup>; l-Msp1p<sup>ΔTM2</sup>; and a band that could correspond to either l-Msp1p<sup>ΔTM1</sup> or p-Msp1p<sup>ΔTM2</sup>, which migrate at the same position within the gel. Thus neither Msp1p<sup>ΔTM1</sup> nor Msp1p<sup>ΔTM2</sup> are fully functional, but intermolecular complementation can restore viability of *Δmsp1<sup>+</sup>* cells.

#### Mitochondrial morphology requires the integrity of the two transmembrane segments of Msp1p

We have previously shown that Msp1p participates in the control of mitochondrial membrane dynamics (Guillou et al., 2005), as do its orthologues Mgm1p and OPA1 (Cipolat et al., 2004; Griparic et al., 2004; Olichon et al., 2003; Wong et al., 2003). The effects of TM1- or TM2-deleted Msp1p mutants on mitochondrial morphology were thus examined by fluorescence microscopy after transfection of *msp1<sup>+</sup>* strains harboring a genome-tagged mCherry-Arg11 gene (Snaith et al., 2005), which encodes a mitochondrial protein. As previously shown (Guillou et al., 2005), low-level expression of wild-type Msp1p had no effect on mitochondrial morphology; after 24 hours of induction a majority of transfected cells contained a tubular mitochondrial network that was similar to that of cells expressing the unrelated CAT gene (Fig. 4A). On the contrary, after a similar expression period of Msp1p<sup>ΔTM1</sup> or Msp1p<sup>ΔTM2</sup> (or Msp1p<sup>mutTM2</sup>, supplementary material Fig. S1) 35% or 80% of the cells, respectively, had fragmented mitochondria that appeared as small individual dots more or less clustered (Fig. 4);

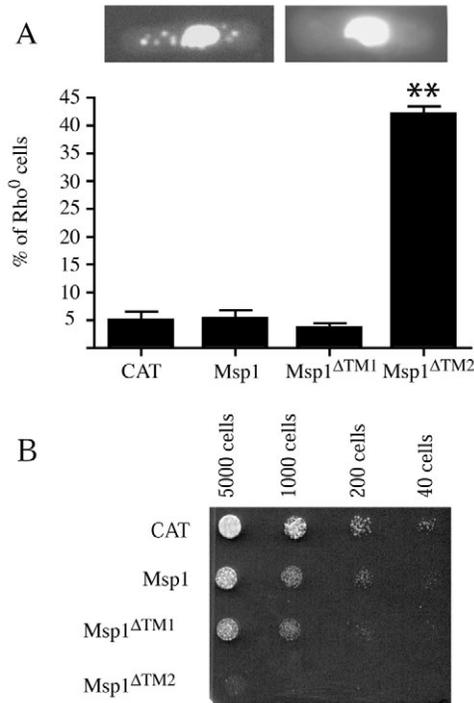


**Fig. 4.** Mitochondrial morphology requires the integrity of the two transmembrane segments of Msp1p. (A) An *msp1<sup>+</sup>* strain expressing a genome-tagged mCherry-Arg11 gene was transfected with CAT, wild-type Msp1p, Msp1p<sup>ΔTM1</sup> or Msp1p<sup>ΔTM2</sup> plasmids under the control of the *nmt1<sup>+</sup>* promoter. Cells were cultivated in medium without thiamine for 24 hours, and observed by fluorescence microscopy. Typical tubular or fragmented mitochondrial phenotypes (upper panels) were quantified after formaldehyde fixation. The lower graph shows the percentage of cells with fragmented mitochondria (mean  $\pm$  s.e.m. of four independent experiments;  $n > 300$  cells per condition; \* $P < 0.05$ , Msp1p<sup>ΔTM1</sup> versus Msp1p and CAT, and \*\* $P < 0.001$ , Msp1p<sup>ΔTM2</sup> versus Msp1p, CAT and Msp1p<sup>ΔTM1</sup>; Tukey's ANOVA test). (B) Time-lapse fragmentation of the mitochondrial network in a single cell expressing a mitochondrial GFP and Msp1p<sup>ΔTM2</sup>.

expression periods longer than 24 hours led to mitochondrial fragmentation in about 95% of the cells, Msp1p<sup>ΔTM2</sup> reaching this level faster than Msp1p<sup>ΔTM1</sup> (not shown). Fig. 4B exemplifies the process of mitochondrial fission occurring in a single cell upon overexpression of Msp1p<sup>ΔTM2</sup>. The mitochondrial fragmentation induced by overexpression of TM-deleted Msp1p variants is reminiscent of that observed in *msp1<sup>+</sup>*-deleted cells (Guillou et al., 2005), and suggests that these unfunctional mutants have a dominant-negative effect on mitochondrial morphology when overexpressed in wild-type cells.

#### Deletion of TM2 but not TM1 induces $\rho^0$ lethality

Because the loss of function of Msp1p obtained by deletion of the *msp1<sup>+</sup>* gene, by overexpression of dominant-negative GTPase or of C-terminally deleted dynamin mutants, resulted in the depletion of mtDNA and cell death (Guillou et al., 2005; Pelloquin et al., 1998), we wondered whether this would also be the case with the present mutants. Cultures of *msp1<sup>+</sup>* strains expressing wild-type Msp1p, Msp1p<sup>ΔTM1</sup>, or Msp1p<sup>ΔTM2</sup>, or CAT were maintained in exponential growth by daily dilution into fresh medium. After 5 days of expression, mitochondrial nucleoids were visualized by fluorescence microscopy using DAPI staining (Fig. 5A), and the viability of each strain was monitored by drop dilution assays (Fig.



**Fig. 5.** Deletion of TM2 but not TM1 in Msp1p induces  $\rho^0$  lethality. An *msp1*<sup>+</sup> strain was transfected with CAT, wild-type Msp1p, Msp1p $\Delta$ TM1 or Msp1p $\Delta$ TM2 plasmids under the control of the moderate *nmt1*<sup>+</sup> promoter, and cells were cultivated by daily dilution in fresh medium without thiamine for 5 days. (A) Cells were observed by fluorescence microscopy after formaldehyde fixation and DAPI staining. Upper panels exemplify typical wild-type (left) and  $\rho^0$  (right) cells. The lower graph shows the percentage of  $\rho^0$  cells (mean  $\pm$  s.e.m. of four independent experiments;  $n > 350$  cells per condition; \*\* $P < 0.001$ , Msp1p $\Delta$ TM2 versus CAT, Msp1p and Msp1p $\Delta$ TM1, Tukey's ANOVA test). (B) At day five, the indicated numbers of cells expressing the various constructs were spotted on minimal medium and grown for 8 days at 25°C.

5B). In 40% of the cells transfected with Msp1p $\Delta$ TM2, mitochondrial genomes were absent (Fig. 5A). This was not due to delocalization of Msp1p $\Delta$ TM2 in the matrix because a similar situation was observed with Msp1p<sup>mut</sup>TM2 (supplementary material Fig. S1). By comparison, expression of Msp1p $\Delta$ TM1, wild-type Msp1p or CAT led to only 5%  $\rho^0$  cells (Fig. 5A). The behavior of the mitochondrial genome could be correlated with cell viability. Although overexpression of wild-type Msp1p or Msp1p $\Delta$ TM1 had no significant effect on cell survival when compared with CAT, expression of Msp1p $\Delta$ TM2 (or Msp1p<sup>mut</sup>TM2, not shown) induced a lethal dominant-negative effect (Fig. 5B). This indicates that deletion or gross modifications of the second transmembrane domain of Msp1p drastically affects the maintenance of the mitochondrial genome and thus the viability of the petite-negative yeast *S. pombe*, whereas deletion of TM1 does not provoke these effects.

## Discussion

Although it is now accepted that the three orthologues of mitochondrial dynamin Mgm1p/Msp1p/OPA1 are localized to the IMS, some discrepancies still persist regarding their relationships with mitochondrial membranes. Mgm1p has been shown to be either peripherally or strongly associated with mitochondrial membranes (Herlan et al., 2003; Sesaki et al., 2003b; Wong et al., 2000), Msp1p

is anchored to the inner membrane (Pelloquin et al., 1999), and OPA1 binds more or less tightly to both mitochondrial membranes (Griparic et al., 2004; Olichon et al., 2002; Satoh et al., 2003). In this study, we compared membrane association of the two Msp1p isoforms that contain either both hydrophobic TM1 and TM2 regions (l-Msp1p) or none (s-Msp1p), with that of mutants deleted for either TM1 or TM2. The l-Msp1p isoform behaved as an integral membrane protein tightly associated with the membranes whereas s-Msp1p was partly extracted together with peripheral membrane proteins. This weaker membrane association of s-Msp1p correlated with the absence of TM1 and TM2, which contributed equally to anchor the l-Msp1p isoform to the mitochondrial membranes. The existence of several isoforms of the Mgm1p/Msp1p/OPA1 dynamin, each containing different sets of TM1 and TM2 because of alternative proteolytic cleavage and mRNA splicing (Delettre et al., 2001; Duvezin-Caubet et al., 2007; Griparic et al., 2007; Guillery et al., 2008; Herlan et al., 2004; Ishihara et al., 2006; Song et al., 2007), might explain the initial discrepancies reported in their localization and membrane association.

Although deletion of TM1 did not modify the mitochondrial localization of Msp1p, the lack of TM2 altered both its biogenesis and its localization. According to the model of alternative topogenesis of Mgm1p (Herlan et al., 2004), deletion or decreased hydrophobicity of TM1 abolishes its stop transfer properties that allow lateral diffusion and membrane insertion of l-Mgm1p, and leads to the exclusive formation of s-Mgm1p after Pcp1p cleavage at the C-terminus of TM2. If this model holds true for the biogenesis of Msp1p, the production of both l-Msp1p $\Delta$ TM1 and s-Msp1p isoforms upon expression of Msp1p $\Delta$ TM1 could be explained by the greater hydrophobicity of TM2 in Msp1p compared with Mgm1p. TM2 could thus possibly act as an alternative stop-transfer signal before Pcp1p cleavage. However, the levels of l-Msp1p $\Delta$ TM1 remained below those of wild-type l-Msp1p because TM2 has a lower hydrophobicity than TM1, and hence a less-efficient stop-transfer activity. The ability of TM2 to constitute a stop-transfer signal was substantiated here by the observation that deletion of TM2 resulted in a partial mislocalization of l-Msp1p $\Delta$ TM2 in the matrix whereas modifications in Msp1p<sup>mut</sup>TM2 that preserved its hydrophobicity also preserved a normal localization. According to the alternative topogenesis model of Mgm1p, arrest of the ATP-driven import occurs upon cleavage by Pcp1p leading to the release of the short isoform from the import motor. Consequently, in both *S. cerevisiae* and *S. pombe*, deletion or gross modifications of TM2, and of the rhomboid recognition sequence normally present in this domain, prevented the formation of the short isoform. Since l-Msp1p $\Delta$ TM2 was partially mislocalized to the matrix, whereas the corresponding l-Mgm1p isoform was totally present in the IMS (Herlan et al., 2004), it is suggested that, in contrast to Mgm1p, the part of MPP-cleaved l-Msp1p $\Delta$ TM2 that does not translate laterally into the IM using TM1, is completely pulled into the matrix when it is not released from the import machinery by protease cleavage. Together, our results suggest that, as is the case for OPA1, additional and/or different mechanisms possibly involving proteases other than Pcp1p, might operate during s-Msp1p biogenesis.

The importance of the association between Msp1p and the mitochondrial membrane is highlighted by the demonstration that both TM1 and TM2 are essential for viability. Expression of Msp1p $\Delta$ TM1 does not complement the deletion of the *msp1*<sup>+</sup> gene, although a long isoform (l-Msp1p $\Delta$ TM1) and a wild-type s-Msp1p are generated. Since l-Msp1p $\Delta$ TM1 is correctly located in the IMS and anchored to the mitochondrial membrane, we conclude that

TM1 is not only involved in the biogenesis of the dynamin isoforms but also has an essential function; this might relate to the presence of the AXXXG sequence, which mediates dimerization within membranes (Russ and Engelman, 2000). In this respect, *cis*-acting Mgm1p-Mgm1p interactions have been proposed to be important for inner-membrane fusion (Meeusen et al., 2006). Since the presence of l-Mgm1p and s-Mgm1p was shown to be necessary to rescue the deletion of *MGM1* (Herlan et al., 2003), the lack of complementation of  $\Delta msp1^+$  cells by expression of Msp1p<sup>ΔTM2</sup> might be due to the absence of s-Msp1p, even though a loss of function of l-Msp1p<sup>ΔTM2</sup> cannot be excluded. Nevertheless, when Msp1p<sup>ΔTM1</sup> is co-expressed with Msp1p<sup>ΔTM2</sup>, intermolecular complementation is observed that might result from Msp1p self-assembly (our unpublished results). In this regard, *trans*-acting Mgm1p-Mgm1p interactions between the GTPase domain and GED have been shown to be involved in inner-membrane fusion (Meeusen et al., 2006).

Expression of TM1- or TM2-deleted variants of Msp1p in wild-type yeast leads to a dominant-negative fragmentation of the mitochondrial network, whereas only overexpression of Msp1p<sup>ΔTM2</sup> induces a dominant-negative loss of mtDNA and death of the petite-negative *S. pombe*. In cells transfected with Msp1p<sup>ΔTM1</sup>, both l-Msp1p<sup>ΔTM1</sup> and s-Msp1p are overexpressed, but only the smaller form is functional. The l-Msp1p<sup>ΔTM1</sup> form, which is anchored to the mitochondrial membrane, might thus exert a dominant-negative effect on endogenous l-Msp1p, which, as has been proposed for Mgm1p (Sesaki et al., 2003a) and OPA1 (Ishihara et al., 2006), could be the fusogenic isoform of this dynamin. Alternatively, increased levels of s-Msp1p, leading to an imbalanced ratio of the two isoforms, could result in mitochondrial fragmentation by decreasing the availability of fusogenic l-Msp1p. The equilibrium between the short and long isoforms has indeed been shown to be crucial in *S. cerevisiae* (Herlan et al., 2003). In cells transfected with Msp1p<sup>ΔTM2</sup>, titration of endogenous l-Msp1p or s-Msp1p by l-Msp1p<sup>ΔTM2</sup>, the sole isoform overexpressed, could induce mitochondrial fragmentation or loss of mtDNA and cell death, respectively. These dominant-negative effects of Msp1p<sup>ΔTM2</sup> did not relate to its partial delocalization in the matrix, because Msp1p<sup>mutTM2</sup> had exactly the same effects while being correctly targeted to the IMS. This situation, where high levels of l-Msp1p<sup>ΔTM2</sup> titrate out endogenous s-Msp1p, is reminiscent of that reported in a *PCP1*-deleted *S. cerevisiae* strain, which does not produce the short form of the dynamin (Sesaki et al., 2003a). From these observations, we speculate that Msp1p functions require oligomerisation. Homo-oligomers of l-Msp1p, or hetero-oligomers with s-Msp1p where the long form predominates – since it has also been reported that both the long and short isoforms of Mgm1p and OPA1 are required for fusion (Herlan et al., 2003; Song et al., 2007) – might trigger membrane deformations leading to fusion. Other types of membrane modifications induced by hetero-oligomers where s-Msp1p predominates might be involved in mtDNA maintenance.

Our results provide the first demonstration that the role of the Msp1p dynamin in the control of mitochondrial morphology can be uncoupled from its function in genome maintenance, and show that this latter function is essential for cell viability. This conclusion was supported by analysis (not shown) of haploid strains derived from sporulation of  $\Delta msp1^+$  cells complemented by coexpression of Msp1p<sup>ΔTM1</sup> and Msp1p<sup>ΔTM2</sup> (Fig. 3A). The loss of mtDNA was rescued in eight independent clones, with proportions of ρ0 cells never exceeding 8%. Out of these, two had a wild-type, and six a

fragmented, mitochondrial morphology with no obvious correlation with the expression profile of the long and short isoforms of the dynamin. Such uncoupling of genome maintenance from mitochondrial morphology might parallel other observations showing that the roles of OPA1 in mitochondrial dynamics, apoptosis and cristae organization can be separated (Frezza et al., 2006; Olichon et al., 2007). Recent studies have shown that missense mutations in *OPA1* cause the accumulation of multiple mtDNA deletions in skeletal muscle (Amati-Bonneau et al., 2008; Hudson et al., 2008). Although the majority of OPA1 mutations are associated with a non-syndromic autosomal dominant atrophy (ADOA) (Ferre et al., 2005), these newly characterized mutations lead to a more complex syndrome consisting of a combination of ADOA with progressive external ophthalmoplegia, peripheral neuropathy, ataxia and deafness (ADOA-plus). Demonstrating that the role of the dynamin in mitochondrial dynamics can be uncoupled from its role in mtDNA maintenance might help to understand the distinct pathological mechanisms that lead to ADOA or ADOA-plus syndrome.

## Materials and Methods

### Plasmid constructions

Plasmids for expression of Myc-tagged versions of the tobacco etch virus (TEV) protease in the IMS (pREP42 TEV<sup>IMS</sup>) or in the matrix (pREP42 TEV<sup>MA</sup>), HA-tagged Msp1p containing a TEV protease consensus sequence (pREP41 Msp1p-TEV-HA), and mito-GFP have been described (Guillou et al., 2005). Deletions of the predicted hydrophobic transmembrane domains (TM1 and TM2) were performed by iPCR using sense and antisense primers, for which the first base was immediately adjacent to the 5' and 3' positions respectively of the sequences to be deleted. After PCR, the parental plasmid was digested to completion with *DpnI* and the amplified plasmid was gel-purified before ligation and transformation into *E. coli* TOP10<sup>+</sup>. Modified fragments were then reintroduced into the *Msp1*<sup>+</sup> coding region. When indicated, this region contained a TEV protease consensus sequence and a C-terminal HA epitope, to yield pREP41 Msp1p<sup>ΔTM1</sup>-TEV or pREP41 Msp1p<sup>ΔTM2</sup>-TEV. In Msp1p<sup>ΔTM1</sup>, 18 residues were deleted between S83 and G102. In Msp1p<sup>ΔTM2</sup>, 22 residues were removed between D192 and D215 and replaced with L residue. Msp1p<sup>mutTM2</sup> was engineered by inserting cohesive synthetic oligonucleotides with the desired sequence into the *Bgl*II site created at the D-L deletion junction of this latter construct. Each modification was verified by two-strand sequencing.

### Yeast strains and cultures

Fission yeast growth media (EMM, ME) were from Bio101 (La Jolla, CA). *S. pombe* strains carrying the indicated plasmids were transfected by electroporation using the Bio-Rad Gene Pulser. Transformants were selected by growth on medium lacking leucine or uracil. Cells carrying plasmids with the *nmt1*<sup>+</sup> promoter were grown in the presence of 4 μM thiamine to repress Msp1 expression, which was induced by three washes in minimal medium and further growth at 25°C in the absence of thiamine. Sporulation was obtained by transfer of diploids to ME medium.

### Preparation of total protein extracts

Cells ( $5 \times 10^8$ ) were harvested and suspended at 4°C in 200 μl lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH 7.4, 250 mM NaCl, 5 mM EDTA, 1 mM DTT, 1% Triton X-100 and 1% NP40) containing a cocktail of protease inhibitors (Roche). After addition of an equal volume of 500 μm glass beads, samples were vortexed using the Fast-Prep (Bio101 Inc) until approximately 90% of the cells were disrupted. The soluble protein fraction was recovered by two centrifugations of 10 minutes at  $20,000 \times g$  at 4°C.

### Preparation and fractionation of mitochondria

Isolated mitochondria (Pelloquin et al., 1999) were disrupted by sonication (Chiron et al., 2007) in hypo-osmotic MEBI buffer (0.06 M mannitol, 2 mM EGTA, 10 mM imidazole HCl pH 6.4 and 0.01% BSA). Intact mitochondria were eliminated by centrifugation ( $12,000 \times g$ , 4°C, 10 minutes) before sedimentation of mitochondrial membranes by ultracentrifugation ( $100,000 \times g$ , 30 minutes, 4°C). The pellet was suspended in the same buffer either alone or containing 1 M NaCl, 0.1 M Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> pH 11 or 0.5% SDS. Samples were incubated for 1 hour at 4°C, and centrifuged ( $100,000 \times g$ , 30 minutes, 4°C) to separate extracted proteins from the membrane pellets.

### Analysis of total and mitochondrial protein extracts

Total cellular (150 μg) or mitochondrial proteins (100 μg) were boiled for 3 minutes in Laemmli sample buffer, separated by 7.5% SDS-PAGE and transferred onto Protran membrane (Schleicher and Schuell). Immunodetection was performed with the

chemiluminescence detection kit from NEN, using antibodies as follows: anti-HA (1:5000, Boehringer), purified anti-Msp1p 1:400 (Pelloquin et al., 1999), anti-Tat-1 (1:1000, provided by Sylvie Tournier), anti-F1-ATPase (1:20,000, a gift from Marc Boutry), anti-CoxIIp (1:5000, a gift from Nathalie Bonnefoy), anti-rabbit IgG-HRP and anti-mouse IgG-HRP (1:5000, New England Biolabs).

### Cytological observations

*S. pombe* cells expressing either a genome-tagged mCherry-Arg11 gene or a mito-GFP were fixed, or not, in 3.7% formaldehyde for 10 minutes and observed using Leica DM5000B or TCS SP2 microscopes. DAPI staining was performed as described (Moreno et al., 1991).

We thank Janet Shaw (University of Utah, Salt Lake City, UT), Jodi Nunnari (University of California, Davis, CA) and Michael Yaffe (University of California, San Diego, La Jolla, CA) for providing vectors; Marc Boutry (University of Louvain, Belgium), Sylvie Tournier (UMR5088, Toulouse, France) and Nathalie Bonnefoy (CGM, Gif-sur-Yvette, France) for providing antibodies; and Kenneth Sawin (University of Edinburgh, UK) and Roger Tsien (University of California, San Diego, CA) for the mCherry vector. Helpful discussions with members of the lab, and correction of the manuscript by Sheryl Goldstone are acknowledged. This work was supported by grants from the Centre National de la Recherche Scientifique, Université Paul Sabatier, Association Française contre les Myopathies, Rétina France, Agence Nationale pour la Recherche and Association contre les Maladies Mitochondriales. E.G. was a recipient of a fellowship from Association pour la Recherche sur le Cancer.

### References

- Amati-Bonneau, P., Valentino, M. L., Reynier, P., Gallardo, M. E., Bornstein, B., Boissiere, A., Campos, Y., Rivera, H., de la Aleja, J. G., Carroccia, R. et al. (2008). OPA1 mutations induce mitochondrial DNA instability and optic atrophy 'plus' phenotypes. *Brain* **131**, 338-351.
- Baxter, R. V., Ben Othmane, K., Rochelle, J. M., Stajich, J. E., Hulette, C., Dew-Knight, S., Hentati, F., Ben Hamida, M., Bel, S., Stenger, J. E. et al. (2002). Ganglioside-induced differentiation-associated protein-1 is mutant in Charcot-Marie-Tooth disease type 4A/8q21. *Nat. Genet.* **30**, 21-22.
- Bleazard, W., McCaffery, J. M., King, E. J., Bale, S., Mozdy, A., Tieu, Q., Nunnari, J. and Shaw, J. M. (1999). The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast. *Nat. Cell Biol.* **1**, 298-304.
- Chen, X. J. and Butow, R. A. (2005). The organization and inheritance of the mitochondrial genome. *Nat. Rev. Genet.* **6**, 815-825.
- Chiron, S., Gaisne, M., Guillou, E., Belenguer, P., Clark-Walker, G. D. and Bonnefoy, N. (2007). Studying mitochondria in an attractive model: *Schizosaccharomyces pombe*. *Methods Mol. Biol.* **372**, 91-105.
- Cipolat, S., de Brito, O. M., Dal Zilio, B. and Scorrano, L. (2004). OPA1 requires mitofusin 1 to promote mitochondrial fusion. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **101**, 15927-15932.
- Cuesta, A., Pedrola, L., Sevilla, T., Garcia-Planells, J., Chumillas, M. J., Mayordomo, F., LeGuern, E., Marin, I., Vilchez, J. J. and 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**, 22-25.
- Delettre, C., Lenaers, G., Griffoin, J. M., Gigarel, N., Lorenzo, C., Belenguer, P., Pelloquin, L., Grosgeorge, J., Turc-Carel, C., Perret, E. et al. (2000). Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat. Genet.* **26**, 207-210.
- Delettre, C., Griffoin, J. M., Kaplan, J., Dollfus, H., Lorenz, B., Faivre, L., Lenaers, G., Belenguer, P. and Hamel, C. P. (2001). Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum. Genet.* **109**, 584-591.
- Duvezin-Caubet, S., Koppen, M., Wagoner, J., Zick, M., Israel, L., Bernacchia, A., Jagasia, R., Rugarli, E. I., Imhof, A., Neupert, W. 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.
- Fekkes, P., Shepard, K. A. and Yaffe, M. P. (2000). Gag3p, an outer membrane protein required for fission of mitochondrial tubules. *J. Cell Biol.* **151**, 333-340.
- Ferre, M., Amati-Bonneau, P., Tourmen, Y., Malthiery, Y. and Reynier, P. (2005). eOPA1: an online database for OPA1 mutations. *Hum. Mutat.* **25**, 423-428.
- Frezza, C., Cipolat, S., Martins de Brito, O., Micaroni, M., Beznoussenko, G. V., Rudka, T., Bartoli, D., Polishuck, R. S., Dhanil, N. N., De Strooper, B. et al. (2006). OPA1 controls apoptotic cristae remodeling independently from mitochondrial fusion. *Cell* **126**, 177-189.
- Gripatic, L., van der Wel, N. N., Orozco, I. J., Peters, P. J. and van der Bliek, A. M. (2004). Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. *J. Biol. Chem.* **279**, 18792-18798.
- Gripatic, 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.
- Guillery, O., Malka, F., Landes, T., Guillou, E., Blackstone, C., Lombes, A., Belenguer, P., Arnoult, D. and Rojo, M. (2008). Metalloprotease-mediated OPA1 processing is modulated by the mitochondrial membrane potential. *Biol. Cell* **100**, 315-325.
- 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.
- Herlan, M., Vogel, F., Bornhvd, 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.
- Herlan, M., Bornhvd, 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.
- Hermann, G. J., Thatcher, J. W., Mills, J. P., Hales, K. G., Fuller, M. T., Nunnari, J. and Shaw, J. M. (1998). Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J. Cell Biol.* **143**, 359-373.
- Hoppins, S., Lackner, L. and Nunnari, J. (2007). The machines that divide and fuse mitochondria. *Annu. Rev. Biochem.* **76**, 751-780.
- Hudson, G., Amati-Bonneau, P., Blakely, E. L., Stewart, J. D., He, L., Schaefer, A. M., Griffiths, P. G., Ahlqvist, K., Suomalainen, A., Reynier, P. et al. (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**, 329-337.
- Ishihara, N., Fujita, Y., Oka, T. and Mihara, K. (2006). Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *EMBO J.* **25**, 2966-2977.
- John, G. B., Shang, Y., Li, L., Renken, C., Mannella, C. A., Selker, J. M., Rangell, L., Bennett, M. J. and Zha, J. (2005). The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol. Biol. Cell* **16**, 1543-1554.
- Jones, B. A. and Fangman, W. L. (1992). Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes Dev.* **6**, 380-389.
- Karbowski, M., Jeong, S. Y. and Youle, R. J. (2004). Endophilin B1 is required for the maintenance of mitochondrial morphology. *J. Cell Biol.* **166**, 1027-1039.
- Mannella, C. A. (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 542-548.
- McQuibban, G. A., Saurya, S. and Freeman, M. (2003). Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature* **423**, 537-541.
- Meeusen, S., DeVay, R., Block, J., Cassidy-Stone, A., Wayson, S., McCaffery, J. M. and Nunnari, J. (2006). Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell* **127**, 383-395.
- Messerschmitt, M., Jakobs, S., Vogel, F., Fritz, S., Dimmer, K. S., Neupert, W. and Westermann, B. (2003). The inner membrane protein Mdm33 controls mitochondrial morphology in yeast. *J. Cell Biol.* **160**, 553-564.
- Moreno, S., Klar, A. and Nurse, P. (1991). Molecular genetic analysis of fission yeast *Schizosaccharomyces pombe*. In *Guide To Yeast Genetics and Molecular Biology*, vol. 194 (ed. C. Guthrie and G. Fink), pp. 795-826. New York: Academic Press.
- Niemann, A., Ruegg, M., La Padula, V., Schenone, A. and 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**, 1067-1078.
- Okamoto, K. and Shaw, J. M. (2005). Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. *Annu. Rev. Genet.* **39**, 503-536.
- Olichon, A., Emorine, L. J., Descoins, E., Pelloquin, L., Brichese, L., Gas, N., Guillou, E., Delettre, C., Valette, A., Hamel, C. P. 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.
- Olichon, A., Baricault, L., Gas, N., Guillou, E., Valette, A., Belenguer, P. and 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**, 7743-7746.
- Olichon, A., Guillou, E., Delettre, C., Landes, T., Arnaune-Pelloquin, L., Emorine, L. J., Mils, V., Daloyau, M., Hamel, C., Amati-Bonneau, P. et al. (2006). Mitochondrial dynamics and disease, OPA1. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 500-509.
- Olichon, A., Elachouri, G., Baricault, L., Delettre, C., Belenguer, P. and 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**, 682-692.
- Paumard, P., Vaillier, J., Couлары, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Brethes, D., di Rago, J. P. and Velours, J. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* **21**, 221-230.
- 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.
- Pelloquin, L., Belenguer, P., Menon, Y., Gas, N. and Ducommun, B. (1999). Fission yeast Msp1 is a mitochondrial dynamin related protein. *J. Cell Sci.* **112**, 4151-4161.
- Praefcke, G. J. and McMahon, H. T. (2004). The dynamin superfamily: universal membrane tubulation and fission molecules? *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **5**, 133-147.
- Russ, W. P. and Engelman, D. M. (2000). The GxxxG motif: a framework for transmembrane helix-helix association. *J. Mol. Biol.* **296**, 911-919.
- Satoh, M., Hamamoto, T., Seo, N., Kagawa, Y. and Endo, H. (2003). Differential sublocalization of the dynamin-related protein OPA1 isoforms in mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **300**, 482-493.

- Sesaki, H. and Jensen, R. E. (2001). UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.* **152**, 1123-1134.
- Sesaki, H., Southard, S. M., Hobbs, A. E. and Jensen, R. E. (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**, 276-283.
- Sesaki, H., Southard, S. M., Yaffe, M. P. and Jensen, R. E. (2003b). Mgm1p, a dynamin-related GTPase, is essential for fusion of the mitochondrial outer membrane. *Mol. Biol. Cell* **14**, 2342-2356.
- Snaith, H. A., Samejima, I. and Sawin, K. E. (2005). Multistep and multimode cortical anchoring of tea1p at cell tips in fission yeast. *EMBO J.* **24**, 3690-3699.
- 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.
- Tondera, D., Czauderna, F., Paulick, K., Schwarzer, R., Kaufmann, J. and Santel, A. (2005). The mitochondrial protein MTP18 contributes to mitochondrial fission in mammalian cells. *J. Cell Sci.* **118**, 3049-3059.
- Wong, E. D., Wagner, J. A., Gorsich, S. W., McCaffery, J. M., Shaw, J. M. and Nunnari, J. (2000). The dynamin-related GTPase, Mgm1p, is an intermembrane space protein required for maintenance of fusion competent mitochondria. *J. Cell Biol.* **151**, 341-352.
- Wong, E. D., Wagner, J. A., Scott, S. V., Okreglak, V., Holewinski, T. J., Cassidy-Stone, A. and Nunnari, J. (2003). The intramitochondrial dynamin-related GTPase, Mgm1p, is a component of a protein complex that mediates mitochondrial fusion. *J. Cell Biol.* **160**, 303-311.
- Zuchner, S., Mersiyanova, I. V., Muglia, M., Bissar-Tadmouri, N., Rochelle, J., Dadali, E. L., Zappia, M., Nelis, E., Patitucci, A., Senderek, J. et al. (2004). Mutations in the mitochondrial GTPase mitofusin 2 cause Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A. *Nat. Genet.* **36**, 449-451.

## **Annexe II :**

**Leroy et al., (2010). Processing of the dynamin Msp1p in *S. pombe* reveals an evolutionary switch between its orthologs Mgm1p in *S. cerevisiae* and OPA1 in mammals FEBS Lett, 584, 3153-57.**





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

Ingrid Leroy<sup>1</sup>, Farnoosh Khosrobakhsh<sup>1</sup>, 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 1 June 2010

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](mailto:pascale.belenguer@cict.fr) (P. Belenguer).

<sup>1</sup> 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*<sup>+</sup> ( $\Delta$ *atp1*), *atp2*<sup>+</sup> ( $\Delta$ *atp2*), *atp3*<sup>+</sup> ( $\Delta$ *atp3*) and *anc1*<sup>+</sup> ( $\Delta$ *anc1*) 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].

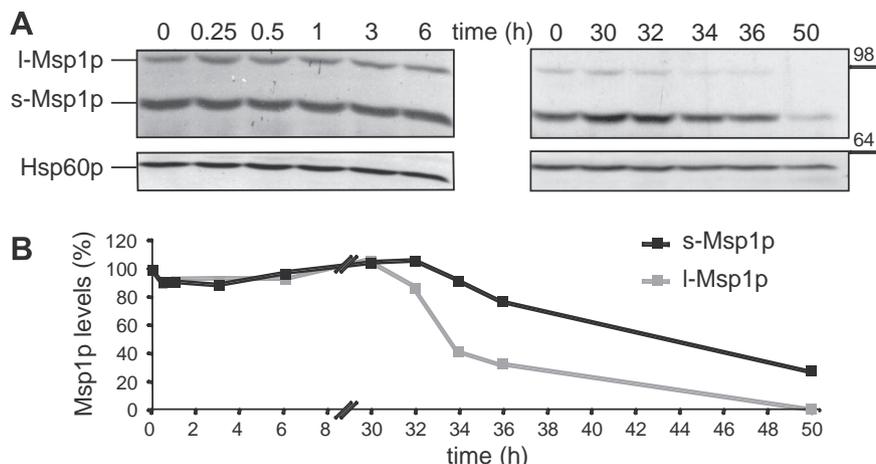
Deleted and control wild-type strains (Table 1) were exponentially grown ( $0.5\text{--}1 \times 10^7$  cells/ml) at 25 °C in glucose rich medium (YES) provided by Formedium (Norfolk, UK) or in home-made respiratory medium containing 1% yeast extract, 2% bactopectone, 0.1% glucose, 3% glycerol and 3% ethanol. Cells carrying plasmids with the *nmt1*<sup>+</sup> 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  $\mu$ M thiamine to repress Msp1 expression, which was induced by three washes in H<sub>2</sub>O 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	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>ade6-M210 ura4-D18 leu1-32 arg11</i> <sup>+</sup> ::mCherry
$\Delta$ <i>rh1</i>	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>ade6-M210 ura4-D18 leu1-32 ASPBC13E7.11::kanMX6 arg11</i> <sup>+</sup> ::mCherry
$\Delta$ <i>rh2</i>	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>ade6-M216 ura4-D18 leu1-32 ASPBP4H10.10::natMX6 arg11</i> <sup>+</sup> ::mCherry
$\Delta$ m-AAA	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>ade6-M210 ura4-D18 leu1-32 ASPBC543.09::kanMX6 arg11</i> <sup>+</sup> ::mCherry
$\Delta$ <i>yme1</i>	<i>h</i> <sup>-</sup> <i>ade6-M210 ura4-D18 leu1-32 ASPCC965.04c::hphMX6 arg11</i> <sup>+</sup> ::mCherry
$\Delta$ <i>atp1</i>	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>leu1-32 ura4-D18 atp1</i> ::kanMX6
$\Delta$ <i>atp2</i>	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>leu1-32 ura4-D18 atp2</i> ::kanMX6
$\Delta$ <i>atp3</i>	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>ade 6-M216 ura 4-D18 leu 1-32 atp3</i> ::kanMX6
$\Delta$ <i>anc1</i>	<i>h</i> <sup>+</sup> <i>leu 1-32 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  $\mu$ g/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* value were determined by 2-sided test.

### 2.3. Cytological observation

*S. pombe* cells expressing a genome mCherry-tagged *arg11<sup>+</sup>* 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.

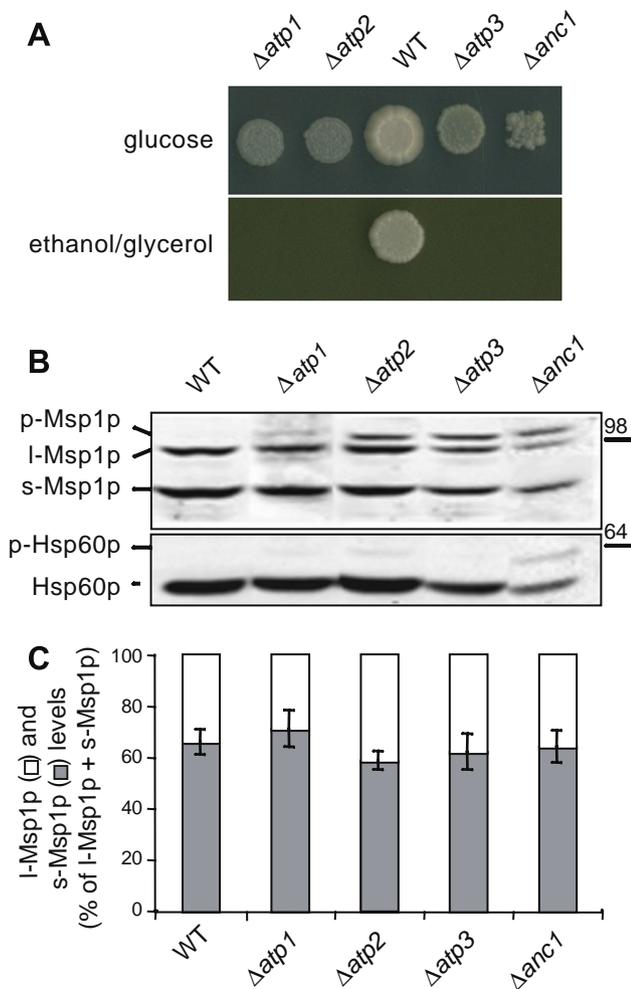
The influence of mitochondrial ATP levels on Msp1p cleavage was evaluated by analyzing the ratio of Msp1p isoforms in strains with individual deletion of the genes coding for the alpha, beta or gamma subunits of the ATP synthase ( $\Delta atp1$ ,  $\Delta atp2$  and  $\Delta atp3$ , respectively), or for the ADP/ATP translocase *Anc1p* ( $\Delta anc1$ ). 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).

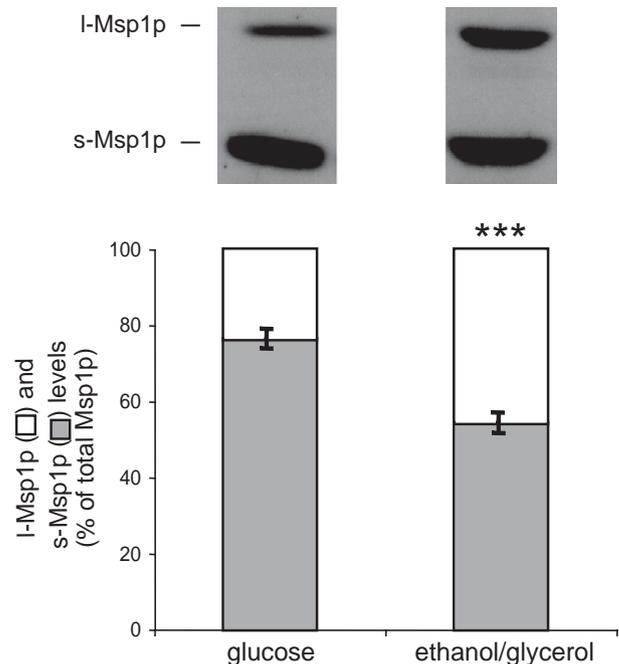
### 3.2. Msp1p is processed by both Rhomboid 1 and Paraplegin

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.

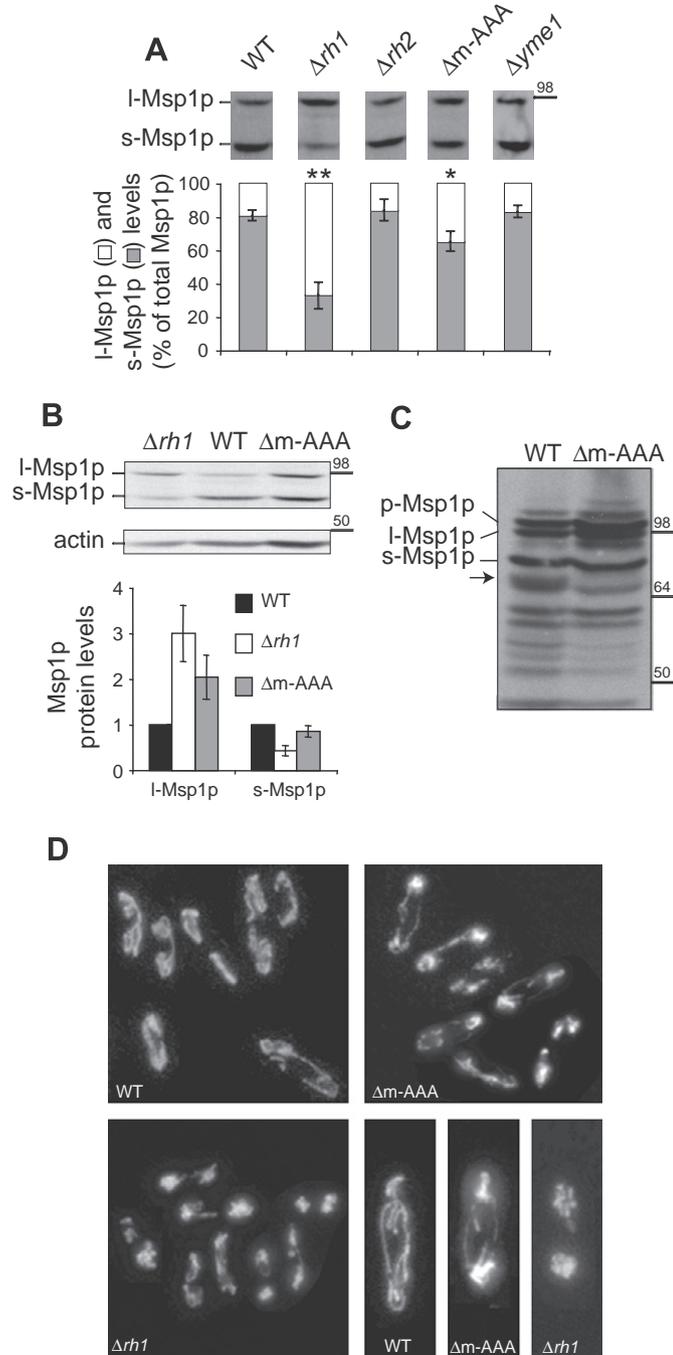
In cells deleted for the gene coding for Rhomboid 1 ( $\Delta rh1$ ), the *S. pombe* orthologue of Pcp1p and PARL, the long to short Msp1p isoforms ratio increased significantly; l-Msp1p contributing to 67% of total Msp1p compared to 19% in a control wild-type yeast (WT) (Fig. 4A). When normalized to actin, l-Msp1p levels increased 3-fold in  $\Delta rh1$  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 ( $\Delta atp1$ ), beta ( $\Delta atp2$ ) or gamma ( $\Delta atp3$ ) or for *Anc1p* ( $\Delta anc1$ ) 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,  $\Delta atp1$ ,  $\Delta atp2$ ,  $\Delta atp3$  and  $\Delta anc1$  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 ( $\Delta rh1$ ), Rhomboid 2 ( $\Delta rh2$ ), m-AAA protease ( $\Delta m\text{-AAA}$ ) and Yme1p ( $\Delta yme1$ ) 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,  $\Delta rh1$  or  $\Delta m\text{-AAA}$  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  $\Delta m\text{-AAA}$  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  $\Delta m\text{-AAA}$  strain. MW (kDa) of protein standards are indicated on the right. (D) WT,  $\Delta rh1$  or  $\Delta m\text{-AAA}$  cells expressing the mitochondrial mCherry-tagged Arg11p 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  $\Delta rh1$  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 ( $\Delta rh2$  and  $\Delta yme1$ , 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 ( $\Delta m\text{-AAA}$ , Fig. 4A). This was due to a 2-fold increase of I-Msp1p levels in  $\Delta m\text{-AAA}$  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  $\Delta m\text{-AAA}$  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  $\Delta m\text{-AAA}$  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  $\Delta rh1$  (Fig. 4) and in  $\Delta rh1/\Delta rh2$  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 ( $m\Delta\psi$ ) or apoptosis [29,30]. However, changes in Msp1p processing were observed neither upon  $m\Delta\psi$  decrease nor after *Oma1*<sup>+</sup> (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 l-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. Cell Biol.* 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., Bornhvd, 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., Bornhvd, 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., Vandehaute, 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] Polanshek, 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 uncouple 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 Prtjate, 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.

Author : Diot Alan

Title : Structure/functions relationship of the mitochondrial dynamin Msp1 : studies of its interactions with the membranes and of its biochemical activities.

Supervisor: Emorine Laurent

## SUMMARY

Mitochondrial dynamics is defined as an equilibrium between antagonistic fusion and fission forces that control mitochondrial morphology and play a major role in the regulation of mitochondrial functions. Our group identified one actor of mitochondrial dynamics, a GTPase of the dynamins' family called Msp1 in the *S.pombe* yeast and OPA1 in humans. OPA1 dysfunction leads to type 1 dominant optic atrophy. This dynamin acts in mitochondrial fusion and is involved in the maintenance of cristae structure and of mitochondrial DNA (mtDNA). It also controls respiration and ATP synthesis with impacts on cellular viability and apoptosis in higher eukaryotes. Given this large spectrum of action, our hypothesis is that Msp1/OPA1 acts on the organization of the mitochondrial inner membrane.

My PhD thesis was initiated to define the biochemical activities of Msp1 responsible for its biological effects, and the underlying structural basis. The role of two hydrophobic domains (TM1 and TM2) in Msp1 membrane association and functions was analysed *in vivo* in *S. pombe* cells. The biochemical properties of Msp1 in membranes organization were studied *in vitro* after purification and reconstitution into liposomes of phospholipid composition similar to that of the mitochondrial inner membrane.

Our *in vivo* studies showed that TM1 and TM2, and a third site of membrane interaction (SIM3), play distinct roles in Msp1 membrane association and in mitochondrial fusion and mtDNA maintenance. We suggest that the local organisation of the inner membrane varies with the relative proportions of the domains (TM1+TM2)/SIM3 reflecting the ratio between a long, l-Msp1, and a short, s-Msp1, isoform that naturally occur in *S. pombe* and differ by the presence of TM1 and TM2 in l-Msp1 only, SIM 3 being common to both.

In our *in vitro* system, the association and topology of l-Msp1 and s-Msp1 onto liposomes are similar to that observed in mitochondria. We showed that s-Msp1 has a GTPase activity similar to that of dynamins, with a low affinity for GTP and a high catalytic activity, and that a C-terminal coiled-coil motif is essential for this activity. With this system we show for the first time that Msp1 induces hemifusion of liposomes, indicating a direct role in membrane fusion. Hemifusion was induced by both l-Msp1 and s-Msp1 isoforms and was independent from GTPase activity and from self-assembly. SIM3, which is common to l-Msp1 and s-Msp1, may thus contain the structural requirements for hemifusion.

Altogether, this work allows us to propose a model in which Msp1 could act as a membrane organizer and as a molecular switch. At each of its sites of action, the dynamin could enter in distinct multi-protein complexes, the composition of which could depend on the relative proportions of each Msp1 isoforms, *i.e.* of the (TM1+TM2)/SIM3 ratio. Modification of this ratio by GTP hydrolysis would modulate local membrane organisation, and hence the composition and activity of these complexes.

Auteur : Diot Alan

Titre : Relations structure/fonction de la dynamine mitochondriale Msp1 : étude de ses relations avec la membrane interne et de ses activités biochimiques

Directeur de thèse : Emorine Laurent

Date et lieu de soutenance : 11 avril 2011, salle de conférence de l'IFR 109.

## RESUME

La dynamique mitochondriale est définie comme un équilibre entre des forces antagonistes de fusion et de fission des membranes qui modulent la morphologie des mitochondries et jouent un rôle majeur dans la régulation des fonctions de l'organelle. Notre équipe a identifié l'un des acteurs de cette dynamique, une GTPase de la famille des dynamines appelée Msp1 chez la levure *S. pombe* et OPA1 chez l'homme. Le dysfonctionnement d'OPA1 est responsable de l'atrophie optique dominante de type 1. Cette dynamine agit sur la fusion des mitochondries, la structure des crêtes et le maintien de l'ADN mitochondrial (ADNmt). Elle module aussi la respiration et la synthèse d'ATP, avec des conséquences sur la viabilité cellulaire et sur l'apoptose chez les eucaryotes supérieurs. Au vue de cette pléiotropie, notre hypothèse est que la dynamine OPA1/Msp1 intervient dans l'organisation de la membrane interne des mitochondries.

Mon travail de thèse a été initié pour définir les activités biochimiques de Msp1 à l'origine de ses effets biologiques, et les bases structurales sous-jacentes. Le rôle de deux domaines hydrophobes (TM1 et TM2) dans l'association aux membranes et les fonctions de Msp1 a été analysé *in vivo* dans la levure *S. pombe*. Les propriétés biochimiques de Msp1 dans l'organisation des membranes ont été étudiées *in vitro* après purification et reconstitution dans des liposomes de composition phospholipidique similaire à celle de la membrane interne.

Nos études *in vivo* ont montré que TM1 et TM2, et un troisième site d'interaction membranaire (SIM3), ont des rôles distincts dans l'association de Msp1 aux membranes, et dans la fusion des mitochondries et le maintien de l'ADNmt. Nous suggérons que l'organisation locale de la membrane interne est modulée par les proportions relatives des sites (TM1 + TM2) / SIM3, reflet du rapport entre une forme longue, l-Msp1, et une forme courte, s-Msp1, qui co-existent naturellement chez la levure et diffèrent par la présence de TM1 et TM2 dans l-Msp1 uniquement, SIM3 étant commun aux deux isoformes.

Dans notre système *in vitro*, l'association de l-Msp1 et s-Msp1 aux liposomes et leur topologie reproduisent la situation observée dans les mitochondries. Nous avons montré que s-Msp1 a une activité GTPase caractéristique des dynamines avec une faible affinité apparente pour le GTP et une forte activité catalytique et qu'un motif coiled-coil C-terminal est nécessaire au développement de cette activité. Grâce à ce système, nous mettons en évidence pour la première fois que Msp1 favorise l'hémifusion des liposomes et a donc un rôle direct dans la fusion membranaire. L'hémifusion est induite par les deux isoformes l-Msp1 et s-Msp1 et est indépendante de l'activité GTPase et de l'oligomérisation de la dynamine. SIM3, qui est commun à l-Msp1 et s-Msp1, pourrait donc contenir les éléments structuraux requis pour l'hémifusion.

L'ensemble de ce travail nous permet de proposer un modèle dans lequel Msp1 agirait comme organisateur de la membrane et comme commutateur moléculaire. A chacun de ses sites d'action, la dynamine entrerait dans des complexes multi-protéiques distincts dont la composition dépendrait des proportions relatives de chacune des isoformes, donc du rapport (TM1+TM2) / SIM3. La modification de ce rapport par l'hydrolyse du GTP modulerait l'organisation locale de la membrane et donc la composition et l'activité de ces complexes.

Discipline : Biologie cellulaire et moléculaire

Adresse du laboratoire: Université Paul Sabatier – CNRS UMR5241, IFR 109 Bâtiment 4R3b2

118 route de Narbonne 31062 Toulouse