



HAL
open science

Localisation de l'ATP synthase mitochondriale et remaniement du réseau mitochondrial en quiescence

Laure Jimenez

► **To cite this version:**

Laure Jimenez. Localisation de l'ATP synthase mitochondriale et remaniement du réseau mitochondrial en quiescence. Biologie cellulaire. Université de Bordeaux, 2014. Français. NNT : 2014BORD0194 . tel-01359182

HAL Id: tel-01359182

<https://theses.hal.science/tel-01359182>

Submitted on 2 Sep 2016

HAL is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers.

L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

THÈSE PRÉSENTÉE POUR OBTENIR LE GRADE DE

DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE BORDEAUX

Ecole doctorale science de la vie et de la santé

Spécialité : biologie cellulaire et physiopathologie

Par Laure JIMENEZ

**Localisation de l'ATP synthase mitochondriale et
remaniement du réseau mitochondrial en quiescence**

Sous la direction de : Isabelle SAGOT

Soutenue le 6 Novembre 2014

Membres du jury :

M. BRETHERS Daniel	Directeur de Recherche CNRS, Bordeaux	Président
Mme BELENGUER Pascale	Professeur de l'université de Toulouse	Rapporteur
M. LOGAN David	Professeur de l'université d'Angers	Rapporteur
M. RIVAL Thomas	Maître de conférences de l'université de la méditerranée	Examineur
Mme SAGOT Isabelle	Directeur de Recherche CNRS, Bordeaux	Directeur de thèse

REMERCIEMENTS

Mes travaux ont été réalisés à l'Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires de Bordeaux (UMR 5095). Je remercie le Dr Bertrand Daignan-Fornier, directeur de cet institut, pour m'avoir accueillie au sein de ce laboratoire.

Je remercie ma directrice de thèse Isabelle Sagot de m'avoir permis d'effectuer cette thèse au sein de son équipe. Je te remercie pour ton encadrement, ton soutien, et pour la confiance que tu m'as accordée.

Je voudrais remercier le Dr Daniel Brèthes pour avoir accepté de présider mon jury de thèse. Je remercie également Dr Pascale Belenguer, Dr David Logan et Dr Thomas Rival pour avoir accepté de juger mon travail en étant membre de ce jury.

Je remercie Stéphane Duvezin-Caubet pour son implication sur la partie de ma thèse portant sur l'ATP synthase.

Je souhaiterais remercier toutes les personnes qui ont rythmé mon quotidien durant ces trois années à l'IBGC. Un très grand merci à toutes les personnes qui peuplent et ont peuplé le second étage, merci pour tous ces bons moments qui rendent si agréable la vie au laboratoire.

Pour finir, je remercie ma famille et mes amis pour tout le soutien qu'ils m'ont apporté.

Localisation de l'ATP synthase mitochondriale et remaniement du réseau mitochondrial en quiescence

La mitochondrie forme un réseau dynamique de tubules, dont la morphologie et la distribution sont étroitement régulées. Les mitochondries sont des organelles à double membrane dont l'architecture interne est complexe. Les crêtes mitochondriales forment des invaginations de la membrane interne. Elles sont le lieu des phosphorylations oxydatives, réactions par lesquelles l'ATP synthase produit l'ATP. L'ATP synthase est également connue pour son rôle clé dans la morphogénèse des crêtes. Dans cette étude j'ai mis en évidence *in vivo* la localisation en cluster de l'ATP synthase au sein du réseau mitochondrial de *S. cerevisiae* se développant sur substrat fermentescible. Mes résultats suggèrent que ces clusters correspondent aux crêtes mitochondriales, ce qui ouvre de nouvelles perspectives pour l'étude du remaniement de la membrane interne.

La morphologie du réseau mitochondrial est maintenue par un équilibre entre les processus de fusion et de fission des tubules mitochondriaux. Dans la deuxième partie de ma thèse, j'ai mis en évidence une fragmentation progressive du réseau mitochondrial lors de l'entrée des cellules en quiescence, un état cellulaire non prolifératif réversible. En quiescence, le réseau mitochondrial est constitué de petites vésicules sous corticales immobiles au contenu enzymatique variable. Lors d'un retour à l'état prolifératif ces vésicules fusionnent rapidement pour reformer un réseau tubulaire, et ce, avant l'émergence de la cellule fille. De façon surprenante j'ai mis en évidence que ni les machineries canoniques de fusion ou de fission, ni le cytosquelette d'actine ne sont requis lors du remaniement du réseau mitochondrial dans les transitions entre prolifération et quiescence.

Mots clés : mitochondrie, crête, ATP synthase, quiescence, *Saccharomyces cerevisiae*

Mitochondrial ATP synthase localization and mitochondrial network remodeling during quiescence

Mitochondria form a dynamic tubular network which organization and distribution is highly regulated. Mitochondria are double membrane organites with a complex internal architecture. Cristae, which are inner membrane invaginations, are the site of oxidative phosphorylation, reactions by which ATP synthase produces ATP. ATP synthase also play a key role in cristae morphogenesis. In this study, I have shown that ATP synthase localized as discrete clusters along the mitochondrial network in living *S. cerevisiae* cells grown on a fermentable carbon source. Overall our data suggest that ATP synthase clusers correspond to mitochondrial cristae, opening new avenues to explore the mechanisms involved in inner membrane remodelling.

Mitochondrial network morphology is regulated by a dynamic equilibrium between the fusion and fission of mitochondrial tubules. In the second part of my thesis, I highlight a progressive mitochondrial fragmentation during quiescence establishment, a state defined as a reversible absence of proliferation. Quiescent cells mitochondrial network is composed of immobile small cortical mitochondrial vesicles with a variable enzymatic content. Upon quiescence exit, cortical mitochondrial vesicles rapidly fuse and a tubular network is reconstituted prior to bud emergence. Astonishingly, neither the canonical fusion or fission machineries nor the actin cytoskeleton are required for the mitochondrial network modification during quiescence / proliferation transition.

Key words: mitochondria, cristae, ATP synthase, quiescence, *Saccharomyces cerevisiae*

TABLE DES MATIERES

CHAPITRE I : INTRODUCTION	- 1 -
I. Historique	- 2 -
II. Généralités	- 4 -
1. Une Origine endosymbiotique	- 4 -
2. ADN mitochondrial	- 4 -
3. L'import des protéines dans la mitochondrie	- 6 -
III. Les fonctions mitochondriales	- 8 -
1. Les oxydations phosphorylantes	- 8 -
1.1. La chaîne respiratoire	- 8 -
1.2. L'ATP synthase	- 10 -
1.3. Organisation des oxydations phosphorylantes.....	- 12 -
2. Métabolisme des sucres.....	- 12 -
3. Autres fonctions mitochondriales	- 13 -
3.1. Métabolisme du fer	- 13 -
3.2. Métabolisme des lipides	- 13 -
3.3. Métabolisme des acides aminés	- 14 -
3.4. Signalisation calcique.....	- 14 -
3.5. Synthèse des hormones stéroïdiennes.....	- 15 -
3.6. Mort cellulaire : apoptose	- 15 -
IV. Morphologie mitochondriale	- 16 -
1. Structure interne mitochondriale	- 16 -
1.1. La membrane externe.....	- 16 -
1.2. La membrane interne	- 17 -
2. Architecture du réseau mitochondrial	- 25 -
2.1. Les machineries de fusion et de fission	- 25 -
V. Morphologie mitochondriale et autres machineries cellulaires	- 32 -
1. Motilité mitochondriale et cytosquelettes	- 32 -
1.1. Mouvements mitochondriaux chez les mammifères	- 33 -
1.2. <i>Saccharomyces cerevisiae</i>	- 34 -
2. Relation entre mitochondrie et Réticulum endoplasmique.....	- 39 -
2.1. Les complexes protéiques à la base du contact Mitochondrie/RE	- 39 -
2.2. Sites de contact et fonction mitochondriale.....	- 40 -
VI. régulation de la morphologie mitochondriale	- 42 -
1. Morphologie interne et Métabolisme <i>in vitro</i>	- 42 -
2. Morphologie mitochondriale et sources de carbone chez <i>S. cerevisiae</i>	- 42 -
2.1. Réorganisation du réseau mitochondrial.....	- 43 -
2.2. Régulation de la structure interne mitochondriale	- 44 -
3. Taille cellulaire.....	- 44 -
4. Autophagie	- 45 -
VII. Conclusion	- 46 -
CHAPITRE II : LOCALISATION IN VIVO DE L'ATP SYNTHASE MITOCHONDRIALE CHEZ LA LEVURE SACCHAROMYCES CEREVISIAE	- 49 -
I. Introduction	- 49 -
II. Contexte de l'étude	- 50 -
1.1. Localisation en microscopie électronique et immuno-marquage	- 50 -

1.2.	Microscopie à fluorescence conventionnelle	- 51 -
1.3.	Microscopie à super-résolution	- 53 -
III.	Résumé de l'article	- 56 -
IV.	Résultats complémentaires	- 70 -
1.	Complexe micos : nouvelle nomenclature	- 70 -
2.	Etude de la mobilité de protéines mitochondriales	- 70 -
3.	Domaines d'ATP synthase et crêtes mitochondriales : modèle	- 71 -
4.	Galactose et localisation de l'atp synthase	- 72 -
V.	Discussion	- 75 -
1.	ATP synthase et crêtes mitochondriales	- 75 -
2.	Localisation des complexes de la chaîne respiratoire	- 77 -
VI.	Conclusions	- 79 -
	CHAPITRE III : REMANIEMENT DU RESEAU MITOCHONDRIAL EN QUIESCENCE	- 83 -
I.	Introduction	- 83 -
II.	Résultats	- 85 -
III.	Résultats complémentaire.....	- 97 -
IV.	Discussion	- 98 -
1.	Hétérogénéité des cellules quiescentes.....	- 98 -
1.	Machineries de fusion et de fission.....	- 100 -
	CHAPITRE V : MATERIELS ET METHODES.....	- 105 -
I.	Souches et plasmides utilisées.....	- 105 -
1.	Souche de levure	- 105 -
1.1.	Souches utilisées.....	- 105 -
1.1.	Milieux et méthodes de culture.....	- 105 -
1.	Plasmides et bactérie	- 105 -
II.	Techniques de biologie cellulaire.....	- 106 -
1.	Etude de la croissance des levures.....	- 106 -
1.1.	Test en goutte.....	- 106 -
1.2.	Courbe de croissance.....	- 106 -
2.	Microscopie	- 106 -
2.1.	Microscope à épifluorescence	- 106 -
2.2.	Analyse microscopie	- 107 -
2.3.	Préparation des échantillons	- 107 -
III.	Techniques de biologie moléculaire.....	- 108 -
1.	Transformation de levure « One Step » Lithium acétate	- 108 -
2.	Construction des protéines de fusion fluorescentes.....	- 108 -
2.1.	A partir d'un plasmide	- 108 -
2.2.	A partir d'une cassette.....	- 110 -
3.	Quantification de protéines par westernblot.....	- 111 -
3.1.	Extraction protéique	- 111 -
3.2.	Dosage des protéines.....	- 111 -
3.3.	SDS-PAGE	- 112 -
3.4.	Transfert des protéines.....	- 112 -
3.5.	Immuno-détection des protéines	- 113 -
3.6.	Déshybridation de la membrane	- 114 -
3.7.	Quantification	- 114 -

TABLE DES FIGURES

<i>Figure 1 : Palade et Sjostrand, les pionniers de la microscopie électronique des mitochondries.....</i>	- 2 -
<i>Figure 2 : La mitochondrie, un organe au carrefour de la vie cellulaire.....</i>	- 3 -
<i>Figure 3 : Distribution de l'ADN mitochondrial chez les Eucaryotes.....</i>	- 5 -
<i>Figure 4 : Voies d'import des protéines mitochondriales.....</i>	- 6 -
<i>Figure 5 : Représentation schématique de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase.....</i>	- 8 -
<i>Figure 6 : Modèle de monomère d'ATP synthase de levure.....</i>	- 11 -
<i>Figure 7 : Représentation schématique d'une crête mitochondriale.....</i>	- 17 -
<i>Figure 8 : Localisation de l'ATP synthase à la surface de la membrane interne mitochondriale.....</i>	- 19 -
<i>Figure 9 : Dimères et oligomères d'ATP synthase : déformation de la membrane et localisation.....</i>	- 19 -
<i>Figure 10 : La dimérisation de l'ATP synthase est nécessaire au maintien de la morphologie de la membrane interne mitochondriale.....</i>	- 20 -
<i>Figure 11 : Organisation de la membrane interne révélée en « subtomogram averaging ».....</i>	- 21 -
<i>Figure 12 : Représentation schématique du complexe MICOS inspiré de (Pfanner et al., 2014).....</i>	- 22 -
<i>Figure 13 : Localisation de Mic60 et Mic10 chez la levure et les mammifères.....</i>	- 22 -
<i>Figure 14 : Morphologie mitochondriale des mutants du complexe MICOS chez S. cerevisiae.....</i>	- 23 -
<i>Figure 15 : Mise en évidence de l'existence des sites de contacts.....</i>	- 24 -
<i>Figure 16 : Fusion et fission mitochondriale, une relation basée sur l'équilibre.....</i>	- 26 -
<i>Figure 17 : Représentation schématique des acteurs de la fusion mitochondriale.....</i>	- 26 -
<i>Figure 18 : Représentation schématique des acteurs de la fission mitochondriale.....</i>	- 29 -
<i>Figure 19 : Représentation schématique des mouvements rétrogrades et antérogrades.....</i>	- 32 -
<i>Figure 20 : Transmission des mitochondries à la cellule fille chez Saccharomyces cerevisiae.....</i>	- 34 -
<i>Figure 21 : Rétention de mitochondries dans le bourgeon.....</i>	- 36 -
<i>Figure 22 : zones de contact entre la membrane plasmique et les mitochondries.....</i>	- 38 -
<i>Figure 23 : Zone de contact entre le réticulum endoplasmique et le réseau mitochondrial.....</i>	- 39 -
<i>Figure 24 : Représentation schématique du complexe ERMES.....</i>	- 40 -
<i>Figure 25 : La topologie de la membrane interne évolue en fonction de l'état respiratoire.....</i>	- 42 -
<i>Figure 26 : remaniement du réseau mitochondrial en fonction de la source de carbone utilisée par la cellule.....</i>	- 44 -
<i>Figure 27 : Localisation de la sous unité 4 de l'ATP synthase au sein du réseau mitochondrial.....</i>	- 49 -
<i>Figure 28 : Distribution des sous unités de l'ATP synthase.....</i>	- 50 -
<i>Figure 29 : Localisation de protéines mitochondriales dans un mutant mdm10Δ.....</i>	- 52 -
<i>Figure 30 : Localisation de l'ATP synthase par microscopie à fluorescence conventionnelle.....</i>	- 52 -
<i>Figure 31 : Localisation de l'ATP synthase en microscopie 4Pi.....</i>	- 53 -
<i>Figure 32 : Localisation de l'ATP synthase en dSTORM.....</i>	- 54 -
<i>Figure 33 : Localisation de l'ATP synthase par STED et TALM.....</i>	- 54 -
<i>Figure 34 : Etude de la mobilité des protéines membranaires mitochondriales par FRAP.....</i>	- 70 -
<i>Figure 35 : Modèle de la localisation de l'ATP synthase et source de carbone.....</i>	- 71 -
<i>Figure 36 : La localisation de l'ATP synthase est influencée par la source de carbone.....</i>	- 72 -
<i>Figure 37 : Intensité de fluorescence de l'ATP synthase le long du réseau mitochondrial.....</i>	- 73 -
<i>Figure 38 : Interprétation possible des profils d'intensité de fluorescence.....</i>	- 74 -

ABRÉVIATIONS

AB : Actin Bodies

ADP : Adénosine- DiPhosphate

ATP : Adénosine- TriPhosphate

DAPI : 4',6-DiAmidino-2-PhenylIndole

ERMES : Endoplasmic Reticulum-Mitochondria Encounter Structure

FRAP : Fluorescence Recovery After PhotoBleaching

GFP : Green Fluorescent Protein

IBM : InnBoundary Membrane

IPTG : IsoPropyl-beta-D-ThioGalactopyranoside

ISC : Iron Suflur Cluster

MICOS : Mitochondrial contact site and cristae organizing system

ORF : Open ReadFrames

PCR : Polymerase Chain Reaction

PE : PhosphatidylEthanolamine

Pi : Phosphate Inorganique

PKA : Protéine Kinase AMPc dépendante

PC : PhosphatidylCholine

PS : PhosphatidylSérine

PSG : Proteasome Storage Granule

PP2B : Protéine Phosphatase 2B

RFP : Red Fluorescent Protein

ROS : Reactive Oxygene Species

SAM : Sorting and Assembly Machinery

SCF : Complexe Skp1-Cullin-E-box

TIM : Translocase of InnBoundary Membrane

TOM : Translocase of OuBoundary Membrane

INTRODUCTION

CHAPITRE I : INTRODUCTION

Après un bref historique concernant la découverte des mitochondries et quelques généralités, les grandes fonctions mitochondriales sont présentées. Dans une autre partie, la morphologie mitochondriale est exposée en partant de l'architecture interne des tubules jusqu'à la morphologie du réseau à l'échelle cellulaire. Ensuite les différents liens qui existent entre les mitochondries et les autres machineries cellulaires sont présentés. Pour finir l'évolution de la morphologie mitochondriale en fonction de l'état physiologique de la cellule est adressée.

I. HISTORIQUE

Observées pour la première fois au milieu du 18^{ème} siècle, il aura fallu attendre le milieu du 20^{ème} siècle pour que les mitochondries soient reconnues comme jouant un rôle central dans le métabolisme cellulaire. Dans les années 1920-1940, de grands progrès sont fait dans la découverte d'aspects clés du métabolisme. A titre d'exemple, Warburg reçut le prix Nobel en 1931 pour avoir identifié la nature et le mode de fonctionnement des enzymes de la chaîne respiratoire et Krebs et Johnson, dans un article publié en 1937, élucidèrent le cycle du citrate (Krebs and Johnson, 1937). Ces découvertes majeures ont été faites avant même que l'on ne comprenne que les mitochondries occupent une place centrale dans le métabolisme cellulaire. L'isolement par centrifugation différentielle des mitochondries par Claude en 1946, est le point de départ d'expériences démontrant la localisation mitochondriale des enzymes impliquées dans la respiration cellulaire (Claude, 1946). En parallèle, les techniques de microscopie électronique voient le jour. Palade et Sjostrand sont les pionniers de la microscopie électronique des mitochondries. Dans leurs travaux publiés en 1953, ils décrivent tous deux la présence d'une double membrane et d'invaginations que forme la membrane interne dans la matrice, invaginations que Palade nomma « crêtes ». Ces études dévoilent l'architecture complexe de cet organite composé de différents compartiments : la membrane externe, l'espace inter-membranaire, la membrane interne et la matrice mitochondriale (Palade, 1953; Sjostrand, 1953) voir **Figure 1**.

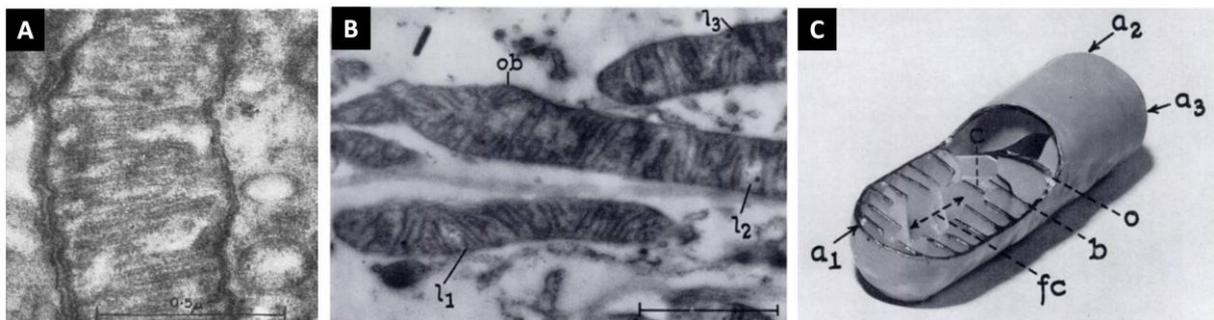


Figure 1 : Palade et Sjostrand, les pionniers de la microscopie électronique des mitochondries

A : Image de mitochondries de bâtonnets de rétine de cochon d'inde d'après (Sjostrand, 1953). **B :** Image de mitochondries d'épithélium de tubule contourné proximal de reins de rat. **C :** modèle de mitochondrie développé par Palade. **B-C :** d'après (Palade, 1953)

En 1961, Peter Mitchell propose la théorie du couplage chimio-osmotique établissant le lien entre l'oxydation de substrats tels que le NADH, et la phosphorylation de l'ADP en ATP (Mitchell, 1961). Ses travaux furent récompensés par le prix Nobel en 1978 et marquent un tournant pour la

biochimie mitochondriale. Suite à ces découvertes majeures, la fonction mitochondriale est longtemps restée limitée à son implication dans la respiration cellulaire. Dans les vingt dernières années, l'étude des mitochondries a pris un essor avec la découverte du rôle que joue cet organe dans la mort programmée des cellules. Les découvertes qui ont suivi ont révélé l'interaction de cet organe avec le reste de la cellule et l'ont placé au centre de nombreux processus (voir **Figure 2**). Certaines de ces fonctionnalités seront décrites dans une partie ultérieure de l'introduction. Aujourd'hui, on estime que les fonctions de près d'un quart des protéines mitochondriales n'ont pas encore été déterminées et plus d'une trentaine de ces protéines sont retrouvées mutées dans des maladies humaines (Pagliarini and Rutter, 2013).

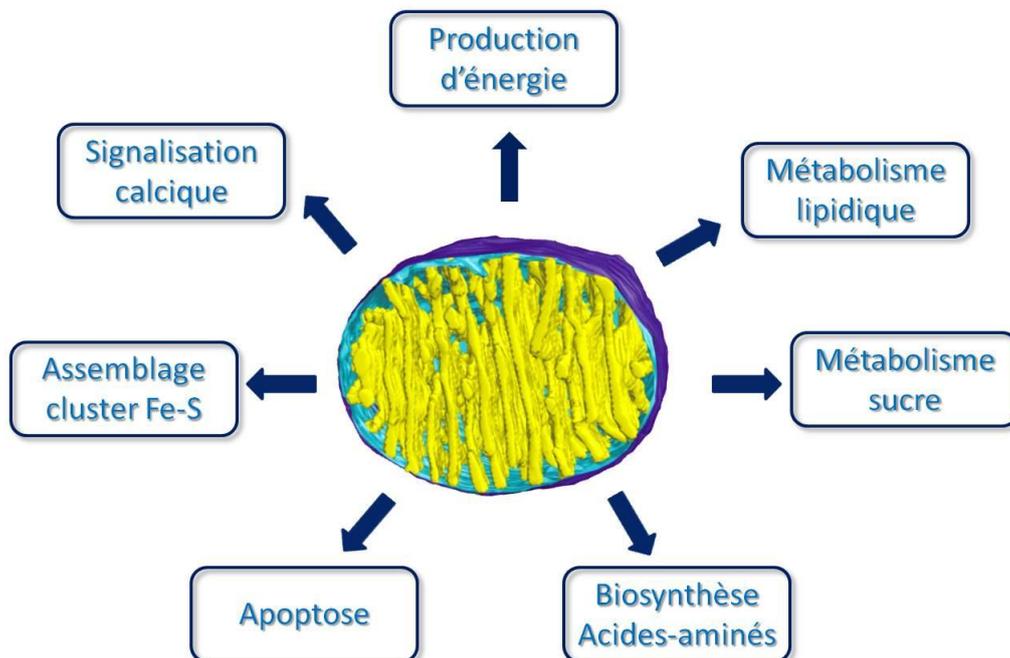


Figure 2 : La mitochondrie, un organe au carrefour de la vie cellulaire

II. GENERALITES

1. UNE ORIGINE ENDOSYMBIOTIQUE

C'est au XIXème siècle que l'idée de la théorie endosymbiotique de l'origine des mitochondries prend naissance. Selon cette théorie les mitochondries ainsi que les plastes dériveraient de l'endocytose de bactéries par des archées il y a deux milliards d'années (Lang et al., 1999). Longtemps débattue, Lynn Margulis remet cette théorie au goût du jour en 1970. Les résultats des laboratoires de Carl Woese et Michael Gray dans les années 80, basés sur une approche de phylogénie moléculaire, renforcent l'idée de l'origine bactérienne des mitochondries (Gray et al., 1989; Yang et al., 1985). Dans cette symbiose, la bactérie produit pour la cellule hôte de l'ATP dérivé de la respiration en échange de sa protection et de l'apport en substrats métabolisés. Dans les années 90, les avancées technologiques en séquençage ont apporté de nouveaux arguments phylogénétiques en faveur de cette théorie suggérant que les mitochondries dérivent de la symbiose avec une α -proteo-bactérie (Andersson et al., 1998).

2. ADN MITOCHONDRIAL

L'ADN mitochondrial possède une taille variable selon les organismes. Chez les plantes, le génome mitochondrial peut atteindre plusieurs centaines de kilo-base (kb), avec à titre d'exemple 367 kb pour *Arabidopsis thaliana* ; 85,8 Kb pour la levure *Saccharomyces cerevisiae* et 16,5 kb chez l'Homme (Anderson et al., 1981). Les petits génomes sont occupés de façon très dense par des gènes codant les sous unités très hydrophobes des complexes assurant les oxydations phosphorylantes ainsi que par les ARN ribosomiques (ARNr) et les ARN de transferts (ARNt) nécessaires à la synthèse mitochondriale des protéines. Les grands génomes sont eux principalement occupés par des introns et de l'ADN non codant. La taille des génomes mitochondriaux reste très inférieure à celle du génome bactérien. Des études suggèrent le transfert au cours de l'évolution d'un grand nombre de gènes mitochondriaux vers l'ADN nucléaire, faisant émerger des questions relatives au maintien d'une petite quantité d'ADN dans les mitochondries. Plusieurs hypothèses ont été proposées. La première hypothèse réfère au caractère très hydrophobe des protéines codées par les gènes présents dans cet ADN. Il a été proposé que l'hydrophobicité de ces protéines empêche leur import dans la mitochondrie (Claros et al., 1995). La deuxième hypothèse stipule que le processus de transfert de gènes vers l'ADN nucléaire n'est pas terminé (Palmer, 1997). Selon la dernière hypothèse la présence de certains gènes dans la mitochondrie permettrait une meilleure régulation de leur expression en adéquation avec les états métaboliques et redox de cet organite (Allen, 1993; Amiott and Jaehning, 2006).

Chez les mammifères, l'ADN mitochondrial est compacté au sein de complexes nucléoprotéiques de 100-400nm, appelés nucléoides, qui contiennent 1 à 10 molécules d'ADN. Il est estimé qu'une cellule contient une centaine de nucléoides répartis dans l'ensemble du réseau mitochondrial (Brown et al., 2011; Kukat et al., 2011). Chez la levure, on dénombre une cinquantaine de nucléoides de 70nm contenant une ou deux molécules d'ADN (Williamson and Fennell, 1979). La **Figure 3** illustre la distribution des nucléoides le long du réseau mitochondrial chez l'Homme et *Saccharomyces cerevisiae*.

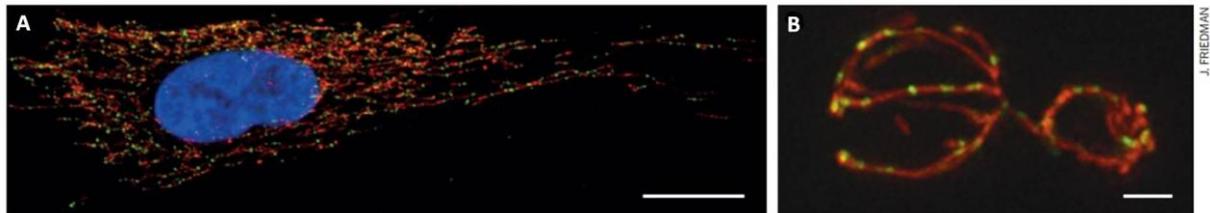


Figure 3 : Distribution de l'ADN mitochondrial chez les Eucaryotes

ADN mitochondrial de fibroblaste (A) et de levure (B). Nucléotide (vert), tubules mitochondriaux, (rouge) noyau (bleu). Barre : 20 µm et 2µm respectivement. Tiré de (Friedman and Nunnari, 2014)

Les nucléoides sont constitués de protéines impliquées dans la maintenance et l'expression de l'ADN mitochondrial. L'acteur principal de compaction chez la levure est la protéine Abf2p qui en se fixant sur les *Autonomously Replicating Sequences* (ARS), emballe et compacte l'ADN. L'orthologue mammifère est TFAM, c'est la protéine nucléotidique la plus abondante. Contrairement à Abf2, TFAM va, en plus du rôle de compactage de l'ADN, avoir un rôle dans sa transcription et sa réplication. Chez les métazoaires, d'autres protéines impliquées dans la transcription, le maintien et la réplication de l'ADN mitochondrial vont également être retrouvés. C'est le cas de l'hélicase Twinkle et de la polymérase γ ou encore des protéines fixant l'ADN simple brin (Bogenhagen, 2011; Garrido et al., 2003).

En 1997, Nunnari *et al.* ont montré que la diffusion des nucléoides était limitée au sein du réseau mitochondrial. En effet l'ADN mitochondrial ne diffuse pas librement, mais il serait ancré dans la membrane mitochondriale. Cet ancrage serait lié à un mécanisme de ségrégation actif qui assure la répartition de l'ADN le long de l'organite et favoriserait sa transmission lors de la division (Nunnari et al., 1997).

Chez la levure, la protéine Mmm1 forme avec Mdm10, Mdm12, Mdm34 un complexe protéique nommé ERMES (*Endoplasmique Reticulum-Mitochondria Encounter Structure*). Ce complexe lie physiquement les mitochondries au réticulum endoplasmique et se localise à proximité des nucléoides (Hobbs et al., 2001). La délétion d'une de ces quatre protéines est associée à une

perte de l'ADN mitochondrial (Boldogh et al., 2003; Youngman et al., 2004). Le complexe ERMES serait impliqué dans la distribution de l'ADN mitochondrial au sein du réseau mitochondrial (Nezich and Youle, 2013).

3. L'IMPORT DES PROTEINES DANS LA MITOCHONDRIE

Alors que les mitochondries contiennent entre 1000 et 1500 protéines différentes (Calvo and Mootha, 2010; Sickmann et al., 2003), moins de 1% sont codées par l'ADN mitochondrial. En effet la plupart des protéines mitochondriales ont une origine nucléaire et sont synthétisées par les ribosomes dans le cytoplasme. Des machineries permettant l'import de ces protéines dans les mitochondries sont donc nécessaires. Ces machineries sont très complexes et constituent de nombreuses voies prenant en compte la topologie et la destination finale des protéines au sein des différents compartiments mitochondriaux (voir Figure 4).

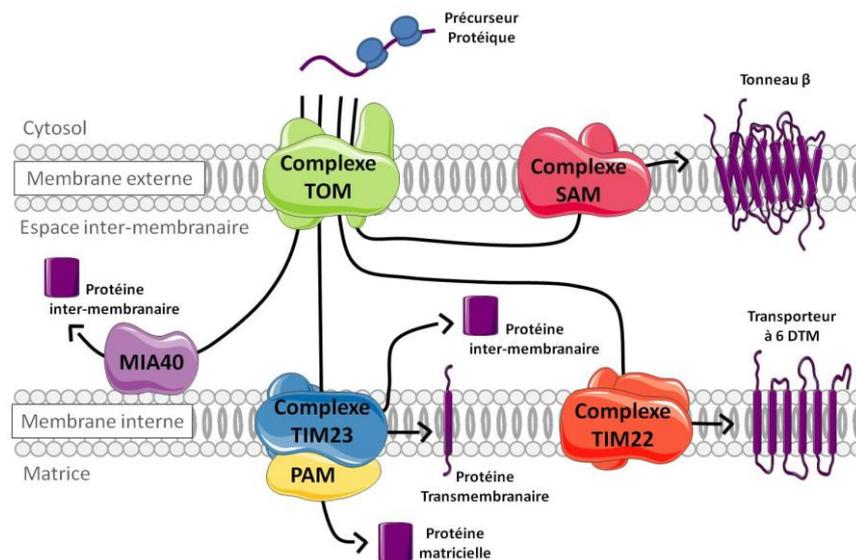


Figure 4 : Voies d'import des protéines mitochondriales

Les protéines codées par l'ADN nucléaire sont importées dans la mitochondrie par le complexe TOM. En fonction de leur destination et topologie, elles empruntent différentes voies. Les protéines en tonneaux β de la membrane externe sont transférées au complexe SAM. Celles qui formeront des transporteurs dans la membrane interne sont transférées au complexe Tim22. Les précurseurs des protéines à destination de l'espace inter-membranaire, de la matrice et de la membrane interne portant une séquence d'adressage en hélice α chargée positivement sont pris en charge par le complexe Tim23. Enfin les protéines de l'espace inter-membranaire riches en cystéines sont prises en charge par Mia40. DTM = Domaine Trans-Membranaire.

L'ensemble des protéines importées dans la mitochondrie a pour point d'entrée le complexe TOM pour Translocase Outer Membrane. Tom40 est sa composante principale et forme plusieurs

canaux par lesquels les protéines vont traverser la membrane. En fonction des séquences signal présentes sur les pré-protéines, elles vont être transférées vers d'autres complexes.

La voie d'import la mieux décrite est celle des protéines à destination de la matrice mitochondriale. Les précurseurs de ces protéines possèdent une séquence d'adressage localisée en N-terminal correspondant à une hélice α chargée positivement. Une fois passée au travers du complexe TOM, la pré-protéine traverse la membrane interne à travers TIM23. La séquence signal est ensuite clivée par une protéase permettant le largage de la protéine dans la matrice. Le complexe TIM23 est associé au complexe PAM, dont la composante principale est la chaperonne mtHsp70 qui servirait de moteur pour permettre le passage des protéines au travers de TIM23.

D'autres protéines qui empruntent la même voie possèdent en aval de la séquence signal une séquence hydrophobe d'adressage. Quand cette séquence est au niveau de TIM23, la translocation est interrompue. Si la protéine a pour destination la membrane interne, le clivage par une protéase en amont de la séquence hydrophobe va permettre le maintien de la protéine dans la membrane. La séquence d'adressage hydrophobe devient le segment transmembranaire de la protéine. Si la protéine a pour localisation finale l'espace inter-membranaire, deux séquences de clivages de part et d'autre de la séquence hydrophobe vont permettre après clivage, le largage de la protéine. Enfin, d'autres protéines à destination de l'espace inter-membranaire ne transitent pas par TIM23. Les pré-protéines possédant un signal d'adressage vers l'espace inter-membranaire riche en cystéines vont former des ponts di-sulfures de façon transitoire avec le complexe MIA40 localisé dans l'espace inter-membranaire qui permettront ensuite la libération de la protéine.

La membrane externe est riche en protéines en tonneau β . Leurs précurseurs vont être, après passage par TOM40, pris en charge par des chaperonnes dans l'espace-inter-membranaire. Ils sont ensuite transférés au complexe SAM (Sorting and Assembly Machinery) permettant aux protéines l'acquisition de leur bonne conformation au sein de la membrane.

La membrane interne contient de nombreux transporteurs à 6 domaines transmembranaires permettant notamment le passage des métabolites. On retrouve sur leurs séquences protéiques des séquences signal d'une dizaine d'acides aminés. Une fois passé la membrane externe via le complexe TOM, les protéines sont prises en charge par les chaperonnes Tim9-Tim10, puis transférées au complexe TIM22 de la membrane interne au travers duquel elles vont être insérées dans la membrane interne.

Les différentes voies brièvement décrites ci-dessus correspondent aux voies les mieux connues et constituent une liste non exhaustive des voies d'import des protéines dans la mitochondrie. Pour revue voir (Chacinska et al., 2009).

III. LES FONCTIONS MITOCHONDRIALES

Les mitochondries jouent un rôle central dans de nombreux processus cellulaires clés. Dans la partie qui va suivre quelques grandes fonctions mitochondriales sont présentées.

1. LES OXYDATIONS PHOSPHORYLANTES

Le système des oxydations phosphorylantes comprend cinq complexes protéiques localisés dans la membrane interne mitochondriale (schématisés dans la **Figure 5**). Ce système peut être divisé en deux parties : le système oxydatif et le système phosphorylant. Le système oxydatif correspond à la chaîne respiratoire. Il est composé des complexes I à IV qui réalisent le couplage entre l'oxydation de différents substrats et le passage de protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire, permettant la mise en place du gradient électrochimique de protons. (2) Le système phosphorylant est assuré par le complexe V, l'ATP synthase, qui utilise le gradient de protons pour synthétiser de l'ATP dans la matrice mitochondriale.

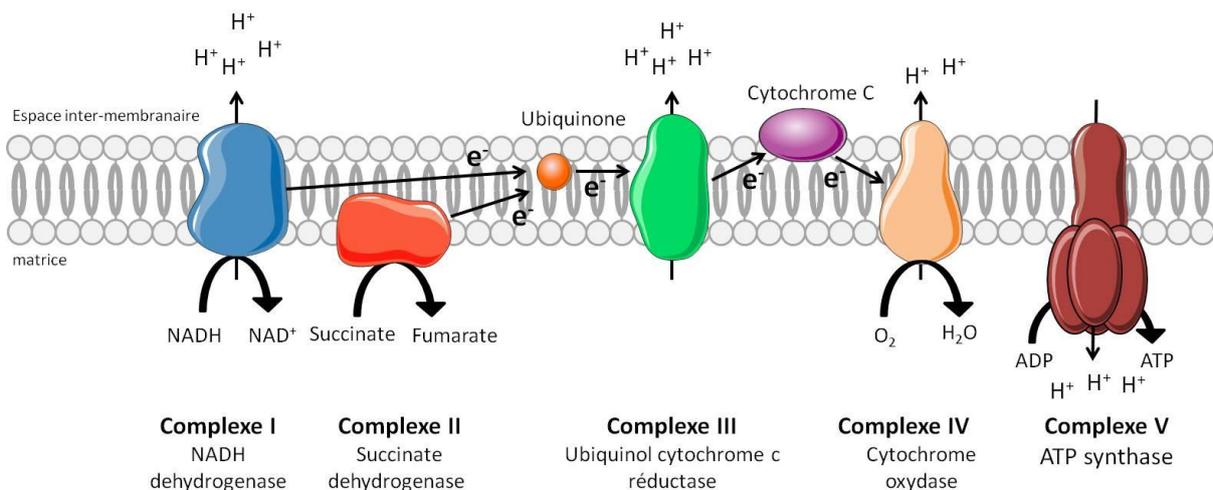


Figure 5 : Représentation schématique de la chaîne respiratoire et de l'ATP synthase

1.1. La chaîne respiratoire

La chaîne respiratoire est constituée de quatre complexes enzymatiques localisés dans la membrane interne mitochondriale et de deux transporteurs : l'ubiquinone et le cytochrome c.

- **La NADH déhydrogénase ou complexe I** est le plus gros complexe enzymatique de la chaîne respiratoire. Il lie le NADH qu'il oxyde, permettant le transfert d'électrons à l'ubiquinone (Q)

pour former le produit réduit : l'ubiquinol (QH₂). Ce transfert d'électron entraîne un changement de conformation qui permet la translocation de protons par les quatre canaux du complexe à travers la membrane interne.

- **La succinate déshydrogénase ou complexe II** est le second point d'entrée des électrons dans la chaîne respiratoire. Ce complexe, situé du côté matriciel de la membrane interne, joue un rôle central dans le métabolisme car il couple l'oxydation du succinate en fumarate dans le cycle de Krebs au transfert des électrons à l'ubiquinol. Contrairement au complexe I, ce transfert d'électron n'est pas couplé à la translocation de protons vers l'espace inter-membranaire.
- **La cytochrome c réductase ou complexe III** oxyde l'ubiquinol en ubiquinone. Une partie des électrons est transférée au cytochrome c et les autres permettent la translocation de protons à travers la membrane.
- **La cytochrome c oxydase ou complexe IV** est le dernier complexe de la chaîne respiratoire. Il va permettre par l'oxydation du cytochrome c, la réduction de l'accepteur final, l'oxygène, en eau. Cette réaction est couplée à la translocation de protons vers l'espace inter-membranaire.
- **L'ubiquinone ou coenzyme Q** est un transporteur liposoluble qui diffuse librement dans la membrane interne mitochondriale. Elle transporte les électrons libérés par les complexes I et II jusqu'au complexe III.
- **Le cytochrome c** est une protéine hydrosoluble qui permet le transfert des électrons du complexe III au complexe IV. Cette protéine est maintenue sur la face externe de la membrane interne mitochondriale.

L'ensemble des réactions d'oxydo-réduction réalisées durant les différentes étapes de la chaîne respiratoire permet la sortie de protons vers l'espace inter-membranaire, créant une différence de potentiel électrochimique de protons qui servira à la synthèse de l'ATP par l'ATP synthase.

Selon les organismes, la composition de la chaîne respiratoire peut varier. A titre d'exemple, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* le complexe I est absent. Le NADH est oxydé dans l'espace inter-membranaire et dans la matrice par des NADH déshydrogénases Nde1, Nde2 et Ndi1. Les sites catalytiques des enzymes Nde1 et Nde2 font face à l'espace inter-membranaire et celui de Ndi1 fait face à la matrice mitochondriale (Luttik et al., 1998; Marres et al., 1991). Comme chez les métazoaires, ces enzymes transfèrent des électrons à l'ubiquinone. En revanche, ce transfert n'est pas couplé à un transport de protons à travers la membrane.

1.2. L'ATP synthase

L'ATP synthase (ou complexe V) est un complexe enzymatique localisé dans la membrane interne. Ce complexe est conservé des bactéries aux eucaryotes et utilise le potentiel électrochimique de proton établi par la chaîne respiratoire pour synthétiser de l'ATP à partir d'un ADP et d'un phosphate inorganique (Pi) dans la matrice mitochondriale. Ce complexe enzymatique fonctionne comme un moteur rotatif. Il est composé d'une portion hydrophile, le sous-complexe F1, qui porte les sites catalytiques, et d'une portion hydrophobe, le sous-complexe Fo, formant un canal au travers duquel les protons traversent la membrane. Selon les organismes considérés, la composition de ce complexe peut varier (Voir **Tableau 1**).

Portion	Fonction	Sous-unité	Gène <i>S.c.</i>	Gène <i>B.t.</i>
F1	Stator	α	ATP1	ATP5A1
		β	ATP2	ATP5B
	Rotor	γ	ATP3	ATP5C1
		δ	ATP16	ATP5D
		ϵ	ATP15	ATP5E
Fo		$9/c^1$	ATP9	ATP5G1/G2/G3
	Stator/pied périphérique.	OSCP	ATP5	ATP50
		$4/b^1$	ATP4	ATP5F1
		$h/F6^1$	ATP14	ATP5J
		d	ATP7	ATP5H
		f	ATP17	ATP5J2
	Mb. stator	$6/a^1$	ATP6	MT-ATP6
		$8/A6L^1$	ATP8	MT-ATP8
		i/j	ATP18	
	dimérisation	e	ATP21	ATP5I
		g	ATP20	ATP5L
k		ATP19		

Tableau 1 : gènes et sous unités formant l'ATP synthase chez la levure et chez le bœuf

¹ nom de la sous unité chez les mammifères. Les gènes correspondent à ceux trouvés chez la levure : *S.c.* = *S. cerevisiae* et chez les mammifères : *B. t.* = *Bos taurus*.

Chez *S. cerevisiae*, l'ATP synthase est constituée d'au moins 17 sous-unités qui forment un complexe de 600 KDa. Le sous complexe F1 est composé de trois sous unités α et β assemblées alternativement, formant la tête catalytique autour de l'axe central composé des sous unités γ , δ et ϵ . La portion hydrophobe est composée d'une sous unité 6, d'un anneau de 10 sous unités 9 au travers duquel le passage des protons entraîne une rotation de l'anneau et de l'axe central. C'est la rotation de l'axe central dans la tête catalytique qui induit les changements de conformations nécessaires pour la synthèse d'ATP (Cross, 2004; Itoh et al., 2004a). La tige périphérique est une portion de l'ATP synthase qui permet de maintenir la tête catalytique avec le sous complexe Fo. Cette tige périphérique est composée de nombreuses sous unités (4, d, f, h et OSCP) dont certaines sont ancrées dans la membrane (voir **Figure 6**). Pour revue voir (Habersetzer et al., 2013).

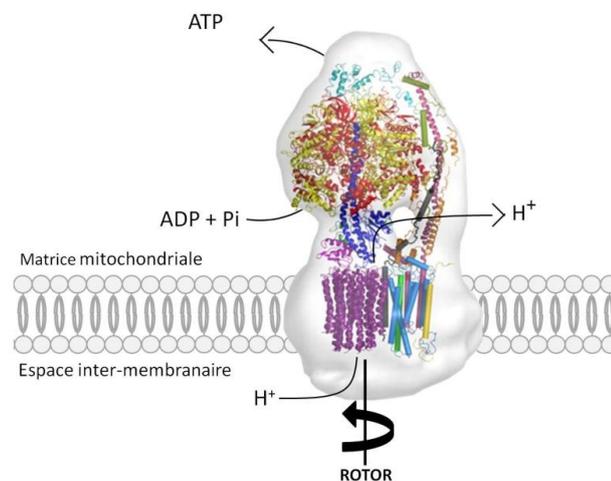


Figure 6 : Modèle de monomère d'ATP synthase de levure

Rouge = α ; jaune = β ; bleu = γ ; magenta = δ ; vert = ϵ ; violet = 9 ; turquoise = OSCP ; rose = 4 ; vert pomme = h ; orange = d ; gris = f ; bleu clair = 6 ; vert foncé = 8 ; or = i/j d'après (Habersetzer et al., 2013).

L'ATP synthase a longtemps été isolée sous la forme de monomères. Au début des années 90, Allen *et al.* décrivent une organisation en « fermeture éclair » des portions F1 de l'ATP synthase suggérant une organisation oligomérique du complexe enzymatique. Quelques années plus tard, l'existence de cette organisation en oligomère a été montrée par gels natifs dans de nombreux organismes, tel que la levure et les plantes. (Arnold et al., 1998; Eubel et al., 2003). Certaines sous unités du Fo sont essentiellement retrouvées lorsque l'ATP synthase est à l'état dimérique, c'est notamment le cas des sous unités *e*, *g* et *k* dont l'absence n'influence pas l'activité de l'ATP synthase (Arnold et al., 1998). Ces sous-unités, localisées à l'interface de deux monomères d'ATP synthase, permettent, avec les sous unités 4 et h, la dimérisation et l'oligomérisation de l'ATP synthase (Fronzes et al., 2006; Spannagel et al., 1998). Le rôle central que joue cette oligomérisation dans la morphologie mitochondriale est présenté dans la partie IV.1.2.1.1 de cette introduction.

1.3. Organisation des oxydations phosphorylantes

De nombreuses études se sont intéressées à l'organisation de ces différents complexes au sein de la membrane interne. Deux modèles sont proposés. Le premier est basé sur une organisation fluide des complexes d'oxydations phosphorylantes. Selon ce modèle, les complexes diffusent librement au sein de la membrane et le transfert des électrons est rendu possible par la collision des complexes (Hackenbrock et al., 1986). Le deuxième modèle au contraire est basé sur une organisation « solide ». Les composants des oxydations phosphorylantes possèdent un haut niveau d'organisation ce qui faciliterait le transfert des électrons. Avec la mise en évidence d'interactions physiques entre différents complexes, ce modèle est devenu celui le plus communément accepté actuellement (Cruciat et al., 2000; Schagger and Pfeiffer, 2000).

2. METABOLISME DES SUCRES

La première étape du catabolisme du sucre est la glycolyse, une étape commune à la respiration et à la fermentation. Lors de cette étape, l'oxydation d'une molécule de glucose produit deux molécules de pyruvate et a pour bilan énergétique la production de deux molécules d'ATP et deux molécules de NADH.

Après transport dans la mitochondrie par des transporteurs, le pyruvate est transformé en acétyl-coenzyme A (acétyl-CoA), qui entre dans le cycle du citrate et aboutit à la formation de NADH et FADH₂, qui, une fois ré-oxydés, permettent la production d'ATP via la chaîne respiratoire et l'ATP synthase (voir III.1). L'ensemble de ces réactions se déroule dans la mitochondrie, ce qui fait de cet organite un composant majeur du métabolisme énergétique.

La levure *S. cerevisiae* est dite aérobie facultative. En présence d'oxygène et de sucres en C6, elle privilégie la fermentation alcoolique, qui a un rapport énergétique très faible par rapport à la respiration. En effet, durant la fermentation alcoolique, la levure tire son énergie de la glycolyse. Ainsi, en présence de sucres fermentescibles, la mitochondrie est peu sollicitée. Cette caractéristique fait de la levure *S. cerevisiae* un très bon modèle pour l'étude des mitochondries. En effet, des souches possédant des défauts respiratoires, telle que la perte de l'ADN mitochondrial, ou des mutations dans les gènes codants des sous unités de la chaîne respiratoire, pourront être maintenues en présence de sources de carbone fermentescibles.

3. AUTRES FONCTIONS MITOCHONDRIALES

Cette partie traite de façon non exhaustive de quelques unes des autres fonctions jouées par les mitochondries.

3.1. Métabolisme du fer

Les mitochondries jouent un rôle central dans le métabolisme du fer. Les « clusters Fer-Soufre » sont des cofacteurs protéiques dont l'assemblage se fait dans la mitochondrie par la machinerie ISC (*Iron Sulfur Cluster*). Ces clusters servent aux protéines mitochondriales mais également aux protéines cytosoliques et nucléaires telles que des hélicases impliquées dans la réparation des dommages à l'ADN et dans la maintenance des télomères (Rudolf et al., 2006). Les mitochondries sont également le lieu de synthèse d'un autre cofacteur protéique : l'hème. L'hème est un composant essentiel de protéines tel que l'hémoglobine et la cytochrome c oxydase (Sheftel et al., 2010). Une régulation très fine de l'apport de fer à la mitochondrie est donc cruciale pour la synthèse de ces cofacteurs et pour le bon fonctionnement des protéines auxquelles ils sont associés. Pour revue voir (Lill et al., 2012).

3.2. Métabolisme des lipides

Chaque membrane biologique a une composition lipidique spécifique. Les lipides sont majoritairement produits par le réticulum endoplasmique. Bien que les mitochondries aient la capacité de synthétiser une partie de leurs propres lipides, les autres lipides doivent être importés. Cette importation passe par des zones de contact entre les mitochondries et le réticulum endoplasmique (voir partie V.2 de cette introduction).

Biosynthèse des lipides :

Les mitochondries sont le lieu de biosynthèse de certains lipides qui peuvent être à destination d'autres membranes de la cellule. Les phosphatidylsérines (PS) sont synthétisées dans le RE et sont ensuite transférées aux membranes mitochondriales externes puis internes dans laquelle se trouve la PS décarboxylase qui permet la conversion d'une PS en phosphatidyléthanolamine (PE). Les PE peuvent être ensuite acheminées jusqu'au réticulum endoplasmique, puis exportées vers leurs membranes d'accueil (Stone and Vance, 2000; Zborowski et al., 1983).

Les cardiolipines sont des dimères de phospholipide retrouvés majoritairement dans la membrane interne mitochondriale au sein de laquelle ils jouent un rôle dans l'organisation des crêtes. La voie de biosynthèse des cardiolipines est très conservée et les enzymes impliquées dans les

quatre réactions permettant la synthèse de ce phospholipide sont localisées sur la face matricielle de la membrane interne (Schlame and Haldar, 1993).

Les mitochondries sont aussi impliquées dans la synthèse *de novo* des acides gras, tel que l'acide lipoïque qui intervient dans le métabolisme énergétique et le métabolisme des acides aminés (Wada et al., 1997).

Dégradation des lipides :

La bêta-oxydation des acides gras par les mitochondries représente une source énergétique importante dans de nombreux tissus très demandeurs en énergie tel que le foie ou les muscles. Les acides gras dégradés vont produire de l'acétyl-CoA à destination du cycle du citrate, et du NADH et du FADH₂ pour alimenter la chaîne respiratoire en électrons (Bartlett and Eaton, 2004).

3.3. Métabolisme des acides aminés

Les mitochondries sont impliquées dans le métabolisme des acides aminés. Elles sont le lieu des premières étapes des voies de biosynthèse de la leucine, de la valine et de l'isoleucine, des acides aminés branchés (Umbarger, 1978). Chez *S. cerevisiae*, les cinq premières étapes de la biosynthèse de l'arginine se déroulent dans la mitochondrie et aboutissent à la production d'ornithine, qui est transportée dans le cytoplasme. La dégradation de cet acide aminé passe également par une étape mitochondriale : l'arginine peut être dégradée en proline dans le cytoplasme, qui après transport dans la mitochondrie, est converti en glutamate (Ljungdahl and Daignan-Fornier, 2012).

3.4. Signalisation calcique

Chez les mammifères, le calcium est un messager secondaire impliqué dans de nombreuses fonctions physiologiques telles que la transduction de signaux, la contraction musculaire, la sécrétion de protéines et d'hormones et l'expression des gènes. Le calcium permet également le fonctionnement d'enzymes clés du métabolisme tels que les déhydrogénases du cycle du citrate. Les mitochondries constituent une réserve de calcium pour la cellule. Elles sont capables de l'accumuler, de le stocker et de le libérer. Le calcium diffuse au travers de la membrane externe par les porines et traverse la membrane interne par des canaux ioniques et des transporteurs. Une fois dans la matrice, il est stocké sous forme de précipité, puis est libéré dans le cytosol par des échangeurs situés dans la membrane interne. Pour revue voir (Nicholls, 2005). La régulation de ce métabolisme passe par une étroite communication entre le réticulum endoplasmique, qui est le lieu principal de stockage du calcium cellulaire, et le réseau mitochondrial. Il a en effet été montré que le largage du calcium du réticulum endoplasmique entraîne une augmentation du calcium mitochondrial (Rizzuto et al., 1998).

3.5. Synthèse des hormones stéroïdiennes

L'étape initiale de la synthèse des hormones stéroïdiennes se déroule dans la membrane interne mitochondriale. Le cholestérol est transporté dans la membrane interne où il subit sa première étape de conversion par le cytochrome P450. Cette enzyme le convertit en prégnénolone qui va majoritairement quitter la mitochondrie pour le réticulum endoplasmique où elle est transformée en hormones stéroïdiennes. En plus d'être le lieu de la première étape de la synthèse des hormones stéroïdiennes, les mitochondries possèdent trois autres enzymes impliquées dans la synthèse de la progestérone, le cortisol, le corticostérone, et l'aldostérone. Pour revue voir (Stocco, 2001).

3.6. Mort cellulaire : apoptose

L'apoptose est un processus de mort cellulaire programmée qui joue un rôle fondamental dans l'homéostasie des tissus et lors du développement. L'apoptose est également impliquée dans de nombreuses pathologies telles que les maladies neurodégénératives et la carcinogenèse. Les mitochondries jouent un rôle central car ce sont elles qui libèrent le cytochrome c, un cofacteur essentiel de ce processus de mort programmée. Dans les cellules saines, les facteurs anti-apoptotiques Bcl-2 lient et séquestrent des facteurs pro-apoptotiques tels que Bax et Bak. En cas de stress, il y a activation des facteurs pro-apoptotiques BH3-*only* qui vont lier les facteurs anti-apoptotiques de la famille Bcl-2 et ainsi permettre la libération des facteurs pro-apoptotiques. Bax et Bak s'assemblent alors en oligomères dans la membrane externe permettant le largage du cytochrome c dans le cytoplasme et l'activation des caspases. En amont de cette libération, le réseau mitochondrial se fragmente de façon dépendante de Drp1, un acteur majeur de la machinerie de fragmentation mitochondriale, pour former de petites vésicules péri-nucléaires. Cette fragmentation permettrait l'insertion et l'assemblage des oligomères de Bax et Bak dans la membrane mitochondriale ce qui permettrait la libération du cytochrome c et induirait ainsi le processus d'apoptose (Brooks et al., 2011).

IV. MORPHOLOGIE MITOCHONDRIALE

Les mitochondries forment un réseau complexe de tubules interconnectés. En fonction du type cellulaire considéré et de son état énergétique, cette morphologie varie. Pour définir au mieux la morphologie mitochondriale, il faut considérer deux composantes : (1) la structure interne des tubules à l'échelle nanométrique et (2) la morphologie du réseau mitochondrial qui, à l'échelle micrométrique, correspond à l'organisation du réseau dans son ensemble au sein de la cellule.

1. STRUCTURE INTERNE MITOCHONDRIALE

Les mitochondries se composent d'une membrane externe et d'une membrane interne qui définissent l'espace inter-membranaire et la matrice mitochondriale.

1.1. La membrane externe

La membrane externe fait face au cytoplasme. Principalement composée de phosphatidylcholine (PC) et de phosphatidyléthanolamine (PE), sa composition lipidique est similaire à celle des autres membranes trouvées chez les Eucaryotes. Son contact avec le cytoplasme en fait un lieu stratégique de communication avec le reste de la cellule. Un grand nombre de complexes protéiques sont localisés dans cette membrane. A titre d'exemple on retrouve certaines protéines impliquées dans la fusion et fission mitochondriales, d'autres protéines permettent le lien entre les mitochondries et le cytosquelette, d'autre sont impliquées dans la synthèse et le transport des lipides.

Une des grandes différences avec la membrane interne, c'est la présence dans la membrane externe de protéines en tonneau β dont les plus connues sont les porines. Ce sont les premiers canaux mitochondriaux à avoir été découverts. Ces canaux ioniques voltage-dépendants permettent le passage de nombreux ions et métabolites rendant la membrane externe perméable aux molécules de petite taille. Par conséquent, cette membrane ne forme une barrière que pour les macromolécules (Colombini, 1979; Lee et al., 1998).

Le complexe TOM, porte d'entrée dans la mitochondrie des protéines synthétisées dans le cytosol, possède lui aussi une structure en tonneau β et est localisé de façon abondante dans la membrane externe (Ahting et al., 2001). On retrouve également dans cette membrane le complexe SAM, qui participe également à l'import des protéines (Kozjak et al., 2003).

1.2. La membrane interne

Contrairement aux autres membranes, la membrane interne mitochondriale est riche en protéines. En effet le ratio protéine/lipide est de l'ordre de 75:25. Ce qui la distingue aussi des autres membranes, c'est sa teneur en cardiolipines qui peut atteindre jusqu'à 20 % des phospholipides. Les cardiolipines seraient important pour la structure et les fonctions de complexes protéiques, et notamment ceux impliqués dans les oxydations phosphorylantes (Paradies et al., 2013). La membrane interne est dépourvue de canaux tels que les porines retrouvées dans la membrane externe, ce qui en fait une membrane imperméable aux petites molécules. En revanche, cette membrane possède de nombreux transporteurs permettant le passage contrôlé des métabolites et des petites molécules.

La membrane interne est divisée en deux régions distinctes de par leurs structures, leurs compositions et leurs fonctions : (1) les crêtes mitochondriales et (2) la membrane interne adjacente à la membrane externe (IBM pour *Inner Boundary Membrane*).

1.2.1. Crêtes mitochondriales

Les crêtes mitochondriales sont formées par l'invagination de la membrane interne dans la matrice mitochondriale. Leur morphologie, répartition et nombre varient en fonction du type cellulaire considéré et de l'état physiologique dans lequel se trouvent les cellules. Les crêtes mitochondriales forment des sortes de « sacs » aplatis dont la coupe transversale révèle une forme tubulaire caractéristique de ce qui est observé sur les coupes de microscopie électronique (voir Figure 7).

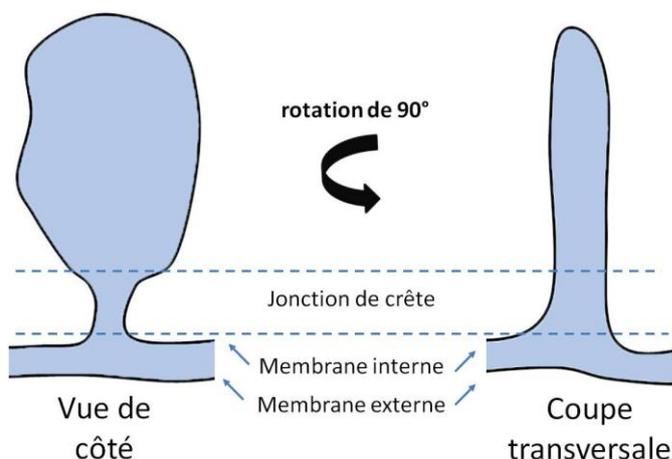


Figure 7 : Représentation schématique d'une crête mitochondriale

Représentation schématique d'une crête mitochondriale vue de côté et en coupe transversale après une rotation de 90°. Inspirée de (Rabl et al., 2009).

Dans les années 60, Daems et Wisse décrivent que l'attachement des crêtes à la membrane interne se fait par une tige qu'ils nomment *pediculi cristae* (Daems and Wisse, 1966). Il faut attendre le début des années 90, avec l'application des techniques de tomographies aux mitochondries pour

que la présence de telles structures soient acceptée par la communauté scientifique. Différentes équipes mettent alors en évidence la présence de connexions tubulaires étroites entre les crêtes et l'espace inter-membranaire chez les mammifères (Mannella et al., 1994) (Penczek et al., 1995) nommées jonctions des crêtes. (Perkins et al., 1997). Le diamètre de cette jonction varie de 12 à 40 nm selon les études. Basées sur des approches d'immuno-marquage, un certain nombre de protéines ont été identifiées comme étant majoritairement localisées dans les crêtes mitochondriales. C'est le cas des complexes de la chaîne respiratoire, du transporteur ADP/ATP et des protéines nécessaires à l'assemblage des « clusters Fe-S » (Vogel et al., 2006; Zick et al., 2009). De nombreuses équipes ont émis l'hypothèse selon laquelle les protéines spécifiques des jonctions de crêtes empêcheraient la diffusion des métabolites, comme l'ADP et les protons, ainsi que la diffusion de complexes de la chaîne respiratoire, permettant ainsi l'optimisation des phosphorylations oxydatives (Mannella et al., 1994; Perkins et al., 1997).

Deux complexes protéiques interviendraient dans la structuration des crêtes mitochondriales : (1) les oligomères d'ATP synthase, qui permettent le maintien des crêtes mitochondriales, et (2) et le complexe MICOS (pour *Mitochondrial contact site and cristae organizing system*) formant la jonction des crêtes.

1.2.1.1. ATP synthase et maintien de la structure des crêtes

En 1962, Fernández-Morán décrit dans ses travaux la présence d'unités structurales répétées au niveau de la membrane interne mitochondriale, qu'il nomme particules élémentaires. Ces particules ont un diamètre compris entre 80 et 100Å et ont été décrites comme étant les composantes de base de la membrane interne mitochondriale (Fernandez-Moran, 1962). Quelques années plus tard, le laboratoire de Racker présente des évidences montrant que ces particules correspondraient à la région F1 de l'ATP synthase (Kagawa and Racker, 1966). Des travaux plus récents réalisés chez *Paramecium multimicronucleatum* montrent l'association en « fermeture éclair » des sous unités F1 de l'ATP synthase, mettant en évidence le caractère très organisé de ces structures (Allen et al., 1989). Les figures illustrant les propos soutenus dans les trois articles cités ci-dessus ont été regroupées dans la **Figure 8**.

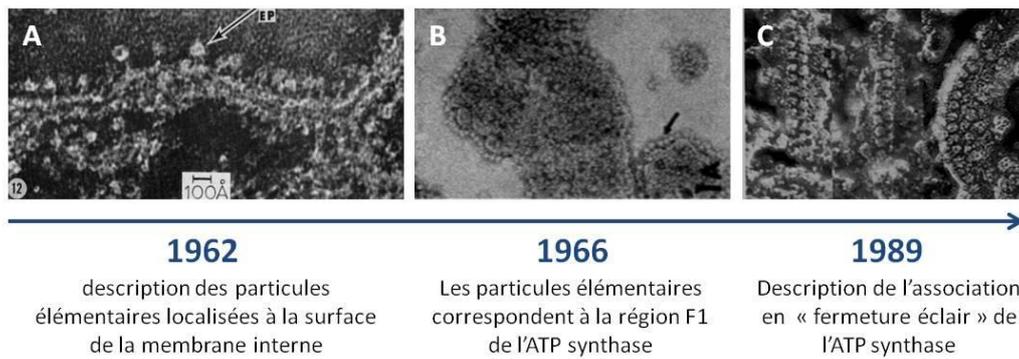


Figure 8 : Localisation de l'ATP synthase à la surface de la membrane interne mitochondriale

Images de microscopie électronique de mitochondries de cellules de cœur de bœuf **A** : (Fernandez-Moran, 1962) **B** : (Kagawa and Racker, 1966), **C** : mitochondries de *Paramecium multimicronucleatum* (Allen et al., 1989).

L'ATP synthase peut s'assembler sous forme dimérique et oligomérique, via les petites sous unités du Fo : *e*, *g*, *k*, *4* et *h*. Les dimères d'ATP synthase adoptent une conformation en « V » dont l'angle varie entre 40 et 142° (Figure 9A) (Dudkina et al., 2005; Minauro-Sanmiguel et al., 2005; Thomas et al., 2008). L'angle formé entre les deux monomères entraînerait localement un pli au niveau de la membrane (Figure 9B-D). Ce serait la déformation locale de la membrane imposée par l'angle que forme les dimères d'ATP synthase qui serait responsable de la formation et/ou du maintien des crêtes mitochondriales. En accord avec cette hypothèse, les oligomères d'ATP synthase ont été décrits comme étant principalement localisés au niveau des bordures des crêtes mitochondriales, là où la membrane est fortement incurvée (Figure 9E) (Allen et al., 1989; Habersetzer et al., 2013; Strauss et al., 2008).

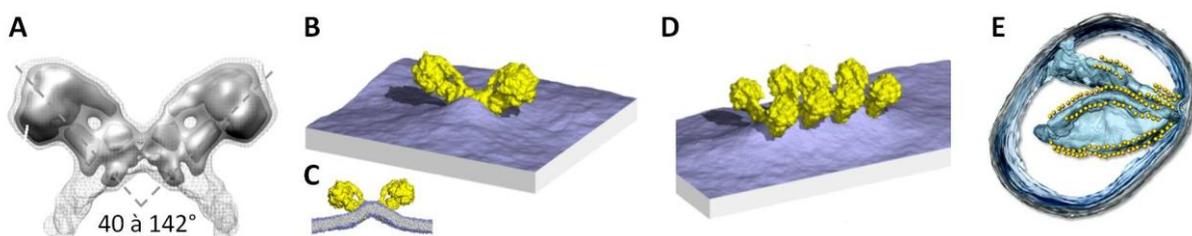


Figure 9 : Dimères et oligomères d'ATP synthase : déformation de la membrane et localisation

A. moyenne de subtomogrammes d'un dimère d'ATP synthase chez *Saccharomyces cerevisiae*. **B**. Simulation d'un dimère d'ATP synthase déformant la bicouche lipidique vue en perspective **C**. Coupe au travers de la membrane des dimères de la figure (B). **D**. Simulation d'oligomères d'ATP synthase déformant la bicouche lipidique vue en perspective. **E**. Tomogramme d'une section de mitochondrie chez *Podospora anserina*. Gris = membrane externe, bleu clair = membrane des crêtes, bleu foncé = membrane de l'IBM, Jaune = ATP synthase. **A**, **B**, **C** et **D** proviennent de (Davies et al., 2012) et **E** de (Davies et al., 2011).

De plus, des études ont mis en évidence le lien entre la dimérisation de l'ATP synthase et la structure des crêtes mitochondriales. Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, l'équipe de J. Velours a montré que la morphologie mitochondriale était altérée dans des mutants *atp20Δ* et *atp21Δ*. Dépourvus des sous-unités *g* et *e* respectivement, ces mutants sont incapables de former des dimères (voir **Figure 10**). Dans cette étude, les auteurs décrivent les mutants *atp20Δ* et *atp21Δ* comme possédant des mitochondries en « pelures d'oignons ». Ce phénotype correspondrait à une biogenèse incontrôlée de la membrane interne mitochondriale au sein de la matrice mitochondriale (Paumard et al., 2002). La sous unité 4 de l'ATP synthase, qui est l'homologue de la sous-unité *b* chez les mammifères, a également été décrite comme ayant un rôle dans la dimérisation de l'ATP synthase. Des mitochondries en « pelures d'oignons » sont observées lorsque le premier domaine transmembranaire de cette sous-unité est absent (Soubannier et al., 2002).

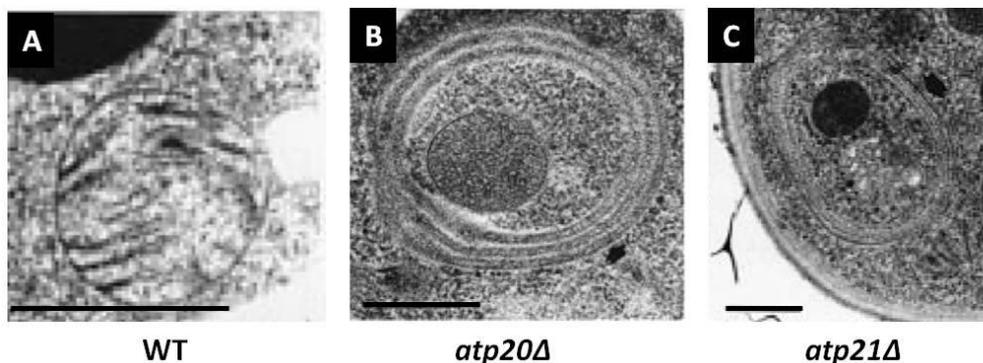


Figure 10 : La dimérisation de l'ATP synthase est nécessaire au maintien de la morphologie de la membrane interne mitochondriale

Images de microscopie électronique de mitochondries chez *S. cerevisiae*. **A** : souche sauvage. **B** : mutant *atp20Δ* **C** : mutant *atp21Δ* d'après (Paumard et al., 2002). Barre : 0,5μm

Les avancées technologiques en microscopie permettent aujourd'hui de mieux appréhender la structure des crêtes mitochondriales ainsi que les conséquences d'une absence de dimérisation de l'ATP synthase. Dans des travaux publiés en 2012 chez *S. cerevisiae*, Davies *et al.* présentent la structure interne mitochondriale en « *Subtomogram Averaging* ». Dans un mutant délété pour les sous unités *atp20Δ* ou *atp21Δ*, et dans un mutant de la sous-unité 4 dépourvu de son domaine transmembranaire (su4TM1), l'ATP synthase est monomérique et les mitochondries sont dépourvues des crêtes plates et lamellaires caractéristiques du *WT*. Les rares crêtes présentes dans ces mutants ont une structure gonflée avec une surface très finement courbée (Davies et al., 2012). Voir **Figure 11**.

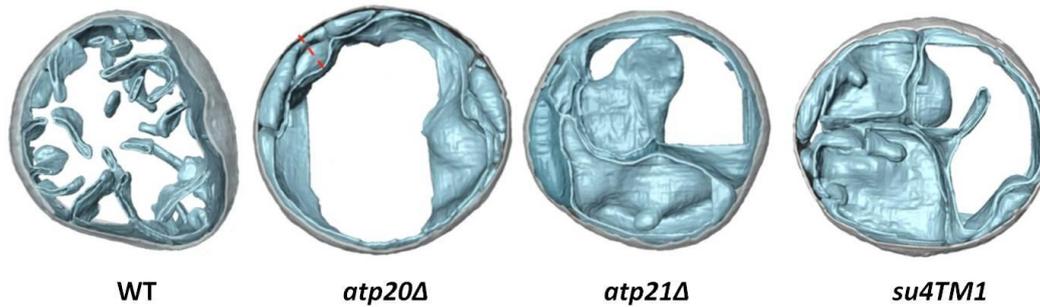


Figure 11 : Organisation de la membrane interne révélée en « subtomogram averaging »

« Subtomogram averaging » d'une section de mitochondrie chez la levure *S. cerevisiae*. Gris = membrane externe, bleu = membrane interne tiré de (Davies et al., 2012).

En plus de son rôle clé joué dans la production de l'énergie cellulaire, l'ATP synthase de par sa dimérisation et son oligomérisation apparaît donc essentielle à la structuration des crêtes mitochondriales.

1.2.1.2. Complexe MICOS et jonction de crête

En 2005, John *et al.* ont montré chez les mammifères que l'absence d'une protéine nommée Mitofiline (Mic60) entraîne la formation de mitochondries avec des couches concentriques de membrane interne dépourvues de jonctions ressemblant aux pelures d'oignon. Listée comme l'orthologue des mitofilines mammifères (Olichon et al., 2006), Mic60 est la première protéine décrite comme étant enrichie au niveau de la jonction des crêtes mitochondriales chez *S. cerevisiae* par microscopie électronique et immuno-marquage (Rabl et al., 2009). Dans cette étude, les auteurs montrent que l'absence de Mic60 altère la morphologie du réseau mitochondrial qui se compose de mitochondries sphériques anormalement larges. Tout comme pour son orthologue mammifère, l'absence de Mic60 entraîne des défauts d'architecture interne avec des crêtes dépourvues de jonctions. Inversement, la surexpression de Mic60 est corrélée à une augmentation du nombre et du diamètre des jonctions de crêtes. Dans ce mutant, il est également observé une augmentation des branchements de membrane interne qui pourraient correspondre à des jonctions de crêtes surnuméraires (Rabl et al., 2009).

En 2011, quatre laboratoires démontrent par des approches différentes que chez *S. cerevisiae*, Mic60 forme un complexe nommé MICOS (pour *mitochondrial contact site and cristae organizing system*) avec 5 autres protéines : Mic10, Mic12, Mic19, Mic26 et Mic27 (voir **Figure 12**) (Alkhaja et al., 2012; Harner et al., 2011; Hoppins et al., 2011; Pfanner et al., 2014; von der Malsburg et al., 2011).

Dans ces études, les auteurs ont étudié les phénotypes des mutants des différentes sous unités du complexe MICOS. Les phénotypes les plus sévères sont ceux des mutants *mic60Δ* et *mic10Δ*. Les autres mutants présentent des phénotypes intermédiaires. Ainsi, dans les quatre études, Mic60 et Mic10 sont présentées comme les composantes centrales du complexe MICOS.

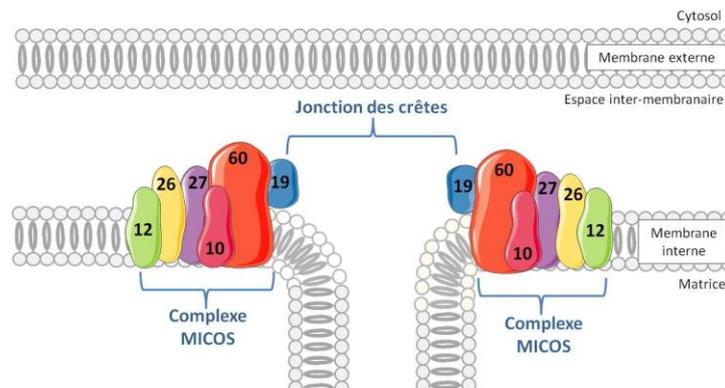


Figure 12 : Représentation schématique du complexe MICOS inspiré de (Pfanner et al., 2014)

- **Localisation :**

Des expériences de microscopie électronique associées à de l'immuno-marquage, ont montré que Mic60 et Mic10 sont enrichies dans les régions proches des jonctions des crêtes mitochondriales (Harner et al., 2011; Jans et al., 2013; Rabl et al., 2009). Dans leurs travaux Hoppins *et al.* ont fusionné ces protéines avec des protéines fluorescentes afin d'étudier leur localisation. Ils montrent que Mic60 localise en petits domaines punctiformes le long du réseau mitochondrial (la protéine de fusion Mic10-GFP n'est pas fonctionnelle) (Hoppins et al., 2011). Plus récemment, des expériences de super-résolution réalisées dans des fibroblastes humains montrent une localisation punctiforme le long du réseau mitochondrial (Jans et al., 2013) Les images des résultats cités ci-dessus sont regroupées dans la **Figure 13**.

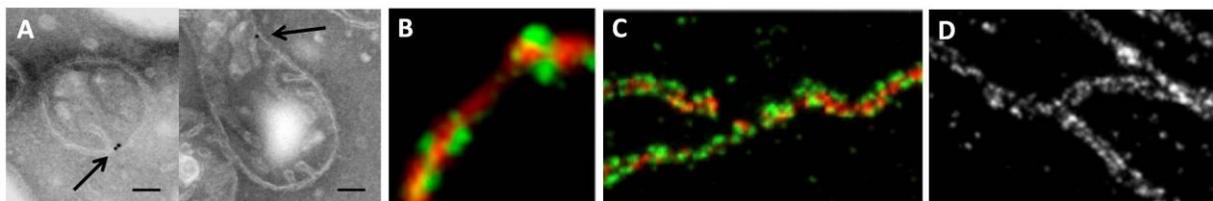


Figure 13 : Localisation de Mic60 et Mic10 chez la levure et les mammifères

A Immuno-marquage de Mic60 chez *S. cerevisiae* (Rabl et al., 2009). Les flèches indiquent les particules d'or. **B**. *S. cerevisiae* exprimant Mic60-GFP (vert) et mito-dsRED (rouge) (Hoppins et al., 2011). **C**. Microscopie STED : Mitofiline (vert) et sous unité β de l'ATP synthase (rouge). **D**. Microscopie STED : Mic10-GFP. **C-D** : fibroblastes humains tiré de (Jans et al., 2013).

➤ Phénotypes associés aux mutants :

L'absence de Mic60 et Mic10 est associée à une morphologie anormale du réseau mitochondrial (Alkhaja et al., 2012; Hoppins et al., 2011; Rabl et al., 2009; von der Malsburg et al., 2011). L'absence de ces protéines entraîne de sévères défauts d'architecture interne, notamment au niveau des crêtes mitochondriales. Les quatre études décrivent la présence de longues crêtes qui forment des empilements lamellaires plus ou moins circulaires (**Figure 14**) (Alkhaja et al., 2012; Harner et al., 2011; Hoppins et al., 2011; Rabl et al., 2009; von der Malsburg et al., 2011).

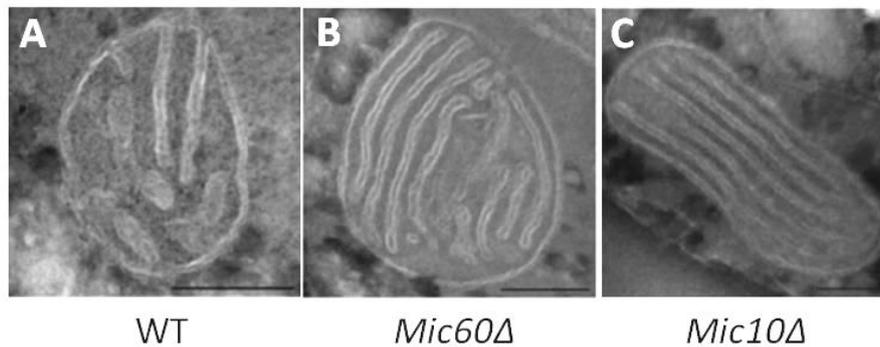


Figure 14 : Morphologie mitochondriale des mutants du complexe MICOS chez *S. cerevisiae*

Morphologie mitochondriale interne révélée en microscopie électronique chez S. cerevisiae. A : souche sauvage, B : mic60Δ, C : mic10Δ. Tiré de (von der Malsburg et al., 2011).

L'absence de jonctions de crêtes décrite par Rabl. *et al.* a été confirmée en microscopie électronique par Harner et par Von der Malsburg (Harner et al., 2011; Rabl et al., 2009; von der Malsburg et al., 2011). Von der Malsburg *et al.* apportent d'autres arguments par la réalisation d'une expérience de gonflement osmotique. Dans cette expérience, le volume de la matrice augmente au fur et à mesure de l'absorption d'eau, entraînant une expansion de la membrane interne par dépliement des crêtes mitochondriales, aboutissant à la rupture de la membrane externe. Bien que la surface de la membrane interne apparaisse plus grande dans les mutants *mic60Δ* et *mic10Δ* en comparaison avec le *WT*, le gonflement osmotique n'entraîne pas de rupture de la membrane externe. Les auteurs concluent à l'absence de continuité entre la membrane des crêtes et l'IBM, étayant l'hypothèse d'une absence des jonctions des crêtes (von der Malsburg et al., 2011). En revanche, les résultats des expériences de Hoppins *et al.* mettent en évidence la présence de quelques jonctions de crêtes intactes dans les mutants des composants du MICOS, indiquant que le complexe MICOS n'est pas strictement essentiel pour la formation de ces jonctions (Hoppins et al., 2011).

Ces résultats mettent en évidence les rôles de l'oligomérisation de l'ATP synthase et du complexe MICOS dans la structuration des crêtes. Deux études ont mis en évidence la présence d'interactions génétiques entre le complexe MICOS et l'ATP synthase (Hoppins et al., 2011; Rabl et al., 2009). L'absence des sous unités *e* et *g* de l'ATP synthase n'influence pas le niveau d'expression de Mic60 et inversement. En revanche, l'absence de Mic60 est corrélée avec une augmentation de la forme oligomérique de l'ATP synthase par rapport à la condition *WT* et sa surexpression corrèle à l'inverse avec une perte de la forme oligomérique de l'ATP synthase (Rabl et al., 2009). Ces résultats mettent en évidence l'influence de Mic60 sur la stabilité des oligomères d'ATP synthase.

1.2.2. IBM et sites de contacts avec la membrane externe

En 1968 Hackenbrock met en évidence dans ses expériences de microscopie électronique la présence de sites de contacts entre la membrane interne et la membrane externe à proximité des crêtes mitochondriales (Hackenbrock, 1968). Voir Figure 15.

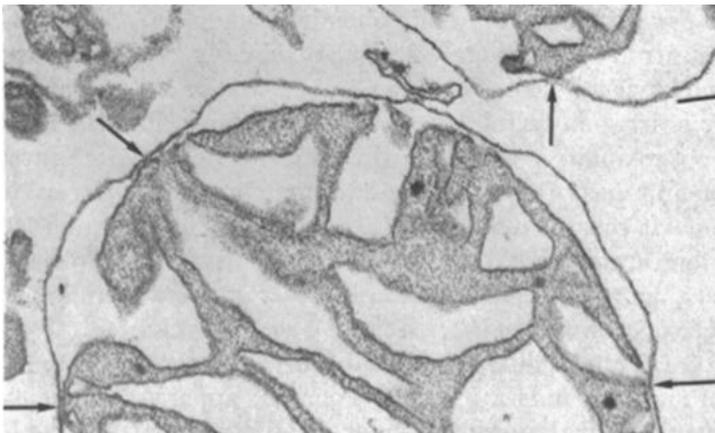


Figure 15 : Mise en évidence de l'existence des sites de contacts

Image de microscopie électronique de mitochondries de foie de rat. Les zones denses aux électrons correspondent à la matrice mitochondriale. Les flèches indiquent les zones de contacts entre la membrane externe et la membrane interne (Hackenbrock, 1968).

L'IBM se distingue des crêtes mitochondriales par sa localisation adjacente à la membrane interne mais également par sa composition protéique. Les études dans lesquelles les auteurs se sont intéressés à la localisation des protéines de la membrane interne ont montré une répartition différentielle des protéines entre les crêtes et l'IBM. En effet Vogel et al. montrent par immunomarquage un enrichissement dans l'IBM des protéines impliquées dans l'import des protéines (complexe TIM23 et Mia40) (Vogel et al., 2006). La même année Wurm *et al.* publient la localisation de 10 protéines de la membrane interne. Pour ce faire, ils expriment ces protéines fusionnées à la GFP dans un mutant *mdm10Δ* présentant des mitochondries géantes. Ils observent alors que les protéines du complexes TIM23 ainsi que celles du complexe PAM localisent au niveau de l'IBM (Wurm and Jakobs, 2006).

Les études ayant identifié le complexe MICOS ont mis en évidence le lien entre ce complexe et la membrane externe. La carte d'interaction génétique réalisée par Hoppins *et al.* a mis en évidence une connexion entre les protéines du MICOS et les protéines des complexes TOM, ERMES et la porine Por1. Des interactions physiques entre ces protéines et celles du complexe MICOS ainsi qu'avec d'autres protéines telles que Mia40, Ugo1 et le complexe SAM ont également été mises en évidence (Harner *et al.*, 2011; Hoppins *et al.*, 2011; von der Malsburg *et al.*, 2011). Ces résultats confirment la localisation des jonctions des crêtes dans le voisinage des sites de contacts observés par Hackenbrock et révèlent un lien fort entre le complexe MICOS et les complexes impliqués dans l'import des protéines dans les mitochondries. Cependant, l'absence des protéines du MICOS n'a globalement pas d'effet sur l'import des protéines dans les mitochondries. Seule l'absence de Mic60 altère l'import des protéines à destination de l'espace inter-membranaire qui transitent par l'intermédiaire de Mia40. Le complexe MICOS permettrait donc par son contact avec le complexe TOM, le maintien de Mia40 au voisinage de ce dernier, par l'intermédiaire de Mic60. L'interaction du MICOS avec le complexe SAM permettrait également de maintenir ce complexe à proximité de TOM, bien qu'aucun défaut d'import des protéines en tonneau β n'a été observé en l'absence des protéines du MICOS (Harner *et al.*, 2011; von der Malsburg *et al.*, 2011).

2. ARCHITECTURE DU RESEAU MITOCHONDRIAL

Les mitochondries constituent un réseau hautement dynamique. Selon le type cellulaire ou les conditions dans lesquelles se trouvent les cellules, ce réseau se réorganise. Ainsi chez les mammifères, le réseau mitochondrial peut prendre différents aspects passant d'un état de longs tubules interconnectés à de petites sphères individuelles. La morphologie de ce réseau est maintenue par l'équilibre entre la fusion et la fission mitochondriale. La motilité du réseau sur le cytosquelette, ainsi que son interaction avec les autres composants cellulaires tels que le réticulum endoplasmique régulent également la morphologie du réseau mitochondrial. La régulation de la morphologie et de la distribution des mitochondries par ces processus permette une optimisation de la fonction mitochondriale en réponse aux changements pouvant survenir au niveau intra ou extracellulaire. Pour revue voir (Friedman and Nunnari, 2014; Lackner, 2014; Scorrano, 2013).

2.1. Les machineries de fusion et de fission

La morphologie du réseau mitochondrial est maintenue par un équilibre entre les processus de fusion et de fission. Ainsi l'absence de fusion entraîne un déséquilibre de la balance, la faisant pencher vers un excès de fission. Ceci a pour conséquence la fragmentation du réseau mitochondrial. De même, une augmentation de la fission entraîne un déséquilibre vers la fragmentation des tubules.

Inversement, l'absence de fission ou l'augmentation de la fusion mitochondriale ont pour conséquence la formation d'un réseau dense et hyper-connecté. Ce principe d'équilibre entre fusion/fission est schématisé dans la **Figure 16**.

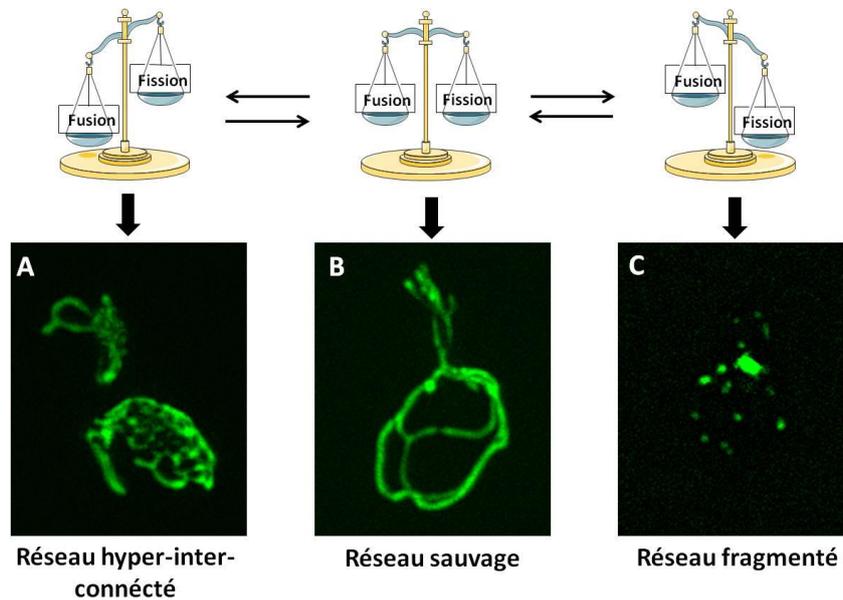


Figure 16 : Fusion et fission mitochondriale, une relation basée sur l'équilibre

Images de microscopie sur cellules vivantes de *S. cerevisiae*. Le réseau mitochondrial est marqué avec la protéine de fusion *Ilv3-GFP*. **A** : mutant *dnm1Δ*, **B** : souche sauvage, **C** : mutant *fzo1Δ*.

2.1.1. Fusion : acteurs et mécanismes

Les différents acteurs de la machinerie de fusion sont schématisés dans la **Figure 17**.

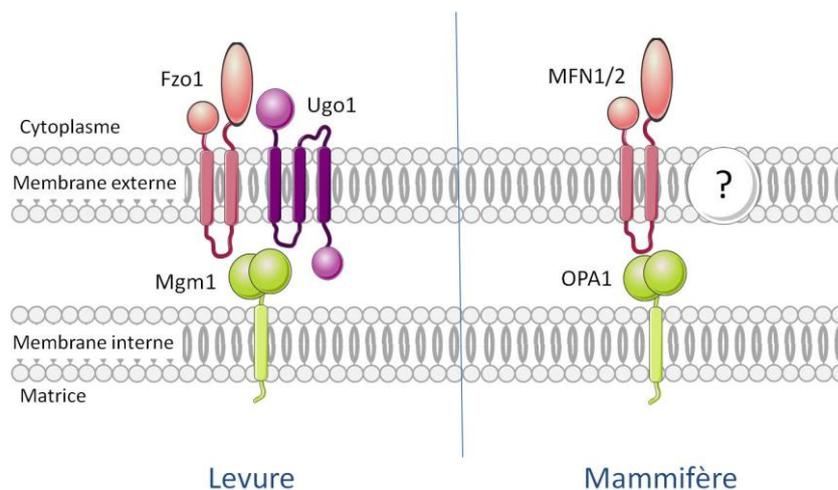


Figure 17 : Représentation schématique des acteurs de la fusion mitochondriale

Inspiré de (Westermann, 2010).

➤ Mitofusines :

Localisées dans la membrane externe mitochondriale, les mitofusines jouent un rôle central pour la fusion de deux tubules mitochondriaux. Les mitofusines sont des GTPases très conservées qui ont d'abord été découvertes chez la drosophile et la levure (Fzo1). Chez ces deux organismes, l'analyse des phénotypes de mutants exprimant des mitofusines portant des mutations non-sens au niveau de résidus clés du domaine GTPase ont montré que la fusion mitochondriale est dépendante de l'activité GTPase de ces protéines (Hales and Fuller, 1997; Hermann et al., 1998). Les mammifères expriment deux mitofusines homologues : Mfn1 et Mfn2. L'absence de ces protéines entraîne la fragmentation du réseau mitochondrial (Santel and Fuller, 2001).

➤ OPA1/Mgm1 :

OPA1 ainsi que son orthologue de levure Mgm1, sont des GTPases de la famille des dynamines. Les formes longues sont ancrées dans la membrane interne et orientées vers l'espace inter-membranaire. Les formes courtes sont localisées dans l'espace inter-membranaire. Tout comme les mitofusines, ces protéines sont essentielles pour la fusion mitochondriale. Le gène OPA1 de mammifère a été identifié comme étant muté dans les cas d'atrophie optique, une neuropathie touchant le nerf optique (Alexander et al., 2000; Delettre et al., 2000). Chez la levure, Mgm1 est clivée par la protéase Pcp1. Ainsi deux isoformes de cette protéine sont présentes : une forme longue : l-mgm1p et une forme courte : s-mgm1p. Le ratio entre ces deux isoformes affecterait la dynamique du réseau (Herlan et al., 2003; McQuibban et al., 2003). Chez les mammifères, OPA1 est également présent sous différentes isoformes ayant pour origine des épissages alternatifs et différents clivages, affectant différenciellement la morphologie mitochondriale (Duvezin-Caubet et al., 2006; Duvezin-Caubet et al., 2007; Ishihara et al., 2006).

➤ Ugo 1 :

Chez les mycètes, une troisième protéine, Ugo1p, est impliquée dans la fusion mitochondriale. Cette protéine est localisée dans la membrane externe et, de part ses domaines N- et C-terminaux localisés respectivement du côté cytoplasmique et dans l'espace inter-membranaire, formerait un pont entre les protéines Fzo1p et Mgm1p (Sesaki and Jensen, 2001).

Mécanismes de fusion :

Les mécanismes à la base de la fusion mitochondriale sont de mieux en mieux connus. Selon le modèle actuel, la fusion entre deux tubules se déroule en 3 étapes : (1) l'amarrage, (2) la fusion de la membrane externe et (3) la fusion de la membrane interne. Lors de la première étape, il y a contact entre les membranes externes de deux tubules. Chez les mammifères ce contact se fait par

l'intermédiaire des mitofusines, qui via leurs domaines coiled-coil, permettent l'amarrage des deux tubules (Koshiba et al., 2004). Fzo1p, jouerait le même rôle chez la levure. Il a été montré que les étapes de fusions des membranes étaient dépendantes du potentiel de la membrane chez les mammifères (Legros et al., 2002). Des études *in vitro* réalisées chez *S. cerevisiae* ont montré que la fusion de la membrane externe et celle de la membrane interne étaient distinctes d'un point de vue mécanistique. La fusion de la membrane externe requiert l'hydrolyse d'une concentration faible de GTP et la présence d'un gradient de proton à travers la membrane interne, alors que la fusion des membranes internes nécessite la présence d'un potentiel électrique au travers de la membrane interne et l'hydrolyse d'une grande quantité de GTP (Meeusen et al., 2004). Tout comme les mitofusines, la protéine Mgm1 est capable de former des complexes en *trans* permettant la mise en contact des deux membranes internes (Meeusen et al., 2006). Peu d'informations existent concernant la fusion de la membrane interne chez les mammifères, mais il est possible que l'orthologue mammifère de Mgm1, OPA1, ait un rôle identique.

2.1.2. Fission : acteurs et mécanismes

Les acteurs composant la machinerie de fission ont été identifiés chez la levure par des cribles génétiques. Ces études ont permis l'identification des homologues mammifères qui, par le biais de leur rôle dans la fission, interviennent dans des processus tel que l'apoptose. Voir **Figure 18**.

➤ Drp1/Dnm1

La protéine cytosolique Drp1 (Dnm1p chez *S. cerevisiae*) est composée d'un domaine GTPase nécessaire pour la fission mitochondriale *in vivo*. Cette protéine s'assemble en une structure hélicoïdale qui s'enroule autour du tubule mitochondrial, permettant la scission de ce dernier. Drp1 et Dnm1 sont retrouvées localisées de façon ponctiforme sur les tubules mitochondriaux définissant ainsi le lieu des futurs événements de fission (Chappie et al., 2010; Ingerman et al., 2005; Mears et al., 2010; Smirnova et al., 2001).

➤ Fis1

Fis1 est une protéine de la membrane externe. Elle se localise de façon homogène le long du réseau mitochondrial, et sa présence est nécessaire au recrutement de Dnm1 à la membrane (Mozdy et al., 2000; Tieu and Nunnari, 2000). L'orthologue humain de Fis1 joue également un rôle central dans le processus de fission chez les mammifères. L'absence de hFis1 entraîne la formation d'un réseau hyper-connecté et tubulaire, alors que sa surexpression entraîne une fragmentation du réseau (James et al., 2003; Yoon et al., 2003).

➤ Mdv1/Caf4

Chez *S. cerevisiae*, les protéines Mdv1p et Caf4p font également parties de la machinerie de fission. De façon dépendante de Fis1p, ces deux protéines sont localisées au niveau de la membrane externe mitochondriale. Elles interviendraient dans le recrutement de Dnm1p en une structure pontiforme le long du réseau mitochondrial et serviraient de protéines adaptatrices entre Drp1 et Fis1 (Fekkes et al., 2000; Griffin et al., 2005; Tieu and Nunnari, 2000).

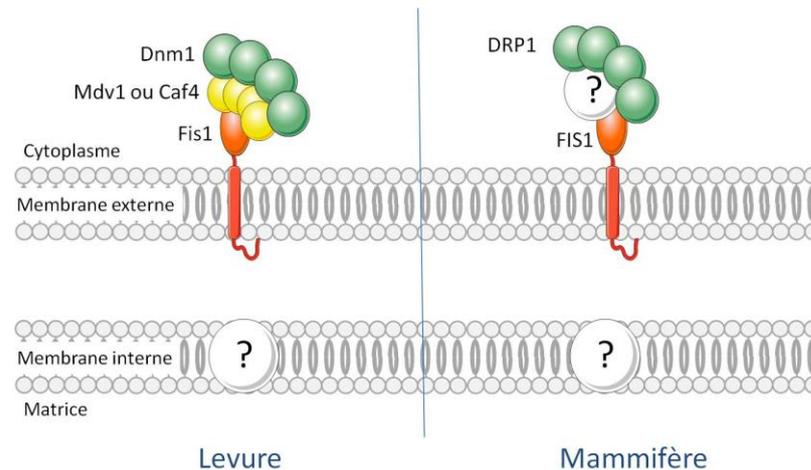


Figure 18 : Représentation schématique des acteurs de la fission mitochondriale

Inspiré de (Westermann, 2010)

Mécanismes de fission

Localisée dans le cytosol, les protéines Dnm1/Drp1 sont recrutées aux sites de fission par l'intermédiaire de Fis1 et des protéines adaptatrices Mdv1 et Caf4, qui jouent un rôle redondant. L'oligomérisation de Dnm1/Drp1 en structure hélicoïdale forme un anneau autour du tubule. Cette conformation favorise la formation d'une interface catalytique permettant l'hydrolyse du GTP ayant pour conséquence un changement de conformation qui induit la scission du tubule mitochondrial (Mears et al., 2010). Plus récemment, il a été montré que le réticulum endoplasmique jouerait un rôle dans le recrutement de Dnm1 aux sites de fissions. Le rôle du réticulum endoplasmique est détaillé dans la partie V.2.3 de cette introduction.

2.1.3. Régulation de l'équilibre fusion/fission

Une régulation de l'équilibre entre fusion et fission est nécessaire pour maintenir la morphologie mitochondriale dans un état stable. En réponse à des signaux intra- ou extra-cellulaires, cet équilibre penche vers la fusion ou la fission, permettant à la cellule d'adapter la morphologie de

son réseau à la demande cellulaire. De nombreuses voies permettent de réguler finement cette balance. Quelques unes sont décrites dans la partie suivante.

➤ Phosphorylation/déphosphorylation :

Pour assurer la fission mitochondriale, la protéine Drp1 est recrutée du cytoplasme à la mitochondrie. Cette protéine possède de nombreux sites de phosphorylation. La phosphorylation de la sérine 656 par la protéine kinase A (PKA), empêche le recrutement de Drp1 à la mitochondrie et inhibe par conséquent la fission. L'expression d'un mutant possédant un aspartate à la place de la sérine 656, mimant ainsi une phosphorylation constitutive, entraîne une élongation des tubules mitochondriaux (Cribbs and Strack, 2007). La calcineurine est une phosphatase aussi connue sous le nom de phosphatase2B (PP2B). Cette enzyme peut être activée suite à une augmentation en calcium cytoplasmique. La déphosphorylation de la sérine 637 de Drp1 par la calcineurine permet le recrutement de Drp1 au futur site de fission sur la mitochondrie (Cereghetti et al., 2008). Cette régulation de Drp1 par phosphorylation/déphosphorylation lie par l'intermédiaire de la PKA, la morphologie mitochondriale avec l'AMPc, l'un des seconds messagers majeurs de la cellule. Par ailleurs, Drp1 est aussi régulé par SUMOylation et S-Nitrosylation. Pour revue voir (Otera et al., 2013).

➤ Dégradation :

Chez *S. cerevisiae* la protéine Mdm30p, qui contient un motif F-box, interagit avec les protéines Skp1p et Cdc53p qui forment le complexe SCF (Skp, Cdc53, F-box containing complex), une E3 ubiquitin ligase (Uetz et al., 2000). Dans un mutant *mdm30Δ* le réseau mitochondrial est fragmenté. Il est montré dans une étude parue en 2003 que le niveau protéique de Fzo1 est régulé par l'ubiquitination dépendante du complexe Skp1-Cdc53-Mdm30, ayant pour conséquence la dégradation de Fzo1p par le protéasome et ainsi une inhibition de la fusion (Fritz et al., 2003).

➤ Epissage alternatif et clivage protéique : OPA1

Chez les mammifères, après épissage alternatif, l'ARNm d'OPA1 est présent sous 8 isoformes (Delettre et al., 2001). Les différentes isoformes sont composées de différents exons et aboutissent à des protéines aux fonctions différentes qui n'ont pas la même implication dans la fusion mitochondriale (Olichon et al., 2007). Les pré-protéines issues de ces 8 isoformes sont importées dans les mitochondries et constituent les formes longues d'OPA1. Chez les mammifères, trois protéases sont connues pour cliver les formes longues d'OPA1 : La protéase rhomboid PARL, l'homologue de Pcp1 de *S. cerevisiae*, la mAAA-protéase et la peptidase OMA1 (Cipolat et al., 2006; Duvezin-Caubet et al., 2007; Ehses et al., 2009; Head et al., 2009; Ishihara et al., 2006). Ces protéases

clivent OPA1 sur différents sites, générant ainsi des isoformes courtes ayant pour conséquence une inactivation de la fusion. En effet, comme chez *S. cerevisiae*, l'équilibre entre les formes longues et courtes régulerait la fusion mitochondriale.

Ces trois exemples de régulation constituent une liste non exhaustive des mécanismes à la base de la régulation de la balance fusion/fission. L'existence de différents isoformes, de différentes protéines adaptatrices et de nombreuses modifications post traductionnelles assurent une régulation fine de cet équilibre permettant une modulation de la morphologie mitochondriale en fonction des besoins cellulaires.

V. MORPHOLOGIE MITOCHONDRIALE ET AUTRES MACHINERIES CELLULAIRES

La morphologie du réseau mitochondrial est étroitement liée aux autres machineries cellulaires. Dans un premier temps le rôle des cytosquelettes sur la motilité mitochondriale est traité, puis dans un second temps l'influence du réticulum endoplasmique est présentée.

1. MOTILITE MITOCHONDRIALE ET CYTOSQUELETES

La motilité est un aspect fondamental pour la distribution des mitochondries dans une cellule et leur répartition lors de la division cellulaire. Elle fait intervenir les cytosquelettes d'actine et de tubuline sur lesquels le réseau mitochondrial se déplace. Les mitochondries peuvent se déplacer dans différentes directions au sein de la cellule. Dans les cellules de mammifères, le déplacement vers la membrane plasmique est appelé mouvement antérograde et le déplacement vers le noyau est dit mouvement rétrograde. Chez *S. cerevisiae*, on parle de mouvement antérograde quand les mitochondries se déplacent vers le bourgeon et de mouvement rétrograde lorsque les mitochondries vont vers le pôle opposé dans la cellule mère. Voir **Figure 19**.

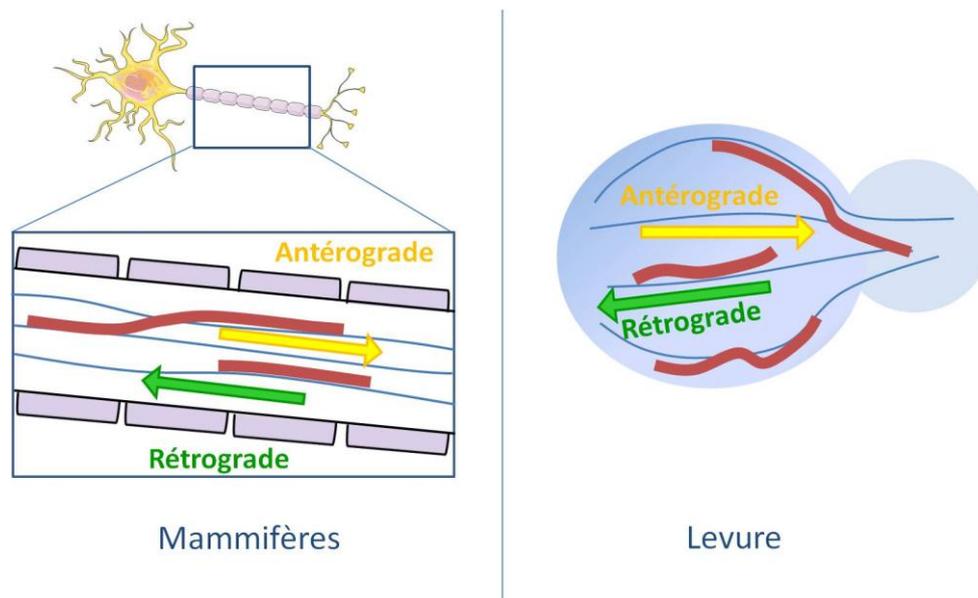


Figure 19 : Représentation schématique des mouvements rétrogrades et antérogrades

Cette figure illustre les mouvements rétrogrades et antérogrades des mitochondries le long des cytosquelettes avec pour exemples chez les mammifères, un neurone et chez la levure. Les mitochondries sont représentées en rouge, les microtubules pour les mammifères et les câbles d'actine pour les levures sont représentés en bleu.

1.1. Mouvements mitochondriaux chez les mammifères

Selon les organismes considérés, le mouvement des mitochondries fait intervenir différents acteurs. Chez les mammifères, les neurones sont souvent utilisés pour étudier la motilité des mitochondries car ces dernières sont transportées sur de longues distances de façon antérograde et rétrograde. Les filaments d'actines et les microtubules permettent le mouvement des mitochondries et l'absence de ces deux cytosquelettes entraîne leur immobilisation. Le transport rapide sur de longues distances se fait par l'intermédiaire du réseau de microtubules, alors que le cytosquelette d'actine sert de « rail » pour de courtes distances (Morris and Hollenbeck, 1995).

1.1.1. Mouvement dépendant des microtubules :

Les microtubules sont des structures polarisées, leurs extrémités « moins » étant généralement localisées vers le noyau et l'extrémité « plus » vers la membrane plasmique. Le transport antérograde des mitochondries sur les microtubules se fait par l'intermédiaire de la kinésine-1 (KIF5B). Cette protéine utilise l'énergie de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter les cargos vers le pôle plus des microtubules. KIF5B interagit avec les mitochondries par l'intermédiaire des protéines Miro1 et Miro2 localisées dans la membrane externe mitochondriale. Même si KIF5B est la kinésine la plus impliquée dans ce transport antérograde, les kinésines-3 Kif1B et Klp6 interviennent également dans le transport des mitochondries (Nangaku et al., 1994; Tanaka et al., 2011). Le transport rétrograde des mitochondries, c'est-à-dire vers l'extrémité négative des microtubules en direction du noyau se fait par l'intermédiaire d'autres protéines moteur : les dynéines. Des études réalisées chez la drosophile ont montré que les mitochondries sont associées aux dynéines. Des mutations dans la chaîne lourde de la dynéine altèrent la vitesse du transport rétrograde (Pilling et al., 2006). Cette interaction entre la dynéine et mitochondries se fait par l'intermédiaire de la protéine dMiro (Russo et al., 2009). Des études menées chez la drosophile ont également mis en évidence le rôle de la protéine Milton, qui sert de protéine adaptatrice entre les mitochondries et la kinésine KIF5 (Stowers et al., 2002). Chez les mammifères, Trak1 et Trak2 sont les deux orthologues de Milton. Ces protéines possèdent des sites de liaisons à la Kinésine KIF5B et à la dynéine révélant le rôle de ces protéines dans les transports antérogrades et rétrogrades des mitochondries (Koutsopoulos et al., 2010; van Spronsen et al., 2013).

1.1.2. Mouvement dépendant du cytosquelette d'actine

Peu de données sont disponibles concernant le rôle du cytosquelette d'actine chez les mammifères. Des expériences réalisées en 1995 par Morris *et al.* sur des neurones d'embryon de poulet ont mis en évidence l'implication du cytosquelette d'actine dans le transport des

mitochondries (Morris and Hollenbeck, 1995). Le mouvement antérograde des mitochondries le long du cytosquelette d'actine ferait intervenir la myosine V, alors que le mouvement rétrograde se ferait par l'intermédiaire de la myosine VI.

1.2. *Saccharomyces cerevisiae*

Chez *S. cerevisiae*, le mouvement des mitochondries se fait sur des structures du cytosquelette d'actine appelées câbles d'actine. Les filaments d'actine composant les câbles sont nucléés au niveau du bourgeon par les formines (Evangelista et al., 2002; Sagot et al., 2002a) et sont orientés selon l'axe mère-fille. Ils servent de « rail » pour le transport polarisé de nombreux composants cellulaires grâce à la myosine de type V, Myo2. Pour revue voir (Pruyne et al., 2004).

La division cellulaire commence par la sélection d'un site de bourgeonnement. S'en suit alors la polarisation du cytosquelette d'actine vers le bourgeon émergent. Cette polarisation permet le transport des organites vers la future cellule fille. A l'émergence de la cellule fille, les mitochondries s'alignent le long des câbles d'actine, puis jusqu'à la fin de mitose, une partie des mitochondries va être transportée dans le bourgeon, c'est le mouvement antérograde. Une autre partie va être transportée dans la direction opposée, permettant le maintien d'un pool de mitochondries dans la cellule mère, c'est le mouvement rétrograde. En parallèle, une partie des mitochondries est maintenue dans la cellule mère ainsi que dans le bourgeon par un mécanisme d'ancrage, assurant la rétention de mitochondries dans les deux cellules après la mitose. Ces différentes étapes sont résumées dans **Figure 20**.

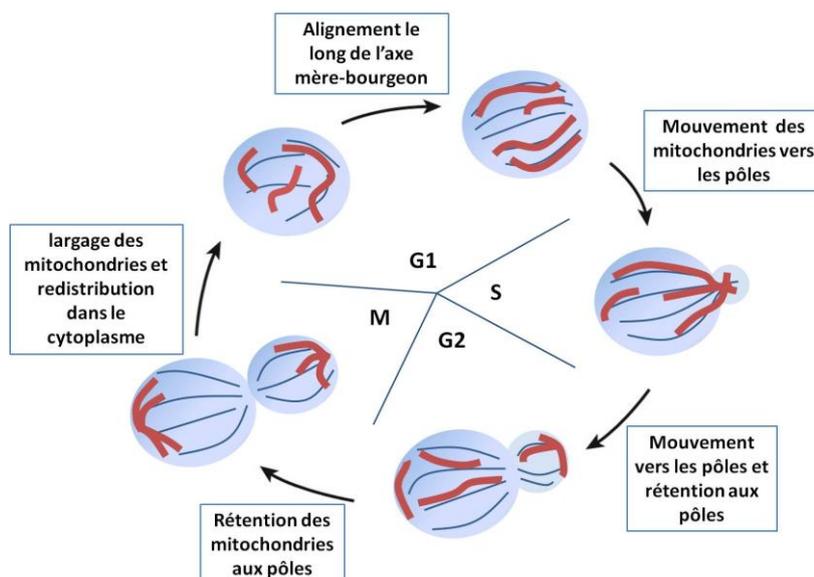


Figure 20 : Transmission des mitochondries à la cellule fille chez *Saccharomyces cerevisiae*

Représentation schématique de la transmission des mitochondries à la cellule fille et de l'organisation du réseau mitochondrial au cours du cycle cellulaire. Les traits bleus correspondent aux câbles d'actine, et les traits rouges aux mitochondries. Ce schéma est inspiré de (Vevea et al., 2014).

Les mitochondries se lient au cytosquelette d'actine par l'intermédiaire d'un complexe appelé le mitochore. Ce complexe est composé de Mmm1, Mdm10 et Mdm12 qui sont nécessaires pour le maintien de la morphologie du réseau et pour sa transmission à la cellule fille (Boldogh et al., 2003; Burgess et al., 1994; McConnell et al., 1990; Sogo and Yaffe, 1994). En l'absence de ce complexe, la répartition des mitochondries présente de sévères défauts notamment au niveau du mouvement rétrograde et antérograde, ce qui met en évidence le rôle central de ce complexe dans le transport de cet organelle (Fehrenbacher et al., 2004).

1.2.1. Le transport antérograde

➤ Le complexe Arp2/3 :

Le complexe Arp2/3 est un complexe de nucléation des filaments d'actine. Il peut également fixer un filament d'actine préexistant pour créer des branchements (Mullins et al., 1998). Il a été montré que des sous unités de ce complexe co-localisent avec le réseau mitochondrial, et qu'en leur absence, le transport antérograde mitochondrial est affecté. C'est la protéine Jsn1 périphérique à la membrane externe mitochondriale qui permet le recrutement du complexe Arp2/3 aux mitochondries. En effet Jsn1 et les sous unités du complexe Arp2/3 interagissent physiquement et la présence de Jsn1 est nécessaire pour la localisation d'Arp2/3 au niveau mitochondrial (Fehrenbacher et al., 2005). Dans ce modèle, il est suggéré que le mouvement antérograde soit dépendant des forces générées par la polymérisation de l'actine par le complexe de nucléation Arp2/3.

➤ Myo2 :

Les résultats concernant l'implication des myosines dans le mouvement antérograde sont controversés. Une première étude a montré que l'absence de myosine n'avait pas d'effet sur la vitesse de mouvement des mitochondries (Simon et al., 1995). D'autres études au contraire montrent que les mitochondries interagissent avec la myosine Myo2. Les mitochondries de souches exprimant une protéine Myo2 mutée dans sa queue globulaire perdent leur capacité à lier les câbles d'actine (Altmann et al., 2008). Par ailleurs, des mutations dans certains domaines de Myo2 empêchent l'accumulation des mitochondries dans la cellule fille. Dans ces mutants, l'expression d'une protéine chimère permettant l'ancrage artificiel et permanent de Myo2 à la mitochondrie, restaure une distribution correcte des mitochondries dans la cellule fille. De plus la surexpression de cette protéine chimérique entraîne une accumulation des mitochondries dans la cellule fille. Ces résultats mettent en évidence le rôle de Myo2 dans le mouvement antérograde des mitochondries et dans l'entrée des mitochondries dans la cellule fille (Fortsch et al., 2011). Récemment, il a été mis en

évidence le rôle des protéines Mmr1 et Ypt11 en tant que protéines adaptatrices entre Myo2 et les mitochondries (Chernyakov et al., 2013).

Dans une revue publiée par le laboratoire de Liza Pon, les auteurs proposent que Myo2 et Arp2/3 agissent à des endroits distincts de la cellule. Ils proposent que le transport antérograde au sein de la cellule mère est dépendant d'Arp2/3 et que Myo2 permet le passage des mitochondries au niveau du cou entre la cellule mère et la cellule fille (Vevea et al., 2014).

1.2.2. Le transport rétrograde

La nucléation et l'élongation des câbles d'actine se font dans la cellule fille grâce aux formines (Evangelista et al., 2002; Pruyne et al., 2002; Sagot et al., 2002a; Sagot et al., 2002b). Cet assemblage d'actine a pour conséquence la mise en place d'un flux rétrograde des câbles d'actine en direction de la cellule mère. Fehrenbacher *et al.* ont montré que la vitesse du mouvement antérograde des mitochondries était similaire à celle de l'élongation des câbles d'actine ($0,26-0,51\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ et $0,3-0,55\mu\text{m}\cdot\text{s}^{-1}$ respectivement). Ces auteurs ont également montré que des mutations qui inhibent le flux rétrograde des câbles entraînaient une absence de transport rétrograde des mitochondries (Fehrenbacher et al., 2004). Les résultats de cette étude ont permis d'établir le modèle selon lequel les mitochondries lient les câbles d'actine et utilisent la force générée par l'élongation des câbles pour se déplacer en direction de la cellule mère.

1.2.3. Rétention dans le bourgeon

Il a été observé qu'une fois entrée dans la cellule fille, une partie des mitochondries est immobilisée au pôle (voir **Figure 21**). Bien qu'un certain nombre d'acteurs impliqués dans la rétention aient été identifiés, les mécanismes à la base de la rétention n'ont pas encore été totalement élucidés.

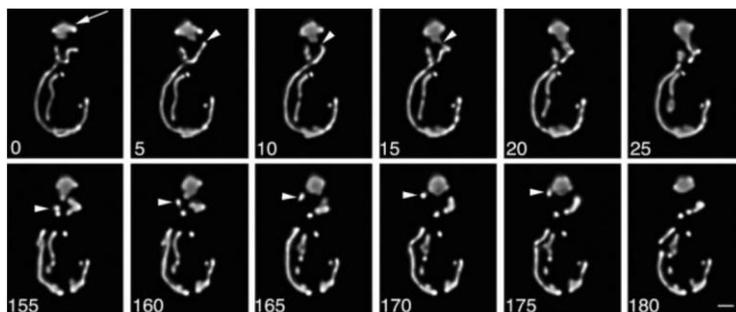


Figure 21 : Rétention de mitochondries dans le bourgeon

Images successives d'une levure exprimant Cit1-GFP comme marqueur du réseau mitochondrial. Le temps est indiqué en secondes. La flèche entière indique la zone de rétention et les têtes de flèche indiquent des mitochondries qui effectuent des mouvements linéaires vers le pôle du bourgeon. Echelle : $1\mu\text{m}$. Figure tirée de (Boldogh et al., 2004).

➤ Ypt11 :

La protéine Ypt11 est une rab-like GTPase qui forme un complexe avec Myo2 (Itoh et al., 2002). Il a été mis en évidence que la délétion de *YPT11* entraîne des défauts de rétention des mitochondries dans le bourgeon (Boldogh et al., 2004). Ypt11 est également associée au réticulum endoplasmique cortical (REc). Son absence s'accompagne d'un défaut de localisation du REc dans la cellule fille, ouvrant la possibilité d'un rôle du REc dans la rétention des mitochondries (Buvelot Frei et al., 2006). Cependant Lewandowska *et al.* ont montré par l'expression de protéines chimériques permettant l'ancrage artificiel de Ypt11 soit à la mitochondrie soit au REc, que seul l'ancrage d'Ypt11 à la mitochondrie permettait de restaurer le défaut de rétention des mitochondries dans la cellule fille observé dans le double mutant *ypt11Δmmr1Δ*. L'ancrage de Ypt11 au REc n'est donc pas nécessaire pour la rétention des mitochondries (Lewandowska et al., 2013).

➤ Mmr1 :

La protéine Mmr1, un homologue des protéines de la famille DSL1, intervient aussi dans la rétention des mitochondries mais de façon indépendante d'Ypt11. Mmr1 se localise dans la cellule fille via Myo2 (Itoh et al., 2004b; Vevea et al., 2014) et est associé aux mitochondries et au REc suggérant une implication du REc dans la rétention des mitochondries dans la cellule fille de façon dépendante de Mmr1 (Swayne et al., 2011).

1.2.4. Rétention dans la cellule mère

Un mécanisme de rétention dans la cellule mère a également été mis en évidence afin d'assurer la rétention d'une quantité minimale de mitochondries dans la cellule mère après la mitose. Il a été observé par microscopie électronique que lorsque les mitochondries sont à proximité de la périphérie de la cellule, la membrane plasmique est déformée et forme une zone de contact avec les mitochondries (voir **Figure 22**) (Klecker et al., 2013). Deux protéines seraient impliquées dans ce mécanisme.

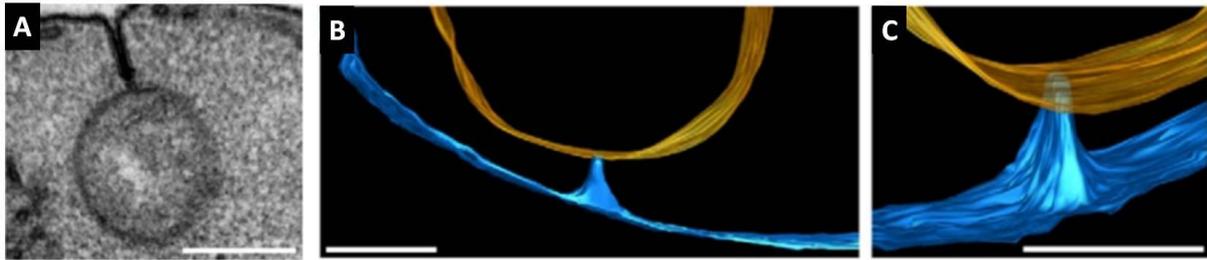


Figure 22: zones de contact entre la membrane plasmique et les mitochondries.

A : image de microscopie électronique d'une cellule sauvage mettant en évidence la zone de contact entre la membrane plasmique et une mitochondrie. **B et C** : Images de tomogramme montrant des zones de contacts entre la membrane plasmique (bleu) et le réseau mitochondrial (orange). Les levures sur-expriment la protéine chimérique Myo2-Fis1 grâce à un plasmide multi-copie. Echelle : 250 nm. Tiré de (Klecker et al., 2013).

Num1 est une protéine ancrée à la membrane plasmique qui co-localise avec les extrémités des tubules mitochondriaux au niveau du cortex cellulaire de la cellule mère. Il a été montré par microscopie électronique et par reconstruction en tomographie que l'absence de Num1 entraîne de sévères défauts de morphologie mitochondriale, ainsi que la perte des zones de contact entre les mitochondries et la membrane plasmique (voir **Figure 22**). L'expression dans un mutant *num1Δ* de protéines chimériques entre un domaine transmembranaire d'une protéine de la membrane externe et le domaine de Num1 qui permet une localisation corticale, restaure un réseau mitochondrial sauvage. Num1 jouerait donc un rôle clé dans l'attachement des mitochondries au cortex de la cellule (Klecker et al., 2013).

La protéine Mdm36 a été identifiée dans un crible de mutants ayant des défauts de morphologie mitochondriale (Dimmer et al., 2002). Comme dans un mutant *num1Δ*, les cellules *mdm36Δ* présentent des défauts d'attachement des mitochondries au cortex (Hammermeister et al., 2010). Mdm36 interagit physiquement avec Num1 et ces deux protéines co-localisent partiellement au niveau des zones de contact mitochondries/cortex de la cellule. Num1 est nécessaire pour la localisation de Mdm36. Mdm36 serait une protéine adaptatrice entre Num1 et les mitochondries (Lackner et al., 2013).

Tout comme pour la rétention des mitochondries dans le bourgeon, le REc semble jouer un rôle dans la cellule mère. En effet ce dernier est retrouvé à proximité des complexes formés par Mdm36 et Num1 (Lackner et al., 2013).

2. RELATION ENTRE MITOCHONDRIE ET RETICULUM ENDOPLASMIQUE

Le réticulum endoplasmique (RE) est le lieu de synthèse de nombreuses protéines notamment des protéines membranaires, et des protéines sécrétées. Il est également le lieu de synthèse de lipides et un lieu de stockage intracellulaire du calcium (Clapham, 1995). De part toutes ces fonctions, le RE communique et interagit avec l'ensemble des composants cellulaires et notamment avec la mitochondrie par l'intermédiaire de zones de contacts. En effet, des images de microscopie électronique réalisées dans les années 60 ont mis en évidence un lien étroit entre le réseau mitochondrial et le RE (Copeland and Dalton, 1959). Plus récemment avec les avancées technologiques et notamment les reconstructions en tomogramme, le contact physique entre ces deux organites a clairement été montré (voir **Figure 23**) (Friedman et al., 2011). Par ailleurs il a été montré par fractionnement que des protéines du RE et des mitochondries étaient retrouvées dans la même fraction suggérant un lien physique entre ces deux organites (Vance, 1990).

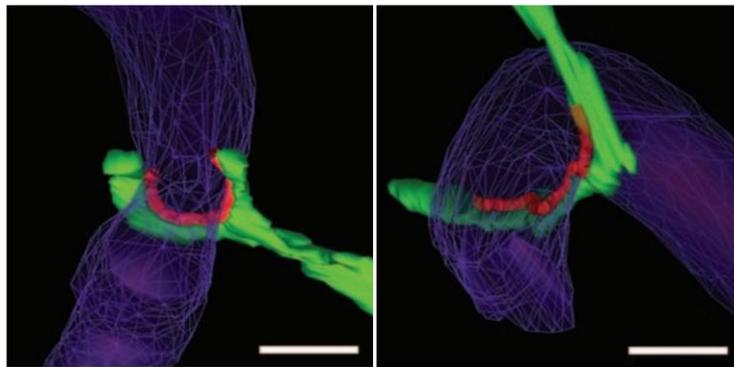


Figure 23 : Zone de contact entre le réticulum endoplasmique et le réseau mitochondrial

Reconstitution en 3 dimensions de zones de contact entre le réticulum endoplasmique et le réseau mitochondrial observées en microscopie électronique chez Saccharomyces cerevisiae. Vert: réticulum endoplasmique, Violet : mitochondrie, Rouge : sites de contacts. Tiré de (Friedman et al., 2011).

2.1. Les complexes protéiques à la base du contact Mitochondrie/RE

Le couplage physique entre le RE et les mitochondries est réalisé par l'intermédiaire de protéines localisées dans les membranes des deux organites. Le complexe ERMES est le mieux caractérisé. Ce complexe, identifié chez *S. cerevisiae* se compose de 4 protéines : Mmm1 qui est ancrée à la membrane du RE, Mdm12 qui est une protéine périphérique de la membrane externe mitochondriale et Mdm34 et Mdm10 qui sont deux protéines localisées dans la membrane externe mitochondriale (Kornmann et al., 2009), voir **Figure 24**

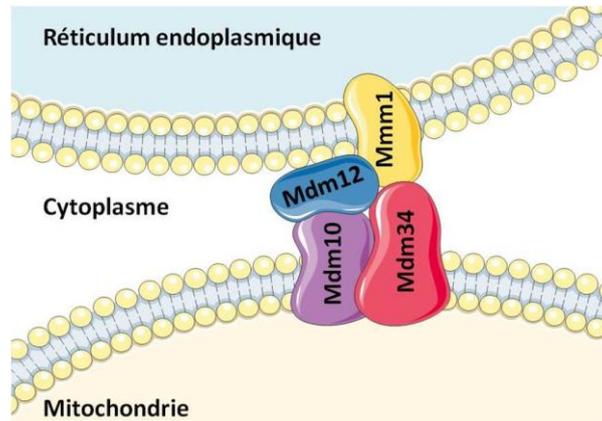


Figure 24: Représentation schématique du complexe ERMES

Chez les mammifères 5 à 20% de la surface mitochondriale se trouve à proximité du RE (Rizzuto et al., 1998). Le complexe ERMES ne semble pas être conservé chez les mammifères. La connexion entre le RE et les mitochondries se fait par l'intermédiaire d'autres complexes, et notamment via la mitofusine 2, une protéine localisée à la surface du RE. Cette protéine interagirait en *trans* avec les mitofusines mitochondriales 1 et 2 permettant une liaison physique entre les deux organites (de Brito and Scorrano, 2008). Par ailleurs une connexion entre les porines de la membrane externe mitochondriale et le récepteur inositol triphosphate du RE (IP₃R) permettrait aussi de lier les deux organites. Cette connexion serait impliquée dans la signalisation calcique. Deux autres complexes seraient aussi impliqués dans la connexion mitochondrie/RE : l'interaction entre la protéine mitochondriale Fis1 et la protéine Bap31 du RE (Iwasawa et al., 2011), et celle de la phosphatase mitochondriale PTPIP51 avec la protéine VAPB, une protéine de la membrane du RE (De Vos et al., 2012).

2.2. Sites de contact et fonction mitochondriale

Les zones de contacts entre ces deux organites sont impliquées dans certaines fonctions mitochondriales.

➤ Synthèse des phospholipides

La synthèse de deux phospholipides la phosphatidylcholine (PC) et la phosphatidylethanolamine (PE), implique une communication étroite entre le RE et les mitochondries. Chez *S. cerevisiae*, le rôle que joue ERMES dans ce processus fait débat. En effet des équipes ont mis en évidence l'implication de ce complexe dans l'échange de lipides entre les deux organites puisque l'absence d'ERMES est corrélée à une diminution du transfert des phospholipides entre ces deux

organites. Cependant le fait que ce transfert de phospholipide ne soit pas totalement aboli suggère l'intervention d'autres complexes dans ce transfert, et par conséquent, dans le contact entre ces deux organites (Kornmann et al., 2009; Voss et al., 2012).

➤ Fission mitochondriale

Chez la levure, des expériences de microscopie électronique en tomographie ont permis la reconstruction 3D des zones de contacts entre les mitochondries et le RE avec une résolution d'environ 4 nm chez la levure et les mammifères. Dans cette étude, les auteurs montrent que le RE s'enroule autour des mitochondries ce qui aurait pour conséquence une constriction du tubule mitochondrial aboutissant à sa scission. Les protéines de fission Dnm1/Drp1 sont décrites comme localisées à proximité de ces zones de contacts. Deux modèles sont envisageables : (1) certaines protéines du RE participent à la fission mitochondriale ou (2) l'enroulement du RE autour des tubules facilite le recrutement des protéines de fission (voir **Figure 23**) (Friedman et al., 2011).

En mettant en évidence l'implication du cytosquelette d'actine dans ce processus, deux études parues récemment chez les mammifères vont dans le sens du deuxième modèle. En effet, la polymérisation d'actine entre le RE et le réseau mitochondrial, par l'intermédiaire de la formine INF2, et la présence de myosine II, permettraient la constriction des tubules ayant pour conséquence l'assemblage des protéines de fission (Korobova et al., 2014; Korobova et al., 2013). Chez *S. cerevisiae*, il semblerait que le complexe ERMES et la GTPase Miro Gem1 soient aussi impliqués dans la fission mitochondriale dépendante du RE (Murley et al., 2013).

Depuis quelques années, nous prenons conscience du lien étroit qui lie les mitochondries au reste des machineries cellulaires. Ces connexions permettent une adaptation des fonctions et de l'architecture mitochondriale aux besoins cellulaires.

VI. REGULATION DE LA MORPHOLOGIE MITOCHONDRIALE

1. MORPHOLOGIE INTERNE ET METABOLISME *IN VITRO*

De nombreuses équipes ont révélé le caractère dynamique de la membrane interne mitochondriale, dont la morphologie évolue en fonction de l'état physiologique de la cellule. Le pionnier dans ce domaine est Hackenbrock. Dans ces travaux publiés en 1966 sur des mitochondries isolées de foie de rat, il montre que la topologie de la membrane interne change en fonction de l'état respiratoire (Hackenbrock, 1966). Lorsque les mitochondries sont en présence d'un excès d'ADP et de substrat, la phosphorylation est à sa vitesse maximale. Dans ces conditions, il observe que les mitochondries sont en conformation condensée caractérisée par des crêtes dont le volume est très augmenté réduisant l'espace matriciel. Lorsque l'ADP devient limitant, le volume des crêtes diminue, il définit cette conformation comme l'état « orthodoxe » (voir Figure 25).

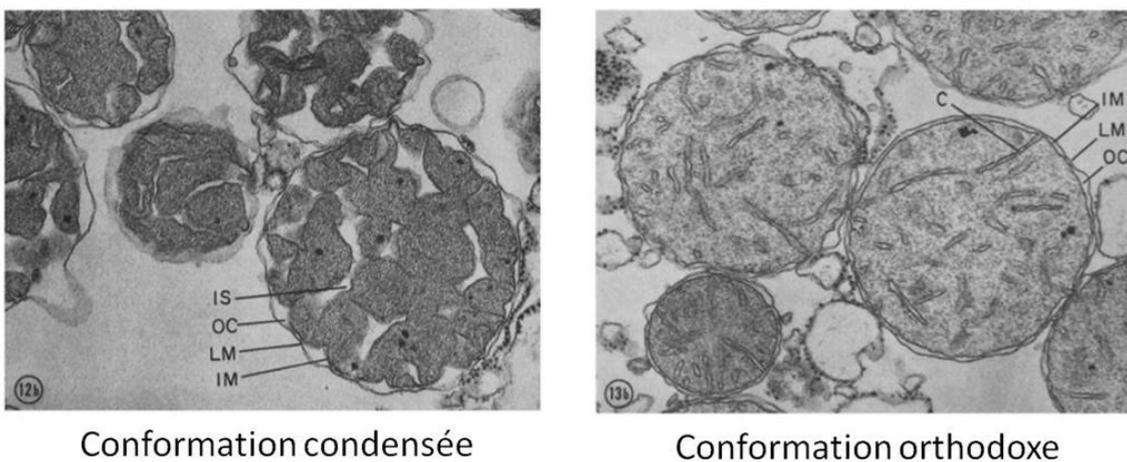


Figure 25 : La topologie de la membrane interne évolue en fonction de l'état respiratoire.

Images de microscopie électronique de mitochondrie de cellules de foie de souris. IS = Intracristal space (espace entre les crêtes), OC = Outer compartment (espace inter-membranaire), LM= Limiting membrane (membrane externe), IM = Inner membrane (membrane interne), C = Cristae (crête). Tiré de (Hackenbrock, 1966).

2. MORPHOLOGIE MITOCHONDRIALE ET SOURCES DE CARBONE CHEZ *S. CEREVISIAE*

S. cerevisiae métabolise de préférence du glucose ou du fructose et préfère n'importe quelle source de carbone fermentescible aux sources de carbone respiratoire, bien que le rendement énergétique en milieu respiratoire soit nettement supérieur.

L'utilisation préférentielle du glucose par la levure passe par une répression transcriptionnelle des gènes requis pour le catabolisme des autres sucres, mais également par la répression des gènes codant pour les phosphorylations oxydatives. Ces processus de régulation, combinent l'action de la kinase Snf1 et du complexe de régulation HAP. En présence de glucose, le complexe SNF1 est inactif et le répresseur transcriptionnel Mig1 non phosphorylé est localisé dans le noyau. Ceci permet la répression des gènes nécessaires au métabolisme des autres sucres. Inversement, en absence de glucose, le complexe SNF1 est activé par phosphorylation et se localise dans le cytoplasme conduisant à une levée de la répression catabolique (De Vit et al., 1997; Treitel et al., 1998).

2.1. Réorganisation du réseau mitochondrial

En 1995, une première étude compare dans différentes conditions de croissance l'organisation du réseau mitochondrial avec l'utilisation d'un marqueur fluorescent. Lorsque les levures sont dans un milieu contenant de l'éthanol comme source de carbone, les auteurs décrivent la présence d'un grand nombre de petites mitochondries sphériques. En présence de glucose dans le milieu de culture, ils montrent que les mitochondries forment un petit nombre de tubules larges et branchées (voir **Figure 26 A et B**) (Visser et al., 1995).

Une autre étude s'est intéressée à la différence de morphologie du réseau en présence de glucose et de glycérol comme source de carbone. Chez les levures cultivées en présence de glucose, le réseau mitochondrial est tubulaire avec peu de points de branchement. Au contraire, en présence de glycérol, le réseau est beaucoup plus complexe. La quantification du nombre de points de branchement dans ces deux conditions révèle qu'en présence de glycérol le réseau est quatre fois plus branché. Il est également montré que les tubules sont légèrement plus épais et que le volume total du réseau mitochondrial est trois fois plus grand en présence de glycérol qu'en présence de glucose (voir **Figure 26 C et D**) (Egner et al., 2002). Les résultats de ces deux études mettent en évidence la capacité adaptative du réseau mitochondrial.

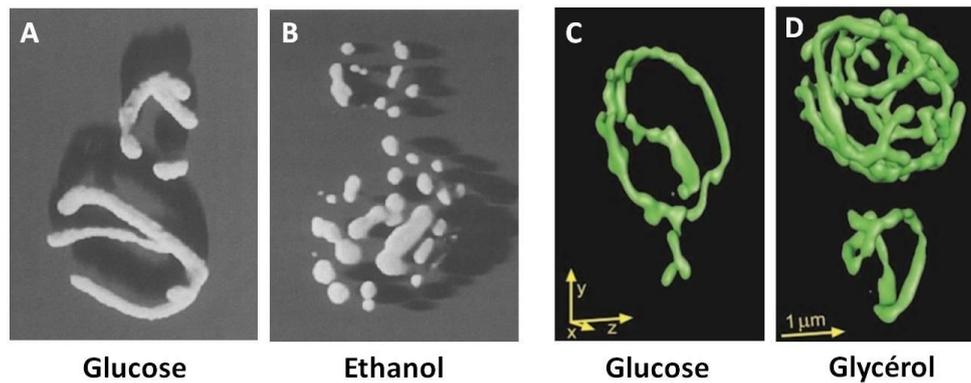


Figure 26 : remaniement du réseau mitochondrial en fonction de la source de carbone utilisée par la cellule

Images de mitochondries de *Saccharomyces cerevisiae* en présence de **A** : Glucose, **B** : Ethanol, **C** : Glucose, **D** : Glycérol. **A-B** d'après (Visser et al., 1995), **C-D** : tiré de (Egner et al., 2002).

2.2. Régulation de la structure interne mitochondriale

En 1962, Yotsuyanagi s'est intéressé à l'évolution de la morphologie mitochondriale au cours de la croissance aérobie en milieu riche contenant du glucose. Durant la phase exponentielle de croissance, les levures consomment le glucose présent dans le milieu et produisent de l'éthanol par fermentation alcoolique. Lorsque le glucose est épuisé, les levures adaptent leur métabolisme et utilisent l'éthanol produit durant la phase exponentielle comme source de carbone : c'est la diauxie. Durant la phase de croissance exponentielle, Yotsuyanagi décrit « des mitochondries aux structures peu développées » contenant très peu de crêtes mitochondriales. A la diauxie, « la remontée de la capacité respiratoire trouve parfaitement sa base structurale : le nombre des mitochondries augmente progressivement, leur taille devient importante et on voit apparaître des cristae (=crêtes) de plus en plus nombreuses à l'intérieur des mitochondries » (Yotsuyanagi, 1962). Ces résultats mettent en avant le caractère dynamique de la membrane interne mitochondriale.

3. TAILLE CELLULAIRE

Chez les mammifères et la levure, le ratio du volume mitochondrial et taille des cellules est constant (Posakony et al., 1977; Uchida et al., 2011). Dans une étude publiée en 2012, Rafelski *et al.* se sont intéressés à l'évolution de ce ratio au cours de la division asymétrique de *S. cerevisiae*. Leurs résultats montrent que les cellules filles possèdent une quantité de mitochondrie proportionnelle à leur taille. Les auteurs mettent aussi en évidence un ratio mitochondrie/volume cellulaire décroissant dans les cellules mères au fur et à mesure des divisions (Rafelski et al., 2012) et donc du

vieillessement répliatif. Ces résultats mettent en évidence le haut niveau de régulation qui doit exister pour ajuster de façon précise la quantité mitochondriale en fonction du volume cellulaire

4. AUTOPHAGIE

L'autophagie est un processus de destruction des constituants cellulaires, il en existe deux types. L'autophagie non sélective se déroule en condition de stress, par exemple lorsque les cellules sont carencées en nutriment et permet l'apport d'énergie aux cellules. L'autophagie dite sélective, à lieu dans des conditions riches, et permet la suppression d'organelles surnuméraires ou défectueux ainsi que la suppression d'agrégats de protéine toxiques pour la cellule. Durant l'autophagie, une partie du cytoplasme et des organites est séquestrée par une structure composée d'une double-membrane appelée autophagosome. La fusion des autophagosomes avec les lysosomes permet la dégradation des cargos par des hydrolases. Cette dégradation permettrait un recyclage des composants cellulaires

La mitophagie est une macro-autophagie spécifique des mitochondries. L'augmentation de la séquestration des mitochondries dans les lysosomes à été observé pour la première fois en microscopie électronique dans des hépatocytes de rats stimulés au glucagon (De Duve and Wattiaux, 1966). En 2007, Kim et al. nomment « mitophagie » le processus d'engloutissement des mitochondries par des vésicules contenant le marqueur LC3 (pour MAP1 light chain 3, dont l'homologue de levure est Atg8) (Kim et al., 2007).

Chez la levure et les mammifères, la mitophagie est précédée par la fission mitochondriale (Nowikovsky et al., 2007; Twig et al., 2008). Elle servirait de processus de « control qualité » en éliminant les mitochondries endommagées. En effet, il a été montré que la mitophagie a lieu en condition d'anaérobie ou lorsque les mitochondries ont un défaut de potentiel de membrane (Nowikovsky et al., 2007; Priault et al., 2005). Il a également été montré que la mitophagie serait requise pour le renouvellement des mitochondries (Tal et al., 2007), pour l'ajustement du nombre de mitochondrie en condition de changement métabolique (Kissova et al., 2004) ainsi que durant la différenciation des globules rouges chez les mammifères (Schweers et al., 2007).

Chez la levure, la protéine Uth1 est principalement localisée dans la membrane externe mitochondriale, elle serait requise pour l'élimination des mitochondries à la suite d'un changement en nutriment (Kissova et al., 2004). La protéine Aup1, de la super famille des phosphatases 2C, faciliterait la mitophagie dans des cultures de levure en milieu respiratoire atteignant l'état stationnaire (Tal et al., 2007). Plus récemment, deux cribles ont identifié la protéine Atg32 comme étant nécessaire pour le processus de mitophagie (Kanki et al., 2009; Okamoto et al., 2009). Aucun

homologue de cette protéine n'est connu chez les métazoaires. Atg32 se localise dans la membrane externe mitochondriale. Son domaine C-terminal localise dans l'espace inter-membranaire et son domaine N-terminal est localisé dans le cytosol. Par son motif de liaison WXXL, Atg32 interagit physiquement avec Atg8. Ces deux protéines interagissent également de façon indirecte par l'intermédiaire de la protéine adaptatrice Atg11. Se sont ces interactions qui permettraient le recrutement des mitochondries aux autophagosomes (Kanki et al., 2009).

D'autres gènes ont été identifiés comme étant nécessaires pour la mitophagie chez la levure suggérant que plusieurs voies interviendraient dans le processus d'autophagie.

VII. CONCLUSION

Les Mitochondries possèdent leur propre génome et forment un réseau au sein des cellules dont la quantité et la morphologie s'adaptent en fonction de l'état physiologique des cellules. Après l'intérêt qui leur a été porté pour leur rôle dans le métabolisme énergétique, les avancées scientifiques ont permis la mise en évidence de leur implication dans de nombreuses fonctions cellulaires faisant ainsi de cet organite un élément central de la vie des cellules. Des liens étroits avec les autres composants cellulaires ont été décrits, impliquant une communication dynamique entre les différents organites afin de permettre la coordination des signaux et des échanges en réponses aux besoins cellulaires. Aujourd'hui, les fonctions de près d'un quart des protéines mitochondriales n'ont pas été découvertes, laissant entrevoir encore de beaux jours pour la biologie mitochondriale.

Localisation *in vivo* de l'ATP synthase
mitochondriale chez la levure
Saccharomyces cerevisiae

CHAPITRE II : LOCALISATION *IN VIVO* DE L'ATP SYNTHASE MITOCHONDRIALE CHEZ LA LEVURE *SACCHAROMYCES CEREVISIAE*

I. INTRODUCTION

A mon arrivée au laboratoire, je me suis intéressé au remaniement du réseau mitochondrial chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* en quiescence (voir chapitre III). Des constructions de protéines mitochondriales fusionnées avec des protéines fluorescentes ont été réalisées pour suivre la morphologie du réseau mitochondrial. De façon inattendue, lorsque les levures prolifèrent en présence de sucres fermentescibles, les sous unités de l'ATP synthase fusionnées avec des protéines fluorescentes présentent une localisation discontinue le long du réseau mitochondrial (voir **Figure 27**).

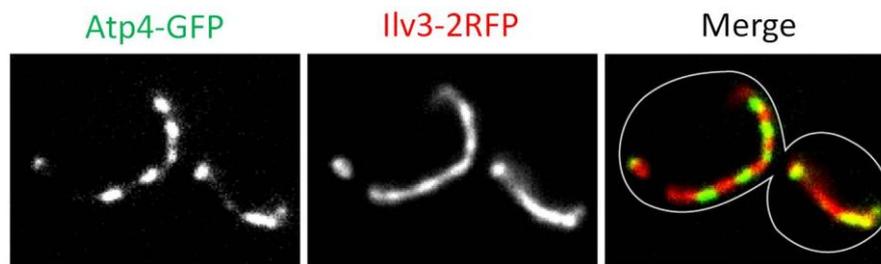


Figure 27 : Localisation de la sous unité 4 de l'ATP synthase au sein du réseau mitochondrial

Image de microscopie d'une souche cultivée en YPD co-exprimant la sous unité Atp4 de l'ATP synthase fusionnée à la GFP, et la protéine Ilv3 à deux RFP en tandem, révélant le réseau mitochondrial.

Durant la première partie de ma thèse, je me suis donc intéressée à la localisation de l'ATP synthase au sein du réseau mitochondrial. Ces travaux ont donné lieu à une publication « *Mitochondrial ATP synthases cluster as discrete domains that reorganize with cellular demand for oxydative phosphorylation* » publiée en Février 2014 dans « *The journal of cell science* ».

II. CONTEXTE DE L'ETUDE

La localisation de l'ATP synthase est depuis longtemps une question qui intéresse de nombreuses équipes de recherche.

1.1. Localisation en microscopie électronique et immuno-marquage

Gilkerson et al., ont localisé l'ATP synthase et le complexe III de la chaîne respiratoire sur des coupes de cœur de bœuf par l'intermédiaire d'anticorps couplés à des particules d'or. 92,3% et 93,8% de l'ATP synthase et des complexes III qu'ils détectent respectivement sont localisés au niveau des crêtes mitochondriales. La normalisation de ces résultats en fonction de l'aire de l'IBM et des crêtes révèle une densité 2,5 fois plus importante de ces complexes dans les crêtes mitochondriales (Gilkerson et al., 2003). Dans une étude publiée en 2006 par Vogel et al., les auteurs se sont intéressés à la localisation de protéines composant trois complexes de la chaîne respiratoire chez *S. cerevisiae*. Ces expériences ont été réalisées en milieu respiratoire, en présence de lactate comme source de carbone. La longueur des crêtes mitochondriales étant 1,5 fois plus longue que l'IBM, les auteurs ont normalisé leurs résultats afin de déterminer la densité relative de chaque protéine au sein des différentes membranes mitochondriales. Ils montrent que la plupart des sous-unités testées localisent majoritairement au sein des crêtes (voir **Figure 28C**). A titre d'exemple, deux protéines du complexe III, Cor1 et Qcr2 localisent respectivement à 67,1% et 66,6% au sein de la membrane des crêtes. Ils estiment également que 55,4% et 60,1% des sous-unités *e* et *g* de l'ATP synthase, codées respectivement par *TIM11* et *ATP20*, localisent au niveau des crêtes (voir **Figure 28**) (Vogel et al., 2006).

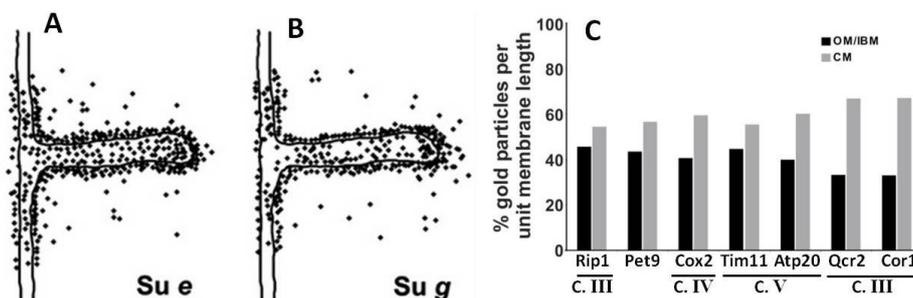


Figure 28 : Distribution des sous-unités de l'ATP synthase

A-B : représentation de l'accumulation des particules d'or sur un modèle de crête par immuno-microscopie électronique chez *S. cerevisiae* cultivées en milieu respiratoire. **C** : quantification de la distribution des protéines impliquées dans les OXPHOS en conditions respiratoires (Vogel et al., 2006).

Ces deux études montrent dans deux modèles différents une localisation préférentielle de l'ATP synthase et des complexes de la chaîne respiratoire dans les crêtes mitochondriales. Toutefois, ces techniques peuvent être critiquées. En effet, la liaison de l'épitope par l'anticorps implique la pénétration de ce dernier dans la cellule, ce qui nécessite une étape de fixation et de perméabilisation des cellules pouvant être à l'origine d'artéfacts.

1.2. Microscopie à fluorescence conventionnelle

Différents articles publiés sous la direction du professeur Devenish ont eu pour objet la mise au point de protéines de fusion entre des sous unités de l'ATP synthase et la GFP chez *S. cerevisiae*. Dans une première étude parue en 1997, les auteurs montrent que l'expression de la protéine Atp5 fusionnée en C-terminal à la GFP via un vecteur multi-copie, dans une souche *atp5Δ*, permet la croissance des cellules en présence de substrats respiratoires, ce qui indique que la protéine de fusion Atp5-GFP est fonctionnelle. De plus, cette protéine de fusion co-purifie avec les autres sous unités de l'ATP synthase, révélant son assemblage au sein de ce complexe enzymatique. Les auteurs ont localisé Atp5-GFP en milieu respiratoire et décrivent un signal de fluorescence formant un réseau filamenteux (voir **Figure 30A**) (Prescott et al., 1997). Ces résultats correspondent à la première localisation de l'ATP synthase avec la GFP par microscopie à fluorescence chez *S. cerevisiae*. Dans une autre étude, dans les mêmes conditions expérimentales que l'étude précédente, les auteurs étudient les localisations des sous unités Atp5, Atp7, Atp4 et Atp20 fusionnées à la GFP et analysent l'influence de la longueur de la séquence « linker » entre les sous unités de l'ATP synthase et la GFP sur la fonctionnalité des protéines de fusion (Prescott et al., 1999). Enfin dans une dernière étude, ils montrent qu'il est d'obtenir une protéine de fusion fonctionnelle entre la sous unité Atp3 et la GFP (Prescott et al., 2003). L'ensemble de ces résultats met en évidence la possibilité de fusionner les sous-unités de l'ATP synthase avec des protéines fluorescentes tout en préservant la fonctionnalité des sous unités de l'ATP synthase. Les auteurs décrivent un signal de fluorescence sous forme de réseau filamenteux caractéristique du réseau mitochondrial. Il est important de prendre en compte que cette localisation résulte d'une surexpression des protéines de fusion liée à l'utilisation de vecteurs multi-copie. De plus, les auteurs observent les cellules après lavage de ces dernières dans de l'eau suivie étonnamment, d'une étape de séchage, ce qui ne correspond pas à des conditions optimales pour étudier la morphologie du réseau mitochondrial chez les levures.

Les levures délétées pour le gène *MDM10* présentent des mitochondries géantes dont le diamètre peut parfois atteindre 2µm. Ce mutant possède bien une double membrane ainsi que des crêtes mitochondriales intactes (Sogo and Yaffe, 1994). Ces mitochondries géantes permettraient la distinction, en microscopie conventionnelle, entre les protéines de l'IBM et celles des crêtes. Dans ce

contexte l'ATP synthase et les complexes de la chaîne respiratoire ont été localisés. A la différence de Tim50 qui se localise à la périphérie des mitochondries géantes, les sous-unités Atp1 et Atp2 de l'ATP synthase ainsi que la sous unité Qcr2 localisent dans la partie centrale révélant selon les auteurs une localisation dans les crêtes mitochondriales (voir **Figure 29**) (Wurm and Jakobs, 2006). Cependant, dans cette étude, les conditions de cultures ne sont pas spécifiées.

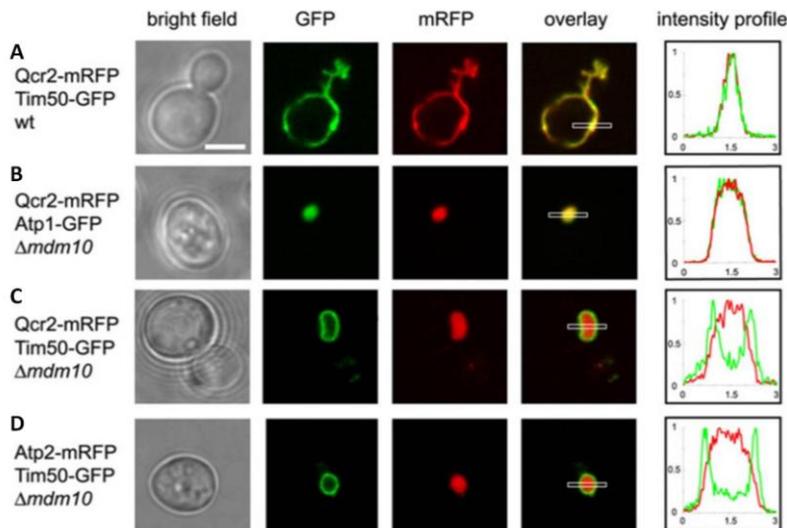


Figure 29 : Localisation de protéines mitochondriales dans un mutant *mdm10Δ*

*Localisation différentielle de protéines de la membrane interne fusionnées à la GFP ou à la mRFP dans les mitochondries géantes *mdm10Δ*. A : WT co-exprimant Qcr2-mRFP et Tim50-GFP. B : *mdm10Δ* co-exprimant Qcr2-mRFP et Atp1-GFP. C : *mdm10Δ* co-exprimant Qcr2-mRFP et Tim50-GFP. D : *mdm10Δ* co-exprimant Atp2-mRFP et Tim50-GFP.*

Figure tirée de : (Wurm and Jakobs, 2006).

En 2010 est parue une étude s'intéressant à la localisation de l'ATP synthase chez les mammifères en microscopie à fluorescence conventionnelle. Les auteurs ont transfecté de façon stable des cellules HeLa avec un vecteur permettant l'expression d'une protéine de fusion entre la sous unité γ (ATP3) de l'ATP synthase et la DsRed ou l'EGFP. Après fixation des cellules, les auteurs ont observé la localisation des protéines de fusion en microscope confocale et décrivent une distribution homogène le long du réseau mitochondrial (voir **Figure 30B**) (Muster et al., 2010).

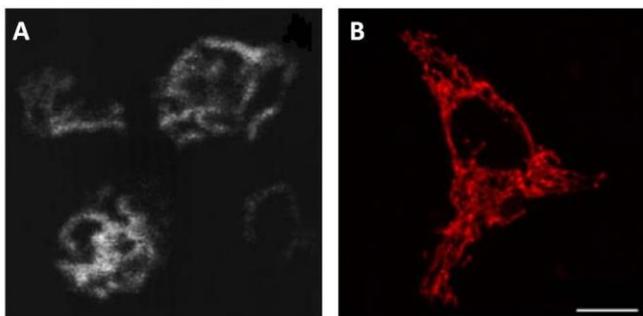


Figure 30 : Localisation de l'ATP synthase par microscopie à fluorescence conventionnelle

A : Image de microscopie confocale : Saccharomyces cerevisiae cultivée en milieu respiratoire exprimant la sous unité Atp5 de l'ATP synthase fusionnée à la GFP (Prescott et al., 1997). B : Images de cellules HeLa fixées après transfection stable de la sous unité γ de l'ATP synthase fusionnée à la DsRed. Echelle : 20 μ m (Muster et al., 2010).

1.3. Microscopie à super-résolution

Dans une étude parue en 2006, des auteurs se sont intéressés à la localisation de l'ATP synthase en microscopie 4Pi. Cette technique permet, par l'utilisation de deux objectifs opposés, une résolution axiale de 100-150nm comparé aux 500-700nm de la microscopie confocale (Hell et al., 1994). Après une étape de fixation et de perméabilisation, la sous unité α de l'ATP synthase a été immuno-marquée dans une lignée cellulaire mammifère. L'anticorps secondaire utilisé a été couplé à une boîte quantique, qui est une structure nanométrique de semi-conducteurs possédant de meilleures propriétés que les fluorophores organiques. Les images de microscopie 4Pi et notamment la représentation 3D montrent une localisation inhomogène de l'ATP synthase. En effet, certaines zones semblent « gonflées » alors que d'autres semblent d'avantage « contractées » (voir **Figure 31**) (Medda et al., 2006)

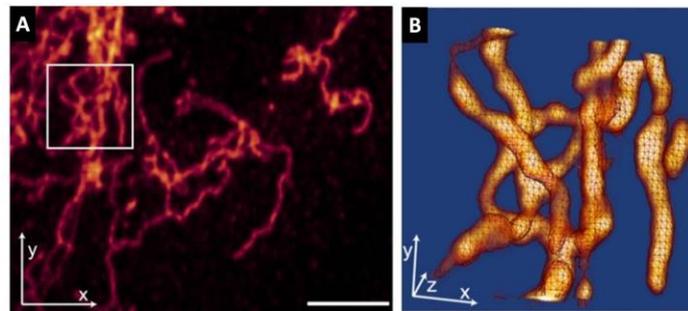


Figure 31 : Localisation de l'ATP synthase en microscopie 4Pi

A : Projection moyenne du réseau mitochondrial en microscopie 4Pi, révélé par la sous unité α de l'ATP synthase. **B** : représentation 3D de la zone encadrée en (A). Échelle : 5 μ m (Medda et al., 2006).

La technique de super-résolution par détection de molécules uniques dSTORM (pour *direct stochastic optical reconstruction microscopy*) a été appliquée à l'ATP synthase dans une lignée cellulaire mammifère (COS-7). Après fixation, les cellules sont incubées avec un anticorps dirigé contre la sous unité β de l'ATP synthase, lui-même reconnu par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa 647. La **Figure 32A** illustre la localisation de l'ATP synthase obtenue en microscopie à fluorescence par réflexion totale interne (TIRF). Les reconstitutions de dSTORM sont illustrées dans les **Figure 32C**. Bien que les mitochondries semblent fragmentées dans les images présentées dans l'article, la possibilité de visualiser des molécules uniques d'ATP synthase est mise en évidence. Cette étude montre un répartition inhomogène des molécules d'ATP synthase au sein de la mitochondrie (van de Linde et al., 2008).

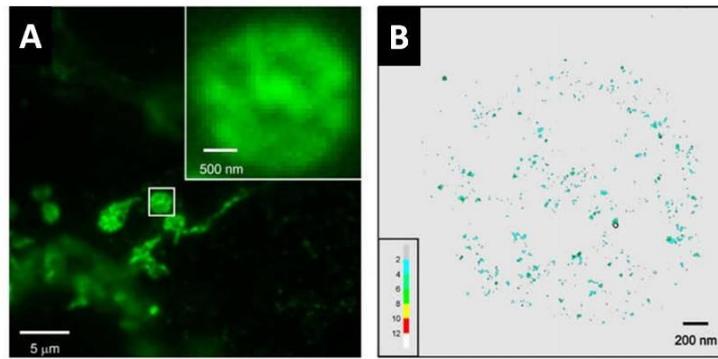


Figure 32 : Localisation de l'ATP synthase en dSTORM

A : Image de microscopie à fluorescence par TIRF (Total Internal Reflection Fluorescence) des cellules COS-7 immuno-marquées pour la sous unité β de l'ATP synthase. **B :** Image de dSTORM reconstruite à partir de l'agrandissement du (A), révélant les détails de distribution de l'ATP synthase (van de Linde et al., 2008).

La microscopie STED (pour *stimulated emission depletion*) a également été appliquée à l'ATP synthase dans la lignée PtK2 en utilisant des anticorps contre la sous unité α . Avec une résolution de 30nm, les résultats de cette étude montrent une distribution hétérogène de l'ATP synthase au sein des tubules des mitochondries et la présence de zones dépourvues de fluorescence (voir **Figure 33A**) (Schmidt et al., 2009).

Pour finir, une autre étude s'est intéressée à la localisation de l'ATP synthase par la technique de TALM (*Tracking And Localisation Microscopy*). Dans cette étude, la sous unité γ fusionnée à un tag Halo est exprimée de façon stable dans des cellules HeLa. Après incubation avec le TMR, un ligand fluorescent qui se fixe au niveau du tag Halo, les images de TALM mettent en évidence une localisation compartimentalisée des molécules d'ATP synthase (voir **Figure 33B**). La carte des trajectoires révèle des parcours orthogonaux à l'axe longitudinal des mitochondries suggérant une localisation de ces molécules dans les crêtes (voir **Figure 33C**) (Appelhans et al., 2012).

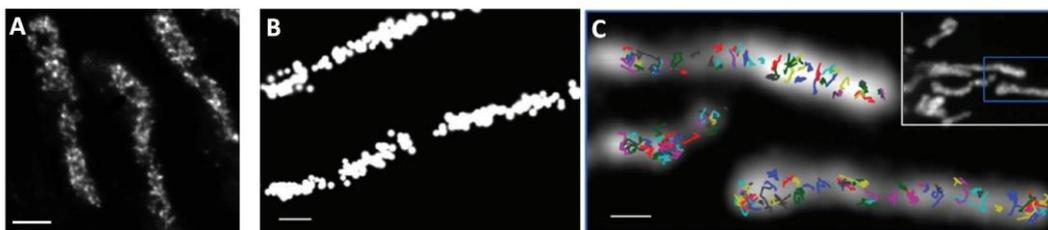


Figure 33 : Localisation de l'ATP synthase par STED et TALM

A : Images de STED révélant la localisation de l'ATP synthase dans la lignée de cellulaire PtK2 (Schmidt et al., 2009) **B :** Image de la localisation de l'ATP synthase révélée par la fixation du TMR sur le tag Halo de la sous unité γ dans des cellules HeLa. **C :** Carte de trajectoires de l'ATP synthase révélées par TALM. **B et C :** (Appelhans et al., 2012). Echelles : 500nm.

Les techniques de super-résolution appliquées à l'ATP synthase apportent des informations nouvelles quant à la localisation de ce complexe au sein des mitochondries. En effet, chacune de ces études met en avant la localisation hétérogène de l'ATP synthase. Les études de dSTORM et de STED sont utilisées sur des échantillons fixés. Les expériences de TALM ont été réalisées par surexpression de sous unités de l'ATP synthase fusionnées à un Halo tag, et ni la fonctionnalité ni l'assemblage dans le complexe ATP synthase n'ont été testés.

Aucune des études citées précédemment n'a permis de localiser de manière dynamique, dans des cellules vivantes, une ATP synthase fonctionnelle exprimée à un niveau endogène. J'ai donc voulu dans la première partie de ma thèse localiser *in vivo* l'ATP synthase chez *S. cerevisiae* en utilisant des souches exprimant à un niveau natif des sous unités de l'ATP synthase qui sont fonctionnelles lorsque fusionnées à des protéines fluorescentes. Pour ce faire, les gènes codant pour la GFP ou la RFP ont été intégrés par recombinaison homologue au locus en 3' de chaque gène codant pour les différentes sous unité de l'ATP synthase, permettant l'expression endogène de la protéine de fusion ainsi créée. Cette étude est présentée dans l'article suivant.

III. RESUME DE L'ARTICLE

La mitochondrie est un organe très dynamique organisé en réseau et composé de tubules qui fusionnent et fissionnent constamment. Les mitochondries possèdent deux membranes : la membrane externe et la membrane interne qui sépare la matrice mitochondriale de l'espace intermembranaire. Cette dernière forme des invaginations dans la matrice mitochondriale appelées crêtes, qui sont le lieu des réactions d'oxydation phosphorylantes lors desquelles l'ATP synthase utilise le gradient électrochimique de protons généré par la chaîne respiratoire pour synthétiser de l'ATP. L'ATP synthase s'organise en multimères qui sont nécessaires à la morphogénèse et au maintien des crêtes mitochondriales.

Dans cette étude, nous nous sommes intéressés à la localisation de l'ATP synthase dans des cellules vivantes de *Saccharomyces cerevisiae* cultivées dans un milieu fermentescible. Ces expériences ont révélé que l'ATP synthase localise en domaines le long du réseau mitochondrial. Ces domaines, qui n'ont ni taille ni espacement spécifique, occupent 55% du réseau mitochondrial et sont dynamiques. Nous avons ensuite étudié la présence des domaines d'ATP synthase dans des mutants avec des défauts d'architecture mitochondriale. Dans un mutant *atp20Δ*, dans lequel la morphologie des crêtes est anormale suite à un défaut de dimérisation de l'ATP synthase, nous avons montré que les domaines d'ATP synthase sont absents et que l'ATP synthase occupe tout le réseau. De manière similaire, la formation des domaines d'ATP synthase est affectée dans des mutants où le complexe MICOS a été inactivé, ce complexe étant lui aussi nécessaire au maintien des crêtes mitochondriales. Enfin, nous avons montré que les domaines d'ATP synthase co-localisent partiellement avec le complexe MICOS qui se localise au niveau de la base des crêtes mitochondriales. Ces résultats suggèrent que les domaines d'ATP synthase correspondent aux crêtes mitochondriales. En conditions respiratoires, la biogénèse mitochondriale est fortement induite et les mitochondries seraient enrichies en crêtes. Dans ces conditions, l'ATP synthase se localise de façon homogène tout au long du réseau mitochondrial. Des expériences de FRAP, ainsi que la localisation du complexe MICOS, suggèrent que dans ces conditions, les crêtes mitochondriales sont si nombreuses et si proches les unes des autres qu'elles ne sont plus séparables en microscopie conventionnelle.

Ces résultats indiquent qu'il est possible de suivre *in vivo* les crêtes mitochondriales en localisant l'ATP synthase et ouvrent de nouvelles perspectives pour l'étude du remaniement de la membrane interne dont l'architecture est essentielle pour l'activité mitochondriale.

SHORT REPORT

Mitochondrial ATP synthases cluster as discrete domains that reorganize with the cellular demand for oxidative phosphorylation

Laure Jimenez^{1,2}, Damien Laporte^{1,2}, Stephane Duvezin-Caubet^{1,2}, Fabien Courtout^{1,2} and Isabelle Sagot^{1,2,*}

ABSTRACT

Mitochondria are double membrane-bounded organelles that form a dynamic tubular network. Mitochondria energetic functions depend on a complex internal architecture. Cristae, inner membrane invaginations that fold into the matrix space, are proposed to be the site of oxidative phosphorylation, reactions by which ATP synthase produces ATP. ATP synthase is also thought to have a role in crista morphogenesis. To date, the exploration of the processes regulating mitochondrial internal compartmentalization have been mostly limited to electron microscopy. Here, we describe ATP synthase localization in living yeast cells and show that it clusters as discrete inner membrane domains. These domains are dynamic within the mitochondrial network. They are impaired in mutants defective in crista morphology and partially overlap with the crista-associated MICOS–MINOS–MITOS complex. Finally, ATP synthase occupancy increases with the cellular demand for OXPHOS. Overall our data suggest that domains in which ATP synthases are clustered correspond to mitochondrial cristae. Being able to follow mitochondrial sub-compartments in living yeast cells opens new avenues to explore the mechanisms involved in inner membrane remodeling, an architectural feature crucial for mitochondrial activities.

KEY WORDS: Mitochondria, Yeast, ATP synthase

INTRODUCTION

Mitochondria are double-membrane-bound organelles with essential functions including the production of key metabolites. Mitochondrial dysfunction has been linked to ageing (Britic and Larsson, 2013) and to a variety of pathologies such as cancer, neurodegenerative disorders and severe neuromuscular syndromes (Schapira, 2012; Wallace, 2012). Mitochondria form a tubular network that is incessantly remodeled. Machineries contributing to mitochondrial fusion, fission, tubulation and partitioning have been identified (Chan, 2012; Westermann, 2010; Youle and van der Bliek, 2012; Zhao et al., 2013), and it was established that mitochondrial division frequently occurs at the site where mitochondria contacts the endoplasmic reticulum (Friedman et al., 2011; Murley et al., 2013; Rowland and Voeltz, 2012). Importantly, the mitochondrial network scales up with increasing cell size (Rafelski et al., 2012) and in fact, the mitochondrial architecture appears tightly linked to the organelle

activity in response to cellular needs (Sauvanet et al., 2010; Westermann, 2010; Youle and van der Bliek, 2012).

Although the overall mitochondrial network remodeling has been described in details using live cell imaging techniques, less is known about the dynamic regulation of the complex internal organization of this organelle. Cristae are inner membrane invaginations that fold into the matrix. Cristae emanate from a narrow neck, the crista junction, and can adopt various morphologies and density depending on the cell type (Mannella, 2006; Mannella et al., 2001). Cristae are thought to be the site of oxidative phosphorylation (OXPHOS), reactions by which ATP is produced from the proton gradient generated across the inner membrane by the respiratory chain. In fact, it was proposed that cristae increase the membrane area available for OXPHOS and play an important role in creating a microenvironment that optimizes ATP synthesis (Bornhövd et al., 2006; Davies et al., 2011; Strauss et al., 2008; Zick et al., 2009). Recently, studies in yeast identified Fc1, a mitofilin homologue, as part of a complex localizing at crista junctions and required for junctions maintenance (Alkhaja et al., 2012; Hamer et al., 2011; Hoppins et al., 2011; Rabl et al., 2009; von der Malsburg et al., 2011). Yet, crista morphogenesis and remodeling remain poorly understood.

ATP synthase is an inner-membrane-anchored rotating enzyme that produces ATP (Walker, 2013). ATP synthase is arranged as dimers assembled like ribbons at the crista apex, a region with high membrane curvature (Allen et al., 1989; Buzhynskyy et al., 2007; Davies et al., 2012; Davies et al., 2011; Dudkina et al., 2005; Strauss et al., 2008; Thomas et al., 2008). Importantly, ATP synthase supra-molecular organization is thought to have a crucial role in shaping cristae, and mutants impaired in ATP synthase dimerization display defects in crista morphology (Davies et al., 2012; Paumard et al., 2002; Rabl et al., 2009; Soubannier et al., 2002; Wittig and Schägger, 2008; Zick et al., 2009). Previous studies using super-resolution techniques in mammalian models have revealed that ATP synthase localizes as clusters in the inner membrane (Appelhans et al., 2012; Jans et al., 2013; Schmidt et al., 2009; van de Linde et al., 2008; Wilkens et al., 2013). In this study, using conventional fluorescence microscopy, we tracked GFP labeled ATP synthases expressed at a native level in living yeast cells. We found that they cluster into discrete domains that we have called F1-F0 ATP synthase clustering domains (F1F0-CDs). These domains do not correlate with mitochondrial fusion or fission sites but partially overlap with crista-associated mitochondrial inner membrane organizing system (MICOS–MINOS–MITOS) components. F1F0-CDs are impaired in mutants with defects in crista morphology and importantly, their occupancy increases with the cellular demand for OXPHOS. Taken together our results strongly suggest that F1F0-CDs correspond to mitochondria cristae.

¹Université de Bordeaux, Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, Unité Mixte de Recherche 5095, Centre National de la Recherche Scientifique, Université Victor Segalen/Bordeaux II, F-33077 Bordeaux Cedex, France.
²CNRS, UMR5095 Bordeaux, France.

*Author for correspondence (isabelle.sagot@ibgc.u-bordeaux2.fr)

Received 19 June 2013; Accepted 13 November 2013

RESULTS AND DISCUSSION

ATP synthase localizes as discrete domains

To localize ATP synthase at a native level in living yeast, we inserted, into haploid strains, the coding sequence for either GFP or a tandem of RFPs (hereafter referred to as 2RFP) downstream of chromosomal loci coding for ATP synthase subunits. Therefore each strain expressed an ATP synthase subunit fused to a fluorescent protein (FP) from its own promoter as the sole source of the ATP synthase subunit (no untagged subunit). Importantly, this procedure was followed for all the GFP fusion proteins used in this study (supplementary material Table. S1). When fused to FP, most ATP synthase subunits remained

functional as attested by cell proliferation on non-fermentable carbon sources (supplementary material Fig. S1A), conditions for which a functional ATP synthase is mandatory for growth. In the following experiments, we used Atp3-FP, Atp4-FP and Atp14-FP as cells expressing these proteins grew just as well as wild-type (WT) cells on lactate medium (supplementary material Fig. S1A). Furthermore, to label the whole mitochondrial network we used Ilv3, a dihydroxyacid dehydratase known to diffusely localize into the matrix space (Brat et al., 2012).

When cells were grown in glucose-rich medium, the ATP-GFP signal was detected as discrete domains along mitochondrial tubules (F1F0-CDs; Fig. 1A). These domains were observed for

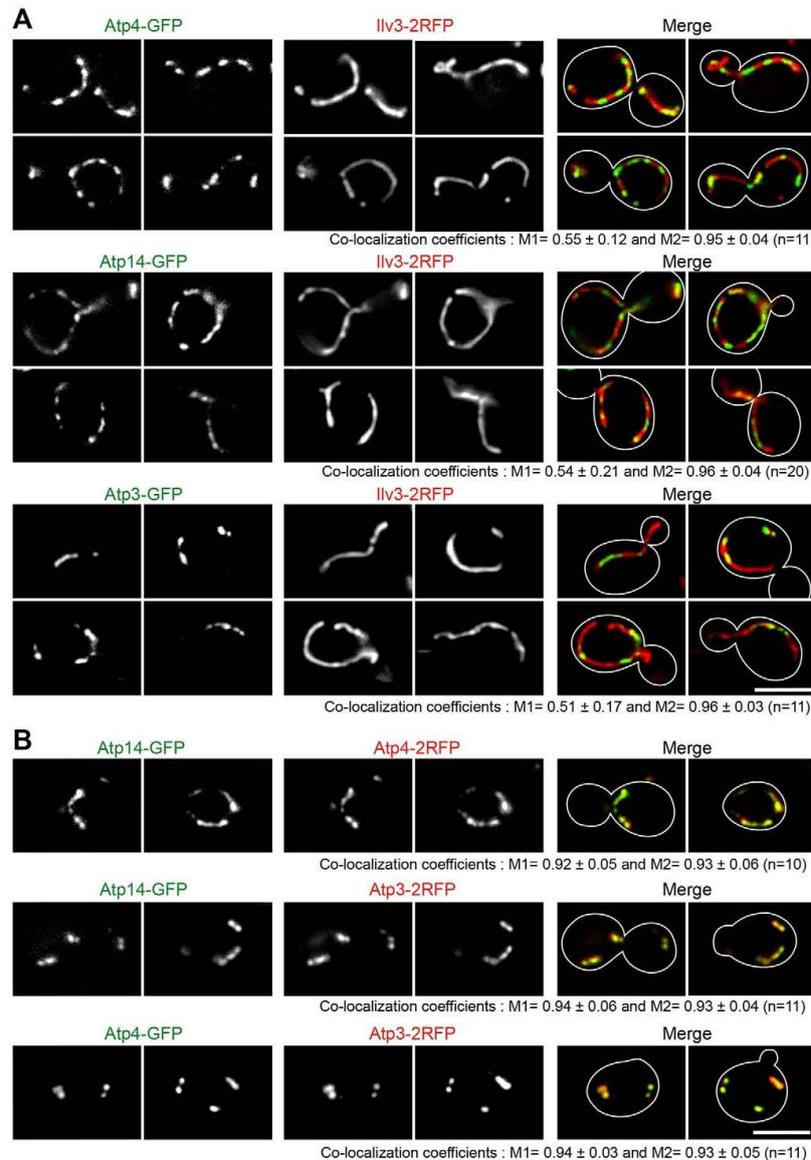


Fig. 1. ATP synthases cluster into discrete mitochondrial domains. (A) Wild-type cells co-expressing Ilv3-2RFP and either Atp4-GFP, Atp14-GFP or Atp3-GFP. (B) Wild-type cells co-expressing Atp14-GFP and Atp4-2RFP; Atp14-GFP and Atp3-2RFP; or Atp4-GFP and Atp3-2RFP. Colocalization coefficients are indicated (M1 is for RFP over GFP signal and M2 is for GFP over RFP signal). Scale bars: 5 μm.

the 11 ATP synthase subunits tested, whether they belonged to the F1 or the F0 sectors, in strains expressing Ilv3–2RFP and ATP synthase subunits fused to GFP but also with the reverse combination of FPs, i.e. Ilv3–GFP and ATP–2RFP (supplementary material Fig. S2A). F1F0-CDs were detected using another matrix marker (Cox4MTS–RFP; supplementary material Fig. S2B) and in another genetic background (W303; supplementary material Fig. S2C). Importantly, ATP synthase subunits colocalized one with another within F1F0-CDs (Fig. 1B). Finally, in *Rho*⁰ cells lacking ATP synthase subunits encoded by the mitochondrial genome, Atp4–FP or Atp14–FP were diffusely localized all along the mitochondrial network (supplementary material Fig. S2D). This indicated that the ATP synthase localization to F1F0-CDs requires the assembly of the complete enzymatic complex. Of note, by contrast to ATP synthase, other inner membrane proteins such as Tim23 (a translocase subunit), Mrs4 (an iron transporter) or Mpc2 (a pyruvate carrier), localized all along the mitochondrial network (supplementary material Fig. S3A). Furthermore, as expected for an integral inner membrane complex, the ATP-FP signal was

surrounded by the outer membrane protein Tom20–GFP (supplementary material Fig. S3B). Altogether these data established that when yeast cells are grown on glucose-rich medium, ATP synthases clustered into discrete domains of the inner mitochondrial membrane.

F1F0-CDs correspond to mobile inner membrane invaginations but do not correlate with tubule fusion or fission sites

F1F0-CDs typically occupied about half of the total mitochondrial network (see colocalization coefficients in Fig. 1A). They did not have a constant size (Fig. 2A, left panel), the average domain length being around 0.5 μ m. In yeast, extensive electron microscopy studies have established that ATP synthase preferentially localizes to the cristae (Davies et al., 2012; Vogel et al., 2006). We measured that in more than 80% of the cases, the presence of an F1F0-CD along a tubule correlated with a decrease in the matrix fluorescence signal (Fig. 2B). This suggested that F1F0-CDs may correspond to cristae. In addition, F1F0-CDs were observed at 49% of the tubules extremities (*n*=471), whether extremities were growing or shrinking (Fig. 2C). In fact, an F1F0-CD could appear to be mobile

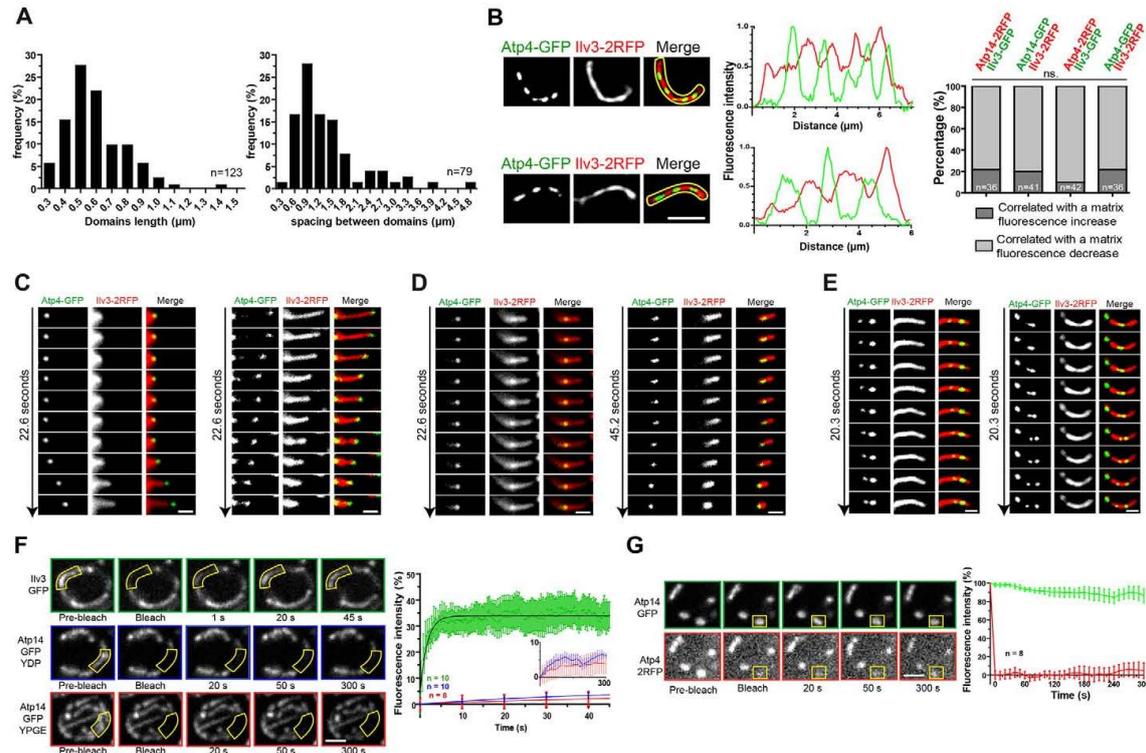


Fig. 2. F1F0-CD dynamics. (A) Frequency distribution of F1F0-CD length (left) and distance between two consecutive F1F0-CD (right). (B) Wild-type cells expressing Atp4–GFP and Ilv3–2RFP, and the corresponding intensity profile (green: Atp4–GFP; red: Ilv3–RFP). Bar graphs represent the percentage correlation between the presence of an F1F0-CD and a decrease, or an increase, of the matrix fluorescence (F1F0-CDs localized at the tip of a tubule were not scored). ns, indicates the absence of statistical differences (*P*=0.39). Scale bar: 2 μ m. (C) Dynamics of F1F0-CD (Atp4–GFP) localized at a tip of a growing (left) or a shrinking (right) mitochondrial tubule. (D) Immobile F1F0-CD (Atp4–GFP) localized within a growing (left) or within a shrinking (right) mitochondrial tubule. (E) Two F1F0-CDs coming closer to each other (left) or moving away from each other (right). Scale bar: 1 μ m (C–E). (F) FRAP of the GFP signal in cells expressing Ilv3–GFP (green) or Atp14–GFP grown in glucose-rich medium (YPD; blue), or in glycerol–ethanol-rich medium (YPGE; red). Bleached areas and the corresponding recovery curves are indicated. Scale bar: 2 μ m. (G) FRAP of the RFP signal in cells expressing Atp14–GFP (green) and Atp4–2RFP (red) and the corresponding recovery curves. Scale bar: 2 μ m. In the graphs the bars indicate the s.e.m.

within a tubule or immobile while the tubule was growing or shrinking (Fig. 2D). The spacing between two consecutive FIF0-CDs could therefore increase or decrease (Fig. 2E), in agreement with the fact that no constant spacing between two consecutive FIF0-CDs could be found (Fig. 2A, right panel). Importantly, fluorescence recovery after photobleaching (FRAP) experiments indicated that within an FIF0-CD, the ATP synthase immobile fraction was largely predominant (the fluorescence recovery being less than 10%; Fig. 2F). This result is consistent with previous FRAP analysis performed in HeLa cells (Sukhorukov et al., 2010) and is in agreement with elegant single particle trajectory analyses indicating that in cultured mammalian cells, movements of single ATP synthase molecules are restricted to an area that matches the size of cristae measured by EM (Appelhans et al., 2012; Wilkens et al., 2013). In addition, the half time recovery calculated for the matrix-soluble protein Ilv3-GFP was 1.09 ± 0.68 seconds ($n=9$, green curve in Fig. 2F), whereas it was at least 15 times slower for the small mobile ATP synthase fraction (see inset of Fig. 2F). Control FRAP experiments in cells expressing both Atp14-GFP and Atp4-2RFP in which only the RFP was bleached indicated that the modest fluorescence recovery measured was not due to the movement of the bleached FIF0-CD out of the measurement area (Fig. 2G). Altogether these experiments suggest that the majority of the ATP synthase is confined to FIF0-CDs, and that FIF0-CDs are mobile within the mitochondrial network. Whether this apparent mobility is due to bona fide movement of FIF0-CDs within the tubule, stretching and/or contraction of the tubule itself, or addition and/or withdrawal of lipids between two FIF0-CDs remain to be established. Finally, 63% of the detected mitochondrial fusion events occurred at a tubule extremity displaying a detectable ATP synthase signal ($n=49$) and 55% of the observed fission events took place where an FIF0-CD was visible ($n=38$). Therefore the presence of an FIF0-CD did not correlate either with tubule fusion or fission. Consistently, only a few FIF0-CDs colocalized with the dynamin-like GTPase Dnm1 or the ERMES components Mdm34 (supplementary material Fig. S3C), two proteins involved in mitochondrial fission (Korrmann et al., 2009; Lackner and Nunnari, 2009; Murley et al., 2013).

FIF0-CDs are impaired in mutants with defective crista morphology and overlap with crista junction components

To test the influence of ATP synthase dimerization on its localization, we utilized *atp20A* (subunit g) mutant cells. We found that ATP synthase was no longer distributed as domains but rather localized all along mitochondrial tubules (Fig. 3A). Atp20 is needed for ATP synthase dimer stabilization but is not required for the enzyme assembly or activity. Furthermore, in *atp20A* cells, the steady state level of ATP synthase is not drastically modified (Arnold et al., 1998; Boyle et al., 1999; Davies et al., 2012; Paumard et al., 2002; Rabl et al., 2009; Velours et al., 2009 (supplementary material Fig. S3D). Therefore, we can rule out that a modification of the ratio between ATP synthase and matrix fluorescence intensity would mask the detection of FIF0-CDs. In fact, it is known that *ATP20* deletion leads to the accumulation of concentric cristae that are no longer lamellar but big and balloon shaped, occupying the entire matrix volume (Davies et al., 2012; Paumard et al., 2002). If FIF0-CDs indeed correspond to cristae, the dramatic alterations in crista morphology induced by the *atp20* deletion could account for the ATP synthase localization observed in *atp20A* cells (Fig. 3A). To further decipher the relationships between FIF0-CDs and cristae, we studied ATP

synthase localization in *fcj1A* cells. It was previously established that in *fcj1A* cells, neither the ATP synthase steady state level nor its dimerization are impaired, but the number of cristae junctions is drastically diminished, leading to abnormally long cristae (Alkhaja et al., 2012; Harner et al., 2011; Hoppins et al., 2011; Rabl et al., 2009; von der Malsburg et al., 2011). In total agreement with this phenotype, we found that in *fcj1A* cells, FIF0-CDs were longer, yet fewer, as the overall FIF0-CD occupancy within the mitochondrial network was not significantly modified (Fig. 3B). This experiment strengthens the idea that FIF0-CDs correspond to cristae. Finally, we found an overlapping localization between FIF0-CDs and Fcjl1, Aim5 and Aim37 (Fig. 3C), proteins localizing to crista junctions (Harner et al., 2011; Hoppins et al., 2011; Rabl et al., 2009; von der Malsburg et al., 2011). Taken together, these experiments strongly suggest that FIF0-CDs do correspond to cristae.

FIF0-CDs occupancy increases with the need for OXPHOS

To produce ATP, ATP synthase needs the proton gradient generated by the respiratory chain. Several respiratory complex proteins were expressed as GFP fusions from their endogenous chromosome locus in haploid cells. We found that when cells were grown on glucose-containing medium, Ndi1 (NADH dehydrogenase), Sdh2 (succinate dehydrogenase, complex II); Qcr9 (subunit 9 of ubiquinol cytochrome *c* reductase, complex III) and Cox7 (subunit VII of cytochrome *c* oxidase, complex IV) localized all along mitochondrial tubules (supplementary material Fig. S4). Yet, the growth of these cells was somewhat impaired on a non-fermentable carbon source, indicating that the GFP-tagged proteins were not fully functional (supplementary material Fig. S4). Therefore, these experiments could not lead to any strong conclusion regarding the colocalization of FIF0-CD and respiratory chain complexes. Interestingly, when cells were grown in glycerol-ethanol-containing medium, conditions in which the expression of OXPHOS proteins is strongly induced (supplementary material Fig. S3E), both the respiratory chain proteins and ATP synthase were detected all along mitochondrial tubules (Fig. 4A,B and supplementary material Fig. S4). Of note, as previously described (Egner et al., 2002; Sauvanet et al., 2010; Stevens, 1981; Visser et al., 1995), we observed that change in carbon source regimen influenced the overall mitochondrial network morphology as tubule diameter increased together with the number of branch points. Importantly, FRAP experiments indicated that in respiratory conditions, no significant pool of unassembled ATP synthase subunits freely diffusing in the matrix could be detected (Fig. 2F, compare Ilv3 to ATP14-GFP in YPGE medium; see Materials and Methods) and that the ATP-synthase-mobile fraction remained unchanged (Fig. 2F, compare the plateau of ATP14-GFP in YPGE and YPD). These experiments strongly suggest that increasing the needs for OXPHOS causes an increase in crista number or size. To distinguish between these two possibilities, we examined the localization of the crista junction proteins Fcjl1 and Aim37 in cells grown in YPGE. In these conditions, Fcjl1 and Aim37 were detected all along mitochondrial tubules (Fig. 4C,D). This indicates that increasing the need for OXPHOS and thereby the amount of ATP synthase, caused an increase in the number of cristae. Supernumerary cristae would then be so closed to each other that they could no longer be resolved as discrete domains by conventional microscopy but rather appear as a continuous signal all along mitochondrial tubules. These experiments establish that following ATP synthase localization can provide crucial

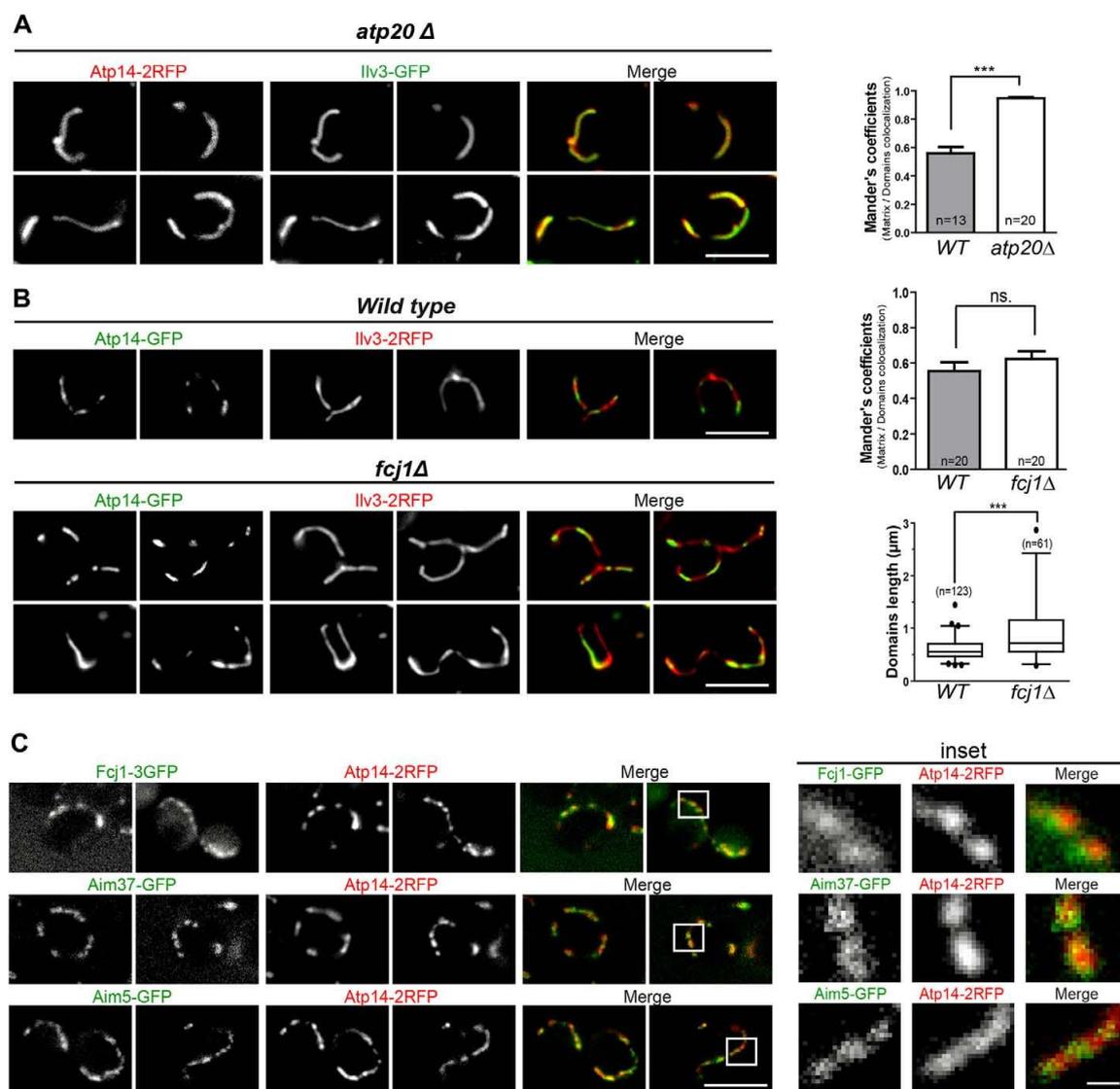


Fig. 3. F1F0-CD correspond to mitochondria cristae. (A) Images of *atp20Δ* cells co-expressing Atp14-2RFP and Ilv3-GFP. The graph represents the mean colocalization coefficients \pm s.e.m. between F1F0-CD and the matrix in wild-type and *atp20Δ* cells. $***P < 0.0001$. Scale bar: 5 μ m. (B) Images of wild-type and *fcj1Δ* cells co-expressing Atp14-GFP and Ilv3-2RFP. The graph represents the mean of colocalization coefficient between F1F0-CD and the mitochondrial matrix \pm s.e.m. ns, no significant difference ($P = 0.314$). The box and whisker plot (2.5 and 97.5 percentiles) represents F1F0-CD length in wild-type and *fcj1Δ*. $***P < 0.0001$. Scale bars: 5 μ m. (C) Images of fixed cell expressing Atp14-2RFP and Fcj1-GFP, Aim37-GFP or Aim5-GFP. Scale bars: 5 μ m; 0.5 μ m (insets).

information on crista remodeling, depending on the physiological situation of the cell.

Cristae are the site of OXPHOS, reactions essential for the viability of most organisms. Here, we demonstrate that the ATP synthase is restricted to discrete domains that are dynamic within the mitochondrial network, and provide strong evidences that these domains correspond to cristae. We further illustrate that it is possible to study changes in ATP synthase domain organization

depending on the genetic background or the cellular needs. Working with yeast offers the possibility to perform dynamic imaging in a wide variety of genetic contexts, in combination with a plethora of biochemical approaches. Being able to follow crista dynamics in living yeast cells opens new routes for studying, not only the remodeling of the mitochondrial inner membrane architecture, but also the relationships between a specific mitochondrial sub-compartment and other cellular machineries.

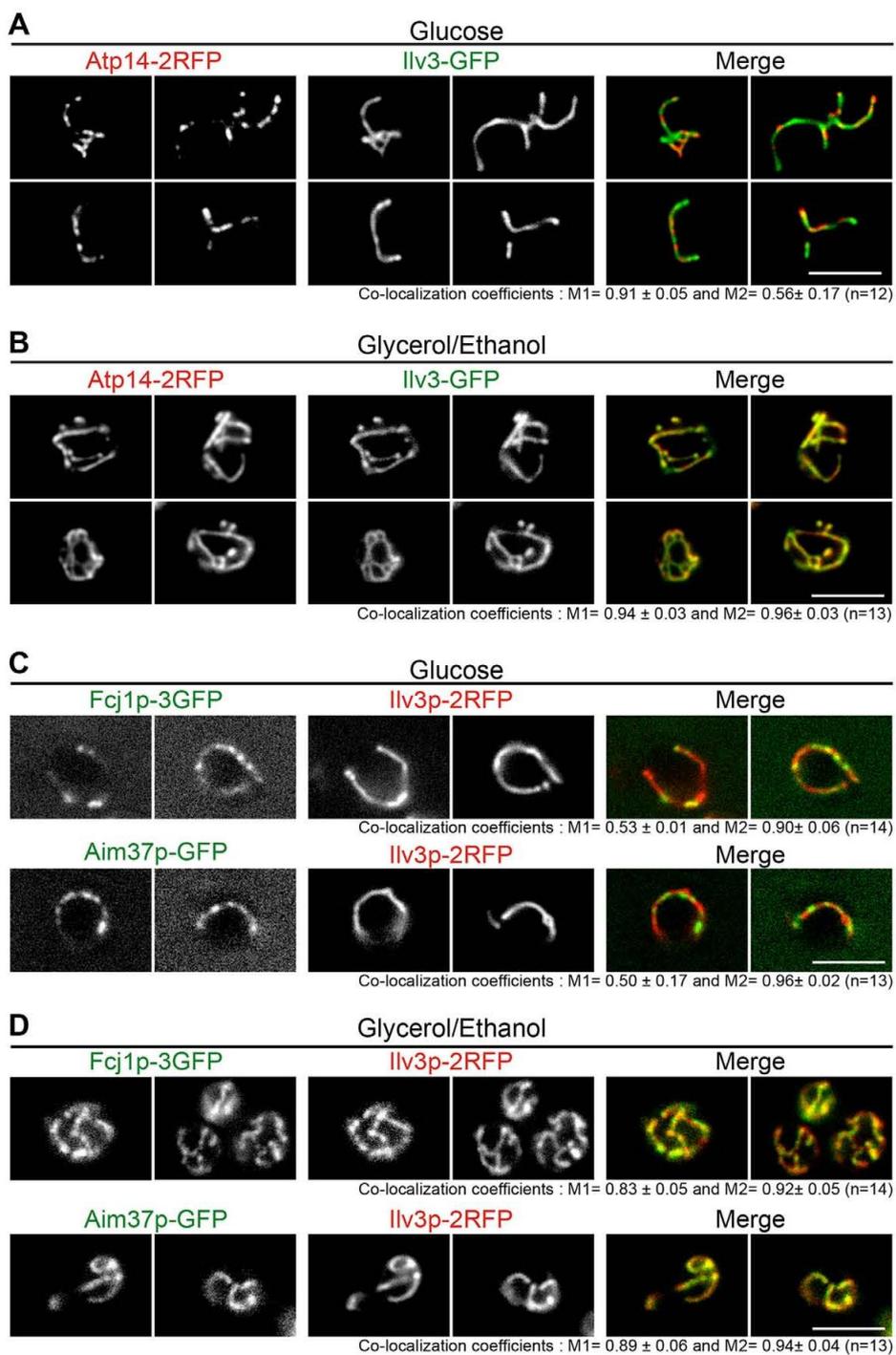


Fig. 4. ATP synthase localization is influenced by the carbon source. (A,B) Wild-type cells expressing Ilv3-GFP and Atp14-2RFP grown in YPD (A) or YPGE (B). (C,D) Wild-type cells expressing Fcj1-GFP and Ilv3-2RFP (upper panel) or Aim37-GFP and Ilv3-2RFP (lower panel) grown in YPD (C) or in YPGE (D). Colocalization coefficients are indicated as in Fig. 1. Scale bar: 5 μ m.

MATERIALS AND METHODS

Strains and growth conditions

The strains used were BY4741 derivatives and were obtained from Invitrogen (Carlsbad, NM). All the GFP fusions and GFP-expressing strains were obtained by integrating the FP sequence at the 3' end of the protein encoding the endogenous chromosomal locus in haploids. All the strains used in this study are described in the supplementary Table S1. Details of the constructions are available upon request. Strains were grown in liquid rich medium containing either 2% glucose (YDP) or 2% glycerol/2% ethanol (YPGE) and imaged at $OD_{600\text{ nm}} < 2$.

Fluorescence microscopy

Cells were imaged as described previously (Laporte et al., 2008). For all fluorescence intensity measurement, the intensity over 6 pixels width (i1) was determined along mitochondria tubules or 'domains'. A zone of 12 pixels width at the same location (i2) was examined in order to calculate the surrounding background intensity. The real intensity (ir) was determined using the following equation: $ir = i1 - ib$, with $ib = [(i2 \times 12) - (i1 \times 6)] / 6$ (Laporte et al., 2011). Intensity profiles correspond to the mean intensity of the 6-pixel width segmented line along mitochondria. Mander's colocalization coefficients were calculated using ImageJ with a JACoP plugin (Bolte and Cordelières, 2006). Fluorescence intensity profiles for F1F0-CD and the matrix were determined along mitochondrial tubules. When an F1F0-CD was detected, the corresponding fluorescence intensity variation of the matrix was scored. F1F0-CD properties were defined using a Gaussian fit of F1F0-CD fluorescence intensity along the mitochondrial tubule ($R^2 > 0.8$). F1F0-CD length σ corresponds to the full width at half maximum ($\sigma = 2\sqrt{\ln 2}SD$). Distances between two F1F0-CDs correspond to the distance between Gaussian centroids. FRAP experiment were performed and analyzed as described by Laporte et al. (Laporte et al., 2013). All statistical analyses were performed using GraphPad (San Diego, CA).

Acknowledgements

We are grateful to D. Brethes, B. Daignan-Fornier, J.P. diRago, J.P. Javerzat, M. Rojo and R. Rossignol for discussions about our work. We thank J. Ceschin for technical assistance and J. Bodin for his advice on statistics. We also thank Christel Pouloul and the Bordeaux Imaging Center where FRAP experiments were performed.

Competing interests

The authors declare no competing interests.

Author contributions

The study was conceived and designed by L.J., D.L., S.D.-C. and I.S. Experiments were performed by L.J., D.L., F.C. and analyzed by L.J., D.L., S.D.-C. and I.S. I.S. wrote the paper with the help of all the contributing.

Funding

This work was supported by a Region Aquitaine post fellowship [to D.L.]; a Ministère de l'enseignement supérieur Ph.D. fellowship [to L.J.]; a Young Investigator Grant from the Agence Nationale pour la Recherche [grant number JC08 310804 to I.S.]; and an Association pour la Recherche sur le Cancer Grant [grant number SFI20101201558 to I.S.].

Supplementary material

Supplementary material available online at <http://jcs.biologists.org/lookup/suppl/doi:10.1242/jcs.137141/-DC1>

References

Alkhaja, A. K., Jans, D. C., Nikolov, M., Vukotic, M., Lytovchenko, O., Ludewig, F., Schliebs, W., Riedel, D., Urlaub, H., Jakobs, S. et al. (2012). MINOS1 is a conserved component of mitofilin complexes and required for mitochondrial function and cristae organization. *Mol. Biol. Cell* **23**, 247–257.

Allen, R. D., Schroeder, C. C. and Fok, A. K. (1989). An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques. *J. Cell Biol.* **108**, 2233–2240.

Appelhans, T., Richter, C. P., Wilkens, V., Hess, S. T., Piehler, J. and Busch, K. B. (2012). Nanoscale organization of mitochondrial microcompartments revealed by combining tracking and localization microscopy. *Nano Lett.* **12**, 610–616.

Arnold, I., Pfeiffer, K., Neupert, W., Stuart, R. A. and Schagger, H. (1998). Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *EMBO J.* **17**, 7170–7178.

Bolte, S. and Cordelières, F. P. (2006). A guided tour into subcellular colocalization analysis in light microscopy. *J. Microsc.* **224**, 213–232.

Bornhövd, C., Vogel, F., Neupert, W. and Reichert, A. S. (2006). Mitochondrial membrane potential is dependent on the oligomeric state of F1F0-ATP synthase supracomplexes. *J. Biol. Chem.* **281**, 13990–13998.

Boyle, G. M., Roucou, X., Nagley, P., Devenish, R. J. and Prescott, M. (1999). Identification of subunit g of yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase, a protein required for maximal activity of cytochrome c oxidase. *Eur. J. Biochem.* **262**, 315–323.

Brat, D., Weber, C., Lorenzen, W., Bode, H. B. and Boles, E. (2012). Cytosolic re-localization and optimization of valine synthesis and catabolism enables increased isobutanol production with the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Biotechnol. Biofuels* **5**, 65.

Bratic, A. and Larsson, N. G. (2013). The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Invest.* **123**, 951–957.

Buzhynskyy, N., Sens, P., Prima, V., Sturgis, J. N. and Scheuring, S. (2007). Rows of ATP synthase dimers in native mitochondrial inner membranes. *Biophys. J.* **93**, 2870–2876.

Chan, D. C. (2012). Fusion and fission: interlinked processes critical for mitochondrial health. *Annu. Rev. Genet.* **46**, 265–287.

Davies, K. M., Strauss, M., Daum, B., Kief, J. H., Osiewacz, H. D., Rycovska, A., Zickermann, V. and Kühlbrandt, W. (2011). Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **108**, 14121–14126.

Davies, K. M., Anselmi, C., Wittig, I., Faraldo-Gómez, J. D. and Kühlbrandt, W. (2012). Structure of the yeast F1F0-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **109**, 13602–13607.

Dudkina, N. V., Heinemeyer, J., Keegstra, W., Boekema, E. J. and Braun, H. P. (2005). Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *FEBS Lett.* **579**, 5769–5772.

Egner, A., Jakobs, S. and Hell, S. W. (2002). Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **99**, 3370–3375.

Friedman, J. R., Lackner, L. L., West, M., DiBenedetto, J. R., Nunnari, J. and Voeltz, G. K. (2011). ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science* **334**, 358–362.

Hamer, M., Körner, C., Walther, D., Mokranjac, D., Kaesmacher, J., Welsch, U., Griffith, J., Mann, M., Reggiori, F. and Neupert, W. (2011). The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *EMBO J.* **30**, 4356–4370.

Hoppins, S., Collins, S. R., Cassidy-Stone, A., Hummel, E., Devay, R. M., Lackner, L. L., Westermann, B., Schuldiner, M., Weissman, J. S. and Nunnari, J. (2011). A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J. Cell Biol.* **195**, 323–340.

Jans, D. C., Wurm, C. A., Riedel, D., Wenzel, D., Staggé, F., Deckers, M., Rehling, P. and Jakobs, S. (2013). STED super-resolution microscopy reveals an array of MINOS clusters along human mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **110**, 8936–8941.

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

Lackner, L. L. and Nunnari, J. M. (2009). The molecular mechanism and cellular functions of mitochondrial division. *Biochim. Biophys. Acta* **1792**, 1138–1144.

Laporte, D., Salin, B., Daignan-Fornier, B. and Sagot, I. (2008). Reversible cytoplasmic localization of the proteasome in quiescent yeast cells. *J. Cell Biol.* **181**, 737–745.

Laporte, D., Coffman, V. C., Lee, I. J. and Wu, J. Q. (2011). Assembly and architecture of precursor nodes during fission yeast cytokinesis. *J. Cell Biol.* **192**, 1005–1021.

Laporte, D., Courtout, F., Salin, B., Ceschin, J. and Sagot, I. (2013). An array of nuclear microtubules reorganizes the budding yeast nucleus during quiescence. *J. Cell Biol.* (in press).

Mannella, C. A. (2006). Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae. *Biochim. Biophys. Acta* **1763**, 542–548.

Mannella, C. A., Pfeiffer, D. R., Bradshaw, P. C., Moraru, I. I., Slepchenko, B., Loew, L. M., Hsieh, C. E., Buttle, K. and Marko, M. (2001). Topology of the mitochondrial inner membrane: dynamics and bioenergetic implications. *JUBMB Life* **52**, 93–100.

Murley, A., Lackner, L. L., Osman, C., West, M., Voeltz, G. K., Walter, P. and Nunnari, J. (2013). ER-associated mitochondrial division links the distribution of mitochondria and mitochondrial DNA in yeast. *Elife* **2**, e00422.

Paul, M. F., Guerin, B. and Velours, J. (1992). The C-terminal region of subunit 4 (subunit b) is essential for assembly of the F0 portion of yeast mitochondrial ATP synthase. *Eur. J. Biochem.* **205**, 163–172.

Paumard, P., Vaillier, J., Couлары, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D. M., Bréthes, D., di Rago, J. P. and Velours, J. (2002). The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *EMBO J.* **21**, 221–230.

Rabl, R., Soubannier, V., Scholz, R., Vogel, F., Mendl, N., Vasiljev-Neumeyer, A., Körner, C., Jagasia, R., Keil, T., Baumeister, W. et al. (2009). Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcj1 and Su efg. *J. Cell Biol.* **185**, 1047–1063.

- Rafelski, S. M., Viana, M. P., Zhang, Y., Chan, Y. H., Thorn, K. S., Yam, P., Fung, J. C., Li, H., Costa, L. F. and Marshall, W. F. (2012). Mitochondrial network size scaling in budding yeast. *Science* **338**, 822–824.
- Rowland, A. A. and Voeltz, G. K. (2012). Endoplasmic reticulum-mitochondria contacts: function of the junction. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **13**, 607–625.
- Sauvanet, C., Duvezin-Caubet, S., di Rago, J. P. and Rojo, M. (2010). Energetic requirements and bioenergetic modulation of mitochondrial morphology and dynamics. *Semin. Cell Dev. Biol.* **21**, 558–565.
- Schapira, A. H. (2012). Mitochondrial diseases. *Lancet* **379**, 1825–1834.
- Schmidt, R., Wurm, C. A., Punge, A., Egner, A., Jakobs, S. and Hell, S. W. (2009). Mitochondrial cristae revealed with focused light. *Nano Lett.* **9**, 2508–2510.
- Soubannier, V., Vaillier, J., Paumard, P., Coulary, B., Schaeffer, J. and Velours, J. (2002). In the absence of the first membrane-spanning segment of subunit 4(b), the yeast ATP synthase is functional but does not dimerize or oligomerize. *J. Biol. Chem.* **277**, 10739–10745.
- Stevens, B. (1981). Mitochondrial structure. In *The Molecular Biology of the Yeast Saccharomyces: Life Cycle and Inheritance* (ed. J.N. Strathern, E.W. Jones and J.R. Broach), pp. 471–504. Cold Spring Harbor, NY: Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Strauss, M., Hofhaus, G., Schröder, R. R. and Kühlbrandt, W. (2008). Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *EMBO J.* **27**, 1154–1160.
- Sukhorukov, V. M., Dikov, D., Busch, K., Strecker, V., Wittig, I. and Bereiter-Hahn, J. (2010). Determination of protein mobility in mitochondrial membranes of living cells. *Biochim. Biophys. Acta* **1798**, 2022–2032.
- Thomas, D., Bron, P., Weimann, T., Dautant, A., Giraud, M. F., Paumard, P., Salin, B., Cavalier, A., Velours, J. and Brèthes, D. (2008). Supramolecular organization of the yeast F1Fo-ATP synthase. *Biol. Cell* **100**, 591–601.
- van de Linde, S., Sauer, M. and Heilemann, M. (2008). Subdiffraction-resolution fluorescence imaging of proteins in the mitochondrial inner membrane with photoswitchable fluorophores. *J. Struct. Biol.* **164**, 250–254.
- Velours, J., Dautant, A., Salin, B., Sagot, I. and Brèthes, D. (2009). Mitochondrial F1Fo-ATP synthase and organellar internal architecture. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **41**, 1783–1789.
- Visser, W., van Spronsen, E. A., Nanninga, N., Pronk, J. T., Gijs Kuenen, J. and van Dijken, J. P. (1995). Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie van Leeuwenhoek* **67**, 243–253.
- Vogel, F., Bomhövd, C., Neupert, W. and Reichert, A. S. (2006). Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J. Cell Biol.* **175**, 237–247.
- von der Malsburg, K., Müller, J. M., Bohnert, M., Oeljeklaus, S., Kwiatkowska, P., Becker, T., Loniewska-Lwowska, A., Wiese, S., Rao, S., Milenkovic, D. et al. (2011). Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Dev. Cell* **21**, 694–707.
- Walker, J. E. (2013). The ATP synthase: the understood, the uncertain and the unknown. *Biochem. Soc. Trans.* **41**, 1–16.
- Wallace, D. C. (2012). Mitochondria and cancer. *Nat. Rev. Cancer* **12**, 685–698.
- Westermann, B. (2010). Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* **11**, 872–884.
- Wilkins, V., Kohl, W. and Busch, K. (2013). Restricted diffusion of OXPHOS complexes in dynamic mitochondria delays their exchange between cristae and engenders a transitory mosaic distribution. *J. Cell Sci.* **126**, 103–116.
- Wittig, I. and Schagger, H. (2008). Structural organization of mitochondrial ATP synthase. *Biochim. Biophys. Acta* **1777**, 592–598.
- Youle, R. J. and van der Bleek, A. M. (2012). Mitochondrial fission, fusion, and stress. *Science* **337**, 1062–1065.
- Zhao, J., Lendahl, U. and Nistér, M. (2013). Regulation of mitochondrial dynamics: convergences and divergences between yeast and vertebrates. *Cell. Mol. Life Sci.* **70**, 951–976.
- Zick, M., Rabl, R. and Reichert, A. S. (2009). Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim. Biophys. Acta* **1793**, 5–19.

Gene	subunit	Sector	GFP Signal	Domain	YPGE	Doubling time (hours)	
						YPD	YPLactate
WT						1.81	2.94
Atp1	α	F1	+++	Yes		2.75	7.77
Atp2	β	F1	+++	Yes		2.28	11.14
Atp3	γ	F1	++	Yes		1.89	3.01
Atp4	b	F0	++	Yes		1.82	2.82
Atp5	oscp	F0	++	Yes		1.82	2.71
Atp6 (1)	a	F0	NT	/		/	/
Atp7	d	F0	++	Yes		1.92	2.47
Atp8 (1)	8	F0	NT	/		/	/
Atp9 (1)	9	F0	NT	/		/	/
Atp14	h	F0	++	Yes		1.83	3.09
Atp15	ε	F1	+	Yes		1.72	11.66
Atp16	δ	F1	NT	/		/	/
Atp17	f	F0	NT	/		/	/
Atp18	i	F0	+	Yes		1.80	3.10
Atp19	k	F0	+	Yes		1.93	3.37
Atp20	g	F0	+	Yes		1.83	3.15

(1) Mitochondrial encoded genes ; NT : Not Tested

	Strain	YPGE	doubling time (hours)	
			YPD	YPLactate
	WT		1.55	2.60
Mitochondrial matrix	Atp3-GFP; Ilv3-2RFP		2.04	4.37
	Ilv3-GFP; Atp3-2RFP		1.84	3.18
	Atp4-GFP; Ilv3-2RFP		1.89	3.00
	Ilv3-GFP; Atp4-2RFP		1.81	2.59
	Atp14-GFP; Ilv3-2RFP		1.58	2.82
	Ilv3-GFP; Atp14-2RFP		1.88	3.33
	Atp14-GFP; Atp4-2RFP		1.94	3.99
ATP synthase	Atp4-GFP; Atp3-2RFP		1.89	3.97
	Atp14-GFP; Atp3-2RFP		1.96	3.68
Translocase of outer membrane	Tom20-GFP Atp14-RFP		1.94	3.35
Translocase of inner membrane	Tim23-GFP Atp14-RFP		2.23	4.46
Mitochondrial pyruvate carrier	Mpc2-GFP Atp14-RFP		1.65	3.44
Iron transporter	Mrs4-GFP Atp14-RFP		1.67	3.17
ERMES complex	Mdm34-GFP Atp14-RFP		1.96	2.86
Fission machinery	Dnm1-GFP Atp14-RFP		1.67	4.45
MICOS/MINOS/MITOS	Fcj1-3xGFP Atp14-RFP		1.91	3.33
	Aim37-GFP Atp14-RFP		1.98	2.95
	Aim5-GFP Atp14-RFP		1.83	3.17

Fig. S1. Growth characteristics of strains used in this study. Serial dilution of a YPD pre-culture were spotted onto YPGE plate and grown for 3 days at 30°C. Generation times in rich medium containing either 2% of glucose or 2% of lactate were calculated using GraphPad software (San Diego, CA) from growth curves (OD_{600nm} in function of time) measured by culturing cells at 30°C in a Bioscreen instrument (Oy Growth Curves Ab Ltd. Helsinki, Finland).

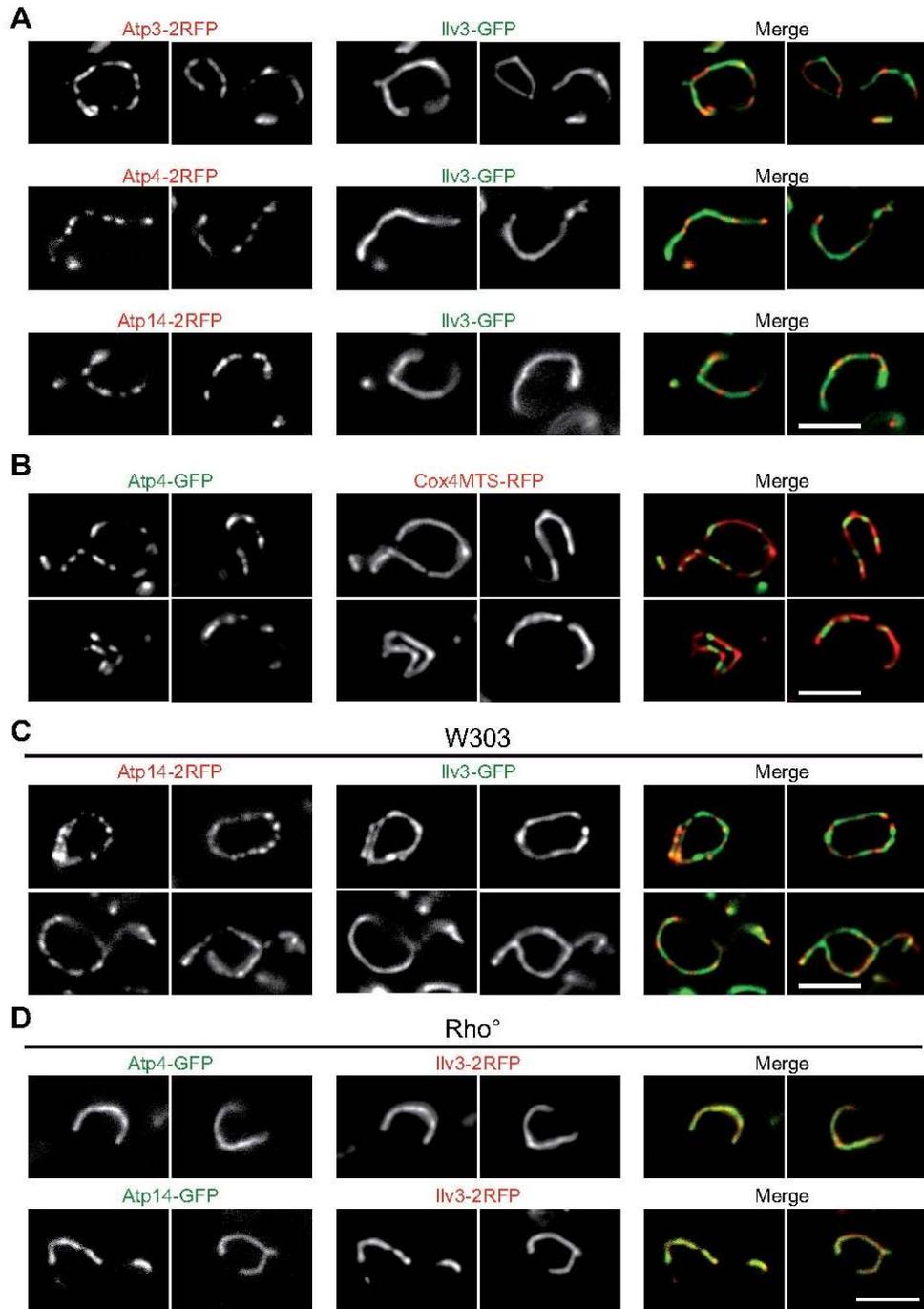


Fig. S2. F1F0-CD in various genetic contexts. (A) Images of wild-type cells expressing Atp3-2RFP or Atp4-2RFP or Atp14-2RFP together with the mitochondrial matrix soluble protein Ilv3 fused to GFP. Cells were grown in YPD at 30°C. (B) Images of wild-type cells co-expressing Atp14-GFP and the mitochondrial targeting sequence of Cox4 (Cox4MTS) fused to RFP as a mitochondrial matrix marker. Cells were grown at 30°C in SD-Leu then shift for 6 h to YPD before imaging. Scale bar: 5 μm. (C) Images of wild-type cells (W303 genetic background) co-expressing Ilv3-GFP and Atp14-2RFP. Cells were grown in YPD at 30°C. (D) Images of Rho^o cells expressing the indicated fusion proteins. Cells were grown in YPD at 30°C. From A to D, images are single focal planes; scale bar: 5 μm.

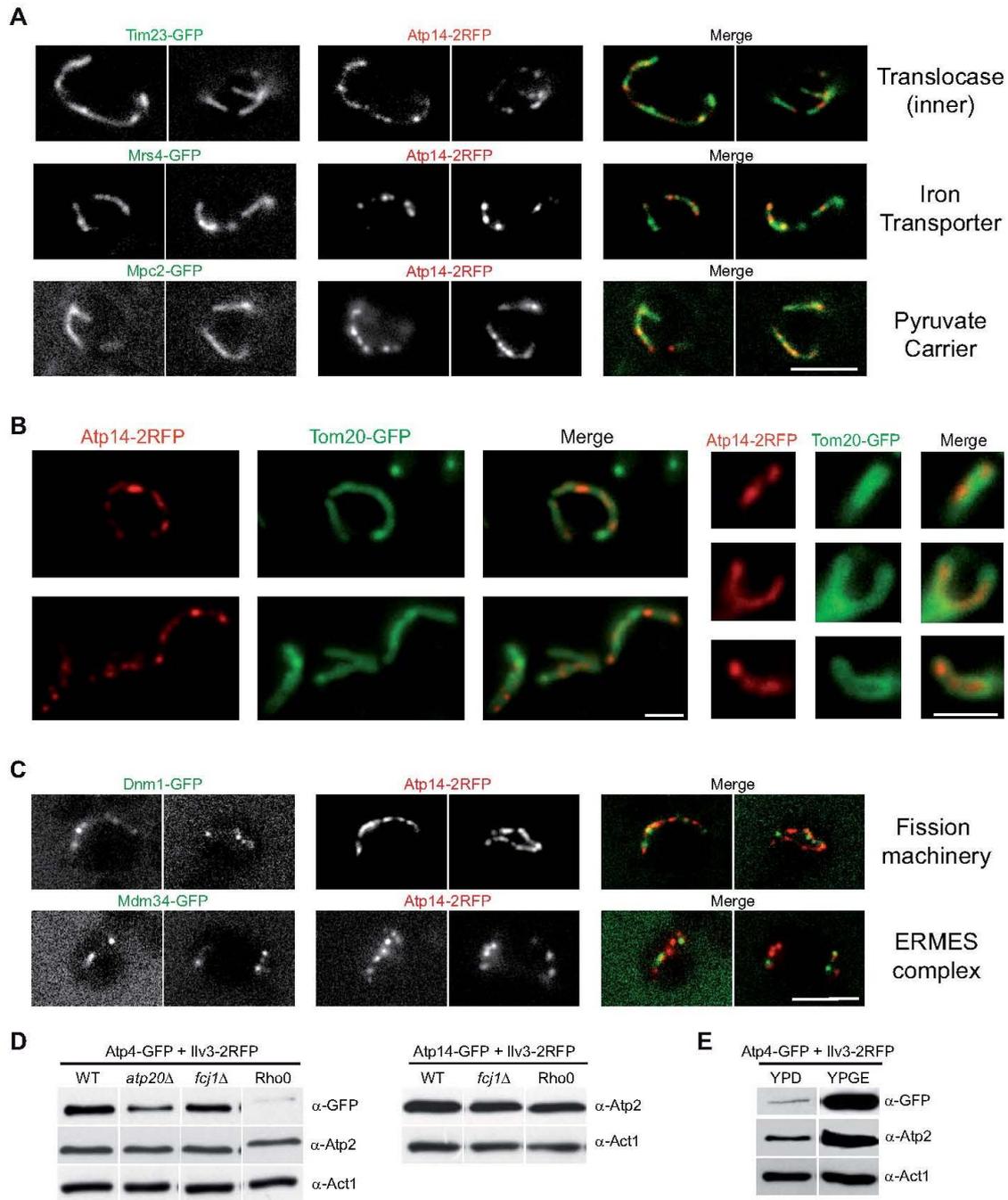


Fig. S3. Localization of various mitochondrial proteins. (A) Wild-type cells expressing Atp14-2RFP and the indicated mitochondrial inner membrane protein fused to GFP and expressed from the endogenous chromosome locus. Scale bar: 5 μ m. (B) Images of wild-type cells expressing Tom20-GFP and Atp4-2RFP. Scale bar: 2 μ m. (C) Images of wild-type cells expressing Atp14-2RFP and the indicated mitochondrial protein fused to GFP and expressed from the endogenous chromosome locus. Scale bar: 5 μ m. From A to C, cells were grown in YPD at 30°C. (D) Steady state level of Atp14-GFP, Atp4-GFP and Atp2 in wild-type (WT), *fcj1Δ*, *Rho⁰* and *atp20Δ* cells revealed by western blot using anti-GFP (Roche Applied Science) anti-Atp2 ((Paul et al., 1992), and kind gift of D. Brèthes) respectively. Antibodies against actin are a kind gift of B. Goode. (E) Steady state level of Atp4-GFP and Atp2 in wild-type cells grown in glucose rich medium (YPD) or in glycerol/ethanol rich medium (YPGE).

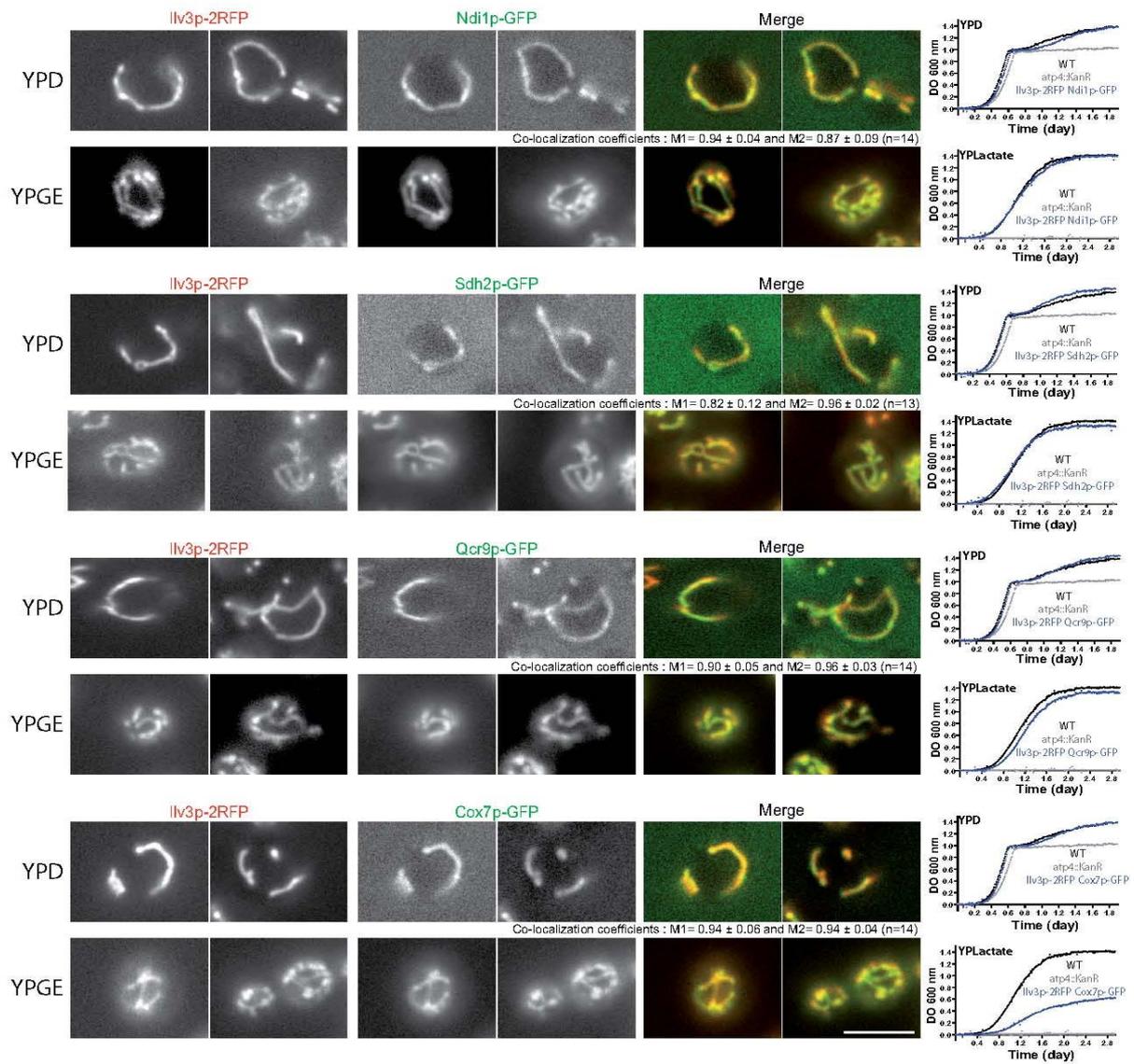


Fig. S4. Respiratory complex localization and growth characteristics. Images of wild-type cells expressing Ndi1-GFP or Sdh2-GFP or Qcr9-GFP or Cox7-GFP together with Ilv3-2RFP grown in YPD (upper panel) or YPGE (lower panel). The colocalization coefficients are indicated. Bar: 5 μ m. On the right, growth curves of the cognate strains in each medium are shown (blue). The growth curves for wild-type (black) and *Rho⁻* cells (*atp4*, grey) are shown as controls.

Supplementary Table : Strains used in this study.

Strain	Genotype	Reference
BY4741 (Y1741)	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Invitrogen
Y262⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP1-GFP-HIS3	Invitrogen
Y5323⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP2-GFP-HIS3	Invitrogen
Y6768⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP14-GFP-HIS3	Invitrogen
Y6770⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP3-GFP-HIS3	Invitrogen
Y6772⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP4-GFP-HIS3	Invitrogen
Y6773⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP7-GFP-HIS3	Invitrogen
Y6774⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP5-GFP-HIS3	Invitrogen
Y6775⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP20-GFP-HIS3	Invitrogen
Y6776⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP18-GFP-HIS3	Invitrogen
Y6777⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP19-GFP-HIS3	Invitrogen
Y6778⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP15-GFP-HIS3	Invitrogen
Y7003⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP4-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3	This study
Y7005⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP3-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA	This study
Y7126⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP14-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3	This study
Y7264⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; QCR9-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3	This study
Y7268⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; COX7-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3	This study
Y7281⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; AIM37-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3	This study
Y7346⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; AIM5-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	This study
Y7347⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; MDM34-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	This study
Y7348⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP14-GFP-HIS3; ATP4-2RFP-URA3	This study
Y7350⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP3-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	This study
Y7359⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP3-GFP-HIS3; ATP4-2RFP-URA3	This study
Y7449⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; AIM37-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	This study
Y7453⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; TOM20-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	This study
Y7555⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ILV3-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	This study
Y7556⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ILV3-GFP-HIS3; ATP4-2RFP-URA3	This study
Y7641⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; TIM23-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	This study
Y7701⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ILV3-GFP-HIS3; ATP3-2RFP-URA3	This study
Y7702⁽¹⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; atp20::KanR</i> ; ILV3-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	This study
Y7751⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; MRS4-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	This study
Y7754⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; MPC2-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	This study
Y7675⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; DNM1-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	This study
Y7996	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; FCJ1-3GFP-LEU2; ILV3-2RFP-URA3	This study
Y8021	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; FCJ1-3GFP-LEU2; ATP14-2RFP-URA3	This study
Y8065⁽¹⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; fej1::KanR</i> ; ATP14-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3	This study
Y8114 (W303)	Mata; <i>ura3-1; trp1-1; ade2-1; leu2-3,112; his3-11,15</i> ; ILV3-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	This study
Y8392⁽¹⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; lys2Δ; atp20::KanR</i> ; ATP4-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3	This study
Y8394⁽¹⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; fej1::KanR</i> ; ATP4-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3	This study
Y8432	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP4-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3; <i>Rho⁰</i>	This study
Y8433	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP4-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3; <i>Rho⁰</i>	This study
Y8434	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP14-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3; <i>Rho⁰</i>	This study
Y8984⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; NDI1-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3	This study
Y8985⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; SDH2-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3	This study

(1) Original deletion collection strains from Winzeler et al. (1999) Science V285 p901-906.

(2) Original GFP collection strains from Huh et al. (2003) Nature V425(6959) p686-91.

IV. RESULTATS COMPLEMENTAIRES

1. COMPLEXE MICOS : NOUVELLE NOMENCLATURE

Cet article est paru avant la nouvelle nomenclature du complexe MICOS. Le **Tableau 2** associe les anciens noms utilisés dans l'article, avec ceux de la nouvelle nomenclature (Pfanner et al., 2014).

Nouvelle nomenclature	Anciens noms
Mic10	Mcs10, Mio10, Mos1, MINOS1
Mic12	Aim5, Fmp51, Mcs12
Mic19	Aim13, Mcs19, CHCH-3, CHCHD3, MINOS3
Mic25	CHCD6, CHCM1
Mic26	Mcs29, Mio27, Mos2
Mic27	Aim37, Msc27, APOOL, MOMA-1
Mic60	Fcj1, Aim28, Fmp13, Mitofilin, HMP, IMMT, MINOS2

Tableau 2 : Nomenclature du complexe MICOS (Pfanner et al., 2014)

2. ETUDE DE LA MOBILITE DE PROTEINES MITOCHONDRIALES

Dans notre étude, des expériences de FRAP ont été réalisées afin d'étudier la mobilité de l'ATP synthase au sein du réseau mitochondrial en fonction de la source de carbone assimilée par la levure. La diffusion de l'ATP synthase a été comparée avec celle de la protéine matricielle Ilv3. Les propriétés de diffusion des protéines diffèrent selon qu'elles se situent dans un environnement aqueux ou dans une membrane c'est pourquoi des expériences complémentaires ont été réalisées avec deux protéines membranaires, l'une localisée dans la membrane interne : Tim23, et l'autre dans la membrane externe : Tom20 (voir **Figure 34**).

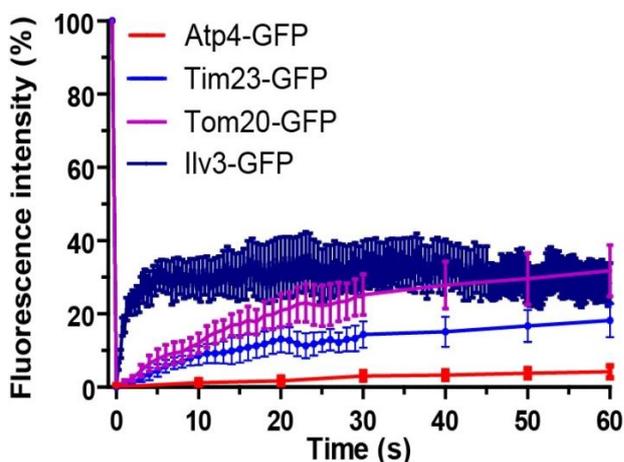


Figure 34 : Etude de la mobilité des protéines membranaires mitochondriales par FRAP

Expérience de FRAP réalisées sur des souches sauvages cultivées en milieu fermentescible exprimant Atp4-GFP ; Tim23-GFP ; Tom20-GFP ou Ilv3-GFP.

La protéine matricielle Ilv3 présente un temps de retour de fluorescence très rapide. Il est important de noter que la fluorescence n'atteint jamais 100% de récupération. Ceci est lié à la grande taille de la zone photo-blanchie par rapport à la taille du réseau mitochondrial. Comme attendu pour les protéines membranaires, Tom20 et Tim23 ont des temps de retour de fluorescence plus long (voir **Figure 34**). La comparaison du retour de fluorescence de la sous unité Atp4 de l'ATP synthase avec celui Tim23, suggère que le caractère stable de l'ATP synthase n'est pas une propriété commune à l'ensemble des protéines localisées dans la membrane interne mitochondriale. Ces contrôles renforcent le modèle selon lequel l'ATP synthase est confinée dans des structures relativement stables que sont les crêtes mitochondriales.

3. DOMAINES D'ATP SYNTHASE ET CRETES MITOCHONDRIALES : MODELE

Dans cette étude nous avons mis en évidence une localisation différentielle de l'ATP synthase en fonction de la source de carbone utilisée par la levure. En présence de glucose, l'ATP synthase localise en domaines le long du réseau mitochondrial. L'augmentation de la demande en phosphorylation oxydative en milieu respiratoire a pour conséquence une augmentation de l'expression de l'ATP synthase et une distribution continue de cette dernière le long du réseau. La localisation du complexe MICOS, ainsi que les expériences de FRAP réalisées dans ces deux conditions nous ont permis de proposer le modèle selon lequel les domaines d'ATP synthase correspondraient à une ou un groupe de crêtes. Ainsi en milieu respiratoire, la localisation continue de l'ATP synthase serait due à une augmentation du nombre de crêtes, qui devenant si nombreuses, seraient indissociables les unes des autres en microscopie conventionnelle. Voir **Figure 35**.

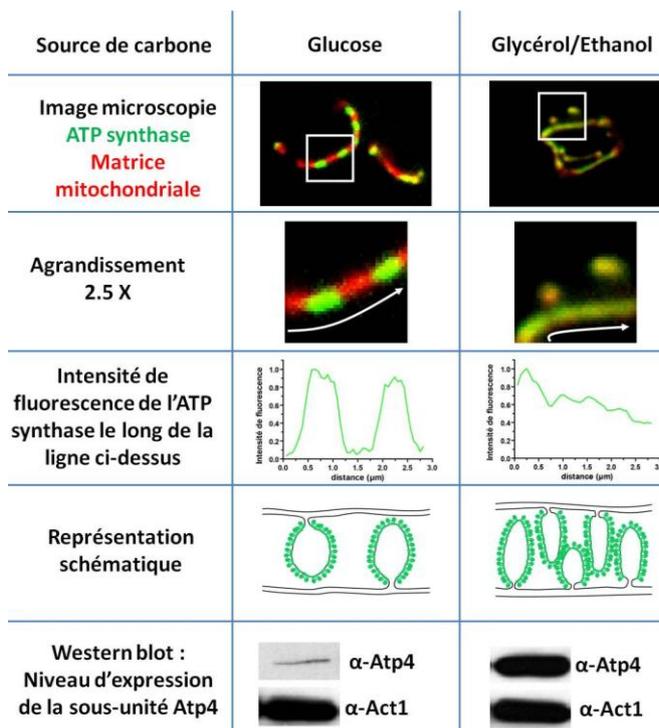


Figure 35 : Modèle de la localisation de l'ATP synthase et source de carbone

Représentation schématique de la localisation de l'ATP synthase en fonction de la source de carbone. Les images correspondent à la localisation dans une souche sauvage, d'une sous unités de l'ATP synthase (vert) et de Ilv3 (rouge). Le graphique représente l'intensité de fluorescence de l'ATP synthase le long du réseau. L'interprétation de ces observations est représentée schématiquement. Les western-blots indiquent les niveaux d'expression de la protéine Atp4-GFP révélée par un anticorps dirigé contre la GFP. L'actine est un contrôle de charge.

4. GALACTOSE ET LOCALISATION DE L'ATP SYNTHASE

En plus du glucose et du glycérol/éthanol, dont les résultats sont présentés dans l'article, nous avons étudié la localisation de l'ATP synthase en présence de galactose. En présence de ce sucre il n'y a pas de répression des gènes de la biogenèse mitochondriale comme cela a lieu lorsque les cellules sont cultivées en présence de glucose.

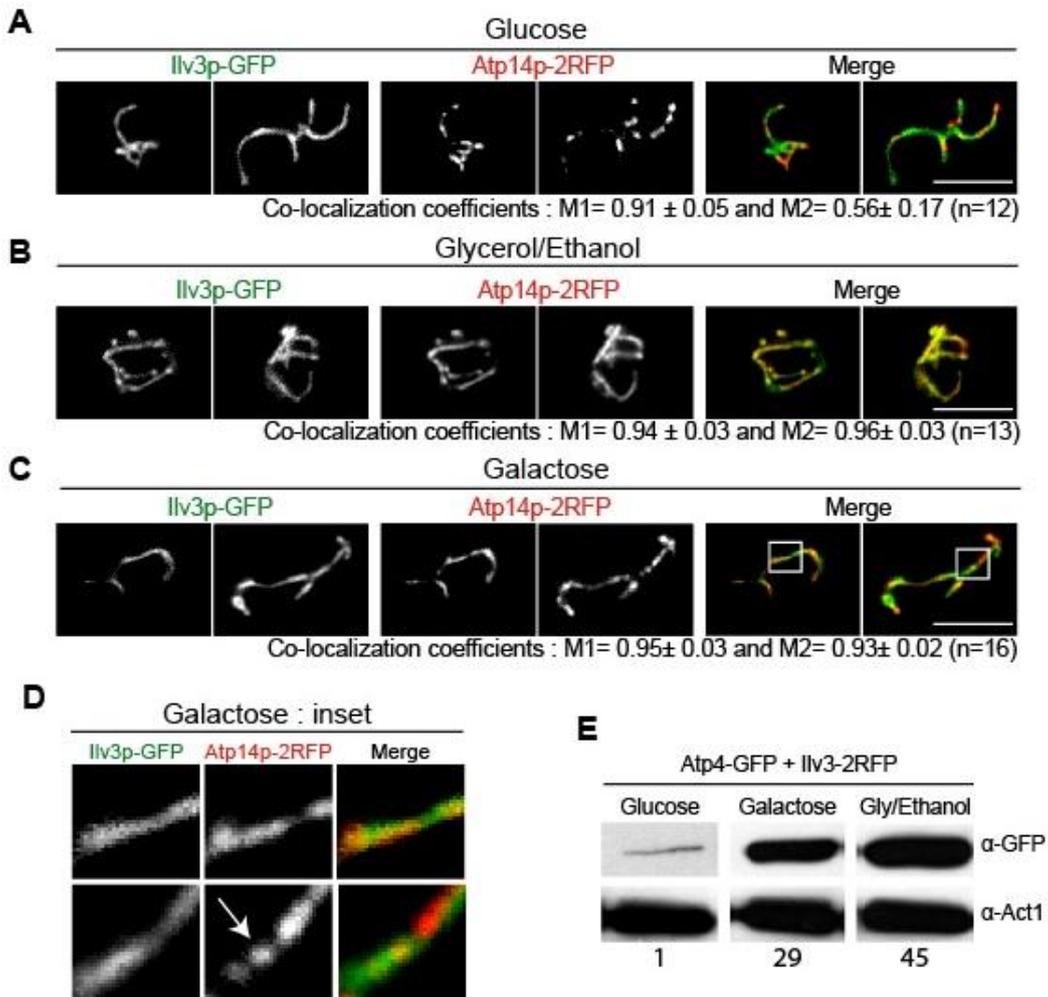


Figure 36 : La localisation de l'ATP synthase est influencée par la source de carbone

Cellules WT exprimant *Ilv3-GFP* et *Atp14-2RFP* cultivées en **A** : YPD, **B** : YPGAL, **C** : YPGE. **D** : agrandissement de la zone encadrée en (B). La flèche indique la présence d'un domaine d'ATP synthase. **E** : niveau d'expression d'*Atp4-GFP* révélée avec un anticorps anti-GFP dans une souche WT cultivée en glucose (YPD), galactose (YPGAL) et Glycérol/Ethanol (YPGE). Les nombres correspondent à la quantification normalisée sur le niveau d'actine révélé par un anticorps anti-Act1, par rapport à la condition glucose. Echelle : 5µm.

La quantification par western blot du niveau d'expression de la protéine de fusion *Atp4-GFP* dans des souches cultivées en présence de galactose révèle une forte induction de l'expression dans

cette condition en comparaison avec les souches cultivées en glucose, ce qui illustre la levée de la répression catabolique en présence de ce sucre. (Figure 36E).

Nous nous sommes ensuite intéressés à la localisation des sous unités de l'ATP synthase fusionnées avec des protéines fluorescentes dans ces conditions. Les images révèlent une différence de localisation de l'ATP synthase en fonction des sources de carbones assimilées (voir Figure 36A-C). En présence de galactose, l'ATP synthase occupe une grande majorité du réseau mitochondrial (Figure 36C). En effet le coefficient de co-localisation de Manders est de $0,93 \pm 0,02$ et il n'y a pas de différences significatives avec celui calculé lorsque les cellules sont en présence d'une source de carbone respiratoire (P value = 0,191). En revanche, le profil de distribution de l'ATP synthase le long du réseau diffère en fonction des conditions étudiées (voir Figure 37). En milieu respiratoire, la représentation graphique des intensités de fluorescence montre une localisation homogène de l'ATP synthase le long du réseau (Figure 37C). En glucose, les profils d'intensité de fluorescence révèlent la présence de pics de fluorescence distincts correspondant aux domaines d'ATP synthase (Figure 37A). En galactose, le profil d'intensité est intermédiaire. En effet, les pics de fluorescence sont différenciables, révélant des zones de forte intensité, mais la fluorescence entre les pics est à un niveau basal nettement supérieur à la condition en présence de glucose (Figure 37B). Les coefficients de Manders calculés en glycerol et en galactose sont proches de 1, et témoignent d'une co-localisation de la matrice et de l'ATP synthase. Par définition ce coefficient correspond au ratio de la somme de l'intensité des pixels du marqueur de matrice mitochondriale pour lesquels l'intensité de l'ATP synthase est au dessus de zéro, sur la somme des intensités des pixels du marqueur de la matrice mitochondriale. Ainsi la présence en galactose d'une intensité de fluorescence basale supérieure à 0 pour l'ATP synthase a pour conséquence un coefficient de Manders proche de 1.

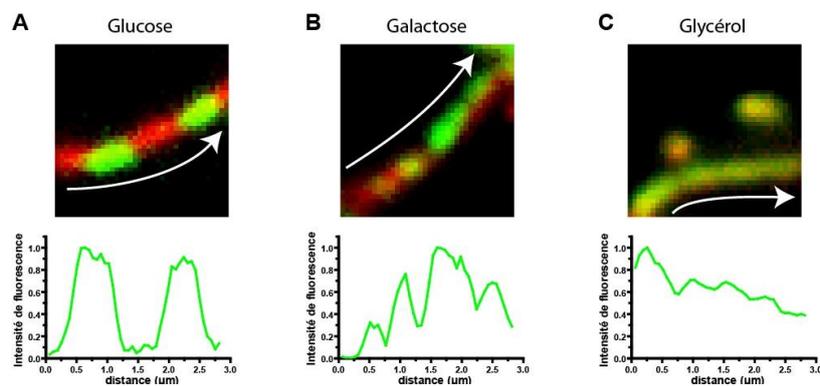


Figure 37 : Intensité de fluorescence de l'ATP synthase le long du réseau mitochondrial

Intensité de fluorescence de l'ATP synthase le long du réseau mitochondrial en fonction des sources de carbone. A : Glucose, B : Galactose, C : Glycérol.

Plusieurs hypothèses peuvent être avancées pour expliquer nos observations en présence de galactose :

D'une part, il serait possible qu'en présence de galactose il y aurait une augmentation du nombre de crêtes. Ainsi en galactose, les crêtes seraient proches les unes des autres ne permettant pas, ou rarement, l'observation de domaines distincts. Cette hypothèse est schématisée dans la **Figure 38C**. Pour tester cette hypothèse, nous pourrions localiser dans ces conditions les protéines du complexe MICOS qui localisent spécifiquement à la jonction des crêtes mitochondriales.

D'autre part, il est envisageable que le niveau basal de fluorescence mis en évidence par les profils d'intensité puisse correspondre soit à des complexes assemblés qui localiseraient dans l'IBM et/ou à des sous unités libres qui diffuseraient dans la matrice mitochondriale (voir **Figure 38D**). Une manière de tester ces hypothèses serait de réaliser des expériences de FRAP. La détection d'un retour de fluorescence rapide, similaire à celui mesuré pour la protéine Ilv3-GFP, nous suggérerait la présence d'un pool libre de sous-unités non assemblées.

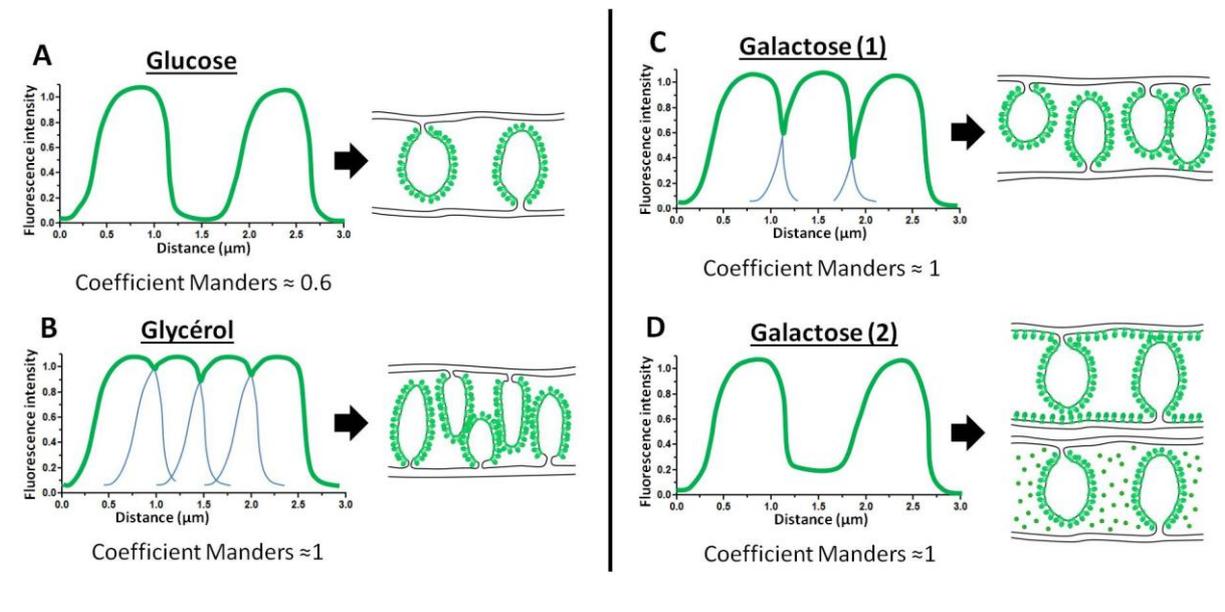


Figure 38 : Interprétation possible des profils d'intensité de fluorescence

Représentation schématique des profils d'intensité de fluorescence de l'ATP synthase et des coefficients de Manders en fonction des différentes sources de carbone. Les schémas représentent les interprétations possibles des profils d'intensité de fluorescence. **A** : Glucose. **B** : Glycérol. **C** et **D** : Galactose.

V. DISCUSSION

1. ATP SYNTHASE ET CRÊTES MITOCHONDRIALES

Dans cette étude, nous proposons que les domaines d'ATP synthase révélés *in vivo* correspondent aux crêtes mitochondriales. Notre modèle est en accord avec les résultats publiés en super résolution dans deux modèles mammifères. En effet, dans leur étude de STED, Schmidt *et al.* montrent une localisation de l'ATP synthase en structures tubulaires localisées de façon perpendiculaire à l'axe du tubule reflétant les crêtes ainsi que la présence de zones dépourvues de fluorescence le long des tubules (Schmidt *et al.*, 2009). Un autre article portant sur l'étude de la mobilité de molécule unique d'ATP synthase par TALM met en évidence des déplacements compartimentalisés de molécules uniques d'ATP synthase de façon orthogonale à l'axe longitudinal des mitochondries suggérant une mobilité restreinte au sein des crêtes (Appelhans *et al.*, 2012). Ces deux études ainsi que nos résultats mettent en évidence la possibilité d'étudier les crêtes mitochondriales par l'intermédiaire de l'ATP synthase. Ces études sont complémentaires. En effet les techniques de super résolution apportent des informations concernant la localisation et la dynamique de l'ATP synthase à l'échelle de la molécule unique, alors que nos résultats offrent la possibilité d'étudier la dynamique des domaines d'ATP synthase à l'échelle de la cellule entière. En effet dans notre étude nous avons étudié la dynamique des domaines d'ATP synthase par deux approches. La première est basée sur le suivi des domaines d'ATP synthase au cours du temps ce qui permet l'étude de la dynamique des domaines d'ATP synthase au sein du réseau. La seconde approche correspond à des expériences de FRAP nous permettant l'étude de la dynamique de l'ATP synthase au sein des crêtes.

(1) Dynamique des crêtes mitochondriales :

Les suivis des domaines d'ATP synthase ont été réalisés sur un même plan durant plusieurs minutes. Les résultats obtenus sont illustrés dans la **Figure 2** de l'article. Trois cas de figures sont observés : (1) le mouvement des domaines d'ATP synthase est dépendant de la dynamique du réseau mitochondrial (voir **Figure 2C**), (2) les domaines d'ATP synthase sont statiques au sein de tubules dynamiques (voir **Figure 2D**), (3) les domaines d'ATP synthase sont dynamiques au sein de tubules mitochondriales immobiles (voir **Figure 2E**). Du fait de la dynamique du réseau mitochondrial, on ne peut pas déduire dans nos conditions des constantes de vitesses des domaines d'ATP synthase, mais nos résultats permettent de comparer cette dynamique dans différents contextes physiologiques ou en condition mutante. Depuis quelques années, des liens étroits entre les mitochondries et les autres

composants cellulaires ont été mis en évidence. Il serait intéressant d'étudier la dynamique des crêtes mitochondriale en lien avec ces composants, tel que le réticulum endoplasmique, la membrane plasmique ou encore le cytosquelette d'actine. Il serait également pertinent d'étudier les conséquences, sur la dynamique et l'organisation des crêtes, de pertes de contact entre ces composants et les mitochondries. Pour se faire nous pourrions utiliser différentes drogues et/ou se placer dans des contextes de mutants.

(2) Dynamique de l'ATP synthase au sein des crêtes

Les expériences de FRAP réalisées dans notre étude apportent des informations complémentaires sur la mobilité de l'ATP synthase au sein des crêtes. En milieu respiratoire et fermentescible nous observons un retour de fluorescence identique pour la sous-unité Atp14 (voir **Figure 2F** de l'article). L'ATP synthase a donc dans ces deux conditions des propriétés dynamiques similaires.

Nos résultats montrent que les retours de fluorescence pour les sous unités testées atteignent environ 5% après 5 minutes d'acquisition (voir **Figure 2F-G** de l'article). Ces résultats indiquent que 5% des protéines sont mobiles, alors que 95% sont immobiles. Dans une étude publiée en 2010, la dynamique de la sous unité γ fusionnée à l'EGFP est étudiée dans un modèle Hela après photo-blanchiment du signal EGFP. Le retour de fluorescence est bi-phasique, indiquant que deux fractions indépendantes diffusent avec des vitesses différentes : une fraction correspondant à $57 \pm 12\%$ des protéines diffuse à une vitesse de $0.4 \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ et l'autre fraction diffuse à une vitesse de $5.10^{-4} \mu\text{m}^2 \cdot \text{s}^{-1}$ (Sukhorukov et al., 2010). L'utilisation dans cette étude de protéines surexprimées de façon transitoire rend l'interprétation quantitative des fractions difficile. Nos résultats sont donc difficilement comparables quantitativement aux résultats publiés dans cette étude, mais ces deux études mettent clairement en évidence deux fractions avec des propriétés dynamiques différentes.

Plusieurs hypothèses non exclusives peuvent être émises pour expliquer cette différence de dynamique des molécules d'ATP synthase. Nous pouvons proposer que cette différence soit liée à la localisation différentielle des complexes entre les crêtes et l'IBM. Il est envisageable que les contraintes physiques imposées par les crêtes et leurs jonctions étroites limitent la mobilité des molécules au sein de ces structures. Ainsi les complexes localisés dans l'IBM auraient des propriétés plus dynamiques. Pour argumenter en faveur ou non de cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser des expériences de suivi de particules uniques pour déterminer les vitesses et les trajectoires associées à ces molécules en fonction de leurs localisations. Bien qu'une majorité des crêtes mitochondriales soit perpendiculaire à l'axe des tubules, cette localisation peut être rendue difficile

par la présence de crêtes longitudinales. Une autre expérience consisterait en la réalisation de FRAP dans un mutant *mdm10Δ*. En effet les mitochondries géantes de ce mutant nous permettraient de photo-blanchir préférentiellement les protéines de fusion localisées dans les crêtes ou dans l'IBM. Pour finir, nous pourrions envisager l'étude des propriétés dynamiques des sous unités de l'ATP synthase dans des mutants des protéines du complexe MICOS qui forment les jonctions serrées à la base des crêtes. Une autre hypothèse serait que les protéines aux propriétés dynamiques correspondent à des sous-unités diffuses au sein de la matrice. Pour finir, nous pouvons envisager que cohabitent au sein des crêtes mitochondriales des complexes en oligomère dont l'organisation limiterait la dynamique, avec des monomères plus dynamiques. Un moyen de tester l'effet de la l'oligomérisation sur la dynamique de l'ATP synthase serait de réaliser des expériences de FRAP ou de suivi de molécules uniques dans un mutant *atp20Δ*, même si la membrane interne de ce dernier présente de sévères défauts de morphologie lié à l'absence d'oligomérisation de l'ATP synthase.

Ainsi la localisation des crêtes par l'intermédiaire des domaines d'ATP synthase nous permet l'étude *in vivo* de la dynamique de ces structures à l'échelle de la cellule entière, ouvrant de nouvelles perspectives pour l'étude du remaniement de la membrane interne mitochondriale.

2. LOCALISATION DES COMPLEXES DE LA CHAÎNE RESPIRATOIRE

Nous avons localisé différentes sous unités des complexes de la chaîne respiratoire fusionnées à la GFP. Nos résultats montrent qu'en milieu respiratoire ces protéines de fusion localisent de façon similaire à l'ATP synthase, c'est-à-dire de manière continue et homogène le long du réseau mitochondrial (voir **Figure S4** de l'article). En présence de glucose nous observons que les complexes de la chaîne respiratoire localisent de façon homogène le long du réseau, ce qui diffère de la localisation en domaine de l'ATP synthase. Ces observations nous amènent à nous questionner sur le fait que les complexes de la chaîne respiratoire ne soient pas localisés en domaine comme l'ATP synthase alors que les éléments de la littérature suggèrent une localisation au sein des crêtes (Gilkerson et al., 2003; Vogel et al., 2006; Wurm and Jakobs, 2006). Plusieurs hypothèses peuvent être avancées.

Tout d'abord l'analyse quantitative est compliquée du fait qu'en milieu fermentescible, nous mesurons pour les protéines de fusion des sous unités des complexes de la chaîne respiratoire, des signaux de fluorescence très faibles, à peine distinguables du bruit de fond. Pour palier à ce problème, certaines sous unités ont été fusionnées avec des protéines fluorescentes en tandem afin d'augmenter l'intensité du signal. Malheureusement l'ajout de plusieurs protéines fluorescentes à

l'extrémité C terminale entraîne des défauts de croissance des souches témoignant une mauvaise complémentation de ces protéines de fusion.

La complémentation des différentes souches co-exprimant la protéine *Ilv3-2RFP* avec *Ndi1-GFP* (NADH déhydrogénase), *Sdh2-GFP* (complexe II), *Qcr9-GFP* (complexe III) et *Cox7-GFP* (complexe IV) a été testée en milieu respiratoire. Seule la souche co-exprimant *Ilv3-2RFP* et *Cox7-GFP* présente de légers défauts de croissance. Ainsi cette localisation continue des complexes de la chaîne respiratoire en glucose ne peut pas être expliquée par des défauts de complémentation.

Les complexes composant la chaîne respiratoire sont assemblés en plusieurs étapes, il serait donc envisageable que cette localisation le long du réseau soit due à la présence d'intermédiaires d'assemblage. A titre d'exemple il a été montré chez les mammifères par des expériences de migration dans un gel non dénaturant Blue-Native PAGE que le complexe IV est retrouvé sous forme de différents intermédiaires d'assemblage (Nijtmans et al., 1998). Dans leur étude de 2003 Gilkerson et al. localisent la majorité des complexes III de la chaîne respiratoire dans les crêtes mitochondriales, mais aussi au niveau de l'IBM. Les auteurs suggèrent que les protéines localisées dans l'IBM correspondent à des intermédiaires d'assemblage (Gilkerson et al., 2003). Nous ne pouvons donc pas exclure que les complexes que nous localisons le long du réseau correspondent à des intermédiaires d'assemblage. Pour tester cette hypothèse nous pourrions réaliser des expériences de migration des protéines sur gel natif. Nous pouvons également émettre l'hypothèse selon laquelle la fluorescence continue le long du réseau mitochondrial correspond à des sous unités libres localisées dans la matrice ou dans l'IBM. Une façon simple de tester cela serait de réaliser des expériences de FRAP, afin de comparer la mobilité des sous unité des complexes de la chaîne respiratoire avec celle de protéines diffusant librement dans la matrice ou dans l'IBM.

Enfin, il est envisageable que nos résultats reflètent effectivement la localisation des complexes de la chaîne respiratoire qui seraient retrouvés tout le long de la membrane interne. En effet les résultats de localisation obtenus par microscopie électronique et immuno-marquage diffèrent selon les études. A titre d'exemple Gilkerson *et al.* montrent que dans des tissus de cœur de bœuf, environ 94% des complexes III sont localisés au niveau des crêtes mitochondriale (Gilkerson et al., 2003) alors que Vogel *et al.* en quantifient 67% pour le complexe III chez *S. cerevisiae* (Vogel et al., 2006). Il est important de noter que les expériences d'immuno-marquage réalisées par Vogel et al ; ont été effectuées sur des levures cultivées en présence d'une source de carbone respiratoire. Il n'est donc pas possible de comparer cette localisation avec celle qui nous décrivons en milieu fermentescible. Toutefois, il serait intéressant de localiser les complexes de la chaîne respiratoire par immuno-marquage dans des levures ayant assimilé du glucose, afin de voir si dans cette conditions

les complexes ont davantage tendance à localiser dans l'IBM. Pour finir, dans une étude publiée en 2012, Appelhans *et al* mettent en évidence des propriétés différentielles entre les complexes de la chaîne respiratoire et l'ATP synthase. Ils comparent par suivi de molécule unique les propriétés dynamiques de l'ATP synthase avec celles du complexe II. Leurs résultats montrent que la majorité des molécules d'ATP synthase ont une trajectoire orthogonale à l'axe des tubules laissant supposer une diffusion restreinte de ce complexe au sein des crêtes. Pour le complexe II, les résultats montrent également des trajectoires le long des tubules qu'ils attribuent à des mouvements au sein de l'IBM. Les auteurs de cette article ne notent pas de telles trajectoires pour l'ATP synthase (Appelhans *et al.*, 2012). Bien que cette étude ait été réalisée dans un modèle mammifère, elle met en évidence une différence de mobilité entre l'ATP synthase et le complexe II de la chaîne respiratoire suggérant qu'en plus de la localisation au sein des crêtes mitochondriales, le complexe II serait retrouvé le long de l'IBM. Nos observations sont donc en accord avec cette étude.

VI. CONCLUSIONS

Nous commençons aujourd'hui à avoir de solides connaissances sur le remodelage du réseau mitochondrial. En revanche, peu de choses sont connues à propos du remaniement de la structure interne des mitochondries. Les technologies donnant accès à la structure interne des mitochondries et notamment celle des crêtes sont longtemps restées cantonnées à la microscopie électronique qui a été suivi par le développement de logiciels permettant des reconstitutions en trois dimensions de ces structures. Depuis quelques années, les avancées des techniques de super résolution et notamment les techniques de détection de particules uniques permettent une meilleure appréhension de la dynamique des complexes protéiques tels que l'ATP synthase.

Les résultats de notre étude ouvrent la possibilité de suivre *in vivo* le remaniement de la membrane interne mitochondriale par l'intermédiaire de la localisation de l'ATP synthase. En effet beaucoup de questions restent ouvertes concernant la réorganisation des crêtes mitochondriales et le lien de ces structures avec les composants mitochondriaux, mais aussi avec le reste de la cellule.

Remaniement du réseau mitochondrial en quiescence

CHAPITRE III : REMANIEMENT DU RESEAU MITOCHONDRIAL EN QUIESCENCE

Dans la deuxième partie de ma thèse, je me suis intéressée au remaniement du réseau mitochondrial en quiescence chez *S. cerevisiae*. Les résultats de cette étude sont présentés sous forme d'un article qui est en cours de rédaction. L'introduction, les figures et les résultats sont présentés en anglais. Les résultats sont eux discutés en français.

I. INTRODUCTION

Cells perpetually face the decision to proliferate or to enter a non-dividing state. Non-dividing states may be non-reversible such as senescence or, alternatively, cells can enter quiescence, a cellular state defined as a reversible absence of proliferation. In fact, quiescence is probably the most common cellular situation encountered on earth. Indeed, micro-organisms spend most of their natural lifetime as quiescent cells waiting for essential nutrients to divide. In multi-cellular eukaryotes, the most studied example of quiescent cells are stem cells that wait for complex signals emanating from the entire organism to resume proliferation in order to maintain tissue homeostasis (Cheung and Rando, 2013; O'Farrell, 2011; Valcourt et al., 2012). Quiescent cells must face aging and cope with extrinsic or intrinsic harmful events that cause the accumulation of damaged macromolecules. A large number of these aggressions are presumably caused by detrimental molecules such as reactive oxygen species (ROS). The inability to handle these stresses ultimately leads to cell death. Besides, upon exit from quiescence, cells must produce off-springs that are presumably born "damage-free" with a full replicative potential, a process called rejuvenation. Importantly, quiescence exit must be tightly regulated since an uncontrolled escape from quiescence could be harmful for the cell itself or for the entire organism, as exemplified by cancers (Malumbres and Barbacid, 2001; Ro et al., 2013; Wells et al., 2013). Finally, in the case of micro-organisms that are in competition with others for the same environmental niche, quiescence exit must be fast since the rapidity of this step conditions the prevalence of the species. Quiescence is thus at the heart of crucial biological issues including development, aging, and evolution. Yet this crucial cellular state remains poorly understood. This may be because quiescence encompasses highly diverse physiological situations that differ not only depending on the cell type but also, in the case of the same type of cells, depending on both the stimuli that triggered quiescence entry (contact inhibition,

exhaustion of growth factors or nutrients, hypoxia, or other) and on the time spent in quiescence (Coller et al., 2006; Klosinska et al., 2011; O'Farrell, 2011).

Single cell eukaryotes like *S. cerevisiae* have been tremendously useful for the comprehension of complex molecular processes. In these organisms, quiescence is primarily induced by limitation for essential nutrients and recent remarkable studies have shed new light on this obscure cellular state (for review see (De Virgilio, 2012)). When the carbon source is exhausted, most *S. cerevisiae* cells enter quiescence from the G1 phase of the cell cycle. But quiescent yeast cells are not simply resting G1 cells as they acquire a variety of specific properties. Indeed, the establishment of quiescence is accompanied by a decrease in protein synthesis rate, the accumulation of storage molecules and the reorganization of various cellular machineries (Daignan-Fornier and Sagot, 2011a; Daignan-Fornier and Sagot, 2011b). As an example, actin filaments that form a polarized and dynamic network of actin patches and cables in dividing yeast collapse into actin bodies, a non polarized and stable actin structure (Sagot et al., 2006).

Mitochondria is a dynamic double-membrane-bound organelle shaped as a tubular network whose morphology is regulated by the equilibrium between fusion and fission (Friedman and Nunnari, 2014; Lackner, 2014). In budding yeast, mitochondrial fission is driven by Dnm1, a dynamin related protein that assembles at the division site into helical structures that wrap mitochondria (Ingerman et al., 2005; Mears et al., 2010). This assembly depends on the outer membrane mitochondrial Fis1 protein together with adaptator proteins such as Mdv1/Caf4 and on contact sites between mitochondria and the endoplasmic reticulum (ER) (Fekkes et al., 2000; Friedman et al., 2011; Griffin et al., 2005; Mozdy et al., 2000; Tieu and Nunnari, 2000). Fusion of the mitochondrial outer and inner membranes requires the action of Fzo1 and Mgm1 respectively. For a review see (Herlan et al., 2003; Hermann et al., 1998). In addition, mitochondrial tubular network dynamics depends on actin cables. Anterograde movements – towards the budding daughter cell - are driven onto actin cables by Myo2 and retrograde movements – towards the mother cell – are mediated by the actin cable flow generated by actin filament elongation at the bud tip for a review see (Vevea et al., 2014).

Mitochondria activity has been linked to survival in quiescence. Indeed, mitochondria malfunctioning is thought to generate ROS which accumulation is supposedly one of the major cause of cellular aging for a review see (Hekimi et al., 2011). Besides, in *S. cerevisiae*, a genome wide genetic screen found that among the mutants that are unable to survive after glucose exhaustion, the most sensitive were impaired for oxidative phosphorylation or tricarboxylic acid cycle (Martinez et al., 2004). In fact, since 1962 it is known that upon carbon source exhaustion, *S. cerevisiae*

mitochondria fragmented (Yotsuyanagi, 1962). Furthermore in other organisms, like worms or flies, aging has also been associated with mitochondrial network remodelling (Sohal, 1975; Yasuda et al., 2006).

In yeast, the actin cytoskeleton is drastically remodelled upon quiescence entry. As this cytoskeleton is a major actor in the yeast mitochondrial network organization, we studied the reshaping of mitochondria upon quiescence establishment. We showed that upon carbon exhaustion, the mitochondrial tubular network progressively fragments and gives rise to small cortical mitochondrial vesicles. By contrast to what was described by Allen and co-workers, no significant difference in the mitochondrial morphology was found between young daughter cells and replicatively aged mother cells. We analyzed the vesicle content and found that while all mitochondrial vesicles contain OXPHOS enzymes, the distribution of mitochondrial DNA was uneven. Upon quiescence exit, cortical mitochondrial vesicles rapidly fuse and a tubular network is reconstituted prior to bud emergence. Astonishingly, neither the canonical fusion machinery nor the actin cytoskeleton are required for this process.

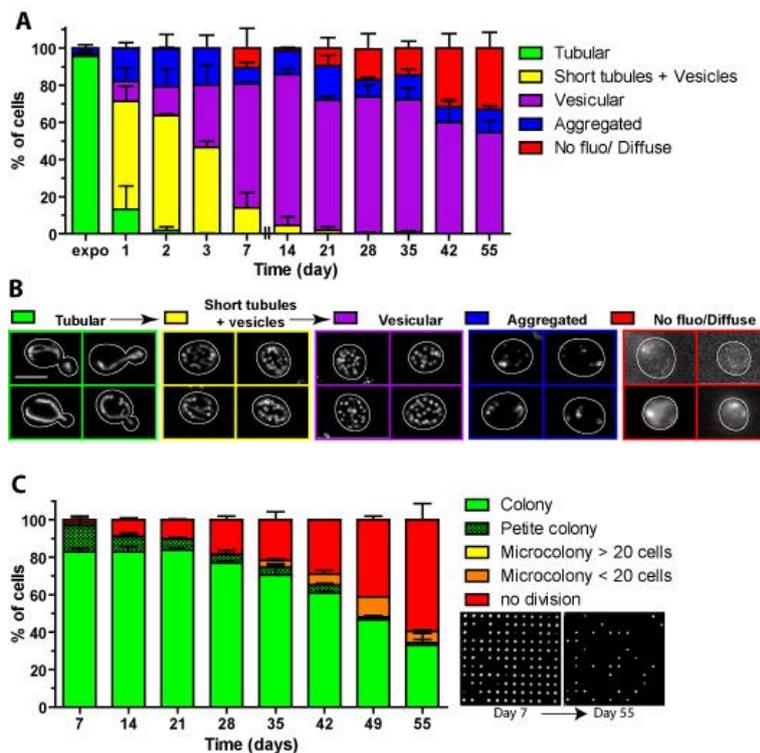
II. RESULTATS

The mitochondrial network is reorganized into small cortical vesicles in quiescence.

To follow the mitochondrial network reorganization upon cell's entry into quiescence, we used the mitochondrial matrix protein *Iiv3* fused to GFP or RFP (Jimenez et al., 2014). Cells were grown in glucose-rich liquid medium (YPDA) at 30°C. As described previously (Egner et al., 2002) actively proliferating cells display a tubular mitochondrial network with few branched points (Figure 1A-B). Upon quiescence entry, the mitochondrial network progressively fragments and short tubules and vesicles begin to appear. After 7 days, the vast majority of the cell population displays only cortical vesicles (Figure 1A-B). One possibility could be that the mitochondrial network remodelling would be due to the accumulation of non fermentable carbon source and/or to the switch toward a respiratory metabolism occurring upon the diauxic shift. Yet, when cells were grown in lactate or glycerol containing rich media, actively dividing cells displayed a highly branched tubular mitochondrial network (Egner et al., 2002) (see Supplemental Figure 1). After lactate or glycerol exhaustion, the mitochondrial network fragmentation was also observed (see Supplemental Figure 1). This strongly suggests that the mitochondrial network fragmentation does not depend on the nature of the metabolized carbon source but is rather linked to the proliferation cessation after carbon source exhaustion. Even after a prolonged time in quiescence, the mitochondrial organization

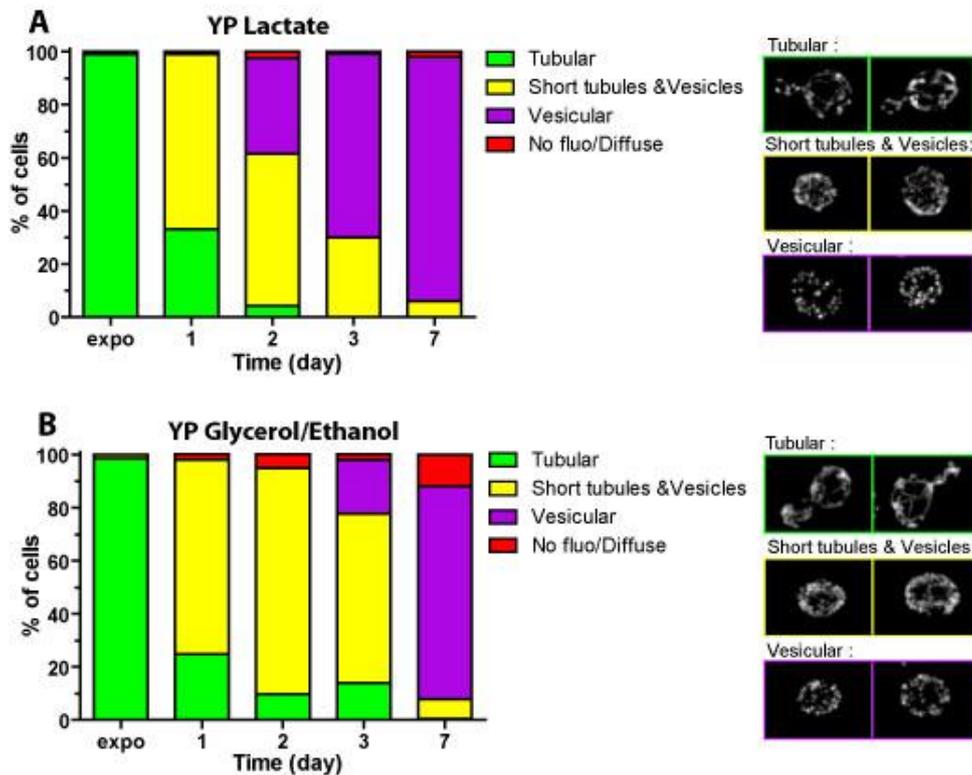
remains mostly organized as cortical vesicles, although the percentage of cells with diffuse or no fluorescence progressively increases. Of note, about 10% of the cells display aggregated mitochondria whatever the time in quiescence (Figure1A).

We then wonder whether a correlation between mitochondrial network organization and cell viability could be found. Therefore, we tested quiescent cells capacity to survive in quiescence and give rise to progeny upon re-feeding. Cells from stationary phase cultures were isolated every week by micromanipulation and their ability to form a colony was tested. These experiments showed that 97.0 ± 4.3 % of 7 day-old quiescent cells were able to give rise to progeny. This percentage decrease to 34.5 ± 11.2 % for 55 day-old cells (Figure 1C), indicating that chronological aged cells progressively lose their ability to re-enter into the proliferating state. Since after 28 days, the percentage of cell displaying a vesicular network was always found to be higher than the percentage of cells capable of exiting quiescence, we could draw any direct correlation between the mitochondrial morphology and the capacity to face chronological aging



Jimenez et al. Figure 1

FIGURE 1: Reorganization of the mitochondrial network upon quiescence entry. (A) WT yeast cells expressing *Ilv3* fused to RFP were grown in YPD at 30°C. Each day (or week), cells were imaged and mitochondrial morphology was scored. For each time point more 300 cells were counted, in two independent experiments. Bars are SD. **(B)** Representative images of cells from each mitochondrial morphology category counted in (A). Bar scale is 5µm. **(C)** WT prototroph cells from a YPD were micro-manipulated on a YPD plate and incubated at 30°C to analyze their capacity to give rise to a colony upon chronological aging. Petite colony were identified by replica-plating cells onto YPGEth plates (n=132, two experiments).



Jimenez *et al*, Supplementary Figure S1

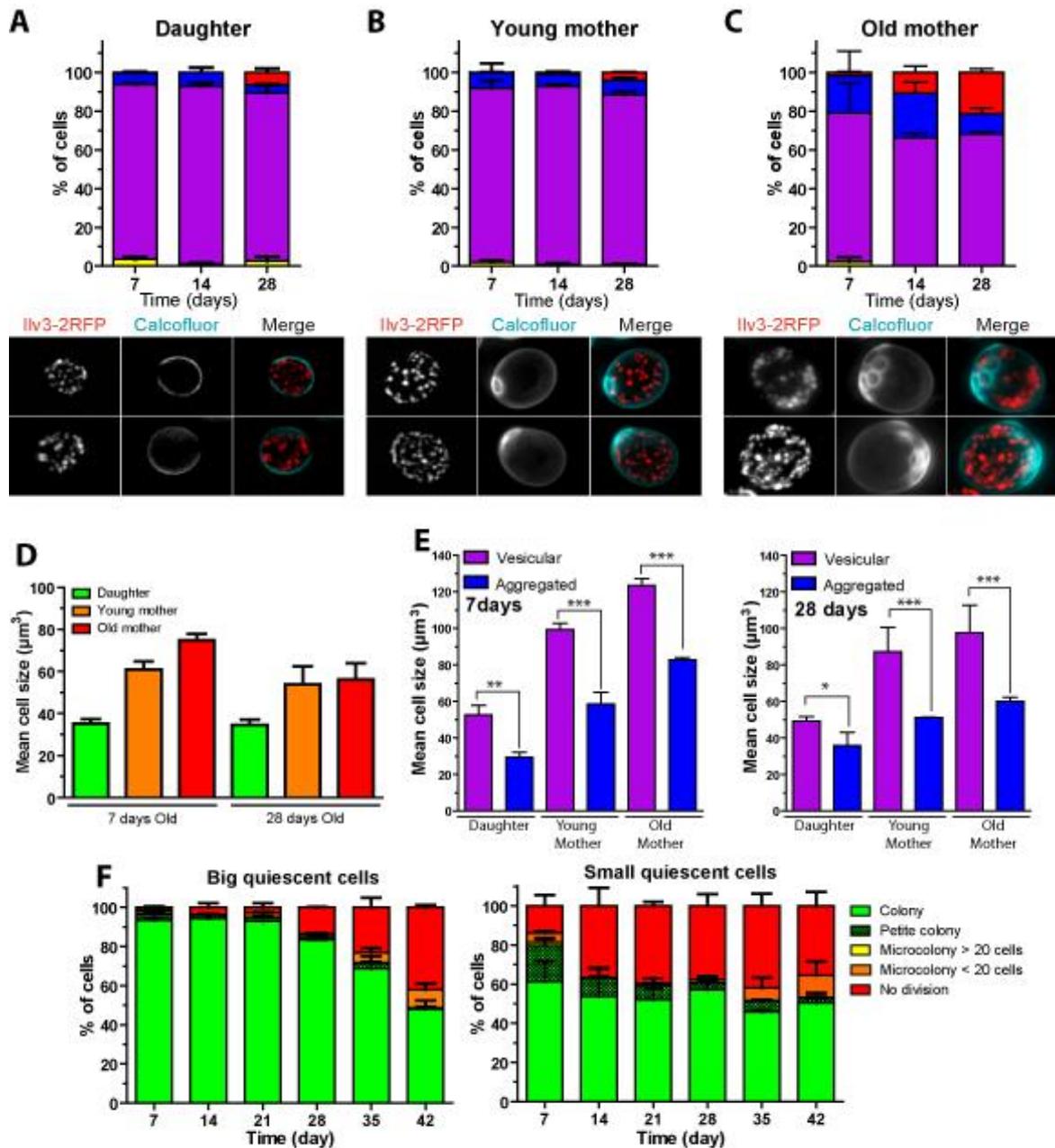
SUPPLEMENTARY FIGURE 1 : WT yeast cells expressing *Ilv3* fused to RFP were grown at 30° in YP Lactate (A) or YP Glycerol/Ethanol (B). Cells were imaged and mitochondrial morphology was scored. For each time point more 300 cells were counted.

Mitochondrial morphology in quiescence according to cell history.

Stationary phase culture contains different replicatively aged cells. Indeed theoretically 50% of quiescent cells are virgin cells, which have never divide (daughter cells), 25% are cells that have budded once and therefore display one bud scar that can be revealed by calcofluor white staining, 12.5% have budded twice and display two bud scars etc... . In a study published in 2006, based on a density gradient Allen *et al.* isolated and characterized two kinds of cells from a stationary-phase culture. They considered the upper fraction as “non-quiescent” cells because they show some viability defects compared to the lower so called “quiescent” lower fraction. Their results indicated that more than 90 % of “quiescent cells” are daughter cells that were described as uniform in size and in which no endoplasmic reticulum and no mitochondria could be detected. By contrast, “non-quiescent cells” were mostly mother cells that were heterogeneous in size, with a large vacuole and numerous mitochondria (Allen *et al.*, 2006). In our culture conditions and in an unfractionated population, we studied mitochondrial morphology according to cell’s replicative age. Wild-type cells expressing *Ilv3*-RFP from a 7, 14 and 28 day-old culture in YPDA were stained with calcofluor white.

Mitochondrial morphology was compared in daughter cells, young mothers (1-5 bud scars) and old mothers (more than 5 bud scars). Around 90% of 7 day-old daughter and young mother cells displayed vesicular mitochondria. This proportion remained constant over time (Figure 2 A-B). The large majority of the old mother cells (70%) also display a vesicular network whatever the time in quiescence. As early as 7 days, already only 30% of the old mother cells display aggregated mitochondria. This proportion decrease with the time spent in quiescence and simultaneously, the number of cells with a diffuse or no fluorescence increases (Figure1C). This result clearly indicated that whatever their replicative age, the large majority of the cells from a stationary phase culture contained vesicular mitochondria.

First we found that whatever the chronological age, mother cells are significantly bigger than daughter cells (Figure 2D). Yet, interestingly, whatever their replicative age, cells with aggregated mitochondria were always smaller than cells with a vesicular mitochondrial network (Figure 2E). Micro-manipulation experiments indicated that big cells start losing their ability to give progeny only after 28 days in culture (Figure 2F) while, as early as after 7 days, about 40% of the small cells were no longer able to give rise to healthy progeny. All together our results indicate that small cells, which are mostly daughter cells which display a vesicular mitochondrial network, are more prone to lose their capacity of exiting quiescence than older cells that are bigger.



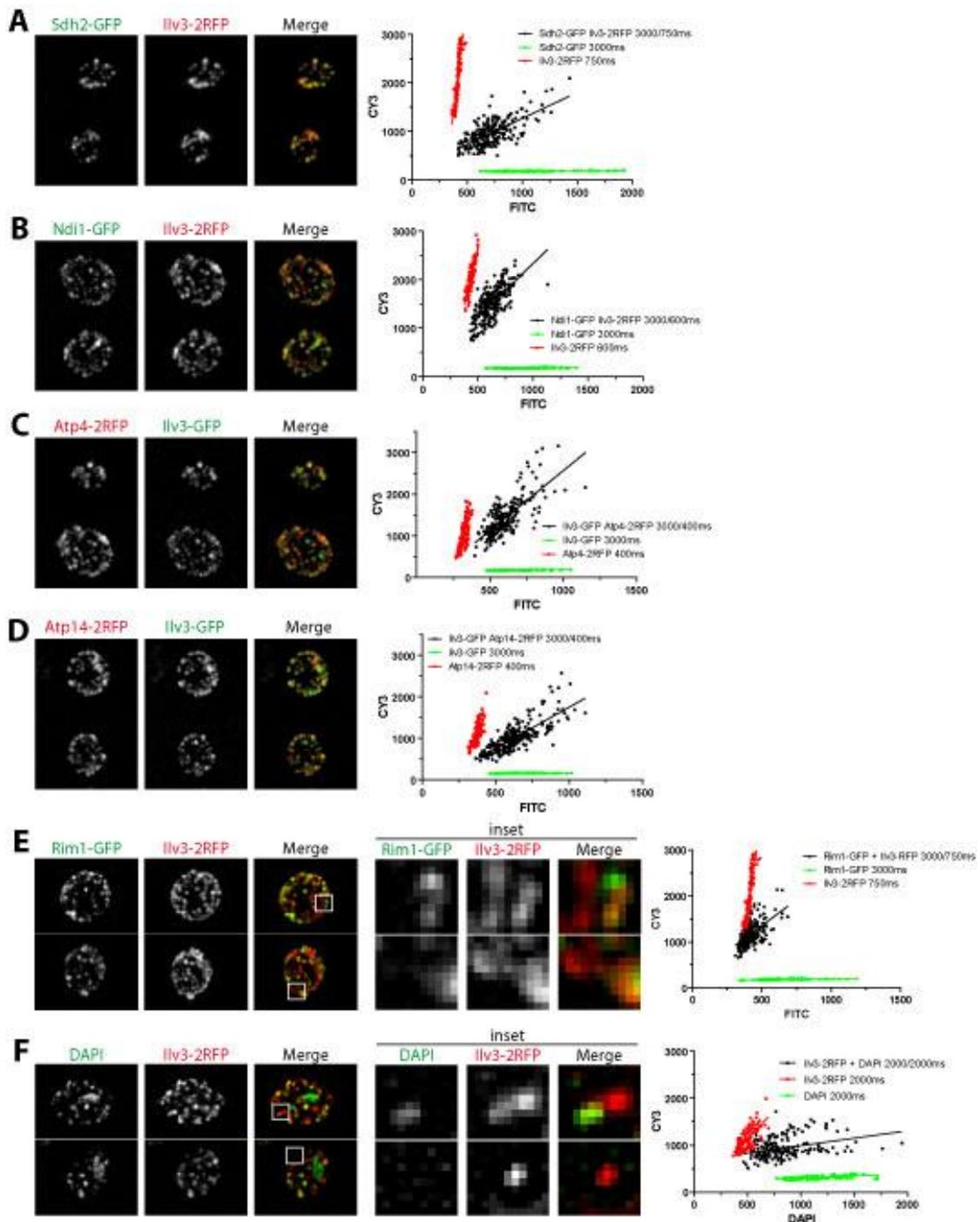
Jimenez *et al.* Figure 2

FIGURE 2: Mitochondrial morphology according to quiescent cell's history. (A-C) WT cells expressing *Ilv3* fused to RFP (red) were grown in YPD and stained with calcofluor white (bleu). Mitochondrial morphology was analysed in cells according to their replicative age. Images are representative of each cell categories. (A) Daughter cells (B) Young mother cells and (C) old mother cells. (D) Mean cell size was measured in daughter, young mother and old mother cells from a 7 and 28 day-old culture ($n=200$, two experiments). (E) WT cells expressing *Ilv3*-RFP were stained with calcofluor white. Cell size was measured and cells were categorized as displaying a vesicular or an aggregated mitochondrial network ($n=200$, two experiments). (F) WT prototroph cells from an YPD culture were micro-manipulated according to their size (big vs. small) on YPD plate and incubated at 30°C. Petite colony were tested by replica-plating cells onto YPGEth plates ($n=120$, two experiments)

Mitochondrial vesicles composition

We have shown that in yeast actively dividing in the presence of glucose, the ATP synthase is heterogeneously distributed along mitochondrial tubules (Jimenez et al., 2014). We thus wonder whether each mitochondrial vesicle detected in quiescent cells display the same content of ATP synthase and/or respiratory enzymes. Cells co-expressing the mitochondrial matrix marker Ilv3 and a protein of interest, each fused with two different fluorophores were observed after 7 days in YPD medium. For each vesicle, fluorescence intensity in both channels was measured. As a control, fluorescence of cells expressing only one of the two fusion proteins was measured in the same imaging conditions. Shd2-GFP and Ndi1-GFP were used to visualize respectively succinate dehydrogenase (Figure 3A) and NADH dehydrogenase (Figure 3B). Each protein was found in every mitochondrial vesicle. Similarly, localization of the ATP synthase subunits Atp4 and Atp14 (respectively in Figure 3C and 3D) indicated that 100% of vesicles tested contain each subunit. This strongly suggests that mitochondrial vesicles have the same OXPHOS enzymatic content.

Mitochondrial DNA is compacted into a nucleoprotein complex called nucleoid that localized as discrete punctuate distributed all along the mitochondrial tubular network. We thus wonder whether in quiescent cells, each mitochondrial vesicle contain a DNA. To localized mtDNA in quiescent cell Rim1, a mtDNA-binding protein, fused to GFP was co-expressed with Ilv3-2RFP. Interestingly the Rim1-GFP fluorescence was not detected in all mitochondrial vesicles (Figure 3E). This indicates that each mitochondrial vesicle does not necessarily contain a nucleoid. This was confirmed using DAPI (Figure 3F). From these results we conclude that mitochondrial vesicles found in quiescent cells are not equivalent.

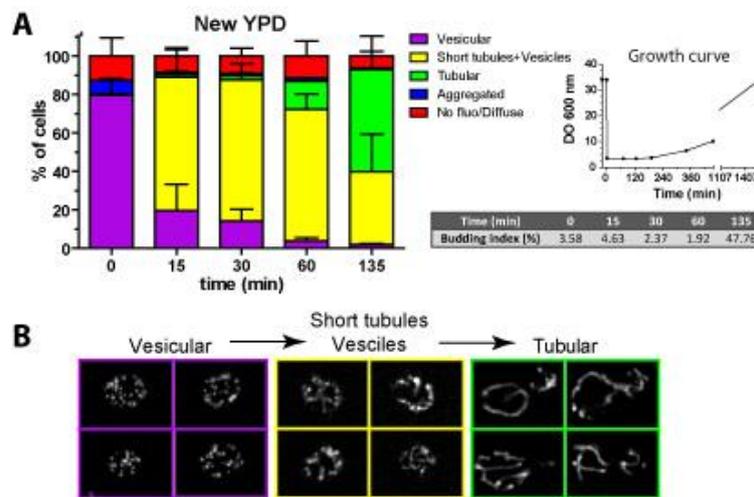


Jimenez *et al.* Figure 3

FIGURE 3: Mitochondrial vesicles composition (A) Representative images of WT cells co-expressing *Ilv3-2RFP* and *Sdh2-GFP* from a 7 day-old culture. Black dots represent the ratio of GFP and RFP fluorescence intensities for > 200 mitochondrial vesicles were plotted. Red and green dots are control fluorescence of WT cells expressing either *Sdh2-GFP* (green) or *Ilv3-2RFP* (red) alone. Same analyzes were made for cells co-expressing **(B)** *Ndi1-GFP* and *Ilv3-2RFP*, **(C)** *Atp4-2RFP* and *Ilv3-GFP*, **(D)** *Atp14-2RFP* and *Ilv3-GFP*, **(E)** *Rim1-GFP* and *ilv3-2RFP*. **(F)** *Ilv3-2RFP* expressing cells stained with DAPI.

Reorganisation of mitochondrial network upon quiescence exit

As in quiescent cells, not all the mitochondrial vesicles display the same content, we wonder how these different vesicles were partitioned upon quiescence exit. Wild-type cells expressing *Ilv3-GFP* were grown 7 days in YPD medium. Cells were then re-fed with new YPD and mitochondrial morphology was followed over time. As shown in Figure 4, within minutes after cell's re-feeding, the majority of the cells already display short tubules. Cells with a typical tubular network started to appear after 60 min, prior to bud emergence. 135 min after re-feeding, about half of the cells have started to bud, and more than 50% of the total cell population displayed a fully tubular mitochondrial network (Figure 4A-B). From that experiment we conclude that mitochondria are not delivered to daughter cells as individual vesicles but rather fuse to form short tubules prior to bud emergence.



Jimenez et al. Figure 4

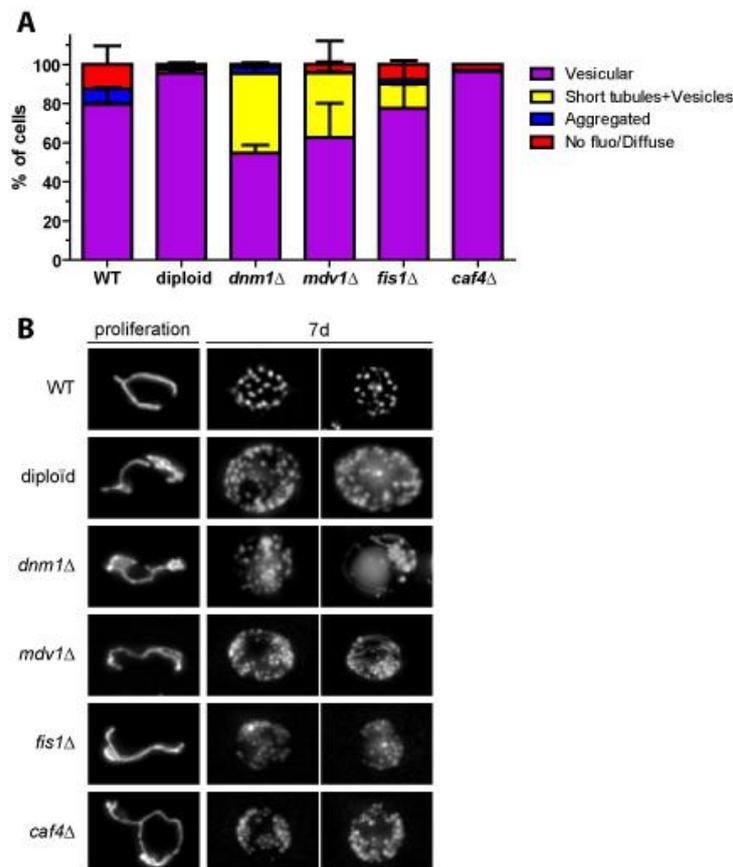
FIGURE 4: Reorganization of the mitochondrial network upon quiescence exit. (A) WT cells expressing *Ilv3-GFP* were grown for 7 days in YPD and then transferred into YPD. The budding index was calculated for each time point. Cell density was monitored by measuring OD_{600nm} . Representative images of mitochondrial morphology are shown in (B).

Mechanism involved in mitochondrial network fragmentation upon quiescence entry

Previous study have shown that upon quiescence entry, actin cables and patches vanish and actin filaments re-organized into a globular structure called actin bodies (Sagot et al, 2006). Because mitochondrial morphology and motility in dividing cells depend on actin cytoskeleton (Simon et al., 1997; Vevea et al., 2014) we wonder whether actin cables disassembly was sufficient to induce the mitochondrial fragmentation observed in quiescence. Exponentially growing *bni1-FH2#1 bnr1Δ* strain, that loose actin cables upon shift to non permissive temperature (Sagot et al, 2002), expressing *Ilv3-2RFP*, was transferred to the restrictive temperature (34°C). As expected, after 30min, actin cables are not longer detected and actin patches are depolarized. Although in those cells, the

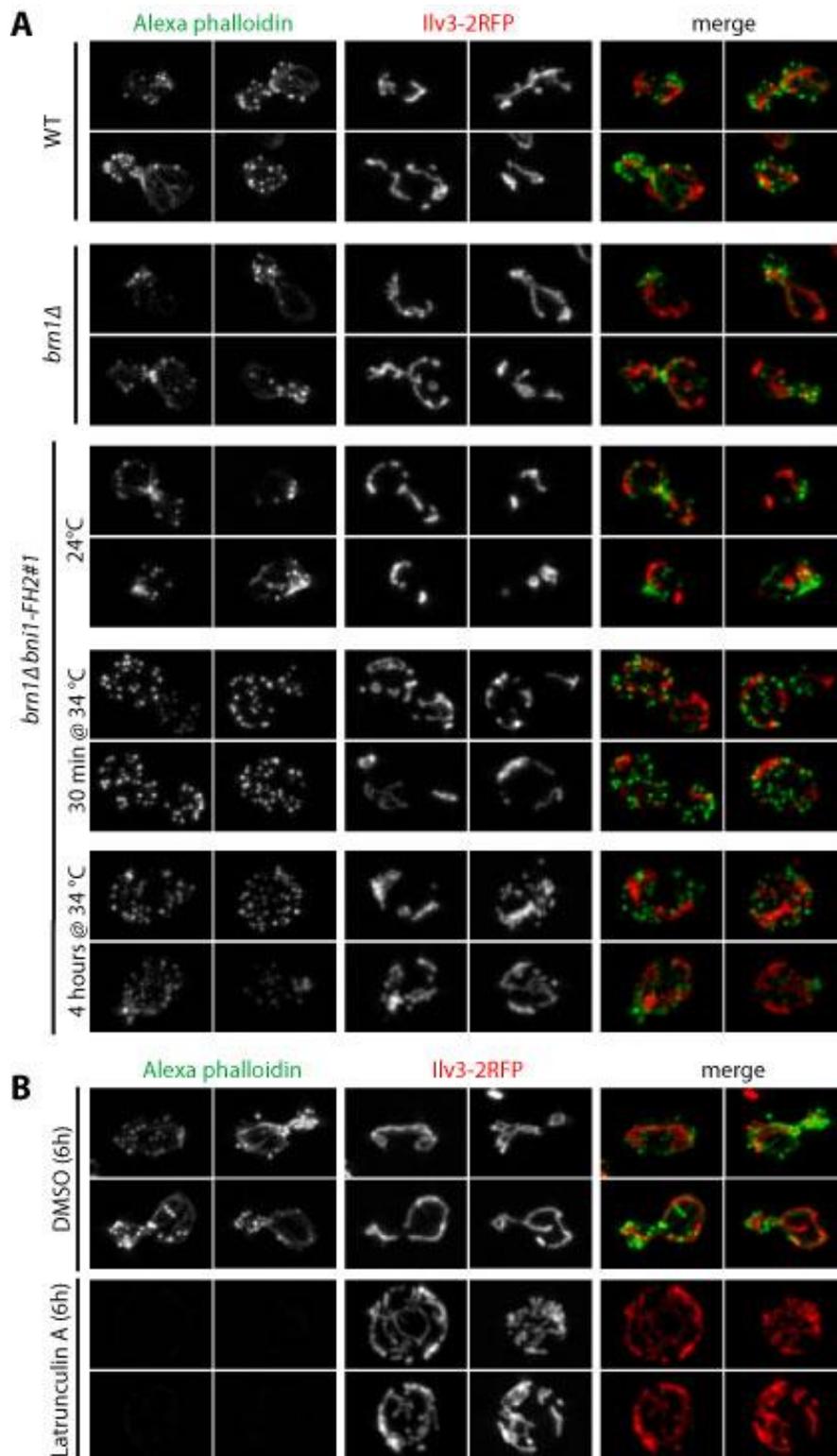
mitochondrial network was clearly perturbed, no cortical mitochondrial vesicles that are typical of quiescent cells were detected. Instead, the mitochondrial network collapsed and form aggregates and thus, even after a prolonged incubation at 34°C (Suppl. Figure 2A). The removal of actin cables by another route, i.e. by treating the cells with the actin depolymerising drug Latrunculin A, gave the same results (Suppl. Figure 2B). These results indicated that the collapse of actin filaments is not sufficient to induce the formation of cortical mitochondrial vesicles observed in quiescent cells.

Mitochondrial morphology during cell proliferation depends on a equilibrium between fusion and fission. First, we wondered wether the fission machinery was involved in mitochondrial fragmentation during quiescence entry. To test this hypothesis we analysed mitochondrial network organization in 7 day-old *dnm1Δ*, *mdv1Δ*, *fis1Δ* and *caf4Δ* cells expressing *Ilv3-RFP*. Surprisingly we observed that the majority of the cells display a typical cortical mitochondrial network, although few *dnm1Δ*, *mdv1Δ* and *fis1Δ* cells still exhibit few short mitochondrial tubules (Figure 5A-B). These results indicated that the fission machinery is not strictly required for mitochondrial fragmentation during quiescence entry.



Jimenez *et al.* Figure 5

FIGURE 5: Mitochondrial network morphology in quiescent fission mutants. (A) Mitochondrial morphology scored at 7 days in WT haploid, WT diploid, *dnm1Δ*, *mdv1Δ*, *fis1Δ* and *caf4Δ* cells expressing *Ilv3* fused to GFP or RFP. **(B)** Representative images of the mitochondrial morphology of each strain



Jimenez et al, Supplementary Figure S2

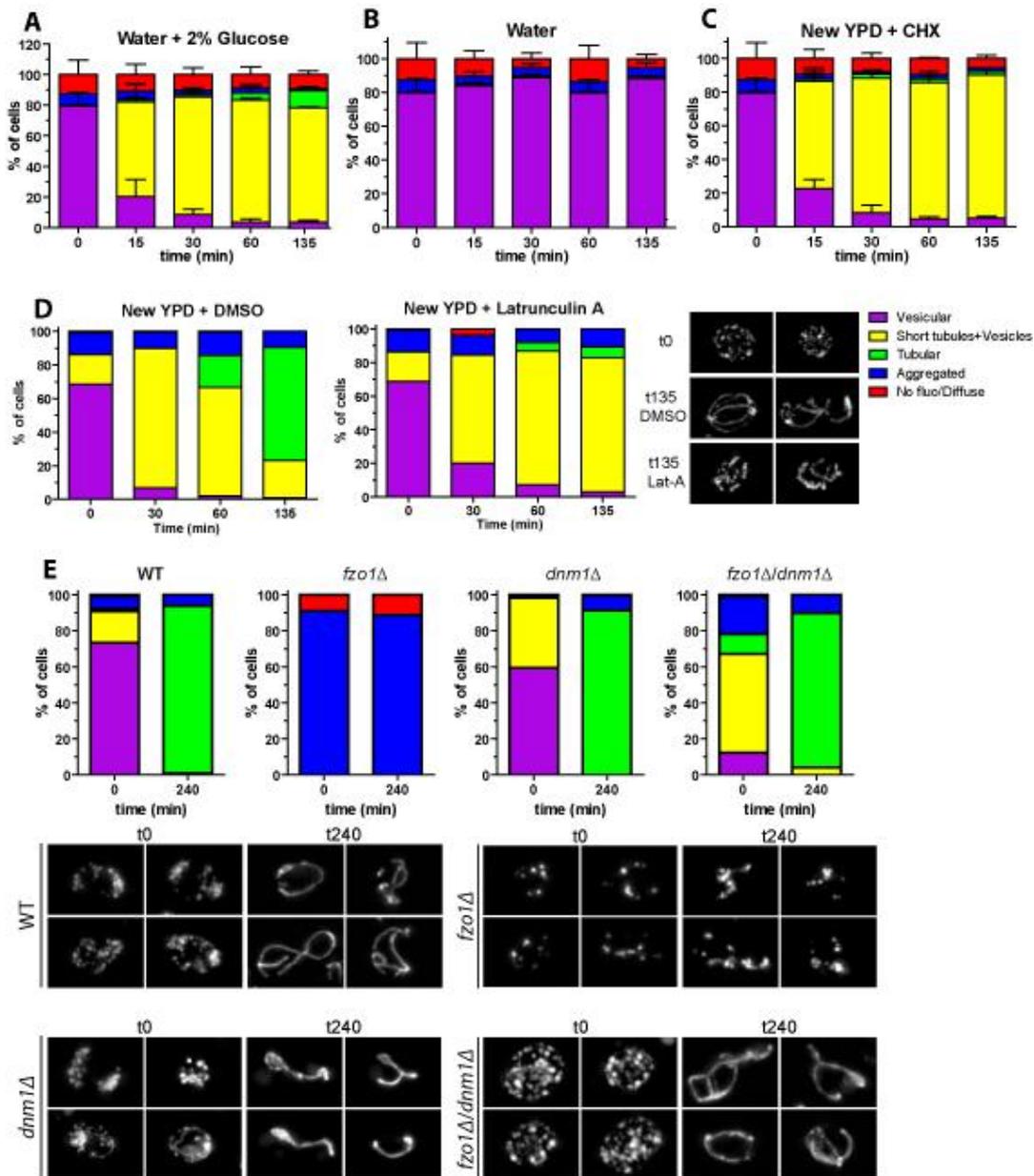
SUPPLEMENTARY FIGURE 2: (A) WT, *brn1Δ* and *bni1-FH2#1 brn1Δ* cells expressing *Ilv3-RFP* were exponentially grown in YPD. Phalloidin staining was done to visualize polymerized actin. The *bni1-FH2#1 brn1Δ* cells were grown at 24°C and then shifted at 34°C for 30 min and 4 hours. **(B)** Exponentially growing WT cells expressing *Ilv3-RFP*. Cells were treated with 100μM of Latrunculin A or with DMSO as control and then stained with Phalloidin.

Mechanism involved in mitochondrial vesicles fusion upon quiescence exit

Laporte *et al.* have shown that the sole addition of glucose is sufficient to trigger the mobilization of actin bodies and the assembly of depolarized actin cables (Laporte et al, 2011). We thus wonder whether actin cables reformation upon glucose addition was enough to trigger mitochondrial vesicles fusion and tubules reformation. Figure 6B shows that 15 minutes after transfer into a 2% glucose-containing solution, $61.7 \pm 16.4\%$ of the cells start to form short mitochondrial tubules. Yet, even after a prolonged incubation with glucose only very few cells with a fully recovered-mitochondrial tubular network could be scored. This experiment indicated that glucose, and hence, actin cables assembly is not enough for a full restoration of a tubular mitochondrial network upon quiescence exit, but it is sufficient to provoke a limited fusion of the cortical mitochondrial vesicles. Similarly *de novo* protein synthesis inhibition upon quiescence exit does not impinge on mitochondria vesicles primary fusion but prevent the reformation of a full tubular network (Figure 6C). No changes in mitochondrial network organization were observed when 7 days quiescent cells were diluted into water (Figure 6A).

In order to directly test the involvement of actin cables in mitochondrial reorganization upon quiescence exit, we treated cells with Latrunculin A treatment upon re-feeding. We found that within few minutes, mitochondrial vesicles fused to formed short tubules even in the absence of polymerized actin filaments. Yet, as upon re-feeding with glucose or as in the presence of cycloheximide, in the presence of Latrunculin A a fully tubular mitochondrial network is not restored. This indicated that the actin cytoskeleton is required for a bona fide mitochondrial tubular network reformation upon quiescence exit (Figure 6D).

Finally, we tested the involvement of the fusion machinery in mitochondrial vesicles re-fusion upon quiescence exit. Because fusion mutants display fragment mitochondria (Hermann et al., 1998), we had to use the *dnm1Δ fzo1Δ* double mutant in which the impairment of both fusion and fission machineries lead to the formation of a tubular mitochondrial network. AS expected, in quiescence the *fzo1Δ* mutant display aggregated mitochondria, while the double mutant *dnm1Δ fzo1Δ* show cortical mitochondrial vesicles. When the cells were re-fed with YPD, we observed that in the *dnm1Δ fzo1Δ* mutant, thje mitochondrial vesicles were able to fuse and to reassemble a tubular network just as WT cells (Figure 6E). From this result we concluded that *fzo1* is not necessary to induce mitochondrial fusion upon quiescence exit.



Jimenez et al. Figure 6

FIGURE 6: Role of the actin cytoskeleton and Fzo1 in mitochondrial vesicles fusion upon quiescence exit. WT cells expressing *Ilv3-GFP* were grown for 7 days in YPD and then transferred into: (A) water, (B) water + glucose 2%, (C) new YPD + CHX. (D) YPD + DMSO and YPD + Latrunculin A 100μM. (A-C) For each time point the mitochondrial morphology was analyzed ($n > 300$ cells, 2 experiments). (E) WT, *dnm1Δ*, *fzo1Δ* and *dnm1Δ fzo1Δ* cells expressing *Ilv3-GFP* were grown 7 days in YPD than transferred into YPD. The reorganization of the mitochondrial network was analyzed. Representatives images are shown.

III. RESULTATS COMPLEMENTAIRE

Il a été montré dans une étude réalisée il y a quelques années au laboratoire, que les signaux qui induisent l'entrée en quiescence peuvent être déconnectés de ceux qui régulent la progression du cycle cellulaire. En effet, bien que les cellules entrent généralement en quiescence suite à un arrêt dans le cycle cellulaire en G1, l'entrée en quiescence peut aussi avoir lieu dans d'autres phases du cycle cellulaire. Cette étude repose sur l'observation de la présence de $10 \pm 5\%$ de cellules quiescentes bourgeonnantes au sein d'une culture en phase stationnaire à 7 jours (Laporte et al., 2011). Ces cellules bourgeonnantes possèdent les marqueurs spécifiques des cellules quiescentes tels que les « Actin Bodies » (AB) et les « Proteasome storage granule » (PSG). Dans ce contexte, je me suis intéressée au remaniement du réseau mitochondrial dans les cellules bourgeonnantes. Les résultats sont présentés dans la Figure 39.

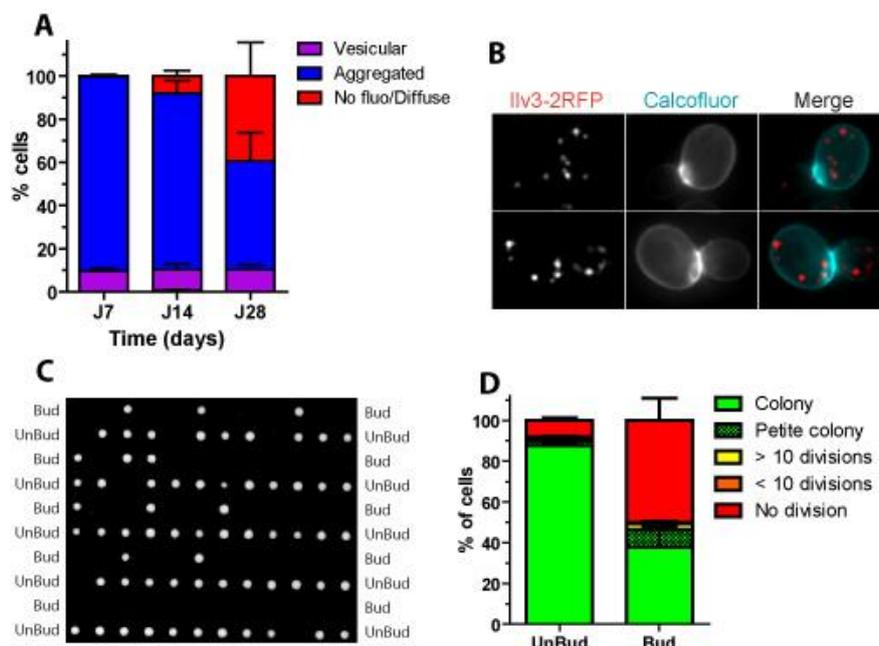


Figure 39 : Cellules bourgeonnantes : organisation du réseau mitochondrial et survie

A : organisation du réseau mitochondrial dans une souche WT. exprimant Ilv3-RFP à 7 ; 14 et 28 jours de culture en YPD ($n=200$, deux expériences). **B** : Images représentatives de la morphologie agrégée des mitochondries des cellules bourgeonnantes. **C-D** : micromanipulation d'une souche sauvage à 7 jours en YPD. **C** : image d'une boîte de micromanipulation dans laquelle sont alternées lignes de cellules bourgeonnantes et lignes de cellules non bourgeonnantes. **D** : les colonies formées par les cellules micromanipulées sont analysées de la façon suivante : ne fait pas de division ; fait moins de 10 divisions ; fait plus de 10 divisions ; forme une colonie. Les colonies « petites » sont testées par réplique sur des boîtes sur milieu YPGEth ($n=120$, 4 expériences).

L'analyse de la morphologie des mitochondries à 7 ; 14 et 28 jours révèle que la plupart des cellules bourgeonnantes possèdent des mitochondries agrégées, réparties de façon hétérogène au sein de la cellule. Cette organisation est stable jusqu'à 14 jours. Après 28 jours en quiescence, nous pouvons noter une augmentation de la proportion de cellules de la catégorie « pas de fluorescence/fluorescence diffuse » (Figure 39 A-B). Des expériences de micromanipulation ont été réalisées sur une souche sauvage après 7 jours de culture, afin de comparer la capacité des cellules bourgeonnantes et non-bourgeonnantes à ré-entrer dans le cycle cellulaire et à donner une progénie viable. Mes résultats indiquent qu'environ $87,66 \pm 2,30\%$ des cellules non bourgeonnantes sont capables de former une colonie, contre $37,67 \pm 20,10\%$ des cellules bourgeonnantes (Figure 39 C-D). Ainsi, les cellules quiescentes bourgeonnantes qui possèdent des mitochondries agrégées sont capables de ré-entrer dans le cycle prolifératif. L'ensemble de ces résultats ne permet donc pas de corréler le caractère agrégé des mitochondries avec un potentiel défaut de survie en quiescence.

IV. DISCUSSION

1. HETEROGENEITE DES CELLULES QUIESCENTES

La population de cellules en phase stationnaire est hétérogène. Comme introduit précédemment, 90 % des cellules qui composent la population sont entrées en quiescence en phase G1 du cycle cellulaire (cellule non bourgeonnantes). Les 10 % restant sont des cellules bourgeonnantes arrêtées dans les différentes étapes du cycle cellulaire (Laporte et al., 2011). De plus, les cellules composant les cultures en phase stationnaire ont différents âges réplcatifs. Voir II de ce chapitre et (Mortimer and Johnston, 1959).

Dans une étude publiée en 2006, les cellules composant une culture en phase stationnaire ont été séparées sur un gradient de densité. Deux populations de cellules ont pu être isolées. La fraction la plus dense est décrite comme correspondant principalement à des cellules filles et à des jeunes mères, dont les caractéristiques de viabilité ont amené les auteurs à qualifier les cellules correspondant à cette fraction de cellules « quiescentes ». *A contrario*, ils qualifient les cellules de la fraction supérieure de « non-quiescentes », en décrivant cette fraction comme contenant un mélange de cellules bourgeonnantes et de cellules non bourgeonnantes de différents âges réplcatifs. Ils montrent également que les cellules composant cette fraction produisent d'avantages de ROS en comparaison avec les cellules dites « quiescentes ». De plus, de façon étonnante, les auteurs de cette étude ne détectent pas de mitochondries dans les cellules dites « quiescentes » alors qu'ils montrent

que les cellules dites « non quiescentes » en sont enrichies (Allen et al., 2006). L'accumulation de ROS dans ces dernières trouve donc son explication. Les résultats obtenus dans cette étude sont discutables sur plusieurs points :

Tout d'abord, une étude publiée quelques années plus tard a mis en évidence que la différence de densité entre les fractions de la culture était due à l'accumulation de carbohydrates tels que le glycogène et tréhalose (Shi et al., 2010), la fraction dense contenant les cellules dites quiescentes contenant plus de réserves de carbohydrates que la fraction cellulaire moins dense. La présence de carbohydrates aurait un rôle protecteur (Crowe et al., 1992; Singer and Lindquist, 1998) et servirait de réserve d'énergie qui permettrait aux cellules de survivre plus longtemps en quiescence et de faciliter la sortie de quiescence (Shi et al., 2010).

Dans notre étude, nous nous sommes intéressés à la morphologie du réseau mitochondrial dans les cellules quiescentes d'âges répliatifs différents en faisant la distinction entre les cellules filles, les jeunes mères (ayant effectuées entre 1 et 5 divisions) et les vieilles mères (ayant effectué plus de 5 divisions). A la différence des résultats de Allen *et al.*, nous observons la présence de mitochondries vésiculaires dans toutes ces classes de cellules. Comme montré dans de nombreuses études et dans la Figure 2D, la taille des cellules augmente au cours de leur vie répliative. Ainsi les cellules filles sont plus petites que les cellules mères (Lee et al., 2012). Nous avons dans notre étude micro-manipulé les cellules en fonction de leur taille et testé leur capacité à sortir de quiescence et à former une colonie. Nos résultats montrent que les cellules de petite taille, correspondant donc majoritairement à des cellules filles, perdent leur capacité à sortir de quiescence plus rapidement et plus drastiquement que les cellules de taille supérieure, majoritairement des cellules mères. Ainsi nos résultats ne sont pas en accord avec ceux publiés par le laboratoire de Margaret Werner-Washburne.

Tout d'abord, il est étonnant que dans leur étude aucune mitochondrie n'ait pu être détectée en microscopie électronique dans les cellules dites « quiescentes » de la fraction dense. Il serait par ailleurs envisageable que la technique de séparation des cellules sur le gradient de percoll puisse être responsable de stress qui aurait pour conséquence une fragilisation des cellules et la perte des caractéristiques des cellules quiescentes. En effet selon leur protocole, 2×10^9 cellules sont concentrées dans 1ml de tampon puis placées sur le gradient et séparées durant 60 minutes de centrifugation à 400 g. Une manière de tester les stress potentiels occasionnés serait de localiser dans ces cellules les marqueurs de quiescence tels que les AB et les PSG.

1. MACHINERIES DE FUSION ET DE FISSION

La morphologie du réseau mitochondrial repose sur un équilibre entre les processus de fusion et de fission. Dans notre étude, nous avons mis en évidence une fragmentation du réseau mitochondrial lors de l'entrée en quiescence. De façon surprenante nous avons observé qu'en l'absence des protéines de la machinerie de fission, le réseau mitochondrial était capable de fragmenter. Lors de la sortie de l'état de quiescence, le réseau mitochondrial fusionne pour reformer un réseau tubulaire. Nous avons montré qu'en l'absence de la protéine de fusion Fzo1 dans le double mutant *dnm1Δ/fzo1Δ*, les mitochondries étaient capables de reformer un réseau tubulaire.

Des résultats similaires ont été obtenus en 2004 par une équipe travaillant dans des conditions de sporulation. Durant la phase tardive de sporulation, une fragmentation du réseau mitochondrial est observée (Miyakawa et al., 1984). Les résultats de cette étude ont montré qu'en l'absence des protéines de fission dans les mutants *dnm1Δ*, *mdv1Δ* et *fisΔ*, 44 à 91% des tétrades au stade tardif présentent un réseau mitochondrial fragmenté suggérant que ces protéines ne jouent pas un rôle central dans le processus de fragmentation lors de la sporulation. (Gorsich and Shaw, 2004).

Dans un premier temps, il est envisageable que la fragmentation soit due à des machineries de fission dont les acteurs n'ont pas encore été identifiés. Comme discuté dans leur article, Gorsich et al. envisagent que de tels acteurs ont pu échapper aux cribles de détection de mutants de morphologie mitochondriale réalisés dans des levures en mitoses (Dimmer et al., 2002; Gorsich and Shaw, 2004). Pour aller plus loin dans cette hypothèse, il serait intéressant de réaliser un crible pour identifier des protéines dont l'absence entraîne la présence de mitochondries tubulaires en quiescence. Pour ce faire, nous pourrions nous baser sur le crible développé par Peters et al. et introduire par croisement la protéine de fusion Ilv3-GFP dans une collection de délétion. La morphologie du réseau mitochondriale serait ainsi détectée de façon automatisée dans les cellules quiescentes (Peters et al., 2013).

Dans un second temps, il a été mis en évidence un lien étroit entre la morphologie du réseau mitochondrial et différents composants cellulaires tels que le cytosquelette d'actine et le réticulum endoplasmique. Il serait donc également envisageable que ces composants soient impliqués dans la fragmentation du réseau mitochondrial lors de l'entrée en quiescence. Nos résultats nous permettent d'écarter l'implication de la dépolymérisation des câbles d'actines dans la fragmentation observée en quiescence. L'implication de réticulum endoplasmique dans la fission mitochondriale a clairement été mise en évidence. En effet, l'enroulement du réticulum endoplasmique autour des mitochondries permettrait leur constriction et ainsi le recrutement de Dnm1p (Friedman and

Nunnari, 2014; Korobova et al., 2013). Bien que nous ayons montré que la protéine Dnm1 n'est pas impliquée dans la fragmentation lors de l'entrée en quiescence, il est envisageable que le réticulum endoplasmique puisse être impliqué dans la fragmentation du réseau mitochondrial lors de l'entrée en quiescence de façon indépendante de Dnm1p.

Les bases moléculaires du remaniement du réseau mitochondrial lors de l'entrée et de la sortie de quiescence restent à découvrir. Par ailleurs, bien que nous ayons établi qu'il semble ne pas y avoir de lien entre la morphologie du réseau mitochondrial en quiescence et la capacité des cellules à survivre en quiescence et donc à faire face au vieillissement chronologique, il reste à identifier les relations entre morphologie mitochondriale et activité/dysfonctionnement mitochondriale lors de ce processus.

Matériels & Méthodes

CHAPITRE V : MATERIELS ET METHODES

I. SOUCHES ET PLASMIDES UTILISEES

1. SOUCHE DE LEVURE

1.1. Souches utilisées

Dans cette étude, sauf précision, les souches de *S. cerevisiae* utilisées sont isogéniques à BY4741 et BY4742. Les mutants proviennent de la banque de délétion Euroscarf (Frankfurt, Germany). Les souches exprimant des protéines fusionnées à la GFP proviennent de la collection disponible chez Invitrogen (Carlsbad, CA). L'ensemble des souches utilisées dans cette étude sont regroupées dans le **Tableau 7**.

1.1. Milieux et méthodes de culture

Les milieux et les méthodes standards de cultures ont été utilisés (Sherman, 2002). De façon générale, les souches sont cultivées à 30 °C sous agitation en milieu complet avec du glucose comme source de carbone (YPD). Selon les expériences réalisées la source de carbone, ainsi que la température de culture peuvent varier. La sélection de souches en fonction de leur marqueur d'auxotrophie se fait sur milieu synthétique solide (SC ou SD).

En routine, la croissance des levures est suivie par mesure de l'absorbance à 600nm en spectrométrie (Genesys 10S UV-VIS, Thermo Scientific). Au laboratoire $1D_{600nm} = 3.10^7 \text{cellules.ml}^{-1}$. Cette quantité a été déterminée à l'aide d'un « Multisizer4 » (Beckman Coulter).

1. PLASMIDES ET BACTERIE

Les différentes constructions de protéines fusionnées aux GFP et RFP ont été réalisées à partir de plasmides disponibles au laboratoire. Les détails des constructions sont développés dans une partie ultérieure. Le **Tableau 8** regroupe l'ensemble des plasmides utilisés durant cette étude. Les plasmides sont amplifiés dans les bactéries *Escherichia coli* DH5 α cultivées en milieu LB + ampicilline sous agitation à 37 °C.

II. TECHNIQUES DE BIOLOGIE CELLULAIRE

1. ETUDE DE LA CROISSANCE DES LEVURES

Dans ce travail deux méthodes ont été utilisées pour l'étude de la croissance de levures.

1.1. Test en goutte

Ce teste donne une estimation relative de la croissance des levures par rapport à une souche de référence. A partir d'une culture de levure maintenue 24h en phase exponentielle de croissance à $DO_{600nm} = 0,5-1,5$, une suspension en eau stérile à $DO_{600nm} = 0,5$ est réalisée. A partir de cette suspension quatre dilutions sérielles au dixième sont effectuées. Cinq μ l de chaque dilution sont ensuite déposés sur le milieu solide adéquat. Les boîtes sont incubées à la température souhaitée puis analysées.

1.2. Courbe de croissance

Les courbes de croissances en continu des souches sont réalisées à l'aide de l'appareil Bioscreen C (Labsystems) permettant la mesure de turbidité de façon automatisée. Les levures sont au préalable maintenues 24h en phase exponentielle dans le milieu et à la température désirées. Elles sont ensuite inoculées dans les microplaques en duplicat à $DO_{600m} = 0,01$ dans 150 μ l de milieu. Les levures sont incubées à 30°C, en agitation continue, à vitesse normale et amplitude maximale. L'agitation est stoppée 5 secondes avant la lecture de l'Absorbance qui est réalisée à DO_{600m} toutes les 10 minutes durant 3 jours. Après normalisation des résultats, le temps de génération des souches est déterminé à l'aide du logiciel GraphPad Prism 5.00 (San Diego, CA, USA).

2. MICROSCOPIE

2.1. Microscope à épifluorescence

Sauf précisions, les levures sont observées vivantes. Deux microlitres d'une culture sont prélevés et déposés entre lame et lamelle. Les levures sont observées grâce à un microscope à épifluorescence inversé entièrement motorisé (Zeiss – Axiovert 200M). Il est équipé d'une platine MS-200 (Applied Scientific Instrumentation, Eugene, OR), d'une lampe à xénon Lambda LS 175 W (Sutter Instrument, Novato, CA), d'un objectif 100X Plan-Apochromat (NA 1.4) et d'une caméra CoolSnap HQ

(Roper Scientific, Tucson, AZ). Le microscope, la caméra et les *shutters* (Uniblitz, Rochester, NY) sont contrôlés par le logiciel SlideBook (Intelligent Imaging Innovations, Denver, CO). Les filtres utilisés (Chroma Technology, Rockingham, VT) ont les caractéristiques suivantes : Cy3 (Ex : HQ535/50 – Em : HQ610/75 – BS : Q565lp) ; Endow GFP longpass (Ex : HQ470/40 – Em : HQ500lp – BS : Q495lp) ; Narrowband HQ FITC (Ex : HQ487/25 – Em : HQ535/40 – BS : Q505lp) ; DAPI/Hoechst/AMCA (Ex : D360/40 – Em : D460/50 – BS : 400dclp).

Les expériences de FRAP ont été réalisées au Bordeaux Imaging Center avec un microscope confocale inversé (modèle DMI 6000; Leica) équipé d'un *spinning disk* (CSU-X1;Yokogawa Corporation of America) et d'une caméra QuantEM (Photometrics) ainsi que d'un système de FRAP (Roper Scientific). Les lasers diode ont été utilisés à 408 nm and 491 nm. L'objectif utilisé est un HCX PL APO CS 100× oil 1.4 NA. Les piles d'images en Z ont été réalisées avec un Piezo (P721LLQ; Physik Instrumente). Le système est contrôlé par le logiciel MetaMorph (Molecular Devices).

2.2. Analyse microscopie

Le traitement des images a été réalisé avec du logiciel Image J (Schneider et al., 2012) et les analyses statistiques avec le logiciel GraphPad (San Diego, CA).

2.3. Préparation des échantillons

➤ Fixation des échantillons

Les cellules sont fixées par addition de formaldéhyde (3.7% final) dans la culture puis incubation de 10 minutes à 4h à la température de culture sous agitation.

➤ Coloration DAPI

Après fixation 3-4h au formaldéhyde, les cellules sont rincées deux fois au PBS, puis re-suspendues dans une solution contenant du PBS, 70% de glycérol et 1µg/ml de solution de DAPI.

➤ Calcofluor White

Après fixation au formaldéhyde, les cellules sont rincées deux fois au PBS puis re-suspendues dans une solution de PBS contenant 2 µg/ml de Calcofluor White. Après 5 min d'incubation à température ambiante, le culot de cellules est lavé avec du PBS et resuspendu dans une solution contenant du PBS et 70% de glycérol.

➤ Alexa Fluor®488 Phalloidine

Après fixation au formaldéhyde, les cellules sont rincées deux fois au PBS puis re-suspendues dans une solution de PBS contenant 1/10 Alexa Fluor®488 Phalloidine et incubé à 4°C durant 6 à 24h. Après lavage dans du PBS, les cellules sont reprises dans du PBS contenant 70% de glycérol et 0.05% de paraphenylenediamine.

III. TECHNIQUES DE BIOLOGIE MOLECULAIRE

1. TRANSFORMATION DE LEVURE « ONE STEP » LITHIUM ACETATE

Les levures à transformer sont fraîchement répliquées en milieu riche (< 6 h). Elles sont placées dans un mélange contenant : 95µl de « one step » ((1,02 % Lithium acétate, 40 % polyéthylène glycol, pH 5), 10 µL de dithiothréitol 1M (DTT), 5µl d'ADN de sperme de saumon dénaturé à 10 µg/µL, et 500-1000 ng de l'ADN à transformer. Après incubation 30 minutes à 45°C, les levures sont étalées sur milieu sélectif puis incubées à 30°C jusqu'à apparition des clones (Chen et al., 1992).

2. CONSTRUCTION DES PROTEINES DE FUSION FLUORESCENTES

Cette partie détaille les différentes étapes de la construction de la fusion d'une protéine d'intérêt avec une protéine fluorescente.

2.1. A partir d'un plasmide

Nous disposons au laboratoire de plasmides de squelette pRS306 contenant en aval du multi-site de clonage les séquences codant deux RFP en tandem (P2915) et trois GFP en tandem (P2408). Le principe de cette construction repose sur l'amplification de la séquence codant la protéine d'intérêt avec des oligonucléotides possédant en plus de la séquence complémentaire de la protéine d'intérêt, des séquences contenant les sites de restrictions permettant l'intégration dans le plasmide. Le détail de construction des protéines de fusion réalisée dans cette étude, ainsi que les différents oligonucléotides utilisés sont regroupés respectivement dans les **Tableau 8** et **Tableau 9** à la fin de ce chapitre.

➤ Choix des enzymes de restriction

Deux sites de restrictions absents de la séquence codant la protéine d'intérêt et localisés spécifiquement dans le multi-site de clonage sont identifiés

➤ « Design » des oligonucléotides

L'amorce sens est « *designée* » pour s'hybrider à partir de l'ATG du gène d'intérêt sur une vingtaine de bases. En amont de l'ATG, des désoxyribonucléotides du premier site de restriction sont ajoutés. Ils sont suivis de trois désoxyribonucléotides.

L'amorce anti-sens est « *designée* » pour s'hybrider sur une vingtaine de base avant le codon stop de la séquence du gène d'intérêt. Une séquence « linker » est ajoutée. Elle est composée de séquences codants pour une succession de glycine et d'alanine. Elle est suivie par la séquence du deuxième site de restriction, elle-même suivie par les trois désoxyribonucléotides finaux. Il est important de noter que la longueur de la séquence « linker » peut influencer la fonctionnalité de la protéine de fusion. Si le coté C-terminal de la protéine d'intérêt est enfouie à l'intérieur de la structure tertiaire et/ou quaternaire de la protéine, une séquence « linker » longue sera nécessaire. Si besoin, un ou deux désoxyribonucléotides sont ajoutés entre la séquence « linker » et le site de restriction afin d'éviter un décalage du cadre de lecture entre la protéine d'intérêt et les protéines fluorescentes.

➤ Réaction en chaine par polymérase

Après extraction d'ADN génomique de la souche sauvage de référence, la séquence codante de la protéine d'intérêt est amplifiée par la polymérase à partir des deux amorces désignées selon l'étape précédemment décrite. Les amplicons sont ensuite purifiés avec le kit ENZA Cycle-Pure (Omega Biotech).

➤ Digestion et Ligation

Le plasmide contenant les tandems des protéines fluorescentes sont au préalable amplifiés dans des bactéries, puis isolés avec le kit de mini-prep GeneJET Plasmid (Fermentas/Thermo Scientific). Les plasmides et les amplicons sont digérés simultanément dans un même tube par les deux enzymes de restrictions. Après purification, les plasmides et les amplicons sont liés par la ligase T4 DNA.

➤ Transformation dans les bactéries

La construction ainsi que des constructions contrôles sont transformées par choc thermique dans des bactéries *Escherichia coli* DH5 α rendues compétentes au CaCl₂. Les levures sont ensuite incubées dans du LB sans pression de sélection, puis étalées sur boîtes contenant de l'IPTG et le marqueur de sélection qui est l'ampicilline pour toutes les constructions de cette étude. Les boîtes sont placées à 37°C.

➤ Obtention des constructions

Les colonies blanches contenant le plasmide avec l'insert sont amplifiées dans du LB+Amp puis isolées avec le kit de mini-prep GeneJET Plasmid (Fermentas/Thermo Scientific). Les constructions sont digérées avec les enzymes utilisées lors de la construction puis une migration sur gel d'agarose contenant du SYBR®Safe (Invitrogen) est réalisée. Les constructions contenant le plasmide et l'insert à la taille attendue sont vérifiées par séquençage (GATC Biotech).

➤ Transformation des levures

Les plasmides sont préalablement linéarisés par restriction. Le site de restriction choisi doit être unique dans la construction (plasmide+insert) et doit se situer environ 200 bases en amont de la fin de la séquence de la protéine d'intérêt. Après obtention des clones, la fluorescence et la complémentarité de la protéine de fusion sont testées pour chaque clone sélectionné.

2.2. A partir d'une cassette

Nous disposons au laboratoire de la banque de protéines de fusion GFP Invitrogen (Carlsbad, CA). Cette banque a été construite par insertion d'une GFP suivie du marqueur de sélection HIS3MX6 en C-terminal de chaque ORF.

Après extraction de l'ADN génomique de la souche contenant la cassette d'intérêt, cette dernière est amplifiée par PCR. L'amorce « sens » est « désignée » pour s'hybrider sur une vingtaine de désoxyribonucléotide à environ 200 bases avant le codon stop de la protéine fusionnée à la GFP et l'amorce « anti sens » est désignée dans son terminateur. Une fois purifiée avec le kit ENZA Cycle-Pure (Omega Biotech), les cassettes sont transformées dans la souche désirée. Les ADN génomiques et les oligonucléotides utilisés pour l'amplification des cassettes utilisées dans cette étude sont retrouvés dans le **Tableau 3**.

Nom	PCR sur ADNg de :	PCR avec :	
		Oligo1	Oligo2
ILV3-GFP-HIS3	Y217	2955	2956
ATP4-GFP-HIS3	Y6772	3268	3269
ATP14-GFP-HIS3	Y6768	3270	3271

Tableau 3 : Cassettes utilisées dans cette étude

Tableau regroupant l'ensemble des cassettes utilisées dans cette étude. Les souches dont l'ADN génomique a été extrait ainsi que les oligonucléotides utilisés pour la PCR sont indiqués.

3. QUANTIFICATION DE PROTEINES PAR WESTERNBLOT

3.1. Extraction protéique

Lorsque les levures sont en phase exponentielles de croissances (DO_{600nm} 0,5-1,5) 10 Unités de DO sont prélevées. Après centrifugation, les levures sont rincées dans de l' H_2O . Le culot est resuspendu dans une solution contenant 185 μ l de NaOH 5N, 37 μ l de β -mercaptoethanol et 278 μ l d' H_2O . Après incubation 10 minutes à 4°C, 500 μ l de TCA 50% est ajouté. La précipitation des protéines se fait durant 10 minutes à 4°C. Après plusieurs centrifugations, le culot est repris dans 50 μ l de SDS 5%. Le pH est neutralisé par ajout de 9 μ l de solution de Tris 3M à pH 8,9. Après une incubation de 15 minutes à 42°C, le surnageant contenant l'extrait protéique est prélevé et stocké à -20°C.

3.2. Dosage des protéines

Le dosage des protéines est réalisé à l'aide du kit « *Pierce BCA Protein Assay* » de chez Thermo Scientifique. Ce dosage est basé sur la détection colorimétrique des protéines. Cette méthode combine la réduction du Cu^{2+} en Cu^{1+} par les protéines et la réaction du Cu^{1+} avec le BCA (Bicinchoninic acid). Il en résulte une intense coloration pourpre dont l'absorbance à 562 nm est proportionnelle à la concentration protéique. La concentration des échantillons est déterminée à l'aide d'une gamme de concentration de BSA.

3.3. SDS-PAGE

Les protéines sont soumises à une électrophorèse dans un gel d'acrylamide en condition dénaturante. Dans ce travail, les gels utilisés sont de types discontinus. Le gel dit de « concentration » sert à concentrer les protéines afin qu'elles pénètrent au même moment dans le gel dit de « séparation ». Les compositions des gels utilisés dans cette étude sont regroupées dans la table. Il faut noter qu'en fonction de la taille des protéines étudiées, la concentration en acrylamide du gel de séparation peut varier.

Composants	Gel de « concentration » 5%	Gel de « séparation » 7,5%
Acrylamide/bis 40%	0,5 ml	1,875 ml
Tampon « <i>running</i> »	/	2,5 ml
Tampon « <i>stacking</i> »	1 ml	/
glycérol	/	1,5 ml
H ₂ O	2,5 ml	3,5 ml
TEMED	5 µl	8 µl
APS 40%	10 µl	12 µl

Tableau 4 : Composition des gels de Western blot

Les volumes indiqués correspondent aux quantités permettant le montage de deux gels de type mini-PROTEAN (BIORAD)

Composition des tampons :

- « Stacking » : 0,5M de Tris/HCl pH 6,8 ; SDS 0,8%
- « Running » 1,5M de Tris/HCl pH 8,8 ; SDS 0,4%

La migration est réalisée dans une solution de Laemmli (Tris pH 8,3 25 mM, Glycine 250 mM , 0,1 % de SDS). L'électrophorèse est réalisée à 100V et 40mA dans le gel de « concentration » et à 180V et 40mA dans le gel de « séparation ».

3.4. Transfert des protéines

Après séparation des protéines sur le gel d'électrophorèse, ces dernières sont transférées sur une membrane de PVDF (0,22µ) au préalablement hydratée dans de l'éthanol 100%. Le type de transfert utilisé dans cette étude est dit de type « semi sec ». Il est réalisé à 50 V et 130 mA sur une durée de 45 minutes avec l'appareil Semi-Phor (Hoefler). L'efficacité du transfert est vérifiée par

incubation quelques minutes dans une solution de rouge ponceau (0,2% de ponceau, 3% de TCA et 3% d'acide sulfosalicylique) puis rincée à l'eau.

3.5. Immuno-détection des protéines

Les protéines sont fixées sur la membrane avec de l'éthanol 100%. La membrane est ensuite saturée pendant 1h à température ambiante sous agitation dans une solution comprenant du TBST (0,01M de trizma base, 0,15M de NaCl, 0,1 % de Tween 20, pH :8) et 5% de lait sans matière grasse. La membrane est incubée à 4°C sur la nuit avec l'anticorps primaire dirigé contre la protéine d'intérêt dilué à la concentration désirée dans du TBST + lait 5%. Le **Tableau 5** indique la liste des anticorps primaires utilisés dans cette étude.

Cible	Dilution	Espèce	Source
GFP	1/10000	souris	Roche Applied Science
Atp2	1/5000	Lapin	Don généreux de D. Brèthes
Act1	1/10000	Poulet	Don généreux de B.Goode

Tableau 5 : description des anticorps primaires utilisés dans cette étude

Après trois cycles de lavages de 20 minutes dans du TBST + lait 5%, la membrane est incubée avec l'anticorps secondaire dirigé contre l'anticorps primaire. Cette incubation est faite 45 min à température ambiante sous agitation. Voir **Tableau 6** pour la liste des anticorps secondaires utilisés dans cette étude.

Cible	dilution	source
Souris	1/10000	Thermo Scientific
Poulet	1/10000	Thermo Scientific
Lapin	1/10000	Pierce

Tableau 6: description des anticorps secondaires utilisés dans cette étude

La membrane est ensuite rincée, puis incubée durant 1h à température ambiante dans du TBST. Le couplage de l'anticorps secondaire à la peroxydase permet la détection du complexe anticorps-antigène révélé à l'ECL par incubation de la membrane avec le substrat de la peroxydase. La chimioluminescence de cette réaction est détectée par un film radiographique

3.6. Déshybridation de la membrane

La membrane est incubée dans la solution de déshybridation (100 mM β -mercapto-ethanol, 2 % SDS, 62.5 mM Tris-HCL pH 6.8) durant 30 min sous agitation à température ambiante. Après 6 lavages de 5 minutes dans du TBST, les étapes de saturation puis d'incubations des anticorps primaires et secondaires sont reprises.

3.7. Quantification

L'actine (Act1) est utilisée comme contrôle de la charge protéique. Le logiciel ImageJ est utilisé (Schneider et al., 2012) pour la quantification de l'intensité des bandes.

Souche	Génotype	Référence
BY4741 (Y1741)	<i>Mata; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i>	Invitrogen
Y217⁽²⁾	<i>Mata; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; ILV3-GFP-HIS3</i>	Invitrogen
Y262⁽²⁾	<i>Mata; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; ATP1-GFP-HIS3</i>	Invitrogen
Y2438	<i>Mata</i>	Invitrogen
Y5323⁽²⁾	<i>Mata; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; ATP2-GFP-HIS3</i>	Invitrogen
Y6768⁽²⁾	<i>Mata; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; ATP14-GFP-HIS3</i>	Invitrogen
Y6770⁽²⁾	<i>Mata; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; ATP3-GFP-HIS3</i>	Invitrogen
Y6772⁽²⁾	<i>Mata; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; ATP4-GFP-HIS3</i>	Invitrogen
Y6773⁽²⁾	<i>Mata; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; ATP7-GFP-HIS3</i>	Invitrogen
Y6774⁽²⁾	<i>Mata; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; ATP5-GFP-HIS3</i>	Invitrogen
Y6775⁽²⁾	<i>Mata; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; ATP20-GFP-HIS3</i>	Invitrogen
Y6776⁽²⁾	<i>Mata; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; ATP18-GFP-HIS3</i>	Invitrogen
Y6777⁽²⁾	<i>Mata; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; ATP19-GFP-HIS3</i>	Invitrogen
Y6778⁽²⁾	<i>Mata; his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; ATP15-GFP-HIS3</i>	Invitrogen
Y6971⁽¹⁾	<i>Mata; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; mdv1::KanR; ILV3-GFP-HIS3</i>	Cette étude
Y6980⁽¹⁾	<i>Mata; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; caf4::KanR; ILV3-GFP-HIS3</i>	Cette étude
Y6983⁽¹⁾	<i>Mata; his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; fis1::KanR; ILV3-GFP-HIS3</i>	Cette étude

Y7001 ⁽¹⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; ugo1::KanR</i> ; ILV3-GFP-HIS3	Cette étude
Y7003 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP4-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y7005 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP3-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA	Cette étude
Y7126 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP14-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y7179 ⁽¹⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; bnr1::KanR</i> ; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y7216 ⁽³⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; bnr1::KanR ; bni-FH2#1 ::HIS3</i> ; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y7264 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; QCR9-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y7268 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; COX7-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y7281 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; AIM37-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y7294 ⁽¹⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; cyt1::KanR</i> ; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y7346 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; AIM5-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	Cette étude
Y7347 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; MDM34-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	Cette étude
Y7348 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP14-GFP-HIS3; ATP4-2RFP-URA3	Cette étude
Y7350 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP3-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	Cette étude
Y7359 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP3-GFP-HIS3; ATP4-2RFP-URA3	Cette étude
Y7449 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; AIM37-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	Cette étude
Y7453 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; TOM20-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	Cette étude
Y7555 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ILV3-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	Cette étude
Y7556 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ILV3-GFP-HIS3; ATP4-2RFP-URA3	Cette étude

Y7641 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; TIM23-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	Cette étude
Y7701 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; ILV3-GFP-HIS3; ATP3-2RFP-URA3	Cette étude
Y7702 ⁽¹⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; atp20::KanR</i> ; ILV3-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	Cette étude
Y7751 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; MRS4-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	Cette étude
Y7754 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; MPC2-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	Cette étude
Y7675 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; DNM1-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	Cette étude
Y7996	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; FCJ1-3GFP-LEU2; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y8021	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0</i> ; FCJ1-3GFP-LEU2; ATP14-2RFP-URA3	Cette étude
Y8065 ⁽¹⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; met15Δ0; ura3Δ0; fcj1::KanR</i> ; ATP14-GFP-HIS3; Ilv3-2RFP-URA3	Cette étude
Y8114 (W303)	Mata; <i>ura3-1; trp1-1; ade2-1; leu2-3,112; his3-11,15</i> ; ILV3-GFP-HIS3; ATP14-2RFP-URA3	Cette étude
Y8392 ⁽¹⁾	Mata; ; <i>his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; atp20::KanR</i> ; ATP4-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y8394 ⁽¹⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; ura3Δ0; fcj1::KanR</i> ; ATP4-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y8421	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i> ; ILV3-2RFP-URA3; <i>Rho</i> ⁰	Cette étude
Y8432	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP4-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3; <i>Rho</i> ⁰	Cette étude
Y8433	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP4-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3; <i>Rho</i> ⁰	Cette étude
Y8434	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0</i> ; ATP14-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3; <i>Rho</i> ⁰	Cette étude
Y8885 ⁽¹⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; met15Δ0; fzo1::KanR</i> ; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y8886 ⁽¹⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; dnm1::KanR</i> ; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y8887 ⁽¹⁾	Mata; <i>his3Δ1; leu2Δ0; lys2Δ0; ura3Δ0; fzo1::KanR; dnm1::KanR</i> ; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude

Y8893	Mata α ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y8984 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; NDI1-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y8985 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; SDH2-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y9128 ⁽¹⁾	Mata α ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>atp4::KanR</i> ; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y9129 ⁽¹⁾	Mata α ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>tmp1::KanR</i> ; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y9130 ⁽¹⁾	Mata α ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>atp5::KanR</i> ; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y9131 ⁽¹⁾	Mata α ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>mgm1::KanR</i> ; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y9132 ⁽¹⁾	Mata α ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>abf2::KanR</i> ; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y9136 ⁽¹⁾	Mata α ; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>lys2Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; <i>cap2::KanR</i> ; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude
Y9198	Mata / Mata α ; <i>his3Δ1</i> / <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> / <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> /MET15; <i>ura3Δ0</i> / <i>ura3Δ0</i> ; ILV3-2RFP-URA3/ILV3	Cette étude
Y9339 ⁽²⁾	Mata; <i>his3Δ1</i> ; <i>leu2Δ0</i> ; <i>met15Δ0</i> ; <i>ura3Δ0</i> ; RIM1-GFP-HIS3; ILV3-2RFP-URA3	Cette étude

Tableau 7 : Souches utilisées pour cette étude

Tableau regroupant l'ensemble des souches de *Saccharomyces cerevisiae* utilisées dans cette étude (1) souche provenant de la banque de délétion (Winzeler et al., 1999)

(2) souche provenant de la banque GFP (Huh et al., 2003) (4) Souche provenant de (Sagot et al., 2002a)

N°	Gène d'intérêt	Marqueur		Origine de répllication	Squelette plasmidique	Cloné dans plasmide	PCR avec		Digestion		Dig. pour intégration
		E.Coli	Levure				Oligo1	Oligo2	Enz1	Enz2	Enz3
P2915	2RFP	AmpR	URA3	intégratif	pRS306						
P2408	3EGFP	AmpR	LEU2	intégratif	pRS305						
P4217	ILV3-2RFP	AmpR	URA3	intégratif	pRS306	P2915	2506	2507	BamHI	SacI	PmlI
P4533	ATP4-2RFP	AmpR	URA3	intégratif	pRS306	P2915	3006	3007	XbaI	BamHI	EheI
P4536	ATP14-2RFP	AmpR	URA3	intégratif	pRS306	P2915	3008	3009	XbaI	BamHI	MfeI
P4546	ATP3-2RFP	AmpR	URA3	intégratif	pRS306	P2915	3025	3026	XbaI	BamHI	MfeI
P4591	FCJ1-3EGFP	AmpR	LEU2	intégratif	pRS305	P2408	3216	3217	HindIII	PstI	NdeI

Tableau 8 : Plasmides utilisés dans cette étude et détails des constructions

Tableau regroupant l'ensemble des plasmides utilisés dans cette étude ainsi que les détails des constructions. Dig :Digestion

N°	Nom	Gène amplifiée	Séquence
2506	Ilv3Bam	ILV3	CGGATCCAAAGCACCAGCACCAGCACCAGCATCTAAAACACAACC
2507	Ilv3sac	ILV3	CGTGAGCTCGTGCAAGTTGTCACCAG
2955	Ilv3up	ILV3-GFP-HIS3	GATGGTAGATTCTCTGGTGGTTCTC
2956	Termilv3down	ILV3-GFP-HIS3	GCGAACAAAAAAGATGATGGAAAAGGAGAATC
3006	ATP4upXbaI	ATP4	GGATCTAGAATGAGCATGAGTATGGGTGTC
3007	ATP4downBamHI	ATP4	GTCGGATCCACAGCACCAGCACCAGCACCTTCAATTTAGAAAGCAATTGTC
3008	ATP14upXbaI	ATP14	GGATCTAGAATGTTCCCTATCGCTTCCAG
3009	ATP14downBamHI	ATP14	GTCGGATCCACAGCACCAGCACCAGCACCATGACTTTCTTTGGTTTCCTC
3025	ATP3upXba1	ATP3	GGATCTAGAATGTTGTCAAGAATTGTATCAAAC
3026	ATP3revBamH1	ATP3	GTCGGATCCACACCAGCACCAGCACCAGCTCCCAAAGAGGAAGCACCAG
3216	Fcj1upHindIII	FCJ1	GGAAAGCTTATGATGCTAAGAACTACTGCCT
3217	Fcj1revpst1	FCJ1	GTCCTGCAGAAAGCACCAGCACCAGCACCCAACGTCCTTATTTACAGTCT
3268	Atp4up	ATP4-GFP-HIS3	CTGAAACTACAAAGGTTTTGTTTGATGTTTCC
3269	Atp4down	ATP4-GFP-HIS3	CTTCATCGTTATCAAAGTGAAGGCGCC
3270	Atp14up	ATP14-GFP-HIS3	CAAGAATATCCTACAACGTCATACAAGATTTG
3271	Atp14down	ATP14-GFP-HIS3	CCAAAAATAATGATCTTGTTTCAGCTTGTGGTTC

Tableau 9 : Oligonucléotides utilisés dans cette étude

Tableau regroupant l'ensemble des oligonucléotides utilisés dans cette étude

Bibliographies

BIBLIOGRAPHIES

- Ahting, U., M. Thieffry, H. Engelhardt, R. Hegerl, W. Neupert, and S. Nussberger. 2001. Tom40, the pore-forming component of the protein-conducting TOM channel in the outer membrane of mitochondria. *J Cell Biol.* 153:1151-60.
- Alexander, C., M. Votruba, U.E. Pesch, D.L. Thiselton, S. Mayer, A. Moore, M. Rodriguez, U. Kellner, B. Leo-Kottler, G. Auburger, S.S. Bhattacharya, and B. Wissinger. 2000. OPA1, encoding a dynamin-related GTPase, is mutated in autosomal dominant optic atrophy linked to chromosome 3q28. *Nat Genet.* 26:211-5.
- Alkhaja, A.K., D.C. Jans, M. Nikolov, M. Vukotic, O. Lytovchenko, F. Ludewig, W. Schliebs, D. Riedel, H. Urlaub, S. Jakobs, and M. Deckers. 2012. MINOS1 is a conserved component of mitofilin complexes and required for mitochondrial function and cristae organization. *Mol Biol Cell.* 23:247-57.
- Allen, C., S. Buttner, A.D. Aragon, J.A. Thomas, O. Meirelles, J.E. Jaetao, D. Benn, S.W. Ruby, M. Veenhuis, F. Madeo, and M. Werner-Washburne. 2006. Isolation of quiescent and nonquiescent cells from yeast stationary-phase cultures. *J Cell Biol.* 174:89-100.
- Allen, J.F. 1993. Control of gene expression by redox potential and the requirement for chloroplast and mitochondrial genomes. *J Theor Biol.* 165:609-31.
- Allen, R.D., C.C. Schroeder, and A.K. Fok. 1989. An investigation of mitochondrial inner membranes by rapid-freeze deep-etch techniques. *J Cell Biol.* 108:2233-40.
- Altmann, K., M. Frank, D. Neumann, S. Jakobs, and B. Westermann. 2008. The class V myosin motor protein, Myo2, plays a major role in mitochondrial motility in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Biol.* 181:119-30.
- Amiott, E.A., and J.A. Jaehning. 2006. Mitochondrial transcription is regulated via an ATP "sensing" mechanism that couples RNA abundance to respiration. *Mol Cell.* 22:329-38.
- Anderson, S., A.T. Bankier, B.G. Barrell, M.H. de Bruijn, A.R. Coulson, J. Drouin, I.C. Eperon, D.P. Nierlich, B.A. Roe, F. Sanger, P.H. Schreier, A.J. Smith, R. Staden, and I.G. Young. 1981. Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature.* 290:457-65.
- Andersson, S.G., A. Zomorodipour, J.O. Andersson, T. Sicheritz-Ponten, U.C. Alsmark, R.M. Podowski, A.K. Naslund, A.S. Eriksson, H.H. Winkler, and C.G. Kurland. 1998. The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature.* 396:133-40.
- Appelhans, T., C.P. Richter, V. Wilkens, S.T. Hess, J. Piehler, and K.B. Busch. 2012. Nanoscale organization of mitochondrial microcompartments revealed by combining tracking and localization microscopy. *Nano Lett.* 12:610-6.
- Arnold, I., K. Pfeiffer, W. Neupert, R.A. Stuart, and H. Schagger. 1998. Yeast mitochondrial F1F0-ATP synthase exists as a dimer: identification of three dimer-specific subunits. *Embo J.* 17:7170-8.
- Bartlett, K., and S. Eaton. 2004. Mitochondrial beta-oxidation. *Eur J Biochem.* 271:462-9.
- Bogenhagen, D.F. 2011. Mitochondrial DNA nucleoid structure. *Biochim Biophys Acta.* 1819:914-20.

- Boldogh, I.R., D.W. Nowakowski, H.C. Yang, H. Chung, S. Karmon, P. Royes, and L.A. Pon. 2003. A protein complex containing Mdm10p, Mdm12p, and Mmm1p links mitochondrial membranes and DNA to the cytoskeleton-based segregation machinery. *Mol Biol Cell*. 14:4618-27.
- Boldogh, I.R., S.L. Ramcharan, H.C. Yang, and L.A. Pon. 2004. A type V myosin (Myo2p) and a Rab-like G-protein (Ypt11p) are required for retention of newly inherited mitochondria in yeast cells during cell division. *Mol Biol Cell*. 15:3994-4002.
- Brooks, C., S.G. Cho, C.Y. Wang, T. Yang, and Z. Dong. 2011. Fragmented mitochondria are sensitized to Bax insertion and activation during apoptosis. *Am J Physiol Cell Physiol*. 300:C447-55.
- Brown, T.A., A.N. Tkachuk, G. Shtengel, B.G. Kopek, D.F. Bogenhagen, H.F. Hess, and D.A. Clayton. 2011. Superresolution fluorescence imaging of mitochondrial nucleoids reveals their spatial range, limits, and membrane interaction. *Mol Cell Biol*. 31:4994-5010.
- Burgess, S.M., M. Delannoy, and R.E. Jensen. 1994. MMM1 encodes a mitochondrial outer membrane protein essential for establishing and maintaining the structure of yeast mitochondria. *J Cell Biol*. 126:1375-91.
- Buvelot Frei, S., P.B. Rahl, M. Nussbaum, B.J. Briggs, M. Calero, S. Janeczko, A.D. Regan, C.Z. Chen, Y. Barral, G.R. Whittaker, and R.N. Collins. 2006. Bioinformatic and comparative localization of Rab proteins reveals functional insights into the uncharacterized GTPases Ypt10p and Ypt11p. *Mol Cell Biol*. 26:7299-317.
- Calvo, S.E., and V.K. Mootha. 2010. The mitochondrial proteome and human disease. *Annu Rev Genomics Hum Genet*. 11:25-44.
- Cereghetti, G.M., A. Stangherlin, O. Martins de Brito, C.R. Chang, C. Blackstone, P. Bernardi, and L. Scorrano. 2008. Dephosphorylation by calcineurin regulates translocation of Drp1 to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 105:15803-8.
- Chacinska, A., C.M. Koehler, D. Milenkovic, T. Lithgow, and N. Pfanner. 2009. Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms. *Cell*. 138:628-44.
- Chappie, J.S., S. Acharya, M. Leonard, S.L. Schmid, and F. Dyda. 2010. G domain dimerization controls dynamin's assembly-stimulated GTPase activity. *Nature*. 465:435-40.
- Chen, D.C., B.C. Yang, and T.T. Kuo. 1992. One-step transformation of yeast in stationary phase. *Curr Genet*. 21:83-4.
- Chernyakov, I., F. Santiago-Tirado, and A. Bretscher. 2013. Active segregation of yeast mitochondria by Myo2 is essential and mediated by Mmr1 and Ypt11. *Curr Biol*. 23:1818-24.
- Cheung, T.H., and T.A. Rando. 2013. Molecular regulation of stem cell quiescence. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 14:329-40.
- Cipolat, S., T. Rudka, D. Hartmann, V. Costa, L. Serneels, K. Craessaerts, K. Metzger, C. Frezza, W. Annaert, L. D'Adamio, C. Derks, T. Dejaegere, L. Pellegrini, R. D'Hooge, L. Scorrano, and B. De Strooper. 2006. Mitochondrial rhomboid PARL regulates cytochrome c release during apoptosis via OPA1-dependent cristae remodeling. *Cell*. 126:163-75.
- Clapham, D.E. 1995. Calcium signaling. *Cell*. 80:259-68.

- Claros, M.G., J. Perea, Y. Shu, F.A. Samatey, J.L. Popot, and C. Jacq. 1995. Limitations to in vivo import of hydrophobic proteins into yeast mitochondria. The case of a cytoplasmically synthesized apocytochrome b. *Eur J Biochem.* 228:762-71.
- Claude, A. 1946. Fractionation of mammalian liver cells by differential centrifugation; problems, methods, and preparation of extract. *J Exp Med.* 84:51-9.
- Coller, H.A., L. Sang, and J.M. Roberts. 2006. A new description of cellular quiescence. *PLoS Biol.* 4:e83.
- Colombini, M. 1979. A candidate for the permeability pathway of the outer mitochondrial membrane. *Nature.* 279:643-5.
- Copeland, D.E., and A.J. Dalton. 1959. An association between mitochondria and the endoplasmic reticulum in cells of the pseudobranch gland of a teleost. *J Biophys Biochem Cytol.* 5:393-6.
- Cribbs, J.T., and S. Strack. 2007. Reversible phosphorylation of Drp1 by cyclic AMP-dependent protein kinase and calcineurin regulates mitochondrial fission and cell death. *EMBO Rep.* 8:939-44.
- Cross, R.L. 2004. Molecular motors: turning the ATP motor. *Nature.* 427:407-8.
- Crowe, J.H., F.A. Hoekstra, and L.M. Crowe. 1992. Anhydrobiosis. *Annu Rev Physiol.* 54:579-99.
- Cruciat, C.M., S. Brunner, F. Baumann, W. Neupert, and R.A. Stuart. 2000. The cytochrome bc1 and cytochrome c oxidase complexes associate to form a single supracomplex in yeast mitochondria. *J Biol Chem.* 275:18093-8.
- Daems, W.T., and E. Wisse. 1966. Shape and attachment of the cristae mitochondriales in mouse hepatic cell mitochondria. *J Ultrastruct Res.* 16:123-40.
- Daignan-Fornier, B., and I. Sagot. 2011a. Proliferation/quiescence: the controversial "aller-retour". *Cell Div.* 6:10.
- Daignan-Fornier, B., and I. Sagot. 2011b. Proliferation/Quiescence: When to start? Where to stop? What to stock? *Cell Div.* 6:20.
- Davies, K.M., C. Anselmi, I. Wittig, J.D. Faraldo-Gomez, and W. Kuhlbrandt. 2012. Structure of the yeast F1Fo-ATP synthase dimer and its role in shaping the mitochondrial cristae. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 109:13602-7.
- Davies, K.M., M. Strauss, B. Daum, J.H. Kief, H.D. Osiewacz, A. Rycovska, V. Zickermann, and W. Kuhlbrandt. 2011. Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 108:14121-6.
- de Brito, O.M., and L. Scorrano. 2008. Mitofusin 2 tethers endoplasmic reticulum to mitochondria. *Nature.* 456:605-10.
- De Duve, C., and R. Wattiaux. 1966. Functions of lysosomes. *Annu Rev Physiol.* 28:435-92.
- De Virgilio, C. 2012. The essence of yeast quiescence. *FEMS Microbiol Rev.* 36:306-39.
- De Vit, M.J., J.A. Waddle, and M. Johnston. 1997. Regulated nuclear translocation of the Mig1 glucose repressor. *Mol Biol Cell.* 8:1603-18.

- De Vos, K.J., G.M. Morotz, R. Stoica, E.L. Tudor, K.F. Lau, S. Ackerley, A. Warley, C.E. Shaw, and C.C. Miller. 2012. VAPB interacts with the mitochondrial protein PTP51 to regulate calcium homeostasis. *Hum Mol Genet.* 21:1299-311.
- Delettre, C., J.M. Griffoin, J. Kaplan, H. Dollfus, B. Lorenz, L. Faivre, G. Lenaers, P. Belenguer, and C.P. Hamel. 2001. Mutation spectrum and splicing variants in the OPA1 gene. *Hum Genet.* 109:584-91.
- Delettre, C., G. Lenaers, J.M. Griffoin, N. Gigarel, C. Lorenzo, P. Belenguer, L. Pelloquin, J. Grosgeorge, C. Turc-Carel, E. Perret, C. Astarie-Dequeker, L. Lasquelles, B. Arnaud, B. Ducommun, J. Kaplan, and C.P. Hamel. 2000. Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy. *Nat Genet.* 26:207-10.
- Dimmer, K.S., S. Fritz, F. Fuchs, M. Messerschmitt, N. Weinbach, W. Neupert, and B. Westermann. 2002. Genetic basis of mitochondrial function and morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell.* 13:847-53.
- Dudkina, N.V., J. Heinemeyer, W. Keegstra, E.J. Boekema, and H.P. Braun. 2005. Structure of dimeric ATP synthase from mitochondria: an angular association of monomers induces the strong curvature of the inner membrane. *FEBS Lett.* 579:5769-72.
- Duvezin-Caubet, S., R. Jagasia, J. Wagener, S. Hofmann, A. Trifunovic, A. Hansson, A. Chomyn, M.F. Bauer, G. Attardi, N.G. Larsson, W. Neupert, and A.S. Reichert. 2006. Proteolytic processing of OPA1 links mitochondrial dysfunction to alterations in mitochondrial morphology. *J Biol Chem.* 281:37972-9.
- Duvezin-Caubet, S., M. Koppen, J. Wagener, M. Zick, L. Israel, A. Bernacchia, R. Jagasia, E.I. Rugarli, A. Imhof, W. Neupert, T. Langer, and A.S. Reichert. 2007. OPA1 processing reconstituted in yeast depends on the subunit composition of the m-AAA protease in mitochondria. *Mol Biol Cell.* 18:3582-90.
- Egner, A., S. Jakobs, and S.W. Hell. 2002. Fast 100-nm resolution three-dimensional microscope reveals structural plasticity of mitochondria in live yeast. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 99:3370-5.
- Ehse, S., I. Raschke, G. Mancuso, A. Bernacchia, S. Geimer, D. Tondera, J.C. Martinou, B. Westermann, E.I. Rugarli, and T. Langer. 2009. Regulation of OPA1 processing and mitochondrial fusion by m-AAA protease isoenzymes and OMA1. *J Cell Biol.* 187:1023-36.
- Eubel, H., L. Jansch, and H.P. Braun. 2003. New insights into the respiratory chain of plant mitochondria. Supercomplexes and a unique composition of complex II. *Plant Physiol.* 133:274-86.
- Evangelista, M., D. Pruyne, D.C. Amberg, C. Boone, and A. Bretscher. 2002. Formins direct Arp2/3-independent actin filament assembly to polarize cell growth in yeast. *Nat Cell Biol.* 4:32-41.
- Fehrenbacher, K.L., I.R. Boldogh, and L.A. Pon. 2005. A role for Jsn1p in recruiting the Arp2/3 complex to mitochondria in budding yeast. *Mol Biol Cell.* 16:5094-102.
- Fehrenbacher, K.L., H.C. Yang, A.C. Gay, T.M. Huckaba, and L.A. Pon. 2004. Live cell imaging of mitochondrial movement along actin cables in budding yeast. *Curr Biol.* 14:1996-2004.
- Fekkes, P., K.A. Shepard, and M.P. Yaffe. 2000. Gag3p, an outer membrane protein required for fission of mitochondrial tubules. *J Cell Biol.* 151:333-40.

- Fernandez-Moran, H. 1962. Cell-membrane ultrastructure. Low-temperature electron microscopy and x-ray diffraction studies of lipoprotein components in lamellar systems. *Circulation*. 26:1039-65.
- Fortsch, J., E. Hummel, M. Krist, and B. Westermann. 2011. The myosin-related motor protein Myo2 is an essential mediator of bud-directed mitochondrial movement in yeast. *J Cell Biol*. 194:473-88.
- Friedman, J.R., L.L. Lackner, M. West, J.R. DiBenedetto, J. Nunnari, and G.K. Voeltz. 2011. ER tubules mark sites of mitochondrial division. *Science*. 334:358-62.
- Friedman, J.R., and J. Nunnari. 2014. Mitochondrial form and function. *Nature*. 505:335-43.
- Fritz, S., N. Weinbach, and B. Westermann. 2003. Mdm30 is an F-box protein required for maintenance of fusion-competent mitochondria in yeast. *Mol Biol Cell*. 14:2303-13.
- Fronzes, R., T. Weimann, J. Vaillier, J. Velours, and D. Brethes. 2006. The peripheral stalk participates in the yeast ATP synthase dimerization independently of e and g subunits. *Biochemistry*. 45:6715-23.
- Garrido, N., L. Griparic, E. Jokitalo, J. Wartiovaara, A.M. van der Blik, and J.N. Spelbrink. 2003. Composition and dynamics of human mitochondrial nucleoids. *Mol Biol Cell*. 14:1583-96.
- Gilkerson, R.W., J.M. Selker, and R.A. Capaldi. 2003. The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation. *FEBS Lett*. 546:355-8.
- Gorsich, S.W., and J.M. Shaw. 2004. Importance of mitochondrial dynamics during meiosis and sporulation. *Mol Biol Cell*. 15:4369-81.
- Gray, M.W., R. Cedergren, Y. Abel, and D. Sankoff. 1989. On the evolutionary origin of the plant mitochondrion and its genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 86:2267-71.
- Griffin, E.E., J. Graumann, and D.C. Chan. 2005. The WD40 protein Caf4p is a component of the mitochondrial fission machinery and recruits Dnm1p to mitochondria. *J Cell Biol*. 170:237-48.
- Habersetzer, J., W. Ziani, I. Larrieu, C. Stines-Chaumeil, M.F. Giraud, D. Brethes, A. Dautant, and P. Paumard. 2013. ATP synthase oligomerization: from the enzyme models to the mitochondrial morphology. *Int J Biochem Cell Biol*. 45:99-105.
- Hackenbrock, C.R. 1966. Ultrastructural bases for metabolically linked mechanical activity in mitochondria. I. Reversible ultrastructural changes with change in metabolic steady state in isolated liver mitochondria. *J Cell Biol*. 30:269-97.
- Hackenbrock, C.R. 1968. Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 61:598-605.
- Hackenbrock, C.R., B. Chazotte, and S.S. Gupte. 1986. The random collision model and a critical assessment of diffusion and collision in mitochondrial electron transport. *J Bioenerg Biomembr*. 18:331-68.
- Hales, K.G., and M.T. Fuller. 1997. Developmentally regulated mitochondrial fusion mediated by a conserved, novel, predicted GTPase. *Cell*. 90:121-9.
- Hammermeister, M., K. Schodel, and B. Westermann. 2010. Mdm36 is a mitochondrial fission-promoting protein in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*. 21:2443-52.

- Harner, M., C. Korner, D. Walther, D. Mokranjac, J. Kaesmacher, U. Welsch, J. Griffith, M. Mann, F. Reggiori, and W. Neupert. 2011. The mitochondrial contact site complex, a determinant of mitochondrial architecture. *Embo J.* 30:4356-70.
- Head, B., L. Griparic, M. Amiri, S. Gandre-Babbe, and A.M. van der Bliek. 2009. Inducible proteolytic inactivation of OPA1 mediated by the OMA1 protease in mammalian cells. *J Cell Biol.* 187:959-66.
- Hekimi, S., J. Lapointe, and Y. Wen. 2011. Taking a "good" look at free radicals in the aging process. *Trends Cell Biol.* 21:569-76.
- Hell, S.W., E.H. Stelzer, S. Lindek, and C. Cremer. 1994. Confocal microscopy with an increased detection aperture: type-B 4Pi confocal microscopy. *Opt Lett.* 19:222.
- Herlan, M., F. Vogel, C. Bornhovd, W. Neupert, and A.S. Reichert. 2003. Processing of Mgm1 by the rhomboid-type protease Pcp1 is required for maintenance of mitochondrial morphology and of mitochondrial DNA. *J Biol Chem.* 278:27781-8.
- Hermann, G.J., J.W. Thatcher, J.P. Mills, K.G. Hales, M.T. Fuller, J. Nunnari, and J.M. Shaw. 1998. Mitochondrial fusion in yeast requires the transmembrane GTPase Fzo1p. *J Cell Biol.* 143:359-73.
- Hobbs, A.E., M. Srinivasan, J.M. McCaffery, and R.E. Jensen. 2001. Mmm1p, a mitochondrial outer membrane protein, is connected to mitochondrial DNA (mtDNA) nucleoids and required for mtDNA stability. *J Cell Biol.* 152:401-10.
- Hoppins, S., S.R. Collins, A. Cassidy-Stone, E. Hummel, R.M. Devay, L.L. Lackner, B. Westermann, M. Schuldiner, J.S. Weissman, and J. Nunnari. 2011. A mitochondrial-focused genetic interaction map reveals a scaffold-like complex required for inner membrane organization in mitochondria. *J Cell Biol.* 195:323-40.
- Huh, W.K., J.V. Falvo, L.C. Gerke, A.S. Carroll, R.W. Howson, J.S. Weissman, and E.K. O'Shea. 2003. Global analysis of protein localization in budding yeast. *Nature.* 425:686-91.
- Ingerman, E., E.M. Perkins, M. Marino, J.A. Mears, J.M. McCaffery, J.E. Hinshaw, and J. Nunnari. 2005. Dnm1 forms spirals that are structurally tailored to fit mitochondria. *J Cell Biol.* 170:1021-7.
- Ishihara, N., Y. Fujita, T. Oka, and K. Mihara. 2006. Regulation of mitochondrial morphology through proteolytic cleavage of OPA1. *Embo J.* 25:2966-77.
- Itoh, H., A. Takahashi, K. Adachi, H. Noji, R. Yasuda, M. Yoshida, and K. Kinoshita. 2004a. Mechanically driven ATP synthesis by F1-ATPase. *Nature.* 427:465-8.
- Itoh, T., E.A. Toh, and Y. Matsui. 2004b. Mmr1p is a mitochondrial factor for Myo2p-dependent inheritance of mitochondria in the budding yeast. *Embo J.* 23:2520-30.
- Itoh, T., A. Watabe, E.A. Toh, and Y. Matsui. 2002. Complex formation with Ypt11p, a rab-type small GTPase, is essential to facilitate the function of Myo2p, a class V myosin, in mitochondrial distribution in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol.* 22:7744-57.
- Iwasawa, R., A.L. Mahul-Mellier, C. Datler, E. Pazarentzos, and S. Grimm. 2011. Fis1 and Bap31 bridge the mitochondria-ER interface to establish a platform for apoptosis induction. *Embo J.* 30:556-68.

- James, D.I., P.A. Parone, Y. Mattenberger, and J.C. Martinou. 2003. hFis1, a novel component of the mammalian mitochondrial fission machinery. *J Biol Chem.* 278:36373-9.
- Jans, D.C., C.A. Wurm, D. Riedel, D. Wenzel, F. Stagge, M. Deckers, P. Rehling, and S. Jakobs. 2013. STED super-resolution microscopy reveals an array of MINOS clusters along human mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 110:8936-41.
- Jimenez, L., D. Laporte, S. Duvezin-Caubet, F. Courtout, and I. Sagot. 2014. Mitochondrial ATP synthases cluster as discrete domains that reorganize with the cellular demand for oxidative phosphorylation. *J Cell Sci.* 127:719-26.
- Kagawa, Y., and E. Racker. 1966. Partial resolution of the enzymes catalyzing oxidative phosphorylation. X. Correlation of morphology and function in submitochondrial particles. *J Biol Chem.* 241:2475-82.
- Kanki, T., K. Wang, Y. Cao, M. Baba, and D.J. Klionsky. 2009. Atg32 is a mitochondrial protein that confers selectivity during mitophagy. *Dev Cell.* 17:98-109.
- Kim, I., S. Rodriguez-Enriquez, and J.J. Lemasters. 2007. Selective degradation of mitochondria by mitophagy. *Arch Biochem Biophys.* 462:245-53.
- Kissova, I., M. Deffieu, S. Manon, and N. Camougrand. 2004. Uth1p is involved in the autophagic degradation of mitochondria. *J Biol Chem.* 279:39068-74.
- Klecker, T., D. Scholz, J. Fortsch, and B. Westermann. 2013. The yeast cell cortical protein Num1 integrates mitochondrial dynamics into cellular architecture. *J Cell Sci.* 126:2924-30.
- Klosinska, M.M., C.A. Crutchfield, P.H. Bradley, J.D. Rabinowitz, and J.R. Broach. 2011. Yeast cells can access distinct quiescent states. *Genes Dev.* 25:336-49.
- Kornmann, B., E. Currie, S.R. Collins, M. Schuldiner, J. Nunnari, J.S. Weissman, and P. Walter. 2009. An ER-mitochondria tethering complex revealed by a synthetic biology screen. *Science.* 325:477-81.
- Korobova, F., T.J. Gauvin, and H.N. Higgs. 2014. A role for myosin II in mammalian mitochondrial fission. *Curr Biol.* 24:409-14.
- Korobova, F., V. Ramabhadran, and H.N. Higgs. 2013. An actin-dependent step in mitochondrial fission mediated by the ER-associated formin INF2. *Science.* 339:464-7.
- Koshiba, T., S.A. Detmer, J.T. Kaiser, H. Chen, J.M. McCaffery, and D.C. Chan. 2004. Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes. *Science.* 305:858-62.
- Koutsopoulos, O.S., D. Laine, L. Osellame, D.M. Chudakov, R.G. Parton, A.E. Frazier, and M.T. Ryan. 2010. Human Mitons associate with mitochondria and induce microtubule-dependent remodeling of mitochondrial networks. *Biochim Biophys Acta.* 1803:564-74.
- Kozjak, V., N. Wiedemann, D. Milenkovic, C. Lohaus, H.E. Meyer, B. Guiard, C. Meisinger, and N. Pfanner. 2003. An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem.* 278:48520-3.
- Krebs, H.A., and W.A. Johnson. 1937. Metabolism of ketonic acids in animal tissues. *Biochem J.* 31:645-60.

- Kukat, C., C.A. Wurm, H. Spahr, M. Falkenberg, N.G. Larsson, and S. Jakobs. 2011. Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 108:13534-9.
- Lackner, L.L. 2014. Shaping the dynamic mitochondrial network. *BMC Biol*. 12:35.
- Lackner, L.L., H. Ping, M. Graef, A. Murley, and J. Nunnari. 2013. Endoplasmic reticulum-associated mitochondria-cortex tether functions in the distribution and inheritance of mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 110:E458-67.
- Lang, B.F., M.W. Gray, and G. Burger. 1999. Mitochondrial genome evolution and the origin of eukaryotes. *Annu Rev Genet*. 33:351-97.
- Laporte, D., A. Lebaudy, A. Sahin, B. Pinson, J. Ceschin, B. Daignan-Fornier, and I. Sagot. 2011. Metabolic status rather than cell cycle signals control quiescence entry and exit. *J Cell Biol*. 192:949-57.
- Lee, A.C., X. Xu, E. Blachly-Dyson, M. Forte, and M. Colombini. 1998. The role of yeast VDAC genes on the permeability of the mitochondrial outer membrane. *J Membr Biol*. 161:173-81.
- Lee, S.S., I. Avalos Vizcarra, D.H. Huberts, L.P. Lee, and M. Heinemann. 2012. Whole lifespan microscopic observation of budding yeast aging through a microfluidic dissection platform. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 109:4916-20.
- Legros, F., A. Lombes, P. Frachon, and M. Rojo. 2002. Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins. *Mol Biol Cell*. 13:4343-54.
- Lewandowska, A., J. Macfarlane, and J.M. Shaw. 2013. Mitochondrial association, protein phosphorylation, and degradation regulate the availability of the active Rab GTPase Ypt11 for mitochondrial inheritance. *Mol Biol Cell*. 24:1185-95.
- Lill, R., B. Hoffmann, S. Molik, A.J. Pierik, N. Rietzschel, O. Stehling, M.A. Uzarska, H. Webert, C. Wilbrecht, and U. Muhlenhoff. 2012. The role of mitochondria in cellular iron-sulfur protein biogenesis and iron metabolism. *Biochim Biophys Acta*. 1823:1491-508.
- Ljungdahl, P.O., and B. Daignan-Fornier. 2012. Regulation of amino acid, nucleotide, and phosphate metabolism in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics*. 190:885-929.
- Luttik, M.A., K.M. Overkamp, P. Kotter, S. de Vries, J.P. van Dijken, and J.T. Pronk. 1998. The *Saccharomyces cerevisiae* NDE1 and NDE2 genes encode separate mitochondrial NADH dehydrogenases catalyzing the oxidation of cytosolic NADH. *J Biol Chem*. 273:24529-34.
- Malumbres, M., and M. Barbacid. 2001. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. *Nat Rev Cancer*. 1:222-31.
- Mannella, C.A., M. Marko, P. Penczek, D. Barnard, and J. Frank. 1994. The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope. *Microsc Res Tech*. 27:278-83.
- Marres, C.A., S. de Vries, and L.A. Grivell. 1991. Isolation and inactivation of the nuclear gene encoding the rotenone-insensitive internal NADH: ubiquinone oxidoreductase of mitochondria from *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*. 195:857-62.

- Martinez, M.J., S. Roy, A.B. Archuletta, P.D. Wentzell, S.S. Anna-Arriola, A.L. Rodriguez, A.D. Aragon, G.A. Quinones, C. Allen, and M. Werner-Washburne. 2004. Genomic analysis of stationary-phase and exit in *Saccharomyces cerevisiae*: gene expression and identification of novel essential genes. *Mol Biol Cell*. 15:5295-305.
- McConnell, S.J., L.C. Stewart, A. Talin, and M.P. Yaffe. 1990. Temperature-sensitive yeast mutants defective in mitochondrial inheritance. *J Cell Biol*. 111:967-76.
- McQuibban, G.A., S. Saurya, and M. Freeman. 2003. Mitochondrial membrane remodelling regulated by a conserved rhomboid protease. *Nature*. 423:537-41.
- Mears, J.A., L.L. Lackner, S. Fang, E. Ingeman, J. Nunnari, and J.E. Hinshaw. 2010. Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission. *Nat Struct Mol Biol*. 18:20-6.
- Medda, R., S. Jakobs, S.W. Hell, and J. Bewersdorf. 2006. 4Pi microscopy of quantum dot-labeled cellular structures. *J Struct Biol*. 156:517-23.
- Meeusen, S., R. DeVay, J. Block, A. Cassidy-Stone, S. Wayson, J.M. McCaffery, and J. Nunnari. 2006. Mitochondrial inner-membrane fusion and crista maintenance requires the dynamin-related GTPase Mgm1. *Cell*. 127:383-95.
- Meeusen, S., J.M. McCaffery, and J. Nunnari. 2004. Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro. *Science*. 305:1747-52.
- Minauro-Sanmiguel, F., S. Wilkens, and J.J. Garcia. 2005. Structure of dimeric mitochondrial ATP synthase: novel F0 bridging features and the structural basis of mitochondrial cristae biogenesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 102:12356-8.
- Mitchell, P. 1961. Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism. *Nature*. 191:144-8.
- Miyakawa, I., H. Aoi, N. Sando, and T. Kuroiwa. 1984. Fluorescence microscopic studies of mitochondrial nucleoids during meiosis and sporulation in the yeast, *Saccharomyces cerevisiae*. *J Cell Sci*. 66:21-38.
- Morris, R.L., and P.J. Hollenbeck. 1995. Axonal transport of mitochondria along microtubules and F-actin in living vertebrate neurons. *J Cell Biol*. 131:1315-26.
- Mortimer, R.K., and J.R. Johnston. 1959. Life span of individual yeast cells. *Nature*. 183:1751-2.
- Mozdy, A.D., J.M. McCaffery, and J.M. Shaw. 2000. Dnm1p GTPase-mediated mitochondrial fission is a multi-step process requiring the novel integral membrane component Fis1p. *J Cell Biol*. 151:367-80.
- Mullins, R.D., J.A. Heuser, and T.D. Pollard. 1998. The interaction of Arp2/3 complex with actin: nucleation, high affinity pointed end capping, and formation of branching networks of filaments. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 95:6181-6.
- Murley, A., L.L. Lackner, C. Osman, M. West, G.K. Voeltz, P. Walter, and J. Nunnari. 2013. ER-associated mitochondrial division links the distribution of mitochondria and mitochondrial DNA in yeast. *Elife*. 2:e00422.

- Muster, B., W. Kohl, I. Wittig, V. Strecker, F. Joos, W. Haase, J. Bereiter-Hahn, and K. Busch. 2010. Respiratory chain complexes in dynamic mitochondria display a patchy distribution in life cells. *PLoS One*. 5:e11910.
- Nangaku, M., R. Sato-Yoshitake, Y. Okada, Y. Noda, R. Takemura, H. Yamazaki, and N. Hirokawa. 1994. KIF1B, a novel microtubule plus end-directed monomeric motor protein for transport of mitochondria. *Cell*. 79:1209-20.
- Nezich, C.L., and R.J. Youle. 2013. Make or break for mitochondria. *Elife*. 2:e00804.
- Nicholls, D.G. 2005. Mitochondria and calcium signaling. *Cell Calcium*. 38:311-7.
- Nijtmans, L.G., J.W. Taanman, A.O. Muijsers, D. Speijer, and C. Van den Bogert. 1998. Assembly of cytochrome-c oxidase in cultured human cells. *Eur J Biochem*. 254:389-94.
- Nowikovsky, K., S. Reipert, R.J. Devenish, and R.J. Schweyen. 2007. Mdm38 protein depletion causes loss of mitochondrial K⁺/H⁺ exchange activity, osmotic swelling and mitophagy. *Cell Death Differ*. 14:1647-56.
- Nunnari, J., W.F. Marshall, A. Straight, A. Murray, J.W. Sedat, and P. Walter. 1997. Mitochondrial transmission during mating in *Saccharomyces cerevisiae* is determined by mitochondrial fusion and fission and the intramitochondrial segregation of mitochondrial DNA. *Mol Biol Cell*. 8:1233-42.
- O'Farrell, P.H. 2011. Quiescence: early evolutionary origins and universality do not imply uniformity. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*. 366:3498-507.
- Okamoto, K., N. Kondo-Okamoto, and Y. Ohsumi. 2009. Mitochondria-anchored receptor Atg32 mediates degradation of mitochondria via selective autophagy. *Dev Cell*. 17:87-97.
- Olichon, A., G. Elachouri, L. Baricault, C. Delettre, P. Belenguer, and G. Lenaers. 2007. OPA1 alternate splicing uncouples an evolutionary conserved function in mitochondrial fusion from a vertebrate restricted function in apoptosis. *Cell Death Differ*. 14:682-92.
- Olichon, A., E. Guillou, C. Delettre, T. Landes, L. Arnaune-Pelloquin, L.J. Emorine, V. Mils, M. Daloyau, C. Hamel, P. Amati-Bonneau, D. Bonneau, P. Reynier, G. Lenaers, and P. Belenguer. 2006. Mitochondrial dynamics and disease, OPA1. *Biochim Biophys Acta*. 1763:500-9.
- Otera, H., N. Ishihara, and K. Mihara. 2013. New insights into the function and regulation of mitochondrial fission. *Biochim Biophys Acta*. 1833:1256-68.
- Pagliarini, D.J., and J. Rutter. 2013. Hallmarks of a new era in mitochondrial biochemistry. *Genes Dev*. 27:2615-27.
- Palade, G.E. 1953. An electron microscope study of the mitochondrial structure. *J Histochem Cytochem*. 1:188-211.
- Palmer, J.D. 1997. Organelle genomes: going, going, gone! *Science*. 275:790-1.
- Paradies, G., V. Paradies, V. De Benedictis, F.M. Ruggiero, and G. Petrosillo. 2013. Functional role of cardiolipin in mitochondrial bioenergetics. *Biochim Biophys Acta*. 1837:408-17.
- Paumard, P., J. Vaillier, B. Coulary, J. Schaeffer, V. Soubannier, D.M. Mueller, D. Brethes, J.P. di Rago, and J. Velours. 2002. The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *Embo J*. 21:221-30.

- Penczek, P., M. Marko, K. Buttle, and J. Frank. 1995. Double-tilt electron tomography. *Ultramicroscopy*. 60:393-410.
- Perkins, G., C. Renken, M.E. Martone, S.J. Young, M. Ellisman, and T. Frey. 1997. Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts. *J Struct Biol*. 119:260-72.
- Peters, L.Z., R. Hazan, M. Breker, M. Schuldiner, and S. Ben-Aroya. 2013. Formation and dissociation of proteasome storage granules are regulated by cytosolic pH. *J Cell Biol*. 201:663-71.
- Pfanner, N., M. van der Laan, P. Amati, R.A. Capaldi, A.A. Caudy, A. Chacinska, M. Darshi, M. Deckers, S. Hoppins, T. Icho, S. Jakobs, J. Ji, V. Kozjak-Pavlovic, C. Meisinger, P.R. Odgren, S.K. Park, P. Rehling, A.S. Reichert, M.S. Sheikh, S.S. Taylor, N. Tsuchida, A.M. van der Bliet, I.J. van der Kleij, J.S. Weissman, B. Westermann, J. Zha, W. Neupert, and J. Nunnari. 2014. Uniform nomenclature for the mitochondrial contact site and cristae organizing system. *J Cell Biol*. 204:1083-6.
- Pilling, A.D., D. Horiuchi, C.M. Lively, and W.M. Saxton. 2006. Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in Drosophila motor axons. *Mol Biol Cell*. 17:2057-68.
- Posakony, J.W., J.M. England, and G. Attardi. 1977. Mitochondrial growth and division during the cell cycle in HeLa cells. *J Cell Biol*. 74:468-91.
- Prescott, M., A. Lourbakos, M. Bateson, G. Boyle, P. Nagley, and R.J. Devenish. 1997. A novel fluorescent marker for assembled mitochondria ATP synthase of yeast. OSCP subunit fused to green fluorescent protein is assembled into the complex in vivo. *FEBS Lett*. 411:97-101.
- Prescott, M., S. Nowakowski, P. Gavin, P. Nagley, J.C. Whisstock, and R.J. Devenish. 2003. Subunit gamma-green fluorescent protein fusions are functionally incorporated into mitochondrial F1FO-ATP synthase, arguing against a rigid cap structure at the top of F1. *J Biol Chem*. 278:251-6.
- Prescott, M., S. Nowakowski, P. Nagley, and R.J. Devenish. 1999. The length of polypeptide linker affects the stability of green fluorescent protein fusion proteins. *Anal Biochem*. 273:305-7.
- Priault, M., B. Salin, J. Schaeffer, F.M. Vallette, J.P. di Rago, and J.C. Martinou. 2005. Impairing the bioenergetic status and the biogenesis of mitochondria triggers mitophagy in yeast. *Cell Death Differ*. 12:1613-21.
- Pruyne, D., M. Evangelista, C. Yang, E. Bi, S. Zigmund, A. Bretscher, and C. Boone. 2002. Role of formins in actin assembly: nucleation and barbed-end association. *Science*. 297:612-5.
- Pruyne, D., A. Legesse-Miller, L. Gao, Y. Dong, and A. Bretscher. 2004. Mechanisms of polarized growth and organelle segregation in yeast. *Annu Rev Cell Dev Biol*. 20:559-91.
- Rabl, R., V. Soubannier, R. Scholz, F. Vogel, N. Mendl, A. Vasiljev-Neumeyer, C. Korner, R. Jagasia, T. Keil, W. Baumeister, M. Cyrklaff, W. Neupert, and A.S. Reichert. 2009. Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcj1 and Su e/g. *J Cell Biol*. 185:1047-63.
- Rafelski, S.M., M.P. Viana, Y. Zhang, Y.H. Chan, K.S. Thorn, P. Yam, J.C. Fung, H. Li, F. Costa Lda, and W.F. Marshall. 2012. Mitochondrial network size scaling in budding yeast. *Science*. 338:822-4.

- Rizzuto, R., P. Pinton, W. Carrington, F.S. Fay, K.E. Fogarty, L.M. Lifshitz, R.A. Tuft, and T. Pozzan. 1998. Close contacts with the endoplasmic reticulum as determinants of mitochondrial Ca²⁺ responses. *Science*. 280:1763-6.
- Ro, S.H., D. Liu, H. Yeo, and J.H. Paik. 2013. FoxOs in neural stem cell fate decision. *Arch Biochem Biophys*. 534:55-63.
- Rudolf, J., V. Makrantoni, W.J. Ingledew, M.J. Stark, and M.F. White. 2006. The DNA repair helicases XPD and FancJ have essential iron-sulfur domains. *Mol Cell*. 23:801-8.
- Russo, G.J., K. Louie, A. Wellington, G.T. Macleod, F. Hu, S. Panchumarthi, and K.E. Zinsmaier. 2009. Drosophila Miro is required for both anterograde and retrograde axonal mitochondrial transport. *J Neurosci*. 29:5443-55.
- Sagot, I., S.K. Klee, and D. Pellman. 2002a. Yeast formins regulate cell polarity by controlling the assembly of actin cables. *Nat Cell Biol*. 4:42-50.
- Sagot, I., B. Pinson, B. Salin, and B. Daignan-Fornier. 2006. Actin bodies in yeast quiescent cells: an immediately available actin reserve? *Mol Biol Cell*. 17:4645-55.
- Sagot, I., A.A. Rodal, J. Moseley, B.L. Goode, and D. Pellman. 2002b. An actin nucleation mechanism mediated by Bni1 and profilin. *Nat Cell Biol*. 4:626-31.
- Santel, A., and M.T. Fuller. 2001. Control of mitochondrial morphology by a human mitofusin. *J Cell Sci*. 114:867-74.
- Schagger, H., and K. Pfeiffer. 2000. Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J*. 19:1777-83.
- Schlame, M., and D. Haldar. 1993. Cardiolipin is synthesized on the matrix side of the inner membrane in rat liver mitochondria. *J Biol Chem*. 268:74-9.
- Schmidt, R., C.A. Wurm, A. Punge, A. Egner, S. Jakobs, and S.W. Hell. 2009. Mitochondrial cristae revealed with focused light. *Nano Lett*. 9:2508-10.
- Schneider, C.A., W.S. Rasband, and K.W. Eliceiri. 2012. NIH Image to ImageJ: 25 years of image analysis. *Nat Methods*. 9:671-5.
- Schweers, R.L., J. Zhang, M.S. Randall, M.R. Loyd, W. Li, F.C. Dorsey, M. Kundu, J.T. Opferman, J.L. Cleveland, J.L. Miller, and P.A. Ney. 2007. NIX is required for programmed mitochondrial clearance during reticulocyte maturation. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 104:19500-5.
- Scorrano, L. 2013. Keeping mitochondria in shape: a matter of life and death. *Eur J Clin Invest*. 43:886-93.
- Sesaki, H., and R.E. Jensen. 2001. UGO1 encodes an outer membrane protein required for mitochondrial fusion. *J Cell Biol*. 152:1123-34.
- Sheftel, A.D., O. Stehling, A.J. Pierik, H.P. Elsasser, U. Muhlenhoff, H. Webert, A. Hobler, F. Hannemann, R. Bernhardt, and R. Lill. 2010. Humans possess two mitochondrial ferredoxins, Fdx1 and Fdx2, with distinct roles in steroidogenesis, heme, and Fe/S cluster biosynthesis. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 107:11775-80.
- Sherman, F. 2002. Getting started with yeast. *Methods Enzymol*. 350:3-41.

- Shi, L., B.M. Sutter, X. Ye, and B.P. Tu. 2010. Trehalose is a key determinant of the quiescent metabolic state that fuels cell cycle progression upon return to growth. *Mol Biol Cell*. 21:1982-90.
- Sickmann, A., J. Reinders, Y. Wagner, C. Joppich, R. Zahedi, H.E. Meyer, B. Schonfisch, I. Perschil, A. Chacinska, B. Guiard, P. Rehling, N. Pfanner, and C. Meisinger. 2003. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 100:13207-12.
- Simon, V.R., S.L. Karmon, and L.A. Pon. 1997. Mitochondrial inheritance: cell cycle and actin cable dependence of polarized mitochondrial movements in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cell Motil Cytoskeleton*. 37:199-210.
- Simon, V.R., T.C. Swayne, and L.A. Pon. 1995. Actin-dependent mitochondrial motility in mitotic yeast and cell-free systems: identification of a motor activity on the mitochondrial surface. *J Cell Biol*. 130:345-54.
- Singer, M.A., and S. Lindquist. 1998. Thermotolerance in *Saccharomyces cerevisiae*: the Yin and Yang of trehalose. *Trends Biotechnol*. 16:460-8.
- Sjostrand, F.S. 1953. Electron microscopy of mitochondria and cytoplasmic double membranes. *Nature*. 171:30-2.
- Smirnova, E., L. Griparic, D.L. Shurland, and A.M. van der Bliek. 2001. Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. *Mol Biol Cell*. 12:2245-56.
- Sogo, L.F., and M.P. Yaffe. 1994. Regulation of mitochondrial morphology and inheritance by Mdm10p, a protein of the mitochondrial outer membrane. *J Cell Biol*. 126:1361-73.
- Sohal, R.D. 1975. Mitochondrial changes in flight muscles of normal and flightless *Drosophila melanogaster* with age. *J Morphol*. 145:337-53.
- Soubannier, V., J. Vaillier, P. Paumard, B. Couлары, J. Schaeffer, and J. Velours. 2002. In the absence of the first membrane-spanning segment of subunit 4(b), the yeast ATP synthase is functional but does not dimerize or oligomerize. *J Biol Chem*. 277:10739-45.
- Spannagel, C., J. Vaillier, G. Arselin, P.V. Graves, X. Grandier-Vazeille, and J. Velours. 1998. Evidence of a subunit 4 (subunit b) dimer in favor of the proximity of ATP synthase complexes in yeast inner mitochondrial membrane. *Biochim Biophys Acta*. 1414:260-4.
- Stocco, D.M. 2001. StAR protein and the regulation of steroid hormone biosynthesis. *Annu Rev Physiol*. 63:193-213.
- Stone, S.J., and J.E. Vance. 2000. Phosphatidylserine synthase-1 and -2 are localized to mitochondria-associated membranes. *J Biol Chem*. 275:34534-40.
- Stowers, R.S., L.J. Megeath, J. Gorska-Andrzejak, I.A. Meinertzhagen, and T.L. Schwarz. 2002. Axonal transport of mitochondria to synapses depends on Milton, a novel *Drosophila* protein. *Neuron*. 36:1063-77.
- Strauss, M., G. Hofhaus, R.R. Schroder, and W. Kuhlbrandt. 2008. Dimer ribbons of ATP synthase shape the inner mitochondrial membrane. *Embo J*. 27:1154-60.
- Sukhorukov, V.M., D. Dikov, K. Busch, V. Strecker, I. Wittig, and J. Bereiter-Hahn. 2010. Determination of protein mobility in mitochondrial membranes of living cells. *Biochim Biophys Acta*. 1798:2022-32.

- Swayne, T.C., C. Zhou, I.R. Boldogh, J.K. Charalel, J.R. McFaline-Figueroa, S. Thoms, C. Yang, G. Leung, J. McInnes, R. Erdmann, and L.A. Pon. 2011. Role for cER and Mmr1p in anchorage of mitochondria at sites of polarized surface growth in budding yeast. *Curr Biol*. 21:1994-9.
- Tal, R., G. Winter, N. Ecker, D.J. Klionsky, and H. Abeliovich. 2007. Aup1p, a yeast mitochondrial protein phosphatase homolog, is required for efficient stationary phase mitophagy and cell survival. *J Biol Chem*. 282:5617-24.
- Tanaka, K., Y. Sugiura, R. Ichishita, K. Mihara, and T. Oka. 2011. KLP6: a newly identified kinesin that regulates the morphology and transport of mitochondria in neuronal cells. *J Cell Sci*. 124:2457-65.
- Thomas, D., P. Bron, T. Weimann, A. Dautant, M.F. Giraud, P. Paumard, B. Salin, A. Cavalier, J. Velours, and D. Brethes. 2008. Supramolecular organization of the yeast F1Fo-ATP synthase. *Biol Cell*. 100:591-601.
- Tieu, Q., and J. Nunnari. 2000. Mdv1p is a WD repeat protein that interacts with the dynamin-related GTPase, Dnm1p, to trigger mitochondrial division. *J Cell Biol*. 151:353-66.
- Treitel, M.A., S. Kuchin, and M. Carlson. 1998. Snf1 protein kinase regulates phosphorylation of the Mig1 repressor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Cell Biol*. 18:6273-80.
- Twig, G., A. Elorza, A.J. Molina, H. Mohamed, J.D. Wikstrom, G. Walzer, L. Stiles, S.E. Haigh, S. Katz, G. Las, J. Alroy, M. Wu, B.F. Py, J. Yuan, J.T. Deeney, B.E. Corkey, and O.S. Shirihai. 2008. Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy. *Embo J*. 27:433-46.
- Uchida, M., Y. Sun, G. McDermott, C. Knoechel, M.A. Le Gros, D. Parkinson, D.G. Drubin, and C.A. Larabell. 2011. Quantitative analysis of yeast internal architecture using soft X-ray tomography. *Yeast*. 28:227-36.
- Uetz, P., L. Giot, G. Cagney, T.A. Mansfield, R.S. Judson, J.R. Knight, D. Lockshon, V. Narayan, M. Srinivasan, P. Pochart, A. Qureshi-Emili, Y. Li, B. Godwin, D. Conover, T. Kalbfleisch, G. Vijayadamodar, M. Yang, M. Johnston, S. Fields, and J.M. Rothberg. 2000. A comprehensive analysis of protein-protein interactions in *Saccharomyces cerevisiae*. *Nature*. 403:623-7.
- Umbarger, H.E. 1978. Amino acid biosynthesis and its regulation. *Annu Rev Biochem*. 47:532-606.
- Valcourt, J.R., J.M. Lemons, E.M. Haley, M. Kojima, O.O. Demuren, and H.A. Collier. 2012. Staying alive: metabolic adaptations to quiescence. *Cell Cycle*. 11:1680-96.
- van de Linde, S., M. Sauer, and M. Heilemann. 2008. Subdiffraction-resolution fluorescence imaging of proteins in the mitochondrial inner membrane with photoswitchable fluorophores. *J Struct Biol*. 164:250-4.
- van Spronsen, M., M. Mikhaylova, J. Lipka, M.A. Schlager, D.J. van den Heuvel, M. Kuijpers, P.S. Wulf, N. Keijzer, J. Demmers, L.C. Kapitein, D. Jaarsma, H.C. Gerritsen, A. Akhmanova, and C.C. Hoogenraad. 2013. TRAK/Milton motor-adaptor proteins steer mitochondrial trafficking to axons and dendrites. *Neuron*. 77:485-502.
- Vance, J.E. 1990. Phospholipid synthesis in a membrane fraction associated with mitochondria. *J Biol Chem*. 265:7248-56.
- Vevea, J.D., T.C. Swayne, I.R. Boldogh, and L.A. Pon. 2014. Inheritance of the fittest mitochondria in yeast. *Trends Cell Biol*. 24:53-60.

- Visser, W., E.A. van Spronsen, N. Nanninga, J.T. Pronk, J. Gijs Kuenen, and J.P. van Dijken. 1995. Effects of growth conditions on mitochondrial morphology in *Saccharomyces cerevisiae*. *Antonie Van Leeuwenhoek*. 67:243-53.
- Vogel, F., C. Bornhovd, W. Neupert, and A.S. Reichert. 2006. Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane. *J Cell Biol*. 175:237-47.
- von der Malsburg, K., J.M. Muller, M. Bohnert, S. Oeljeklaus, P. Kwiatkowska, T. Becker, A. Loniewska-Lwowska, S. Wiese, S. Rao, D. Milenkovic, D.P. Hutu, R.M. Zerbes, A. Schulze-Specking, H.E. Meyer, J.C. Martinou, S. Rospert, P. Rehling, C. Meisinger, M. Veenhuis, B. Warscheid, I.J. van der Klei, N. Pfanner, A. Chacinska, and M. van der Laan. 2011. Dual role of mitofilin in mitochondrial membrane organization and protein biogenesis. *Dev Cell*. 21:694-707.
- Voss, C., S. Lahiri, B.P. Young, C.J. Loewen, and W.A. Prinz. 2012. ER-shaping proteins facilitate lipid exchange between the ER and mitochondria in *S. cerevisiae*. *J Cell Sci*. 125:4791-9.
- Wada, H., D. Shintani, and J. Ohlrogge. 1997. Why do mitochondria synthesize fatty acids? Evidence for involvement in lipoic acid production. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 94:1591-6.
- Wells, A., L. Griffith, J.Z. Wells, and D.P. Taylor. 2013. The dormancy dilemma: quiescence versus balanced proliferation. *Cancer Res*. 73:3811-6.
- Westermann, B. 2010. Mitochondrial fusion and fission in cell life and death. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 11:872-84.
- Williamson, D.H., and D.J. Fennell. 1979. Visualization of yeast mitochondrial DNA with the fluorescent stain "DAPI". *Methods Enzymol*. 56:728-33.
- Winzeler, E.A., D.D. Shoemaker, A. Astromoff, H. Liang, K. Anderson, B. Andre, R. Bangham, R. Benito, J.D. Boeke, H. Bussey, A.M. Chu, C. Connelly, K. Davis, F. Dietrich, S.W. Dow, M. El Bakkoury, F. Foury, S.H. Friend, E. Gentalen, G. Giaever, J.H. Hegemann, T. Jones, M. Laub, H. Liao, N. Liebundguth, D.J. Lockhart, A. Lucau-Danila, M. Lussier, N. M'Rabet, P. Menard, M. Mittmann, C. Pai, C. Rebischung, J.L. Revuelta, L. Riles, C.J. Roberts, P. Ross-MacDonald, B. Scherens, M. Snyder, S. Sookhai-Mahadeo, R.K. Storms, S. Veronneau, M. Voet, G. Volckaert, T.R. Ward, R. Wysocki, G.S. Yen, K. Yu, K. Zimmermann, P. Philippsen, M. Johnston, and R.W. Davis. 1999. Functional characterization of the *S. cerevisiae* genome by gene deletion and parallel analysis. *Science*. 285:901-6.
- Wurm, C.A., and S. Jakobs. 2006. Differential protein distributions define two sub-compartments of the mitochondrial inner membrane in yeast. *FEBS Lett*. 580:5628-34.
- Yang, D., Y. Oyaizu, H. Oyaizu, G.J. Olsen, and C.R. Woese. 1985. Mitochondrial origins. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 82:4443-7.
- Yasuda, K., T. Ishii, H. Suda, A. Akatsuka, P.S. Hartman, S. Goto, M. Miyazawa, and N. Ishii. 2006. Age-related changes of mitochondrial structure and function in *Caenorhabditis elegans*. *Mech Ageing Dev*. 127:763-70.
- Yoon, Y., E.W. Krueger, B.J. Oswald, and M.A. McNiven. 2003. The mitochondrial protein hFis1 regulates mitochondrial fission in mammalian cells through an interaction with the dynamin-like protein DLP1. *Mol Cell Biol*. 23:5409-20.
- Yotsuyanagi, Y. 1962. [Study of yeast mitochondria. I. Variations in mitochondrial ultrastructure during the aerobic growth cycle]. *J Ultrastruct Res*. 7:121-40.

Youngman, M.J., A.E. Hobbs, S.M. Burgess, M. Srinivasan, and R.E. Jensen. 2004. Mmm2p, a mitochondrial outer membrane protein required for yeast mitochondrial shape and maintenance of mtDNA nucleoids. *J Cell Biol.* 164:677-88.

Zborowski, J., A. Dygas, and L. Wojtczak. 1983. Phosphatidylserine decarboxylase is located on the external side of the inner mitochondrial membrane. *FEBS Lett.* 157:179-82.

Zick, M., R. Rabl, and A.S. Reichert. 2009. Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria. *Biochim Biophys Acta.* 1793:5-19.