

UNIVERSITE PARIS SUD
UFR SCIENTIFIQUE D'ORSAY

THESE
présentée pour obtenir
le grade de Docteur en Sciences de l'Université Paris Sud

par

Delphine BERNARD

Sujet :

**Assemblage des cytochromes de type *c* dans la
mitochondrie chez *Saccharomyces cerevisiae***

Soutenue publiquement le 24 Mars 2006, devant le jury composé de :

Annie Sainsart-Chanet	Présidente
Géraldine Bonnard	Rapporteur
Brigitte Meunier	Rapporteur
Claude Jacq	Examineur
Patrice Hamel	Examineur
Bernard Guiard	Directeur de thèse

Thèse préparée au Centre de Génétique Moléculaire, Gif-sur-Yvette,
(France) et à University of California, Los Angeles (États-Unis).

- REMERCIEMENTS -

Je tiens à exprimer toute ma reconnaissance à Bernard Guiard pour m'avoir accueillie dans son laboratoire avec enthousiasme, dans des circonstances inattendues. Je le remercie infiniment pour nos nombreuses discussions scientifiques, sa disponibilité et pour la confiance et la liberté qu'il a su m'accorder. Merci aussi pour ces moments partagés autour de notre traditionnel thé aux madeleines !

Je remercie Patrice Hamel pour son inépuisable disponibilité, son accueil chaleureux à Los Angeles, ainsi que pour la richesse de nos échanges scientifiques, cinématographiques et philosophiques, à toute heure de la journée. Merci également aux inventeurs du téléphone et du mail : nos échanges outre-atlantiques ont ainsi été grandement facilités !

Je remercie Sabeeha Merchant de m'avoir généreusement accueillie dans son laboratoire à UCLA, pendant une année extrêmement enrichissante.

Je remercie Geneviève Dujardin, avec qui j'ai eu le plaisir de commencer cette grande aventure scientifique et humaine. J'ai en particulier apprécié sa disponibilité constante tout au long de ma thèse.

Une attention toute particulière au personnel des services administratifs et techniques du Centre de Génétique Moléculaire qui ont contribué à l'aboutissement de ce travail. Un grand merci à Anita et Marie-Line pour leur présence au quotidien.

Je remercie également l'ensemble des membres de l'équipe de Christopher Herbert et de Bernard Guiard pour leurs conseils, leur sympathie et leur gourmandise.

Merci à Stéphane Gabilly pour ses fous rires entraînants, son professionnalisme et son passage à Gif-sur-Yvette.

Je remercie Marguerite Picard pour m'avoir transmis le goût de la génétique formelle et Martine Heude pour m'avoir épaulée lors de mes premiers pas d'enseignante. Je remercie également mes collègues généticiens de l'Université Paris XI, notamment pour avoir regroupé mes enseignements afin de faciliter mon départ pour Los Angeles.

Un grand merci à mes collègues et compagnons gifois, avec qui j'ai partagé des moments fort agréables: Alexandra M, Aleksandra N, Caroline, Cécile, Céline, Emilie, Lise, Marie-Eve, Myriam, Otakar, Sean, Stéphane, Thuy Ahn et Yann. Merci également à Lynda Latrèche avec qui j'ai eu le plaisir de travailler pendant une partie de l'été 2004. Je n'oublie pas mes collègues et compagnons 'californiens': Anthony & Karine, Diana, Dudley, Elida, Janette, José & Maria, Maria, Michael and Penny.

Une pensée toute particulière à Emanuele, à ma famille et à mes proches amis.

Enfin, j'adresse mes remerciements à tous les membres du jury pour avoir accepté d'examiner ce travail.

- RESUME -

Les cytochromes de type *c* sont des protéines ubiquitaires, transporteurs d'électrons, qui sont impliquées dans des processus fondamentaux tels que la phosphorylation oxydative, la photosynthèse et la mort cellulaire programmée (chez les mammifères). Les cytochromes de type *c* portent un cofacteur hémique attaché de manière covalente à l'apocytochrome *via* des liaisons thioéthers impliquant deux résidus cystéines du motif conservé CXXCH. Trois voies distinctes de biosynthèse des cytochromes de type *c* dans le monde vivant ont été décrites (les systèmes I, II et III). On rencontre une de ces voies dans les mitochondries de métazoaires et de champignons (système III). Chez *Saccharomyces cerevisiae*, cette voie est caractérisée par la présence de deux protéines, les hème lyases du cytochromes *c* et du cytochrome *c*₁ (CCHL et CC₁HL), localisées dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie. Bien que plusieurs facteurs redox interviennent dans la maturation des cytochromes de type *c* dans les systèmes I et II, l'existence de ces derniers n'avait jusqu'alors pu être démontrée pour le système III. Mon travail de thèse a porté sur l'étude de l'assemblage des cytochromes de type *c* dans le système III en utilisant la levure *S. cerevisiae* comme organisme modèle.

En utilisant une approche génétique, qui consistait à rechercher des suppresseurs génétiques et multicopies capables de restaurer la croissance respiratoire de mutants d'hème lyases, nous avons montré que: (1) la CCHL pouvait se substituer partiellement à la CC₁HL, (2) l'absence de la CC₁HL pouvait être compensée par des mutations situées dans les gènes codant l'enzyme CCHL ou le substrat apocytochrome *c*₁, ou par la surproduction de Cyc2p, une protéine mitochondriale alors peu caractérisée. Nous avons également établi que l'unique hème lyase putative humaine, dont une déficience entraîne un défaut neurodéveloppemental majeur chez l'humain, pouvait remplacer les deux hèmes lyases de levure (Bernard *et al.*, 2003).

En outre, une étude génétique m'a permis de préciser que Cyc2p était spécifiquement requise pour l'activité de la CCHL chez la levure *S. cerevisiae*. La caractérisation biochimique de Cyc2p a montré qu'il s'agissait d'une flavoprotéine, ancrée à la membrane interne de la mitochondrie, avec son domaine de liaison au FAD localisé dans l'espace intermembranaire, le compartiment d'assemblage des cytochromes de type *c*. Des tests *in vitro* de réduction du ferricyanure montrent enfin que Cyc2p agit comme une réductase en présence de NADPH. Cette flavoprotéine pourrait intervenir *in vivo* dans la réduction du cofacteur hémique (Bernard *et al.*, 2005).

Enfin, des expériences d'électrophorèse en conditions natives (Blue-Native PAGE) suggèrent l'existence de deux complexes protéiques de haut poids moléculaire contenant respectivement la CCHL et Cyc2p. La caractérisation des protéines de ces complexes devrait permettre d'identifier de nouveaux facteurs impliqués dans la biogenèse des cytochromes de type *c*.

INTRODUCTION

I. La mitochondrie..... 11

1. LA MITOCHONDRIE, UN ORGANITE COMPARTIMENTE ET DYNAMIQUE	11
1.1. <i>Origine endosymbiotique</i>	11
1.2. <i>Les compartiments mitochondriaux</i>	11
1.3. <i>Morphologie et dynamique mitochondriale</i>	13
2. FONCTION ENERGETIQUE DE LA MITOCHONDRIE	14
2.1. <i>Principe de la phosphorylation oxydative</i>	14
2.2. <i>Organisation de la chaîne respiratoire</i>	15
2.3. <i>Origine génétique mixte et biogenèse des complexes respiratoires</i>	16
3. FONCTIONS ESSENTIELLES DE LA MITOCHONDRIE	17
3.1. <i>Analyse des protéines mitochondriales essentielles à la viabilité cellulaire</i>	17
3.2. <i>Import des protéines mitochondriales</i>	18
3.3. <i>Assemblage des protéines à groupement fer-soufre</i>	20
3.4. <i>Les dernières étapes de la biosynthèse de l'hème</i>	21

II. Les cytochromes de type c. 22

1. DEFINITION.....	22
1.1. <i>Historique de la découverte du pigment</i>	22
1.2. <i>Classification des cytochromes</i>	22
1.3. <i>Les cytochromes de type c</i>	23
2. L'HEME : PROPRIETES ET BIOSYNTHESE	24
2.1. <i>Propriétés de l'hème</i>	24
2.2. <i>Biosynthèse de l'hème</i>	25
2.2.1. <i>Biosynthèse de l'hème chez les eucaryotes</i>	25
2.2.2. <i>Biosynthèse de l'hème chez les procaryotes</i>	27
2.3. <i>Le transport de l'hème</i>	28
3. LOCALISATION DES CYTOCHROMES DE TYPE C	28
4. FONCTIONS ASSUREES PAR LES CYTOCHROMES DE TYPE C	29
4.1. <i>Les cytochromes de type c eucaryotes</i>	29
4.1.1. <i>Transporteurs d'électrons dans le cadre de la respiration cellulaire</i>	29
4.1.2. <i>Transporteurs d'électrons dans le cadre de la photosynthèse</i>	30
4.1.3. <i>Signalisation cellulaire : rôle du cytochrome c dans la mort cellulaire programmée</i>	31
4.2. <i>Les cytochromes de type c procaryotes</i>	32
4.2.1. <i>Une particularité bactérienne : les cytochromes de type c multihèmes</i>	32
4.2.2. <i>Transporteurs d'électrons et catalyse enzymatique</i>	33

III. Les différentes voies d'assemblage des cytochromes de type c 35

1. PRINCIPES FONDAMENTAUX	35
2. ASSEMBLAGE DES CYTOCHROMES DE TYPE C SELON LE SYSTEME I.....	36
2.1. <i>Vue générale du système I</i>	36
2.1.1. <i>Le système I chez E. coli</i>	36
2.1.2. <i>Le système I dans les mitochondries de plantes</i>	37
2.2. <i>Voie de livraison de l'apocytochrome</i>	38
2.2.1. <i>Transport de l'apocytochrome</i>	38
2.2.2. <i>Contrôle redox de la maturation des cytochromes de type c</i>	39
2.2.2.1. <i>Une voie oxydatrice médiée par DsbA et DsbB</i>	39
2.2.2.2. <i>Une voie réductrice médiée par CcmG, CcmH et DsbD</i>	39

2.3. Voies de livraison de l'hème	41
2.3.1. Transport de l'hème à travers la membrane cytoplasmique	41
2.3.2. Voies de livraison de l'hème : CcmC, CcmD et CcmE.	43
2.3.2.1. CcmE, une chaperonne de l'hème	43
2.3.2.1. Rôles de CcmC et CcmD	44
2.4. Liaison de l'hème à l'apocytochrome : rôle de CcmF.	45
3. ASSEMBLAGE DES CYTOCHROMES DE TYPE C SELON LE SYSTEME II	46
3.1. Vue générale du système II.	46
3.2. Adressage des apocytochromes.	47
3.3. Rôles de CcsA et CcsI.	48
3.4. Un système redox : rôles de CcdA et ResA.	49
4. ASSEMBLAGE DES CYTOCHROMES DE TYPE C SELON LE SYSTEME III	50
4.1. Vue générale du système III.	50
4.2. Rôle des hème lyases dans l'import mitochondrial des apocytochromes de type c	50
4.2.1. Import de l'apocytochrome c.	50
4.2.2. Import et maturation de l'apocytochrome c ₁	51
4.3. Rôle des hème lyases dans la formation d'holocytochromes c et c ₁	52
4.3.1. Analyse des mutants de levure déficients en hème lyase	52
4.3.2. Mesure de l'activité hème lyase	53
4.3.3. Rôle des motifs conservés CPX	54
4.3.4. Import des hème lyases.	55
4.4. Pathologie associée à une déficience en hème lyase chez l'humain	55
4.5. Autres facteurs de maturation ?	56
6. FORMATION <i>IN VITRO</i> D'HOLOCYTOCHROME C.	58

IV. Problématique abordée au cours de la thèse 60

RESULTATS

Chapitre I : Etude de la spécificité de substrats des hème lyases 62

1. CADRE DE L'ETUDE	62
2. RESUME DE L'ARTICLE I :	63
1.1. Conversion de l'apocytochrome c ₁ en holocytochrome c ₁ médiée par la CCHL.	63
2.2. La surexpression de la CCHL compense l'absence de la CC ₁ HL.	63
2.3. L'hème lyase humaine peut assembler les cytochromes c et c ₁ chez la levure.	64
2.4. Des supprimeurs génétiques compensent l'absence de la CC ₁ HL	64
2.4.1. L'expression du cytochrome c ou de la CCHL est altérée chez les révertants récessifs.	64
2.4.2. Les mutations supprimeurs semi-dominantes touchent les gènes codant la CCHL et le cytochrome c ₁	65
2.5. Isolement de CYC2, supprimeur en copie multiple de l'absence d'hème c ₁ lyase.	66
2.6. Conclusion.	66
ARTICLE I	67
3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES	79
3.1. La mutation supprimeur <i>su19</i> ne toucherait pas le gène <i>HAP1</i>	79
3.2. Modification par mutagenèse dirigée du site muté chez le révertant <i>UV9</i> : variations sur un même thème	80
3.3. La suppression des mutants $\Delta cchl$ et Δcc_1hl médiée par l'hème lyase humaine (HCCS) ne dépend pas de la présence de <i>Cyc2p</i>	81
3.4. Une seconde recherche de supprimeurs multicopies.	82
4. CONCLUSION ET DISCUSSION AUTOUR DU CHAPITRE I	82

Chapitre II : Cyc2p, une flavoprotéine impliquée dans la maturation des cytochromes de type c. 85

1. CADRE DE L'ETUDE	85
2. RESUME DE L'ARTICLE 2	86
2.1. <i>Cyc2p est requise pour l'activité de la CCHL</i>	86
2.2. <i>Cyc2p devient essentielle pour la respiration quand le site de liaison à l'hème du cytochrome c₁ est modifié (CAPCH au lieu de CAACH)</i>	86
2.3. <i>Cyc2p est une flavoprotéine capable d'utiliser le NADPH comme donneur d'électrons</i>	88
2.4. <i>Cyc2p est associée à la membrane interne mitochondriale avec son domaine de liaison au FAD localisé dans l'espace intermembranaire</i>	88
2.5. <i>Conclusion, discussion et modèle fonctionnel</i>	89
2.5.1. <i>Cyc2p, un partenaire de la CCHL</i>	89
2.5.2. <i>Cyc2p, une flavoprotéine membranaire impliquée dans la réduction de l'hème ?</i>	90
2.5.3. <i>Modèle fonctionnel</i>	91
ARTICLE II.....	92
3. RESULTATS COMPLEMENTAIRES	101
3.1. <i>Recherche de nouveaux facteurs d'oxydoréduction mitochondriaux</i>	101
3.2. <i>Recherche de supprimeurs génétiques à partir du mutant $\Delta cyc2\ cyt1-34$</i>	102
3.3. <i>Essais de cristallisation de la protéine Cyc2p</i>	103
4. CONCLUSION DU CHAPITRE II.....	104

Chapitre III : Analyse des hème lyases par mutagenèse dirigée 105

1. ROLE DES MOTIFS CPV DE REGULATION PAR L'HEME DE LA CCHL.....	105
1.1. <i>Contexte de l'étude</i>	105
1.2. <i>Analyse du variant CCHL-ΔCPV dans un contexte $\Delta cyc2$</i>	105
1.3. <i>Effet de la surproduction de CCHL-ΔCPV dans le mutant Δcc_1hl</i>	106
2. ROLE DE CERTAINS RESIDUS DANS L'ACCROCHAGE DES HEME LYASES A LA MEMBRANE	107
2.1. <i>Contexte de l'étude</i>	107
2.2. <i>Analyse du variant G2A de l'hème lyase humaine (HCCS)</i>	108
2.2.1. <i>Méthodologie</i>	108
2.2.2. <i>Effet de la surproduction du variant G2A de HCCS chez la levure</i>	108
2.3. <i>Analyse des variants G2A et WFW₃₋₅:AAA₃₋₅ de la CCHL</i>	109
2.3.1. <i>Méthodologie</i>	109
2.3.2. <i>Effet des substitutions sur l'assemblage des cytochromes de type c</i>	110
2.3.3. <i>Effet des substitutions sur l'interaction à la membrane</i>	110
2.4. <i>Discussion</i>	111
3. AUTRES MUTATIONS TOUCHANT LE GENE CODANT LA CCHL.....	111
3.1. <i>Analyse de la substitution E143L de la CCHL</i>	111
3.2. <i>Mutations obtenues par des 'dommages collatéraux'</i>	112

Chapitre IV: Identification d'un complexe d'assemblage putatif ? 114

1. CONTEXTE DE L'ETUDE	114
2. MISE EN EVIDENCE D'UN COMPLEXE PROTEIQUE DE 300 KDA CONTENANT LA CCHL	114
2.1. <i>Procédure expérimentale</i>	114
2.2. <i>Détection d'un complexe de 300 kDa par BN-PAGE</i>	115
2.3. <i>Tentative d'identification des composants du complexe</i>	116
3. LA PROTEINE CYC2P-TAP MIGRERAIT AU NIVEAU DE DEUX SOUS-COMPLEXES.....	116
4. ESSAI PRELIMINAIRE DE PURIFICATION DU COMPLEXE DE 300 KDA CONTENANT LA CCHL	117
4.1. <i>Procédure expérimentale</i>	117
4.1.1. <i>Construction des souches</i> :	117

4.1.2. Purification du complexe en une étape à partir de la souche YDB6 (CCHL-TEV-protéineA-His ₆).....	117
4.2. Résultats préliminaires.....	118
5. CONCLUSION DU CHAPITRE IV.....	118

DISCUSSION ET PERSPECTIVES

I. Une vue nouvelle de l'assemblage des cytochromes de type *c* dans la mitochondrie chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. 121

1. FONCTIONS DES HEMES LYASES.	121
1.1. Fonction de la CCHL.	121
1.1.1. Activité cytochrome <i>c</i> hème lyase	121
1.1.2. Interaction de la CCHL et de l'hème.	122
1.2.3. Rôle de la CCHL dans l'import de l'apocytochrome <i>c</i>	122
1.2. La CCHL et la CC ₁ HL ont des propriétés différentes	123
1.3. Un complexe d'assemblage putatif ?	124
1.4. Comment poursuivre l'analyse de la CCHL ?	124
2. CONTROLE REDOX DE L'ASSEMBLAGE DES CYTOCHROMES DE TYPE C	125
2.1. Contexte de l'étude	125
2.2. Rôle de la réductase Cyc2p chez <i>S. cerevisiae</i>	125
2.2.1. Caractérisation de Cyc2p	126
2.2.2. Quel est le substrat de la flavoprotéine Cyc2p ?	126
2.2. Existe-il un homologue fonctionnel de Cyc2p chez l'homme ?	127
2.3. Comment poursuivre l'étude de la protéine Cyc2p ?	128
2.4. Les systèmes redox de l'espace intermembranaire mitochondrial.....	129
2.4.1. Un système d'échanges de ponts disulfures médié par Erv1p et Mia40p.	129
2.4.2. Le système thioredoxine/thioredoxine réductase (Trx3p et Trr2p).	130

II. Comparaison des trois systèmes de biogenèse des cytochromes *c* 131

1. COMMENT RELIER L'EXISTENCE DE CES TROIS SYSTEMES A LA PHYLOGENIE ?	131
2. COMMENT TROIS SYSTEMES DIFFERENTS PEUVENT PERMETTRE L'ASSEMBLAGE D'UNE HEMOPROTEINE UBIQUITAIRE?.....	133

BIBLIOGRAPHIE

&

ANNEXES

Liste des Figures

Figure 1. Coupe de mitochondries visualisées par microscopie électronique.	12
Figure 2. Images du réseau mitochondrial.	13
Figure 3. Représentation schématique de la chaîne respiratoire chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	15
Figure 4. Import et assemblage des protéines mitochondriales.	19
Figure 5. Les différents types d'hèmes.	22
Figure 6. Attachement covalent de l'hème aux cytochromes de type <i>c</i> .	23
Figure 7. Structure cristallographique de cytochromes de type <i>c</i> multihèmes bactériens.	24
Figure 8. Structure cristallographique du cytochrome <i>c</i> de cœur de cheval.	24
Figure 9. La chaîne de biosynthèse de l'hème.	25
Figure 10. Modèle d'interaction physique des trois dernières enzymes de biosynthèse de l'hème chez l'humain.	26
Figure 11. Localisation et fonctions des cytochromes de type <i>c</i> .	29
Figure 12. Comparaison des trois principaux systèmes de maturation des cytochromes de type <i>c</i> .	35
Figure 13. Modèle de maturation des cytochromes de type <i>c</i> chez <i>E. coli</i> (système I).	37
Figure 14. Modèle du contrôle redox de la maturation des cytochromes de type <i>c</i> chez <i>E. coli</i> .	39
Figure 15. Alignement de séquences de différentes oxydoréductases de la famille des thioredoxines au niveau du motif conservé CXXC chez <i>E. coli</i> .	40
Figure 16. Modèle d'interaction physique des sous-unités de l'appareil de maturation des cytochromes de type <i>c</i> dans le système I.	45
Figure 17. Modèle de maturation des cytochromes de type <i>c</i> dans le chloroplaste chez <i>Chlamydomonas reinhardtii</i> (système II).	46
Figure 18. Organisation générale du chloroplaste.	47
Figure 19. Modèle de maturation des cytochromes de type <i>c</i> dans la mitochondrie chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> (système III).	50
Figure 20. Modèle de maturation du cytochrome <i>c</i> ₁ dans la mitochondrie chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	51
Figure 21. Localisation spatiale des sites du cytochromes <i>c</i> modifiés chez certains révertants capables de supprimer le défaut respiratoire d'un mutant Δcc_1hl .	65
Figure 22. Comparaison des croissances respiratoires de différents mutants.	79
Figure 23. Transformation des mutants $\Delta cchl$ et Δcc_1hl par un plasmide multicopie exprimant la CC ₁ HL ou différentes versions de la CCHL.	80
Figure 24. Effet de certaines mutations du gène codant la CCHL sur l'accumulation d'holocytochrome <i>c</i> et sur la stabilité de la CCHL.	80
Figure 25. La substitution FL :QN de la CCHL affecte l'assemblage du cytochrome <i>c</i> .	80

Figure 26. La substitution FL :QN de la CCHL affecte la capacité de la protéine à compléter le mutant $\Delta cchl$.	81
Figure 27. Recherche de suppresseurs multicopies.	82
Figure 28. Structure cristallographique de la cytochrome <i>b5</i> réductase érythrocytaire humaine.	101
Figure 29. La délétion des gènes <i>CBR1</i> et <i>MCR1</i> n'aggrave pas le phénotype du mutant nul $\Delta cyc2$.	102
Figure 30. Essai de cristallisation du domaine soluble de la protéine Cyc2p.	104
Figure 31. Spectre d'absorption des cytochromes à basse température.	104
Figure 32. Effet de certaines mutations du gène codant la CCHL sur l'accumulation d'holocytochrome <i>c</i> et sur la stabilité de la CCHL.	104
Figure 33. Transformation des mutants $\Delta cchl$ et Δcc_1hl par un plasmide multicopie exprimant différentes versions de la CCHL.	105
Figure 34. La délétion des motifs CPV de la CCHL n'affecte pas la capacité de la protéine à compléter le mutant $\Delta cchl$.	106
Figure 35. La substitution G2A de l'hème lyase humaine n'affecte pas la capacité de la protéine à compléter les mutants $\Delta cchl$ et Δcc_1hl de levure.	108
Figure 36. Les substitutions G2A et WFW _{2,5} :AAA _{2,5} de la CCHL n'affectent pas l'assemblage des cytochromes de type <i>c</i> .	109
Figure 37. La surexpression de l'allèle $cchl_{WFW:AAA}$ ne supprime pas le mutant Δcc_1hl à 36°C.	110
Figure 38. Effet de la substitution WFW _{2,5} :AAA _{2,5} sur l'interaction de la CCHL à la membrane.	111
Figure 39. Spectre d'absorption des cytochromes à basse température de différents mutants <i>cchl</i> .	112
Figure 40. La CCHL migre au niveau d'un complexe de 300 kDa.	114
Figure 41. La CC ₁ HL ne semble pas former de complexe (dans les conditions où la CCHL se trouve associée à un complexe de 300 kDa).	114
Figure 42. La migration du complexe de 300 kDa ne semble pas modifiée dans un contexte $\Delta cyc2$ et Δcc_1hl .	114
Figure 43. Migration du cytochrome <i>c</i> dans des conditions natives.	115
Figure 44. Les gels en deux dimensions ne permettent pas de détecter les différents composants éventuels du complexe de 300 kDa.	116
Figure 45. La protéine Cyc2p-TAP migre au niveau des deux sous-complexes.	117
Figure 46. L'addition d'étiquettes en C-terminal de la CCHL et de Cyc2p n'altère pas la fonction de ces protéines.	118
Figure 47. Contrôle des différentes étapes de la purification du complexe contenant la CCHL-protéineA.	119
Figure 48. Alignement des séquences protéiques entre Cyc2p et la NAD(P)H cytochrome <i>b₅</i> réductase humaine.	127

Figure 49. Modélisation de la structure de Cyc2p à partir de la structure de la NAD(P)H cytochrome <i>b</i> ₅ réductase.	128
Figure 50. Import et repliement des petites protéines riches en cystéines dans l'espace intermembranaire mitochondrial.	129
Figure 51. Arbre phylogénétique construit à partir de l'analyse combinée de onze protéines mitochondriales.	132

Liste des tableaux

Tableau 1. Protéines mitochondriales essentielles à la viabilité cellulaire chez <i>Saccharomyces cerevisiae</i> .	17
Tableau 2. Nomenclature des gènes impliqués dans la maturation des cytochromes de type <i>c</i> dans le système I.	36
Tableau 3. Alignement de séquences des sites de liaison à l'hème de cytochromes de type <i>c</i> mitochondriaux issus de différentes espèces.	84
Tableau 4. Séquence du site de liaison à l'hème du cytochrome <i>c</i> ₁ des révertants obtenus (de façon indépendante) à partir du mutant $\Delta cyc2\ cyt1-34$, sur différents milieux respiratoires.	103
Tableau 5. Corrélation entre le nombre d'hème lyases et la présence du gène <i>CYC2</i> .	126
Tableau 6. Répartition des différents systèmes d'assemblage des cytochromes de type <i>c</i> .	131

Liste des annexes

Annexe 1. Alignements de séquences protéiques.	152
Annexe 2. Protocole : <i>Blue Native gels</i> .	166
Annexe 3. Protocole : <i>Large scale purification of complexes from CCHL-proteinA</i> .	169
Annexe 4. Génotypes des souches de levure construites ou utilisées au cours de ce travail.	171
Annexe 5. Liste des oligonucléotides utilisés pour des expériences de mutagenèse ou d'addition d'étiquettes.	174

- INTRODUCTION -

Les mitochondries, en contribuant à de nombreux processus biologiques, sont des organites essentiels à la viabilité de la cellule eucaryote. Outre leur rôle bien connu dans la production d'énergie sous forme d'ATP, les mitochondries sont impliquées dans une grande variété de processus métaboliques, dans le maintien de l'homéostasie ionique et dans certains aspects de la signalisation cellulaire - la mort cellulaire programmée illustre bien ce point. C'est ainsi que des défauts de fonctionnements mitochondriaux chez l'homme conduisent à une multitude de pathologies dont le cancer, le diabète, les cardiomyopathies et certaines maladies neuro-dégénératives. De récentes études intégratives et comparatives des protéomes de mitochondries de levure et d'humain estiment qu'environ 10 % des protéines humaines connues pour être associées à une pathologie seraient localisées dans la mitochondrie (Taylor *et al.*, 2003; Andreoli *et al.*, 2004; Prokisch *et al.*, 2004). Ces études de protéomique suggèrent également que les mitochondries de mammifères et de champignons comportent approximativement un millier de protéines différentes. La levure *Saccharomyces cerevisiae* contiendrait 750 protéines mitochondriales, ce qui représenterait environ 10% du protéome de cet organisme (Sickmann *et al.*, 2003). Seulement la moitié des protéines mitochondriales a été caractérisée pour leur fonction, ce qui laisse entrevoir de nouveaux mécanismes à découvrir. La majorité des protéines mitochondriales étant codée par le génome nucléaire, et seulement de l'ordre d'une dizaine par le génome mitochondrial, des mécanismes régulés d'adressage mitochondrial, d'import, de repliement et d'assemblage de l'ensemble de ces protéines ont été mis en place au cours de l'évolution.

Mon travail de thèse se situe dans ce cadre général qui vise à mieux comprendre les mécanismes d'assemblage des protéines mitochondriales, en prenant pour exemple une classe d'hémoprotéines ubiquitaires, les cytochromes de type *c*. Ces molécules sont présentes dans la plupart des organismes vivants, associées à des compartiments subcellulaires variés, et assurent des fonctions diverses. De façon surprenante, bien que ces molécules soient extrêmement conservées, plusieurs voies d'assemblage distinctes des cytochromes de type *c* coexistent dans le monde vivant, soulevant en particulier des questions d'ordre phylogénétique.

En guise d'introduction, je commencerai par vous présenter la mitochondrie en tant qu'organe compartimenté, dynamique et essentiel. L'objectif de cette partie n'est pas de présenter une liste exhaustive des différentes fonctions assurées par la mitochondrie mais

plutôt de proposer au lecteur un cadre général à l'étude des cytochromes de type *c* mitochondriaux, chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*. Je m'attarderai ensuite sur les principales caractéristiques et fonctions des cytochromes de type *c* à travers l'ensemble du monde vivant (procaryotes, eucaryotes unicellulaires, organismes pluricellulaires). Enfin, je vous présenterai un état des lieux des connaissances obtenues sur les différentes voies d'assemblage des cytochromes de type *c*. J'essayerai alors de vous convaincre de l'intérêt d'étudier l'assemblage des cytochromes de type *c* mitochondriaux chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

I. La mitochondrie

1. La mitochondrie, un organe compartimenté et dynamique

1.1. Origine endosymbiotique

Des analyses phylogénétiques s'appuyant sur le nombre croissant de séquences complètes disponibles de génomes procaryotes, mitochondriaux et nucléaires, semblent désigner les α -proteobactéries comme les plus proches parents des mitochondries. La conservation des fonctions de production d'ATP et de traduction des protéines mitochondriales dans tous les génomes mitochondriaux ont notamment permis de retrouver les traces de cet ancêtre. Ces données renforcent l'hypothèse selon laquelle la mitochondrie proviendrait de l'internalisation d'une α -proteobactérie ancestrale, parasite intracellulaire obligatoire, par une cellule pro-eucaryotique. La bactérie *Rickettsia prowazekii* serait le plus proche parent de l'ancêtre endosymbiote bactérien (Gray *et al.*, 2001). Des études génomiques semblent par ailleurs montrer que le génome mitochondrial ne serait apparu qu'une seule fois au cours de l'évolution, et que les génomes mitochondriaux et nucléaires auraient évolué de concert au cours de l'histoire évolutive des eucaryotes, avec des transferts de gènes depuis la mitochondrie jusqu'au noyau. Les génomes mitochondriaux ont pu diverger et subir des processus évolutifs indépendants, comme en témoignent les disparités dans le nombre de gènes mitochondriaux codant des protéines : 67 gènes mitochondriaux chez le protiste *Reclinomonas americana* et seulement 3 chez les apicomplexes, protistes parasites stricts (pour exemple, *Plasmodium falciparum*).

Je terminerai ce paragraphe sur une curiosité évolutive, les hydrogénosomes. Ces organelles à double membrane, productrices d'ATP et de H₂ par voie fermentaire, se trouvent chez les eucaryotes anaérobiques dépourvus de mitochondries. La relation phylogénétique entre les mitochondries et ces hydrogénosomes n'est toujours pas éclaircie, malgré la récente découverte d'un hydrogénosome pourvu d'ADN (Boxma *et al.*, 2005; Martin, 2005).

1.2. Les compartiments mitochondriaux

La mise au point de la microscopie électronique a permis de connaître, dans les années 1950, l'organisation de la mitochondrie, organe à deux membranes phospholipidiques définissant deux compartiments aqueux: l'espace intermembranaire et la matrice (Figure 1). J'ai choisi de vous présenter brièvement les différents compartiments mitochondriaux chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, organisme modèle de référence.

La membrane externe présente une perméabilité peu sélective du fait de la présence de porines, protéines permettant la diffusion de petites molécules (jusqu'à 8kDa). Chez *S. cerevisiae*, deux isoformes de porines coexistent : (1) la porine Por1p, majoritaire, principale voie de flux de métabolites entre le cytoplasme et la mitochondrie (2) la porine Por2p, faiblement exprimée. Les complexes multiprotéiques impliqués dans l'import des protéines mitochondriales, parmi lesquelles la translocase de la membrane externe (TOM), porte d'entrée de la majorité des polypeptides mitochondriaux, sont également situés dans cette membrane. La majorité des protéines impliquées dans le contrôle de la morphologie mitochondriale sont également associées à la membrane externe.

Puisque les petites molécules traversent librement la membrane externe à travers les porines, l'espace intermembranaire a une composition ionique proche de celle du cytoplasme. Parmi les protéines de l'espace intermembranaire, citons en premier lieu celles étudiées au cours de ce travail de thèse, à savoir le cytochrome *c*, soluble, ainsi que le cytochrome *c*₁, les hème lyases et la flavoprotéine Cyc2p, associés à la membrane interne. Des protéases sont également localisées dans ce compartiment aqueux, parmi lesquelles les protéases Yme1p, Imp1p et Imp2p, associées à la membrane interne. Mentionnons également la L-lactate déshydrogénase (cytochrome *b*₂) qui utilise le cytochrome *c* comme accepteur d'électrons, la NADH-cytochrome *b*₅ réductase dont une isoforme est également présente dans la membrane externe (Haucke *et al.*, 1997) et la cytochrome *c* peroxydase qui catalyse la destruction des radicaux libres dérivés de l'oxygène.

La membrane interne, particulièrement riche en protéines, comprend les complexes respiratoires, l'ATP synthétase et une quarantaine de transporteurs spécifiques dont le transporteur ADP-ATP. Ces derniers sont responsables du contrôle strict de la perméabilité de la membrane interne, évitant ainsi toute fuite de protons. La surface de la membrane interne est considérablement élargie par la présence d'invaginations, les crêtes, chacune d'entre elles pouvant former des connexions avec la membrane externe. Certains suggèrent que les points de contact physique ainsi établis entre les deux membranes pourraient avoir une signification biologique, en particulier pour l'import de protéines ou le passage de métabolites (Mannella, 2005). La quantité et la forme des crêtes varient selon l'activité métabolique de la cellule. L'ATP synthétase serait impliquée dans la modulation de la morphologie des crêtes puisque des mutations dans les gènes codant les sous-unités *e* et *g* du domaine membranaire Fo de l'ATP-synthétase, requises pour l'oligomérisation, conduisent à des membranes mitochondriales en forme de pelures d'oignon (Paumard *et al.*, 2002). Le même type de phénotype a été observé suite à l'inactivation de la mitofiline, une protéine récemment

caractérisée qui semble être directement impliquée dans le contrôle de la morphologie des crêtes (figure 1 et John *et al.*, 2005).

La matrice contient l'ADN mitochondrial, présent en plusieurs exemplaires et ancré à la membrane interne, ainsi que tous les facteurs permettant son expression autonome (réplication, transcription, maturation, épissage et traduction). Les enzymes du cycle de Krebs, générateur de pouvoir réducteur, les enzymes d'oxydation des acides aminés et les enzymes permettant l'oxydation des acides gras sont également situées dans ce compartiment. Des chaperonnes et des protéases sont également présentes pour assurer le repliement de protéines en cours de maturation. Les enzymes de biosynthèse des groupements [Fe-S] sont elles aussi localisées dans la matrice.

1.3. Morphologie et dynamique mitochondriale

La mitochondrie (du grec *mitos* : filament et *khondros* : grain) porte bien son nom. Représentées traditionnellement sous la forme de *grain*, les mitochondries sont en réalité des organites dynamiques formant des *filaments* allongés et ramifiés, changeant régulièrement de forme, de taille et de position, selon l'état physiologique de la cellule (Figure 2). Ce réseau mitochondrial hautement dynamique est appelé chondriome. Des approches génétiques chez la levure de boulangerie identifiaient, dans les années 1990, les premières protéines requises pour la formation des tubules, la distribution et la morphologie mitochondriale. La dynamique du réseau mitochondrial serait en particulier contrôlée par deux mécanismes opposés : la fusion et la division (revue : Okamoto and Shaw, 2005). Alors que les facteurs impliqués dans le contrôle de la forme tubulaire des mitochondries semblent restreints aux champignons, la plupart des protéines régulant la fusion et la fission chez la levure, en particulier des GTPases, se trouvent conservées au cours de l'évolution. Outre l'intérêt certain en recherche fondamentale, l'étude de la dynamique mitochondriale présente des retombées en santé publique. En effet, des mutations provoquant des défauts de dynamique mitochondriale chez l'homme ont été identifiées comme étant la cause de désordres neurologiques (ADOA, autosomal dominant optic atrophy ; CMT2A Charcot-Marie-Tooth neuropathy type 2A). De surcroît, chez les eucaryotes pluricellulaires, les protéines impliquées dans la fusion et la fission, en modifiant la morphologie de la mitochondrie, pourraient réguler les étapes précoces de la mort cellulaire programmée. Il serait également intéressant de comprendre comment toutes ces voies pourraient interagir avec d'autres processus mitochondriaux incluant l'import, l'assemblage des complexes et la maintenance de l'ADN mitochondrial.

2. Fonction énergétique de la mitochondrie

L'étude approfondie de la fonction respiratoire chez les eucaryotes a été facilitée par l'utilisation d'un organisme modèle particulièrement approprié, la levure *Saccharomyces cerevisiae*, champignon unicellulaire aérobique facultatif. Cette levure représente en effet un excellent modèle pour l'étude des fonctions mitochondriales car contrairement à la plupart des organismes, des mutants mitochondriaux ou nucléaires affectant la respiration sont viables sur un milieu contenant du glucose, la synthèse d'ATP pouvant être entièrement assurée par la fermentation. Cette propriété a permis d'isoler les premiers mutants respiratoires en 1955 (Ephrussi and Slonimski, 1955).

2.1. Principe de la phosphorylation oxydative

La production d'énergie par la phosphorylation oxydative requiert une machinerie dans laquelle cinq complexes multiprotéiques coopèrent pour transformer l'énergie libérée par l'oxydation de substrats carbonés en une forme d'énergie directement utilisable par la cellule, l'ATP. La mitochondrie constitue ainsi le principal fournisseur d'ATP de la cellule. La théorie chimiosmotique développée par Mitchell (prix Nobel de chimie en 1978) établit l'existence d'un couplage entre l'acidification de l'espace intermembranaire et la synthèse d'ATP dans la membrane interne mitochondriale. La phosphorylation oxydative consiste en deux phénomènes étroitement couplés :

(1) des molécules à fort pouvoir réducteur, le NADH et le FADH₂ (produits par la glycolyse, le cycle de Krebs et l'oxydation des acides gras), sont oxydées par la chaîne respiratoire de transports d'électrons qui transfère les électrons du NADH et du FADH₂ à l'oxygène moléculaire. Ce flux d'électrons est utilisé pour véhiculer des protons de la matrice vers l'espace intermembranaire et établir ainsi un gradient de protons à travers la membrane interne mitochondriale.

(2) l'énergie libre constituée par le gradient de protons est alors couplée à la synthèse d'ATP grâce au fonctionnement de l'ATP synthétase, véritable moteur moléculaire.

C'est ainsi que 38 molécules d'ATP peuvent être produites par la mitochondrie au cours de l'oxydation d'une seule molécule de glucose. Ce bilan énergétique est à comparer à celui de l'oxydation d'une molécule de glucose par la voie fermentaire : seules 2 molécules

d'ATP sont produites suite à la fermentation lactique chez l'homme ou suite à la fermentation alcoolique chez la levure.

2.2. Organisation de la chaîne respiratoire

Cinq complexes respiratoires de haut poids moléculaire sont présents au niveau de la membrane interne : la NADH deshydrogénase, la succinate deshydrogénase, le complexe bc_1 , la cytochrome oxydase et l'ATP synthétase. Une autre nomenclature les qualifie respectivement de complexes I, II, III, IV et V. La description brève de ces complexes aura pour objectif de situer le rôle du cytochrome c et du cytochrome c_1 au sein de la chaîne respiratoire (Figure 3).

Les réactions d'oxydo-réduction réalisées au sein de ces complexes respiratoires sont assurées par des groupements prosthétiques de quatre types : les groupements flavine (FMN dans le complexe I et FAD dans le complexe II), les centres fer-soufre, les atomes de cuivre et enfin, les groupements hémiques : hèmes b dans les complexes II et III, hèmes a dans le complexe IV et hème c dans le cytochrome c_1 du complexe III et dans le cytochrome c .

Suivons maintenant le trajet effectué par les électrons. Le NADH généré par le cycle de Krebs fournit ses électrons au complexe I. Ce complexe est constitué d'une quarantaine de sous-unités chez l'homme mais n'existe pas chez la levure *S. cerevisiae* où seules trois NADH deshydrogénases non-couplées à une translocation de protons ont été mises en évidence (Kitajima-Ihara and Yagi, 1998). Les électrons sont ensuite transférés au pool de quinones.

L'oxydation du succinate en fumarate, catalysée par le complexe II, enzyme membranaire du cycle de Krebs constituée de quatre sous-unités, permet également le transfert d'électrons jusqu'au pool de quinones.

Les quinones ainsi réduites transfèrent leurs électrons au complexe III, constitué de dix sous-unités différentes (présentes en deux exemplaires, formant ainsi un dimère) dont trois sous-unités catalytiques : le cytochrome b , la protéine de Rieske et le cytochrome c_1 . Ce dernier interagit directement avec le cytochrome c , petite hémoprotéine soluble (12kDa) de l'espace intermembranaire servant de navette moléculaire pour le transfert des électrons du complexe III au centre Cu_A du complexe IV. Le complexe IV est constitué de onze sous-unités dont deux ont un rôle catalytique : Cox1p qui porte les hèmes a , a_3 et un atome de cuivre (Cu_B) et Cox2p qui fixe deux atomes de cuivre (Cu_A). L'oxygène moléculaire est l'accepteur final d'électrons. Ces transferts d'électrons sont couplés à une translocation de protons de la matrice vers l'espace intermembranaire, au niveau des complexes III et IV.

Enfin, l'ATP synthétase, composée de deux sous-complexes Fo et F1, permet la synthèse de l'ATP grâce à l'énergie fournie par le gradient de protons. Le sous-complexe membranaire Fo, composé de huit sous-unités, constitue le canal à protons tandis que le sous-complexe F1, composé de six sous-unités et localisé dans la matrice, porte l'activité catalytique. L'ATP synthétase représente un remarquable exemple de moteur moléculaire dont la meilleure compréhension de la structure et du mécanisme a fait l'objet du prix Nobel de chimie en 1997 (John Walker et Paul Boyer).

2.3. Origine génétique mixte et biogenèse des complexes respiratoires

Chez *S. cerevisiae*, huit des neuf protéines codées par le génome mitochondrial sont des sous-unités de la chaîne respiratoire (la neuvième protéine étant une protéine ribosomale). Il s'agit du cytochrome *b* du complexe III, des trois sous-unités Cox1p, Cox2p, Cox3p du complexe IV ainsi que des trois sous-unités de la partie Fo de l'ATP synthétase : Atp6p, Atp8p et Atp9p. Les complexes respiratoires sont donc composés de sous-unités codées en minorité par le génome mitochondrial (sous-unités particulièrement hydrophobes) et en majorité par le génome nucléaire. Cette origine génétique mixte suppose l'existence de mécanismes moléculaires permettant la coordination de l'assemblage de polypeptides provenant de compartiments cellulaires différents.

L'assemblage des complexes respiratoires se trouve donc sous la dépendance de gènes nucléaires qui codent non seulement la plupart des sous-unités des enzymes respiratoires mais également de nombreux facteurs protéiques annexes indispensables à l'élaboration de ces édifices supramoléculaires. A titre d'exemple, la protéine Oxa1p agirait comme une machinerie d'insertion de certaines protéines membranaires mitochondriales (Saint-Georges *et al.*, 2001). De récentes études proposent que les complexes respiratoires soient spécifiquement associés pour former des structures supramoléculaires appelées supercomplexes, introduisant ainsi un niveau de complexité supplémentaire (Schagger and Pfeiffer, 2000; Dudkina *et al.*, 2005).

3. Fonctions essentielles de la mitochondrie

Bien que la fonction respiratoire soit facultative chez la levure *S. cerevisiae* (ce qui n'est pas le cas des mammifères pour qui la respiration est une fonction essentielle), l'intégrité de la mitochondrie ainsi que sa transmission au cours des divisions cellulaires sont essentielles à la survie de la cellule.

3.1. Analyse des protéines mitochondriales essentielles à la viabilité cellulaire.

Une multitude de données obtenues suite à l'étude du protéome mitochondrial de levure (Sickmann *et al.*, 2003; Prokisch *et al.*, 2004), du projet de délétion systématique des 6000 gènes de levure et de la localisation des produits de ces gènes, a été analysée et intégrée au sein d'une base de données nommée Mito2p (Andreoli *et al.*, 2004) que vous pouvez consulter sur le site <http://ihg.gsf.de/mitop2/start.jsp>. Cet outil permet d'accéder à des données selon des critères précis de recherche. Par exemple, si vous recherchez sur ce site toutes les protéines localisées dans la mitochondrie (d'après Sickmann *et al.*) et essentielles à la viabilité cellulaire sur milieu complet (d'après le projet de délétion systématique) vous en trouverez une cinquantaine. Toutefois, l'étude plus approfondie, basée sur les données fournies par la littérature, des protéines ainsi sélectionnées m'a permis d'en retenir une quarantaine, présentées dans le tableau 1 et regroupées selon des classes fonctionnelles. Parmi celles-ci figurent des protéines impliquées dans des mécanismes que je qualifierais de *généraux* : la machinerie d'import (quatorze facteurs essentiels), la maturation et le repliement de précurseurs mitochondriaux (protéases et chaperonnes). Enfin, curieusement, bien que la traduction mitochondriale ne soit pas essentielle à la viabilité cellulaire chez *S. cerevisiae*, 4 protéines mitochondriales ribosomales apparaissent essentielles. Cette observation suggérerait un rôle supplémentaire de ces sous-unités ribosomales dans une autre fonction essentielle. On peut également envisager l'hypothèse que ces protéines présentent une double localisation cellulaire et que la caractéristique essentielle serait due à la fonction assurée par ces protéines dans cet autre compartiment (le cytoplasme).

Parmi les protéines essentielles assurant une fonction que je qualifierais de plus *spécifique* apparaissent des enzymes de la biosynthèse de l'hème. La survie des mutants obtenus suite à la délétion des gènes codant ces protéines peut cependant être restaurée sur un milieu de culture contenant du tween et de l'ergostérol. Un certain nombre de protéines impliquées dans l'homéostasie du fer et la maturation des groupements Fer-Soufre

apparaissent également essentielles; ce point sera développé un peu plus loin. La fonction de la sulfhydryl oxydase Erv1p, localisée dans l'espace intermembranaire, reste encore spéculative. De récentes études proposent toutefois un rôle de Erv1p dans l'assemblage des groupements Fer-Soufre (pour revue, Lill and Muhlenhoff, 2005) et dans la maturation des petites protéines de l'espace intermembranaire, en association avec la protéine Mia40 (Rissler *et al.*, 2005).

Dans les paragraphes suivants, je développerai les aspects de la biologie de la mitochondrie qui, me semble-t-il, pourront enrichir la réflexion sur l'étude de la maturation des cytochromes de type *c* mitochondriaux. Je vous propose donc une vue d'ensemble de l'import des protéines mitochondriales, puis un exemple d'assemblage de protéines mitochondriales à cofacteur, les protéines [Fe-S], et enfin la présentation des dernières étapes de la biosynthèse de l'hème.

3.2. Import des protéines mitochondriales.

Les protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire sont synthétisées dans le cytoplasme par des polyribosomes sous la forme d'un précurseur, maintenues dans une structure compétente pour leur translocation par des protéines chaperonnes (Hsp70, Nfs1) puis importées dans la mitochondrie de façon post-traductionnelle. Près de la moitié des ARN messagers codant des protéines mitochondriales seraient toutefois traduits par des polyribosomes associés à la mitochondrie (Sylvestre *et al.*, 2003b; Margeot *et al.*, 2005). Les signaux d'adressage de ces ARNm à proximité de la mitochondrie sont contenus, au moins en partie, dans la région 3' UTR de ces ARNm (Corral-Debrinski *et al.*, 2000; Sylvestre *et al.*, 2003a). Il a été proposé que la localisation du site de traduction de certaines protéines mitochondriales au niveau de la mitochondrie pourrait favoriser certaines étapes de leur import (Margeot *et al.*, 2005).

Il est désormais clair que plusieurs voies distinctes d'import coexistent. L'utilisation d'une de ces voies dépend de la destination finale de la protéine au sein de l'organelle. La translocase de la membrane externe (le complexe TOM) représente cependant la voie d'entrée commune à tous les précurseurs mitochondriaux codés par le noyau. Ce complexe de 450 kDa, composé de sept sous-unités, comporte en particulier la protéine essentielle Tom40, véritable pore moléculaire, et les récepteurs Tom 22, Tom20 et Tom70. Les précurseurs sont ensuite dirigés vers l'une des quatre principales voies d'import présentées dans la figure 4 et résumées ci-dessous (pour revues : Rehling *et al.*, 2004; Pfanner *et al.*, 2004) :

(1) les préprotéines possédant une préséquence d'adressage mitochondrial utilisent la translocase de la membrane interne, nommée également complexe Tim23. La pré-séquence d'adressage mitochondrial est généralement située en N-terminal, de longueur variable¹ et caractérisée par la présence de résidus chargés positivement et capables de former une hélice amphiphile. Le complexe Tim 23, qui permet l'insertion transitoire des précurseurs dans la membrane interne, coopère avec un moteur moléculaire, le complexe PAM (presequence-translocase-associated import motor) dont le composant central est la protéine chaperonne mtHsp70. La pré-séquence est ensuite clivée par une protéase matricielle.

Cette voie, qui requiert de l'énergie sous forme d'ATP ainsi qu'une différence de potentiel ($\Delta\psi$) de part et d'autre de la membrane interne, concerne essentiellement les protéines de la matrice. Toutefois, certaines protéines de la membrane interne, comme le cytochrome c_1 , ou de l'espace intermembranaire, comme le cytochrome b_2 ou la cytochrome b_5 réductase, pourront suivre partiellement cette voie. Les protéines de l'espace intermembranaire ainsi importées subissent deux clivages protéolytiques successifs : la séquence signal d'adressage à la matrice est d'abord coupée dans la matrice par la protéase MPP (Mitochondrial Processing Peptidase) puis la séquence signal hydrophobe (permettant l'arrêt du transport vers la matrice) est à son tour clivée par une protéase spécifique, située dans l'espace intermembranaire, libérant ainsi la protéine mature dans ce compartiment.

(2) Les protéines de la membrane interne possédant de multiples segments transmembranaires et une séquence d'adressage interne (par exemple, l'ADP/ATP transporteur), sont guidées dans l'espace intermembranaire par des complexes composés de petites protéines Tim (Tim9-Tim10) jouant le rôle de chaperonnes afin d'éviter tout risque d'agrégation, puis sont insérés dans la membrane interne par le complexe Tim22. Cette voie est également $\Delta\psi$ -dépendante.

(3) Les protéines de la membrane externe présentant des structures en tonneaux β (par exemple, la porine) sont transférées vers le complexe SAM (Sorting and Assembly Machinery) qui permet l'insertion de ces protéines dans la membrane externe. Cette voie est indépendante du potentiel de membrane.

(4) Une voie spécifique d'import des petites protéines de l'espace intermembranaire a tout récemment été identifiée. Les petites protéines sont caractérisées par une masse moléculaire inférieure à 20kD et une richesse en résidus cystéines probablement impliqués dans la formation de ponts disulfures ou dans la liaison à un ion métallique type zinc ou

¹ entre 10 et 80 acides aminés environ (Pfanner, N. (2000) Protein sorting: recognizing mitochondrial presequences. *Curr Biol*, 10, R412-415.)

cuivre (pour exemple : Cox17, Cox19, Tim9, Tim10...). Cette voie, indépendante du potentiel de membrane, requiert la protéines Mia40 et l'oxydase Erv1, essentielles à la viabilité cellulaire (Rissler *et al.*, 2005; Mesecke *et al.*, 2005). Notez que l'import du cytochrome *c* ne dépend pas de cette voie (Wiedemann *et al.*, 2003b).

Enfin, des connexions entre machinerie d'import et dynamique mitochondriale sembleraient exister. En effet, de récentes études menées chez la levure (Meisinger *et al.*, 2004) montrent que Mdm10p, un composant du complexe MMM (Mmm1p-Mdm10p-Mdm12p) impliqué dans la formation de tubules, serait également requis pour la formation du complexe SAM et jouerait un rôle spécifique dans des dernières étapes de l'assemblage du complexe TOM.

3.3. Assemblage des protéines à groupement fer-soufre

Les protéines à cofacteur [Fe-S] sont des métalloprotéines ubiquitaires impliquées dans de nombreux processus cellulaires : transport d'électrons, catalyse enzymatique, régulation de l'expression génique. Les groupements [Fe-S] les plus répandus ont une stoechiométrie de type [2Fe-2S] ou [4Fe-4S]. Depuis une dizaine d'années, un effort tout particulier a été dédié à l'étude de la maturation des groupements [Fe-S] dans la mitochondrie et à leur insertion dans l'apoprotéine (pour revues : Balk and Lill, 2004; Lill and Muhlenhoff, 2005; Rouault and Tong, 2005).

Des études préliminaires *in vitro*, basée sur la reconstitution d'une protéine [Fe-S] à partir d'apoprotéine, de sel de fer, d'ion sulfide inorganique S^{2-} et d'agent réducteurs (sulfhydryl) en conditions d'anaérobiose, ont longtemps fait penser que les groupements [Fe-S] pouvaient s'assembler spontanément. Ce type de protocole ne peut cependant pas être concevable dans une cellule vivante en raison de la toxicité du $Fe^{2+/3+}$ et du S^{2-} et des paramètres cinétiques de cet assemblage (la réaction étant très lente *in vitro*). En réalité, des enzymes spécifiques sont requises à différentes étapes de la biogenèse d'une protéine [Fe-S] incluant : la formation du groupement [Fe-S], l'insertion dans l'apoprotéine et le maintien de ces structures. La plupart des connaissances sur les premières étapes de l'assemblage des protéines [Fe-S] ont été obtenues chez la levure de boulangerie. Chez cet organisme, la mitochondrie représente le site principal de synthèse des groupements [Fe-S]. L'organite est également requis pour la maturation de protéines [Fe-S] extramitochondriales. Environ 12 protéines mitochondriales, majoritairement matricielles, sont impliquées dans l'assemblage

des groupements [Fe-S]. La majorité de ces protéines ont été identifiées suite à des recherches d'homologie avec l'opéron bactérien *isc* (pour iron-sulfur clusters).

La plupart des connaissances obtenues jusqu'à présent concerne essentiellement l'étape de formation des groupements [Fe-S] qui comprend en particulier : un donneur de soufre (la cystéine desulfurase Nfs1p) associé à un système redox (Yah1p, Arh1p), un donneur de fer (la frataxine Yfh1p) et un échafaudage protéique (Isu1p/Isu2p) permettant d'assembler les groupements [Fe-S]. En revanche, le processus d'insertion du groupement Fe-S dans l'apoprotéine reste encore spéculatif. Il se peut que la protéine chaperonne Ssq1p et sa cochaperonne Jac1p, qui semblent spécifiquement dédiées à l'assemblage de ces groupements, puissent faciliter l'insertion du cofacteur dans l'apoprotéine correspondante. Ces chaperonnes agiraient en aval de Isu1p/Isu2p puisqu'une diminution de Ssq1p ou Jac1p conduit à l'accumulation de groupement [Fe-S] dans l'échafaudage formé par Isu1p/Isu2p (Muhlenhoff *et al.*, 2003).

3.4. Les dernières étapes de la biosynthèse de l'hème

Le caractère « essentiel à la viabilité cellulaire » des gènes codant les enzymes de biosynthèse de l'hème est à relativiser dans la mesure où de tels mutants peuvent pousser sur un milieu contenant du tween-ergostérol, une source d'acides gras insaturés qui ne sont pas synthétisés dans les mutants (hem⁻) en raison de l'absence des cytochromes P450 du réticulum endoplasmique. La fonction essentielle de l'hème est en réalité 'extra-mitochondriale'.

La biosynthèse de l'hème requiert la coopération des compartiments cytoplasmiques et mitochondriaux. Cet aspect, d'intérêt certain pour l'étude de la maturation des cytochromes de type *c*, sera largement développé dans la prochaine partie.

II. Les cytochromes de type *c*.

1. Définition

1.1. Historique de la découverte du pigment

Les cytochromes ont été découverts à la fin du 19^{ème} siècle par le docteur irlandais C.A. Mac Munn (1852-1910), suite à des observations au microscope de lame de tissus compressés provenant d'organismes très différents (mollusques, insectes, reptiles, humain, etc...). Le docteur Mac Munn a ainsi pu observer la présence de pigments colorés, universels et présentant des caractéristiques spectrales similaires; il baptisa alors ces molécules de myohématine et d'histohématine (C.A. Mac Munn, 1886). Puis il aura fallu attendre quarante années, en 1925, avant que le biologiste David Keilin (1887-1963) de l'Université de Cambridge ne redécouvre les travaux de Mac Munn. Keilin caractérisa les mêmes types de pigments, à partir d'échantillons biologiques variés, vérifiant ainsi les premières observations faites par son prédécesseur. Le terme *cytochrome* (du grec *kutos* cellule et *khroma* couleur) fut alors introduit pour désigner ces pigments cellulaires. David Keilin fut également le premier à proposer un rôle des cytochromes dans la fonction respiratoire, dans le cadre de son article intitulé « On Cytochrome, A respiratory Pigment Common to Animals, Yeast and Higher Plants ».

1.2. Classification des cytochromes²

Les cytochromes sont des hémoprotéines contenant un ou plusieurs hèmes dont l'état d'oxydation alterne entre Fe(II) et Fe(III) au cours du transfert d'électrons : les cytochromes transfèrent par conséquent un seul électron à la fois. La forme réduite des cytochromes présente un spectre d'absorption caractéristique dans le domaine du visible, avec la présence de trois bandes d'absorption (α , β , γ ou bande de Soret). Le pic de la région α fut utilisé par David Keilin pour définir les cytochromes de type *a*, *b* et *c*. A titre d'exemple, les cytochromes de type *c* ont un pic d'absorption maximal (pic α) compris entre 550 nm et 555 nm.

Les atomes d'azote des quatre noyaux pyrroles de la porphyrine (la protoporphyrine IX, également présente dans l'hémoglobine) ainsi qu'un ou deux ligands axiaux coordonnent

² consulter le site suivant <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/CYTOCHROMES.html>

l'atome de fer, situé en position centrale. Les ligands axiaux sont généralement fournis par les atomes d'azote ou de soufre provenant respectivement d'un résidu histidine ou méthionine de l'apoprotéine. Tous ces cytochromes diffèrent principalement par le type d'hème auquel ils sont associés, par la nature des ligands axiaux et par le mode d'attachement de l'hème à l'apocytochrome, et présentent donc des propriétés spectrales et redox différentes. Les potentiels redox dépendent également de l'environnement protéique local du groupement prosthétique.

Les figures 5 et 6 représentent la formule développée de différents types d'hème. Tous diffèrent par la nature des groupements périphériques de la porphyrine. Par exemple, l'hème A diffère de l'hème B du fait qu'un groupe méthyle est oxydé en un groupe formyle et du fait qu'une des chaînes vinyles est remplacée par un isoprénoloïde (farnésyle).

1.3. Les cytochromes de type *c*

Contrairement aux cytochromes de type *b* pour lesquels l'hème est maintenu associé à l'apocytochrome par de multiples interactions faibles (hydrophobe, électrostatique...), les cytochromes de type *c* sont caractérisés par l'attachement covalent du cofacteur hémique sur l'apocytochrome, au niveau d'une séquence conservée de type CXXCH. Deux liaisons thioethers sont ainsi formées entre le groupement thiol des cystéines du polypeptide et le carbone α des chaînes vinyles de l'hème, comme indiqué dans la figure 6. Dans certaines situations tout à fait exceptionnelles, l'attachement de l'hème se fait au niveau d'un motif de type CXXXCH ou CXXXXCH ou CXXCK ou par une seule liaison thioether au niveau d'un motif A/FXXCH, chez le groupe des Euglenozoa (par exemple *Trypanosoma brucei*, *Leishmania major*, *Euglena gracilis*) (Stevens *et al.*, 2004; Allen *et al.*, 2003). Les ligands axiaux de l'hème C sont l'histidine et habituellement une méthionine (pour les cytochromes de type *c* mitochondriaux et bactériens mono-hème) ou une autre histidine (pour les cytochromes de type *c* bactériens multi-hèmes). Chez les bactéries, le nombre de groupements hème par chaîne polypeptidique s'étendrait de 1 à 34 (chez *Geobacter sulfurreducens*) constituant, dans ce dernier cas, de véritables poches à hèmes.

La structure du cytochrome *c* mitochondrial de levure ou d'humain (Louie and Brayer, 1990; Bushnell *et al.*, 1990) ne présente aucune ressemblance avec celle des cytochromes *c* multihèmes, hormis le positionnement de l'hème et l'organisation du motif CXXCH. Les figures 7 et 8 représentent respectivement les structures cristallographiques de cytochromes de type *c* multihèmes bactériens et du cytochrome *c* de coeur de cheval.

Une question souvent soulevée au cours de ces dernières années concerne l'intérêt d'avoir une liaison covalente entre l'hème et l'apocytochrome (Stevens *et al.*, 2004). Wood fut le premier à proposer que l'attachement covalent soit un moyen d'éviter la perte du cofacteur hémique par dissociation (Wood, 1983 FEBS lett). Du fait que beaucoup d'hémoprotéines du milieu intra- et extracellulaire possèdent un hème sans attachement covalent, cet argument fut cependant en partie contesté. Un système expérimental fondé sur l'étude du cytochrome c_{552} de la bactérie thermophile *Hydrogenobacter thermophilus* a été réalisé dans le but de répondre à cette question (Tomlinson and Ferguson, 2000a). Dans cette expérience, le cytochrome c_{552} a été muté au niveau des cystéines du site de liaison à l'hème (AXXAH au lieu de CXXCH) formant ainsi un cytochrome de type *b*, tout en maintenant une structure tertiaire proche du cytochrome *c* d'origine (Wain *et al.*, 2004). Une telle conversion provoque une diminution de la stabilité thermique et chimique des formes oxydées et réduites de la protéine sans modifier de façon majeure le potentiel redox, diminué seulement de 75 mV. La perte d'une seule liaison thioether a en revanche un très faible impact sur la stabilité et le potentiel (Tomlinson and Ferguson, 2000b). Enfin, le cytochrome c_{552} modifié au niveau des deux cystéines peut conserver l'hème de façon stable: la rétention de l'hème n'est donc pas la raison première justifiant l'existence des cytochromes de type *c*. Il est intéressant de noter que, parmi les protéines globulaires, seuls les cytochromes de type *c* sont capables de lier autant d'hèmes sur une seule chaîne polypeptidique. En dépit des nombreuses hypothèses proposées, l'intérêt d'une liaison covalente entre l'hème et l'apocytochrome *c* n'apparaît donc pas de façon évidente.

2. L'hème : propriétés et biosynthèse

2.1. Propriétés de l'hème

L'hème est constitué d'un noyau tétrapyrrolique, la protoporphyrine, associé à un atome de fer. Il s'agit d'un composé extrêmement hydrophobe qui, à l'état libre, peut être toxique pour la cellule. L'hème libre peut en effet générer des espèces réactives de l'oxygène qui peuvent causer des dommages de l'ADN, une peroxydation des lipides et une dénaturation des protéines (Wijayanti *et al.*, 2004; Kumar and Bandyopadhyay, 2005). L'hème est donc en permanence associé à des protéines, en particulier au sein des cytochromes, et contribue ainsi à un grand nombre de fonctions fondamentales : transport de l'O₂, transporteurs d'électrons,

senseur de l'O₂ (Rodgers, 1999 : réponse au stress oxydatif, détoxification, régulation transcriptionnelle de l'expression génique).

2.2. Biosynthèse de l'hème

La biosynthèse de l'hème est universelle et s'effectue en huit étapes catalysées par des enzymes fonctionnellement conservées parmi les procaryotes et les eucaryotes. La figure 9 présente les intermédiaires de biosynthèse de l'hème, strictement conservés, ainsi que les enzymes catalysant chacune de ces étapes.

2.2.1. Biosynthèse de l'hème chez les eucaryotes.

Chez les eucaryotes, la biosynthèse de l'hème requiert la coopération des compartiments cytoplasmiques et mitochondriaux. Des déficiences partielles de sept des huit enzymes de biosynthèse de l'hème conduisent à des pathologies nommées porphyries. Les signes cliniques associés aux porphyries sont le résultat de l'accumulation des précurseurs de l'hème. Dans ce paragraphe, je décrirai uniquement les enzymes à localisation mitochondriale, en particulier celles catalysant les dernières étapes de la biosynthèse de l'hème.

La première étape de la biosynthèse de l'hème consiste à former l'acide δ -aminolévulinique à partir du succinyl-CoA et de la glycine. Cette étape est catalysée par une enzyme localisée dans la matrice mitochondriale, la 5-aminolevulinate synthase, et dont l'import dans la mitochondrie est régulé par l'hème chez certaines espèces (voir paragraphe III.4.3.3.). Les trois dernières enzymes de biosynthèse de l'hème sont également localisées dans la mitochondrie (voir figure 9), tout du moins chez les mammifères. Il s'agit de la coproporphyrinogène oxydase (ou CPO), la protoporphyrinogène oxydase (ou PPO) et la ferrochelatase.

La réaction catalysée par la première de ces enzymes est la décarboxylation oxydative des groupes propionates de deux cycles pyrroles, formant ainsi un groupe vinyle. Alors que cette enzyme est localisée du côté interne de la membrane externe mitochondriale chez les mammifères, l'enzyme est cytoplasmique chez la levure *S. cerevisiae*.

La deuxième enzyme, la protoporphyrinogène oxydase (ou PPO), associée à la membrane interne mitochondriale, catalyse l'oxydation à six électrons de la protoporphyrinogène en protoporphyrine. La structure cristallographique de la PPO mitochondriale de tabac, une protéine dimérique, (Koch *et al.*, 2004), montre la présence de

trois domaines permettant respectivement la liaison au FAD, la liaison au substrat et la liaison à la membrane.

Enfin, la dernière étape de biosynthèse de l'hème, catalysée par la ferrochelatase, consiste en l'insertion de l'ion ferreux Fe^{2+} dans la protoporphyrine IX, formant ainsi le protohème IX. La structure tridimensionnelle de la ferrochelatase humaine révèle une protéine homodimérique contenant un groupement [2Fe-2S] par monomère (Wu *et al.*, 2001). Comme le montre la figure 10, la ferrochelatase est localisée sur la face interne de la membrane interne mitochondriale. Chez l'homme, les trois dernières enzymes de biosynthèse de l'hème pourraient interagir au sein d'un même complexe. La figure 10 montre la configuration hypothétique de ce complexe, dans lequel on pourrait imaginer un transport possible de l'hème à travers la membrane interne, depuis la matrice vers l'espace intermembranaire. Le protohème ainsi formé correspond au groupement prosthétique de nombreuses hémoprotéines, en particulier les cytochromes *b*.

Le protohème peut également subir des modifications pour former d'autres types d'hèmes. Il peut en effet devenir hème C suite à la liaison covalente du cofacteur sur l'apocytochrome. Cet aspect, qui relève de la maturation des cytochromes de type *c*, sera largement développé dans la troisième partie. La biosynthèse de l'hème A, effectuée dans la matrice à partir du protohème, nécessite quelques étapes supplémentaires. La première réaction, catalysée par Cox10p, une farnésyl transférase, conduit à la formation de l'intermédiaire hème O (Morales *et al.*, 2004). La conversion de l'hème O en hème A (figure 5) impliquerait d'autres enzymes matricielles dont Cox15p et Yah1p. Des mutations dans les gènes *COX10* et *COX15* conduisant à une déficience en cytochrome oxydase sont responsables de graves pathologies chez l'homme (revue Barrientos, 2003).

Enfin, il est intéressant de noter que certains organismes pluricellulaires, comme le nématode *Caenorhabditis elegans* ou les trypanosomes *Leishmania* spp., sont incapables de synthétiser l'hème *de novo*, bien que ces animaux contiennent des hémoprotéines impliquées dans des processus fondamentaux. Ne possédant pas toutes les enzymes nécessaires à la biosynthèse de l'hème, *C. elegans* acquiert donc l'hème exclusivement de façon exogène (Rao *et al.*, 2005). Cela suppose des mécanismes (inconnus) d'import et de distribution de l'hème dans les compartiments où il est requis, en particulier dans l'espace intermembranaire mitochondrial.

2.2.2. Biosynthèse de l'hème chez les procaryotes.

La biosynthèse de l'hème chez les procaryotes se déroule dans le cytoplasme, selon les étapes décrites dans la figure 9. La première étape de formation de l'acide δ -aminolevulinique peut suivre deux voies. Alors que les α -protéobactéries, ancêtres des mitochondries, utilisent tout comme les eucaryotes la voie de l'ALA synthase, les autres bactéries synthétisent l'acide δ -aminolevulinique en deux étapes, à partir de glutamyl-tRNA^{Glu}. Les étapes suivantes sont catalysées par le même type d'enzymes que les eucaryotes mais peuvent toutefois présenter quelques différences. Par exemple, les organismes aérobies utilisent des enzymes dépendantes de l'oxygène pour catalyser les étapes 6 et 7 décrites dans la figure 10 alors que les organismes anaérobies ou aérobies facultatifs utilisent une enzyme indépendante de l'oxygène qui décarboxyle le coproporphyrinogène en protoporphyrinogène.

La dernière étape de biosynthèse de l'hème implique la ferrocyclase. La structure cristallographique de la ferrocyclase de *B. subtilis* montre qu'il s'agit d'une protéine soluble, monomérique et sans groupement [Fe-S]. La ferrocyclase humaine présente une boucle N-terminale supplémentaire et une extension C-terminale impliquée dans la coordination du groupement [2Fe-2S] et la stabilisation du dimère. Malgré ces différences structurales, le squelette de la ferrocyclase de *B. subtilis* ressemble à celui de la sous-unité de la ferrocyclase humaine (Dailey, 2002).

Enfin, alors que la majorité des bactéries, comme *E. coli* ou *Bacillus subtilis*, possèdent toutes les enzymes de biosynthèse de l'hème, certaines n'en possèdent qu'une partie d'entre elles, notamment des bactéries pathogènes comme *Haemophilus influenzae*, obligeant celles-ci à récupérer l'hème (et le fer) du milieu extérieur. Certaines bactéries ont donc développé des systèmes sophistiqués de capture de l'hème extérieur *via* des contacts directs entre la source d'hème exogène (ex : hémoglobine) et des récepteurs bactériens de haute affinité ou, dans le cas des bactéries Gram⁻ uniquement, *via* l'excrétion d'hémophores, protéines extracellulaires chargées de chélater l'hème du milieu extérieur et de le ramener vers un récepteur de la membrane externe (pour revue : Wandersman and Delepelaire, 2004). Les analyses génomiques montrent également que les Archaeae ne possèdent pas l'ensemble des enzymes de biosynthèse de l'hème, suggérant ainsi la possibilité d'autres voies ou d'autres facteurs impliqués dans la biosynthèse de l'hème (Panek and O'Brian, 2002).

3.3. Le transport de l'hème.

La question du transport de l'hème à travers les membranes phospholipidiques concerne plusieurs aspects de la biologie. Par exemple, en physiologie humaine, au cours de l'absorption intestinale, on ignore la façon dont l'hème est transporté à travers la membrane plasmique des entérocytes. Le transport intracellulaire de l'hème, depuis son site de synthèse jusqu'au site de maturation des hémoprotéines, mérite également d'être clarifié. Du fait des propriétés toxiques de l'hème libre, il a cependant été proposé que l'hème soit transporté *via* des transporteurs membranaires spécifiques. Un transporteur de l'hème a d'ailleurs été tout récemment identifié au niveau des entérocytes duodénaux. Il s'agit d'une protéine intégrale à neuf segments transmembranaires putatifs, présentant des homologies avec les transporteurs bactériens de tétracycline et qui serait régulée par la concentration locale de fer (Shayeghi *et al.*, 2005).

3. Localisation des cytochromes de type *c*

Les cytochromes de type *c* sont des molécules ubiquitaires qui fonctionnent comme des transporteurs d'électrons dans des processus fondamentaux comme la respiration ou la photosynthèse, mais également dans certaines voies de signalisation cellulaire. Ils sont présents chez la plupart des organismes vivants, au niveau des systèmes membranaires transducteurs d'énergie (membrane plasmique bactérienne, membrane interne mitochondriale, membrane du thylakoïde). Les cytochromes de type *c* peuvent être solubles ou membranaires mais le domaine de fixation de l'hème est toujours situé du côté positif de la membrane (en considérant la différence de potentiel générée par ce type de membranes). Aussi retrouve-t-on les cytochromes de type *c* :

- (1) chez les bactéries : ancrés dans la membrane cytoplasmique (avec le domaine de liaison à l'hème situé du côté extracytoplasmique), ainsi que dans le périplasme des bactéries Gram-négative et l'espace extracytoplasmique des bactéries Gram-positives. Il a récemment été montré que certains cytochromes de type *c* multihèmes de *Schwannella oneidensis* sont localisés dans la membrane externe *via* un ancrage lipidique, du côté du milieu extérieur (Myers and Myers, 2004)

(2) dans les chloroplastes : au niveau des membranes thylakoïdiennes (cytochrome *f*) et dans le lumen (cytochrome *c₆* et cytochrome *c_x*³)

(3) dans les mitochondries : au niveau de la membrane interne (cytochrome *c₁*) et de l'espace intermembranaire (cytochrome *c*).

La figure 11 présente les compartiments auxquels se trouvent associés les différents cytochromes de type *c*, ainsi que les principales fonctions assurées par ces métalloprotéines.

4. Fonctions assurées par les cytochromes de type *c*

Les cytochromes de type *c* sont essentiellement réputés pour leur fonction de transporteurs d'électrons au cours de la respiration, la photosynthèse et la détoxification (cf. figure 11). Néanmoins, outre leur fonction redox, les cytochromes de type *c* sont également impliqués dans des processus de signalisation cellulaire, en particulier au cours de la mort cellulaire programmée chez les mammifères. Dans ce paragraphe, j'insisterai particulièrement sur les fonctions assurées par les cytochromes de type *c* mitochondriaux.

4.1. Les cytochromes de type *c* eucaryotes

4.1.1. Transporteurs d'électrons dans le cadre de la respiration cellulaire

Les cytochromes de type *c* mitochondriaux correspondent au cytochrome *c* et au cytochrome *c₁*. Le cytochrome *c₁*, codé par le gène nucléaire *CYT1* chez la levure, est inséré dans la membrane interne par l'intermédiaire d'une hélice transmembranaire, au sein du complexe III. Le cytochrome *c₁* transfère les électrons du centre [Fe-S] de la protéine de Rieske au cytochrome *c*.

Le cytochrome *c* fut isolé pour la première fois aux environs de 1930 par David Keilin, à partir d'extraits de levure. Ce fut une des premières protéines pour laquelle la structure cristallographique fut obtenue. Le cytochrome *c* est une petite molécule soluble de 12kD, localisée dans l'espace intermembranaire. Son rôle fondamental consiste au transfert d'électrons du cytochrome *c₁* (complexe III) à la sous-unité Cox2p du complexe IV (voir

³ La fonction du cytochrome *c_x* n'est pas connue (Wastl, J., Purton, S., Bendall, D.S. and Howe, C.J. (2004) Two forms of cytochrome *c₆* in a single eukaryote. *Trends Plant Sci*, 9, 474-476., Howe, C.J., Schlarb-Ridley, B.G., Wastl, J., Purton, S. and Bendall, D.S. (2006) The novel cytochrome *c₆* of chloroplasts: a case of evolutionary bricolage? *J Exp Bot*, 57, 13-22.).

figure 3 et paragraphe I.2.2.). Le cytochrome *c* pourrait donc ‘diffuser’ à la surface de la membrane interne, entre les complexes respiratoires III et IV. La forme oxydée du cytochrome *c* peut également accepter des électrons provenant du cytochrome *b*₂, permettant l’oxydation du lactate en pyruvate, ou de la sulfite oxydase (chez les mammifères).

Chez *S. cerevisiae*, il existe deux isoformes du cytochrome *c* : l’isoforme 1 et l’isoforme 2, codées respectivement par les gènes nucléaires *CYC1* et *CYC7*. Ces deux isoformes présentent 80% d’identité de séquence protéique. L’isoforme 1 est la forme majoritaire qui représente, dans des conditions d’aérobic, 95% du pool de cytochrome *c* (Burke *et al.*, 1997). L’isoforme 2, bien que minoritaire en aérobic⁴, suffit à maintenir une activité respiratoire basale (sauf sur un milieu contenant du lactate comme unique source de carbone). En revanche, l’absence des deux isoformes abolit la respiration et conduit à une absence de signal spectral des hèmes *aa*₃ causée par une dégradation des trois sous-unités d’origine mitochondriale du complexe IV. La dégradation de Cox2p peut cependant être supprimée par la délétion du gène codant la protéase Yme1p, suggérant un rôle de Yme1p dans le ‘turn-over’ des sous-unités non assemblées du complexe IV (Pearce and Sherman, 1995). En revanche, dans une souche $\Delta cyc1$, le niveau spectral d’oxydase *aa*₃ est maintenu à un niveau sauvage : une faible quantité de cytochrome *c* (5%) suffit donc à stabiliser la cytochrome oxydase (Barrientos *et al.*, 2003). Barrientos *et al.* ont également montré que l’assemblage de la cytochrome oxydase ne nécessitait pas une forme catalytiquement active du cytochrome *c*. Le rôle stabilisateur du cytochrome *c* dans l’assemblage de la cytochrome oxydase mérite toutefois d’être défini plus précisément.

4.1.2. Transporteurs d’électrons dans le cadre de la photosynthèse.

Les cytochromes de type *c* chloroplastiques correspondent au cytochrome *c*₆ et au cytochrome *f* (pour revue, Kerfeld and Krogmann, 1998). Le cytochrome *f*, membranaire, appartient au complexe *b*₆*f* qui est l’équivalent fonctionnel du complexe *bc*₁ mitochondrial. Le complexe *b*₆*f*, ancré dans la membrane thylakoïdienne, transfère les électrons du photosystème II au photosystème I des membranes photosynthétiques oxygéniques et participe au gradient électrochimique de protons en transférant des protons du stroma au lumen. Le complexe *b*₆*f* contient quatre grandes sous-unités (le cytochrome *f*, le cytochrome *b*₆, la protéine de Rieske et la sous-unité IV) et trois petites sous-unités (petG, petL, petM). Le

⁴ Notez que le gène *CYC7* s’exprime dans des conditions hypoxiques.

cytochrome *f* joue un rôle analogue à celui du cytochrome *c*₁, en dépit des différences structurales. Le sixième ligand axial du cytochrome *f* provient d'une tyrosine.

Le cytochrome *c*₆ est un cytochrome de type *c* soluble, de petite taille (10 kDa), similaire au cytochrome *c* mitochondrial et présent uniquement chez certaines algues, au niveau du lumen des thylakoïdes des chloroplastes, et chez les cyanobactéries. Chez ces organismes, le cytochrome *c*₆ et la plastocyanine (une métalloprotéine à cuivre) sont fonctionnellement interchangeables. Dans beaucoup d'espèces, le cytochrome *c*₆ remplace la plastocyanine en réponse à une déficience en cuivre, la plastocyanine étant dégradée dans ces conditions. Le cytochrome *c*₆ catalyse le transfert d'électrons du cytochrome *f* jusqu'au photosystème I.

4.1.3. Signalisation cellulaire : rôle du cytochrome *c* dans la mort cellulaire programmée.

La mort cellulaire programmée permet de contrôler la taille de populations cellulaires, notamment au cours du remodelage embryonnaire, et d'éliminer certaines cellules devenues indésirables. Ce processus biologique est donc fondamental pour le développement normal des organismes multicellulaires. L'apoptose, définie par Kerr *et al.* en 1972 selon des critères morphologiques, est un type de mort cellulaire programmée. Elle conduit à une séquence de changements stéréotypés que subissent les cellules lors de leur suicide. Parmi les changements les plus significatifs figurent l'altération du potentiel de membrane mitochondriale, la condensation de la chromatine, la fragmentation de l'ADN et l'exposition des résidus de phosphatidylsérine dans la couche externe de la membrane plasmique. Grâce à tous ces signaux, la cellule apoptotique peut être reconnue et éliminée.

Les principaux effecteurs de l'apoptose sont les caspases (cysteinyl aspartate-specific proteinase), enzymes participant aux nombreux événements protéolytiques qui ont lieu dans une cellule en apoptose. Deux voies apoptotiques majeures conduisant à l'activation des caspases ont été décrites dans les cellules de mammifères : une voie dite « extrinsèque » dans laquelle les caspases sont activées directement, et une voie dite « intrinsèque » qui requiert la participation de la mitochondrie. Deux événements majeurs impliqués dans le contrôle de la voie intrinsèque ont été décrits : la libération de facteurs pro-apoptotiques tels que le cytochrome *c*, et la production d'espèces réactives de l'oxygène. Les mécanismes sous-jacents à la libération du cytochrome *c* restent encore mal connus. Deux modèles principaux ont cependant été proposés : un premier modèle impliquant une rupture de la membrane externe de l'organite, et un second dans lequel la perméabilité de la membrane externe est

altérée sélectivement, à travers le fonctionnement de canaux spécifiques dont la composition moléculaire fait l'objet d'un large débat (Rostovtseva *et al.*, 2005).

L'analyse comparée des génomes semblait indiquer que l'apoptose était restreinte aux organismes multicellulaires. Il a cependant récemment été montré que des mécanismes de type apoptotique pouvaient être induits chez des organismes unicellulaires, en particulier chez *S. cerevisiae* en condition de stress oxydatif ou en présence d'acide acétique (revues Madeo *et al.*, 2002a; Madeo *et al.*, 2004). Une protéase similaire aux caspases humaines, nommée YCA1, et une flavoprotéine de l'espace intermembranaire orthologue de AIF (Apoptosis-Inducing Factor), ont notamment été identifiés chez cette levure (Madeo *et al.*, 2002b; Wissing *et al.*, 2004). Il a également été montré que le type de mort cellulaire programmée induite par l'acide acétique pourrait être médiée par une voie 'apoptotique' dépendante de la mitochondrie et associée à une libération de cytochrome *c* dans le cytoplasme (Ludovico *et al.*, 2002). La présence de mécanismes de type apoptotique chez la levure reste toutefois controversée et soulève également des interrogations quant à l'intérêt de la mise en oeuvre d'une mort cellulaire programmée chez les organismes unicellulaires (pour la survie de l'espèce ?).

4.2. Les cytochromes de type *c* procaryotes.

Le métabolisme des eubactéries est d'une incroyable complexité et diversité, comme peut l'illustrer la multitude d'accepteurs finaux d'électrons. A titre d'exemple, la bactérie Gram-négative *Shewanella oneidensis* utilise quatorze accepteurs finaux d'électrons différents incluant l'oxygène moléculaire, le nitrate, des oxydes et oxyhydroxydes de Fe(III) et Mn(IV). Cette espèce peut également réduire des métaux toxiques tels que le chrome, l'arsenate et l'uranium. La séquence du génome de *S. oneidensis* a permis d'identifier 42 gènes codant des cytochromes de type *c* ! Etant donnée la remarquable complexité du métabolisme bactérien, je m'attarderai uniquement sur les fonctions principales assurées par les cytochromes de type *c* bactériens.

4.2.1. Une particularité bactérienne : les cytochromes de type *c* multihèmes.

Une spécificité notable du monde bactérien est la présence de nombreux cytochromes de type *c* multihèmes. Parmi ceux-ci, citons l'hydroxylamine oxydoréductase (octahèmes), la famille NapC/NirT/TorC (tétrahèmes), la protéine Hmc (High molecular mass cytochrome *c*, tétrahèmes) trouvée chez les bactéries réductrices du sulfate, ainsi que le cytochrome *c*₃ (tétrahèmes). Les avantages d'un tel système font l'objet de débats (pour revue, Allen *et al.*,

2003). Cette propriété semble pourtant idéale pour les enzymes catalysant des réactions d'oxydation ou de réduction impliquant plusieurs électrons : c'est le cas de la nitrite réductase (pentahèmes) qui catalyse la réduction du nitrite en ammonium *via* un transfert de six électrons, ainsi que l'hydroxylamine oxydoréductase qui catalyse l'oxydation de l'hydroxylamine en nitrite *via* un transfert de quatre électrons.

4.2.2. Transporteurs d'électrons et catalyse enzymatique.

Les chaînes de transport d'électrons bactériennes, ancrées dans la membrane plasmique, présentent un niveau d'organisation élevé. Bien que certaines chaînes de transfert d'électrons bactériennes ressemblent à celle de la mitochondrie, la majorité d'entre elles sont fort différentes, la composition en cytochromes et le nombre de complexes respiratoires pouvant en effet être très variables. Les bactéries ont ainsi la capacité de s'adapter à un large éventail de conditions de croissance. Les cytochromes de type *c* bactériens participent ainsi à la respiration aérobie/anaérobie et à la photosynthèse oxygénique/anoxygénique.

Tout comme leurs homologues mitochondriaux, les cytochromes de type *c* bactériens participent à la génération d'un gradient électrochimique de protons *via* un flux d'électrons provenant d'un réducteur (NADH) jusqu'à un accepteur (oxygène moléculaire, nitrate...). Alors que le cytochrome *c*₁ bactérien garde son appellation d'origine 'mitochondriale', les homologues bactériens du cytochrome *c* sont habituellement nommés *c*₅₅₀, *c*₅₅₁ etc..., les trois indices se référant à la longueur d'onde d'absorption maximale de la bande α . La diversité en terme de respiration bactérienne requiert un vaste nombre de cytochromes de type *c* différents, en particulier des cytochromes multihèmes (voir paragraphe précédent). Dans certains cas, un des hèmes participe à la catalyse enzymatique, par exemple dans le cas des enzymes qui réduisent le nitrite en ammonium ou celles qui oxydent l'hydroxylamine en nitrite.

Chez *E. coli*, un des systèmes modèles pour l'étude de la maturation des cytochromes de type *c*, on trouve cinq cytochromes de type *c*, uniquement synthétisés dans des conditions d'anaérobiose. Le cytochrome de type *c* membranaire TorC, principal composant de la triméthylamine-N-oxyde (TMAO) réductase, est induit en présence de TMAO. Un milieu contenant du nitrite permet d'induire les quatre autres cytochromes de type *c* : NrfA et NrfB composants de la nitrite réductase dépendante du formate, NapB et NapC composants de la nitrite réductase périplasmique.

Des analyses génomiques, basées sur la recherche de motifs CXXCH, montrent que certaines bactéries contiendraient plus de trente cytochromes de type *c* différents! Outre leur rôle dans la respiration et la photosynthèse, les cytochromes de type *c* bactériens sont impliqués dans d'autres processus (pour revue, Ferguson, 2001). Certains participent à la génération d'un gradient électrochimique de sodium, d'autres interviennent dans la dissipation d'excès de pouvoir réducteur (notamment chez *P. denitrificans*), d'autres permettent le transfert d'électrons dans le sens 'inverse'. Ce dernier exemple est illustré chez le genre *Nitrobacter* qui produit de l'énergie grâce à l'oxydation du nitrite par l'oxygène, mais qui doit également générer du NAD(P)H pour la fixation du dioxyde de carbone. Dans la chaîne de transport d'électrons de cette bactérie, une majorité des électrons issus de l'oxydation du nitrite permet d'établir un gradient électrochimique de protons nécessaire à la synthèse d'ATP, tandis qu'une minorité d'électrons est dirigée vers une NAD(P)H deshydrogénase pour la réduction du NAD(P)⁺ en NAD(P)H. Dans ce cas, le complexe *bc*₁ et la NADH deshydrogénase fonctionnent en sens 'inverse', grâce au mouvement de protons du périplasma vers le cytoplasme.

Enfin, certains cytochromes de type *c* peuvent également être impliqués dans des processus de détoxification de métaux (chez *Shewanella oneidensis*) et participer à des mécanismes de signalisation. Notez également que certains cytochromes de type *c* bactériens possèdent d'autres groupements prosthétiques (ex : FAD dans le flavocytochrome *c*).

III. Les différentes voies d'assemblage des cytochromes de type *c*

1. Principes fondamentaux

La maturation des cytochromes de type *c* décrit le processus par lequel une cellule convertit un polypeptide non replié, l'apocytochrome, en un polypeptide structuré autour d'un ou plusieurs cofacteurs hémiques, redox-actifs, liés de façon covalente à la partie protéique. Bien que les cytochromes de type *c* soient des molécules extrêmement conservées, des études génétiques menées chez plusieurs organismes modèles, couplées à l'analyse des génomes disponibles à ce jour, montrent qu'au moins trois systèmes distincts de maturation de ces molécules coexistent dans le monde vivant (pour revues Kranz *et al.*, 1998; Stevens *et al.*, 2004). Le système I, apparemment le plus complexe, a principalement été étudié chez les bactéries *Escherichia coli* et *Rhodobacter capsulatus*, et plus récemment dans les mitochondries de plantes. Le système II prend place chez *Bacillus subtilis* ainsi que dans les chloroplastes, avec pour modèle celui de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii*. Enfin, le système III, qui semblerait être le système le moins sophistiqué, se retrouve dans les mitochondries de champignons et de cellules animales. Ce dernier système, qui fait l'objet de ce travail de thèse, a principalement été analysé chez *Saccharomyces cerevisiae* et *Neurospora crassa*. La figure 12 présente une comparaison des trois systèmes principaux de maturation des cytochromes de type *c*. Chacun de ces différents systèmes sera développé dans les sous-chapitres suivants.

L'analyse de ces différents systèmes permet toutefois d'établir un certain nombre de règles communes relatives à la maturation d'un cytochrome de type *c* : (1) Le cytochrome de type *c* acquiert sa configuration finale active suite à la liaison covalente de l'hème, dans le compartiment final d'assemblage situé du côté positif de la membrane. (2) Du fait de la compartimentalisation, l'apocytochrome et l'hème doivent être transportés depuis leur site de synthèse vers le compartiment d'assemblage, ce qui implique la traversée d'une membrane phospholipidique. (3) Les cystéines du motif CXXCH de l'apocytochrome doivent être maintenus dans un état réduit (Tong and Margoliash, 1998). Des études sur les mitochondries de champignons montrent que l'hème doit également être réduit avant sa fixation covalente sur l'apocytochrome (Nicholson and Neupert, 1989). (4) Les groupes thiols s'engagent dans une liaison covalente avec les groupes vinyles de l'hème, d'une façon stéréospécifique (Daltrop and Ferguson, 2003) : la première cystéine du site CXXCH se lie avec la carbone C3

de l'hème, la deuxième cystéine avec le carbone C8. Stevens *et al* suggèrent que le mécanisme réactionnel mis en œuvre pourrait consister en la protonation du carbone β du groupe vinyle (avec un intermédiaire carbocation) suivie de l'addition du thiol (par attaque nucléophile) et de la perte d'un proton (Stevens *et al.*, 2004).

L'étude de la maturation des cytochromes de type *c* soulève donc un certain nombre de questions, en particulier : Comment l'apocytochrome et l'hème sont-ils transportés vers le compartiment final d'assemblage ? Quel est le mécanisme moléculaire régissant l'attachement covalent de l'hème à l'apocytochrome ? Existents-ils des facteurs redox impliqués dans le maintien des cystéines et de l'hème dans un état réduit ? La comparaison des différents systèmes soulève également des questions d'ordre phylogénétique : en effet, comment expliquer que les mitochondries de plantes aient conservé un système de maturation des cytochromes *c* proche de celui de *E. coli* alors que les mitochondries animales utilisent un tout autre système pour synthétiser de tels cytochromes ? Cette question sera abordée lors de la discussion.

Dans les sous-chapitres suivants, je vous propose donc une vision générale de la maturation des cytochromes de type *c* dans chacun des trois systèmes décrits jusqu'à présent, en insistant plus particulièrement sur le système III, utilisé par les mitochondries des cellules animales.

2. Assemblage des cytochromes de type *c* selon le système I

2.1. Vue générale du système I

2.1.1. Le système I chez *E. coli*.

Le système I est opérationnel chez les α -, γ -protéobactéries et certaines β -protéobactéries (Gram⁻), chez *Deinococcus* ainsi que dans les mitochondries de plantes, d'algues rouges et de protistes (ex : paramécie) et chez certaines archaées. Ce système a principalement été étudié chez les bactéries Gram⁻ suivantes : *Rhodobacter capsulatus*, *Bradyrhizobium japonicum*, *Paracoccus denitrificans* et *E. coli* (Thony-Meyer *et al.*, 1995), aboutissant ainsi à l'utilisation de nomenclatures complexes. Dans un souci de simplicité, je me baserai sur la nomenclature *ccm* (cytochrome *c* maturation) utilisée chez *E. coli*. Les correspondances sont indiquées dans le tableau 2.

Chez *E. coli*, la formation d'holocytochromes *c* est contrôlée par huit gènes *ccm* et trois gènes *dsb* (disulfide bond formation). L'étude du système I a été facilitée par le fait que les gènes *ccmABCDEFGH(I)* se trouvent situés au sein d'un même opéron dans la plupart des γ -proteobactéries. *E. coli* représente un cas particulier dans la mesure où le gène *ccmH* est fusionné avec *ccmI*. L'organisation en opéron des gènes *Ccm* peut toutefois être différente chez d'autres espèces bactériennes ; les gènes *ccm* de *R. capsulatus* se trouvent par exemple sur 4 loci différents. Les neuf gènes *ccm* codent des protéines membranaires essentielles à la maturation des cytochromes de type *c* et la surexpression des gènes *ccm* permet la production de grandes quantités d'holocytochrome *c* (Arslan *et al.*, 1998), rendant ainsi possible certaines études structurales. Enfin, il est intéressant de noter que des mutations dans certains gènes *ccm*, chez quelques espèces bactériennes appartenant aux genres *Pseudomonas*, *Rhizobium*, *Paracoccus* et *Legionella*, présentent d'autres types de déficiences difficiles à relier avec la simple perte des holocytochromes. Ces phénotypes additionnels incluent la perte de la production ou de l'utilisation de sidérophores (petites molécules capables de chélater le fer du milieu extérieur avec une haute affinité), des modifications de la résistance au cuivre, une capacité réduite de croissance dans des conditions de carence en fer ou lors de l'infection des cellules hôtes (pour revue : Cianciotto *et al.*, 2005). Par exemple, l'analyse de mutants *CcmC* de *P. fluorescens* montre que *CcmC* est également requis pour la production de pyoverdines, un sidérophore fluorescent (Gaballa *et al.*, 1998). Bien que la connexion entre ces différents processus ne soit pas connue, ces observations suggèrent que les protéines *ccm* pourraient accomplir des fonctions additionnelles nécessaires au bon fonctionnement de la cellule.

La figure 13 présente une vue schématique du système I chez *E. coli*. Vous pouvez distinguer (1) une voie de livraison des apocytochromes (transport et contrôle redox) (2) une voie de livraison de l'hème et (3) une voie contrôlant l'étape finale de liaison de l'hème sur l'apocytochrome (pour revues sur le système I : Thony-Meyer, 2002; Stevens *et al.*, 2005)

2.1.2. Le système I dans les mitochondries de plantes.

De façon intéressante, les génomes de plantes terrestres comme *Arabidopsis thaliana* ou *Triticum aestivum* contiennent la plupart des gènes *ccm*, en particulier les gènes *CcmE* et *CcmH* (nucléaires) et les gènes *CcmB*, *CcmC* et *CcmF* (mitochondriaux). La maturation des cytochromes de type *c* dans les mitochondries de plantes se trouve donc sous la dépendance des deux génomes, nucléaire et mitochondrial, et reflète ainsi, à l'échelle de l'évolution, la migration ancestrale de certains gènes mitochondriaux vers le génome nucléaire. Notez que

les génomes mitochondriaux de plantes sont de très grande taille, par exemple 367 kb pour *A. thaliana* (Unsold *et al.*, 1997), contrairement au cas des cellules animales, mais présentent toutefois une capacité codante relativement réduite (32 protéines mitochondriales chez *A. thaliana*). Les transcrits des gènes *ccm* mitochondriaux ont de plus la particularité d'être modifiés par le mécanisme d'édition des ARNs (Giege and Brennicke, 1999).

Contrairement aux mitochondries animales, les mitochondries de plantes ont donc retenu le même système de maturation que leur ancêtre α -proteobactérie. De façon surprenante, au moins deux voies distinctes de maturation des cytochromes de type *c* ont donc été sélectionnées durant l'évolution de la mitochondrie (système I et système III).

Dans les paragraphes suivants, je vous propose un bref état des lieux des connaissances des différentes étapes de la maturation des cytochromes de type *c* selon le système I décrit principalement chez *E. coli*, tout en n'oubliant pas de mentionner, pour chaque étape, les spécificités des mitochondries de plantes.

2.2. Voie de livraison de l'apocytochrome

2.2.1. Transport de l'apocytochrome

La séquence primaire d'un apocytochrome *c* contient, outre le(s) motif(s) C-X-X-C-H de liaison à l'hème, une séquence signal située en N-terminal définissant la localisation du polypeptide. Cette séquence est requise pour l'export de l'apocytochrome depuis son compartiment de synthèse, le cytoplasme, jusqu'au compartiment d'assemblage, le périplasma. Les apocytochromes de type *c* sont transportés dans le périplasma, dans un état non replié, par la machinerie générale de translocation *sec* (Thony-Meyer and Kunzler, 1997). La voie *sec* comprend le complexe SecYEG utilisé comme translocon, associé à la protéine SecA qui hydrolyse l'ATP. Les cytochromes de type *c* bactériens, tous extracytoplasmiques, peuvent être membranaires ou solubles. Dans ce dernier cas, la séquence signal est clivée, après la translocation, par une protéase périplasmique (LepB) ; dans le cas contraire, la séquence signal permet l'ancrage dans la membrane cytoplasmique.

Les mécanismes par lesquels la machinerie de maturation *ccm* reconnaît les apocytochromes *c* restent inconnus. Puisqu'un certain degré de repliement de l'apocytochrome pourrait être requis pour l'attachement de l'hème, certains suggèrent que la présence d'un pont disulfure intramoléculaire, probablement catalysé par la thiol :disulfide oxydoréductase DsbA, entre les deux cystéines adjacentes du motif CXXCH, pourraient

favoriser le repliement de l'apoprotéine et permettre ainsi le correct positionnement de l'hème (Sambongi and Ferguson, 1996; Allen *et al.*, 2002).

2.2.2. Contrôle redox de la maturation des cytochromes de type c

2.2.2.1. Une voie oxydatrice médiée par DsbA et DsbB.

En dépit de l'absence de preuves expérimentales, il semblerait que les résidus cystéines de l'apocytochrome *c* soient oxydés par l'oxydase périplasmique DsbA pendant ou juste après la translocation de l'apocytochrome. Cette étape d'oxydation paraît nécessaire à la maturation des cytochromes *c* dans la mesure où des mutants *dsbA* ne synthétisent plus de cytochromes *c* (Metheringham *et al.*, 1995; Sambongi and Ferguson, 1996). En outre, la pléiotropie de ces mutations souligne le rôle central de DsbA dans le périplasma bactérien. DsbA catalyse l'oxydation aléatoire des cystéines des protéines réduites non repliées *via* une réaction rapide d'échanges de ponts disulfures (pour revue : Kadokura *et al.*, 2003). DsbA serait réoxydée par DsbB, une oxydoréductase membranaire qui transfère les équivalents réducteurs aux quinones de la chaîne de transport d'électrons (Kobayashi and Ito, 1999 et figure 14). Tout comme DsbA, des mutations dans *dsbB* conduisent à un phénotype pléiotrope, affectant en particulier la maturation des cytochromes de type *c*. DsbA et DsbB font partie de la superfamille des thioredoxines caractérisées par la présence d'un motif extrêmement conservé C-X-X-C constituant le site actif (Figure 15). La nécessité de formation d'un pont disulfure intramoléculaire pourrait expliquer la raison pour laquelle aucun cytochrome de type *c* bactérien ne contienne d'hème lié par une seule liaison thioéther (revue Ferguson, 2001), ce type de cytochrome étant par ailleurs stable, comme le montrent les études des cytochromes mitochondriaux de protozoaires (Allen *et al.*, 2004).

D'autres données expérimentales questionnent toutefois l'implication de DsbA et DsbB dans la maturation des cytochromes de type *c* : en effet, chez *R. capsulatus*, l'autre modèle expérimental pour l'étude du système I, les mutants *dsbA*- et *dsbB*- ne sont pas affectés pour ce processus (Deshmukh *et al.*, 2003).

2.2.2.2. Une voie réductrice médiée par CcmG, CcmH et DsbD.

La maturation des cytochromes de type *c* s'effectue dans un environnement oxydant, le périplasma, alors que les cystéines du motif CXXCH doivent être accessibles, et donc réduites, pour rendre possible la liaison covalente de l'hème à l'apocytochrome. Afin de maintenir ces cystéines dans un état réduit, la cellule utilise une voie de réduction spécifique

impliquant des protéines périplasmiques à activité disulfide réductase (revue Fabianek *et al.*, 2000 et figures 13-14) ; il s'agit de CcmG, DsbD et CcmH, décrites en particulier chez *E. coli*.

CcmG est une thioredoxine périplasmique ancrée dans la membrane cytoplasmique. L'implication de CcmG dans la maturation des cytochromes de type *c* a été décrite dans plusieurs espèces bactériennes dont *B. japonicum* (Fabianek *et al.*, 1997) et *R. capsulatus* (Beckman and Kranz, 1993). La détermination de la structure cristallographique de CcmG a notamment permis de mettre en évidence la présence d'un domaine thioredoxine caractéristique de ce type d'oxydoréductase (Edeling *et al.*, 2001).

Une interaction directe entre CcmG et le domaine périplasmique de la protéine intégrale DsbD a été mise en évidence. Un mutant *dsbD* peut être sauvé par l'ajout d'agent réducteur dans le milieu de culture (Sambongi and Ferguson, 1994). Fabianek *et al.* proposent que DsbD fournit le potentiel réducteur à l'apocytochrome en recyclant les formes oxydées de CcmG. DsbD est une protéine membranaire intégrale composée de trois domaines fonctionnels: un domaine périplasmique amino-terminal, un coeur hydrophobe composé de huit segments transmembranaires et un domaine périplasmique carboxyterminal, chaque domaine contenant un doublet de cystéines conservées et essentielles à l'activité de DsbD (Katzen and Beckwith, 2000). Katzen and Beckwith proposent un modèle selon lequel les électrons seraient transférés de la thioredoxine cytoplasmique TrxA à travers les cystéines des différents domaines de DsbD jusqu'à un certain nombre de substrats périplasmiques incluant CcmG et CcmH, puis au niveau du site de liaison à l'hème de l'apocytochrome (Figure 13). Chez certaines espèces bactériennes (dont *R. capsulatus*), DsbD est remplacée par CcdA, une protéine qui ressemble au domaine central hydrophobe de DsbD (Deshmukh *et al.*, 2000). Il est intéressant de noter que des mutations dans *ccdA* peuvent être supprimées par l'absence des oxydases DsbA ou DsbD, chez *R. capsulatus* (Deshmukh *et al.*, 2003). La double absence de la voie réductrice et oxydante peut donc restaurer la biogenèse des cytochromes de type *c*.

La protéine CcmH d'*E. coli* est composée de deux domaines qui correspondent aux protéines Ccl2 et CychH chez *R. capsulatus*, CycL et CychH chez *B. japonicum* (voir tableau 2). Le domaine N-terminal de CcmH, tout comme les protéines CycL, Ccl2, portent un motif RCXXC exposé du côté périplasmique. Chez *E. coli*, des mutants ponctuels des cystéines de CcmH (mais pas le mutant nul) sont supprimés par l'ajout d'agent réducteur (Fabianek *et al.*, 1999). Bien que ces deux cystéines soient essentielles à la fonction de réduction (Fabianek *et al.*, 1999), des comparaisons de séquences suggèrent toutefois que CcmH ne soit pas un

membre typique de la famille thioredoxine. CcmH serait impliquée dans la réduction des cystéines du motif CXXCH des apocytochromes *c* (Fabianek *et al.*, 1999), bien que l'interaction directe de CcmH avec l'apocytochrome *c* n'ait pas été démontrée à ce jour chez *E. coli*.

Curieusement, chez certaines α -protéobactéries (ex : *Rickettsia*), la voie réductrice CcmG/CcmH/DsbD est absente alors que les facteurs CcmA-F sont présents. Rappelons que *Rickettsia*, considérée comme l'ancêtre des mitochondries, est une bactérie pathogène intracellulaire obligatoire; il est donc possible que l'environnement 'réducteur' soit alors fourni par l'hôte (Kranz *et al.*, 2002).

L'orthologue de *ccmH* a tout récemment été identifié dans le génome nucléaire de *A. thaliana* (Heazlewood *et al.*, 2004, Meyer *et al.*, 2005). AtCcmH est une protéine intégrale localisée dans la membrane interne mitochondriale et dont le motif conservé RCXXC est situé dans l'espace intermembranaire. Des expériences de double-hybride suggèrent qu'AtCcmH pourrait physiquement interagir avec l'apocytochrome *c*. Bien qu'AtCcmH ne puisse pas compléter l'absence de CcmH chez *E. coli*, AtCcmH interagirait physiquement avec l'hème lyase putative CcmF d'*E. coli*. Des expériences d'électrophorèse en conditions natives (BN-PAGE) suggèrent toutefois que AtCcmH et AtCcmF_{N2} (similaire au domaine N-terminal de CcmF d'*E. coli*) soient associés au sein d'un complexe de 500 kDa dans les mitochondries de *A. thaliana*. AtCcmF_{N2} serait de plus associée à un complexe de 700kDa. Enfin, une forme réduite de AtCcmH est capable *in vitro* de réduire les cystéines du motif CXXCH d'un peptide modèle d'apocytochrome *c*. AtCcmH est donc le premier facteur redox impliqué dans le système I de maturation des cytochromes de type *c* à avoir été identifié dans les mitochondries de plantes. Aucun orthologue de CcmG n'a été identifié chez les plantes à ce jour.

2.3. Voies de livraison de l'hème

2.3.1. Transport de l'hème à travers la membrane cytoplasmique

La question du transport de l'hème depuis le compartiment cytoplasmique, siège des dernières étapes de biosynthèse de l'hème, jusqu'au compartiment périplasmique reste mystérieuse. Certains ont toutefois proposé que CcmA et CcmB, peut-être en conjonction avec CcmC et CcmD, pourraient transporter l'hème à travers la membrane cytoplasmique (Goldman *et al.*, 1998). Des analyses de séquences suggèrent que CcmA et CcmB constitueraient les sous-unités d'un transporteur de type ATP-Binding Cassette (ou ABC)

(Figure 13). CcmA est en effet une protéine membranaire périphérique contenant une cassette conservée de liaison à l'ATP. CcmA s'associerait avec CcmB, une protéine intégrale à six segments transmembranaires considérée comme la perméase, dans une organisation de type A₂B₂. CcmAB a été purifié et présente une activité ATPasique (L. Thony-Meyer, communication personnelle). Le fait que CcmC pourrait également constituer une sous-unité du transporteur reste controversé (Goldman *et al.*, 1997; Schulz *et al.*, 1999; Page and Ferguson, 1999). Bien qu'aucun substrat n'ait été encore identifié, certains proposent que cet ABC transporteur puisse transporter l'hème. Aucune preuve expérimentale ne soutient pourtant cette hypothèse. Des arguments expérimentaux suggèrent plutôt que l'hème ne soit pas transporté *via* l'ABC transporteur putatif : (1) les cytochromes de type *b* périplasmiques sont toujours synthétisés dans un mutant *ccmA* (Throne-Holst *et al.*, 1997), l'hème est donc disponible dans le périplasme sans système *ccm* fonctionnel (2) l'hème peut être incorporé dans CcmE en l'absence de CcmAB (voir sous-chapitre suivant), (3) l'addition d'hème extracellulaire chez *P. denitrificans* ne restaure pas la formation de cytochromes de type *c* chez des mutants *ccmABC* (Page *et al.*, 1997), (4) le transport putatif de l'hème médié par CcmAB n'a jamais pu être démontré par des expériences *in vitro* (Cook and Poole, 2000). Deux questions centrales persistent donc : Comment l'hème est-il transporté à travers la membrane cytoplasmique ? Quel est le substrat de l'ABC transporteur codé par *CcmA* et *CcmB* ? L'identification du (des) substrat(s) de *CcmA* et *CcmB* paraît particulièrement importante pour la compréhension des mécanismes moléculaires régissant la maturation des cytochromes de type *c* bactériens.

Un orthologue de *CcmB*, nommé *TaccmB*, a également été identifié dans les mitochondries de blé *Triticum aestivum* (Faivre-Nitschke *et al.*, 2001). Le gène *TaccmB*, porté par le génome mitochondrial, est transcrit dans la matrice mitochondriale sous la forme d'un ARN qui subit des modifications de type *RNA editing*. La protéine TaCcmB se trouve associée à la membrane interne mitochondriale et présenterait six segments transmembranaires putatifs. Du fait de l'homologie avec *CcmB* d'*E. coli*, TaCcmB pourrait constituer un élément d'un ABC transporteur. D'autres orthologues des gènes *ccm* ont par ailleurs été trouvés dans les génomes mitochondriaux. Alors que les gènes *ccm* sont dispersés dans le génome chez le blé et chez *A. thaliana*, les gènes *ccm* mitochondriaux du protozoaire *R. americana* sont rassemblés, rappelant ainsi l'organisation en opérons des gènes bactériens. Un orthologue de *ccmA* a d'ailleurs été identifié dans le génome mitochondrial de *R. americana*. Le génome mitochondrial ancestral, tout comme celui de son ancêtre

procaryotique, coderait donc les deux sous-unités de l'ABC transporteur. L'homologue de CcmA a récemment été identifié chez *A. thaliana* (Rayapuram, cité par Meyer E, 2004).

2.3.2. Voies de livraison de l'hème : CcmC, CcmD et CcmE.

2.3.2.1. CcmE, une chaperonne de l'hème

Bien que le transporteur de l'hème demeure inconnu, un système périplasmique de manipulation et de transfert de l'hème a toutefois été identifié chez *E. coli*. La protéine périplasmique CcmE, située au coeur de ce système, possède la propriété remarquable de pouvoir lier l'hème de façon covalente et transitoire (Schulz *et al.*, 1998), ce qui lui vaut le qualificatif de chaperonne de l'hème. La formation d'holo-CcmE a été détectée chez *E. coli* dans des conditions de surproduction des protéines CcmABCDEFGH. Bien que les caractéristiques spectrales de CcmE ressemblent à celles des cytochromes de type *c*, la séquence primaire de CcmE ne contient ni motif CXXCH de liaison à l'hème, ni même de cystéine conservée. CcmE représente donc un nouveau modèle d'hémoprotéine. L'hème est en réalité lié de façon covalente à CcmE *via* une histidine située au sein d'un motif strictement conservé LAKHDEXY. Chez *E. coli*, un mutant H130A ne peut ni lier l'hème ni le transférer à l'apocytochrome (Schulz *et al.*, 1998). La liaison covalente serait établie entre un atome d'azote du noyau imidazole de l'histidine et un des carbones d'un groupement vinyle (Lee *et al.*, 2005). Des études spectrométriques menées chez *E. coli* ont également permis de caractériser les deux ligands axiaux de l'hème lié à CcmE, à savoir une histidine et la tyrosine Tyr¹³⁴ (Uchida *et al.*, 2004).

Bien que la structure de l'holoprotéine CcmE n'ait pas été résolue, deux structures de l'apoprotéine montrent que CcmE comprend un domaine central en tonneaux β et un domaine C-terminal flexible (Arnesano *et al.*, 2002; Enggist *et al.*, 2002). L'histidine impliquée dans la liaison covalente de l'hème est exposée à la surface de la protéine et localisée à la jonction de ces deux domaines. CcmE serait ancrée à la membrane cytoplasmique par une hélice α hydrophobe située en N-terminal. De récentes études *in vivo* suggèrent que le domaine C-terminal de CcmE serait impliqué dans la liaison à l'hème plutôt que dans le transfert de l'hème à l'apocytochrome (Harvat *et al.*, 2005).

Différentes hypothèses concernant le rôle probable de CcmE dans la maturation des cytochromes de type *c* ont été proposées. CcmE transférerait l'hème directement à l'apocytochrome. La liaison covalente de l'hème pourrait (1) prévenir la précipitation de l'hème et empêcher l'association non spécifique de l'hème à la membrane ou (2) présenter

l'hème dans une conformation appropriée et contrôler ainsi l'attachement stéréospécifique de l'hème sur l'apocytochrome.

L'orthologue *AtCCME* a été mis en évidence dans le génome nucléaire de *Arabidopsis thaliana*. *AtCCME* est une protéine mitochondriale associée à la membrane interne et présentant un large domaine hydrophile localisé dans le compartiment de maturation des cytochromes de type *c*, l'espace intermembranaire. Des expériences de complémentation hétérologue réalisée dans un mutant *ccmE* de *E. coli* montrent que *AtCCME* est capable de lier l'hème mais ne permet pas de restaurer la production d'holocytochrome *c*. Puisque l'histidine conservée His²²² est essentielle à la liaison de l'hème à *AtCCME*, il se peut que l'hème soit attaché de façon covalente au niveau de cette histidine (Spielewoy *et al.*, 2001).

2.3.2.1. Rôles de CcmC et CcmD

En l'absence de CcmABCD, CcmE ne lie plus l'hème : au moins un de ces facteurs est donc essentiel à la liaison covalente de l'hème sur CcmE. Seul le facteur de maturation CcmC est en fait strictement requis pour le transfert et l'attachement de l'hème sur CcmE, CcmA et CcmB assurant une fonction indépendante de CcmC (Schulz *et al.*, 1999). Des mutants déficients en CcmA et CcmB forment de l'holo-CcmE si des quantités suffisantes de CcmC sont disponibles, mais ne produisent pas d'holocytochrome *c* : le substrat transporté par l'ABC transporteur CcmA-CcmB n'est donc probablement pas l'hème mais un facteur (à identifier) toutefois requis pour la maturation des cytochromes de type *c* : ce substrat pourrait-il être un réducteur de l'hème ?? On ne peut toutefois pas formellement exclure la possibilité que CcmA et CcmB transportent l'hème et soient requis dans une étape qui suit la fixation de l'hème sur CcmE. CcmD, une petite protéine membranaire de 8 kDa, stabiliserait CcmE et CcmC dans la membrane cytoplasmique (Schulz *et al.*, 2000). Bien que CcmD soit essentielle pour la maturation des cytochromes de type *c*, la délétion de *ccmD* peut être supprimée par la surexpression des protéines CcmCE (Schulz *et al.*, 1999). Il est intéressant de noter que chez *P. fluorescens*, les séquences CcmD et CcmE sont fusionnées pour former un seul polypeptide, ce qui suggère une interaction physique étroite entre CcmD et CcmE chez *E. coli*. Une étude récente montre d'ailleurs que CcmD interagit physiquement avec CcmC et CcmE, formant ainsi un complexe protéique ternaire CcmCDE (Ahuja and Thony-Meyer, 2005). L'hème est ensuite transmis de CcmE vers l'apocytochrome.

CcmC est une protéine membranaire intégrale à six segments transmembranaires putatifs présentant un motif conservé riche en tryptophanes WG Φ WXWD (où Φ est un

résidu aromatique) situé dans la deuxième boucle périplasmique ainsi que deux histidines conservées localisées dans la première et la troisième boucle périplasmique. Le motif riche en tryptophane, également présent dans CcmF, NrfE (paralogue de CcmF) ainsi que dans l'homologue CcsA (voir système II) constitue une signature de la maturation des cytochromes de type *c* dans les systèmes I et II. CcmC s'avère être une protéine membranaire capable de lier l'hème et d'interagir physiquement avec CcmE (Ren and Thony-Meyer, 2001). CcmC pourrait être requis dans la translocation de l'hème à travers la membrane ou dans le transfert de l'hème à CcmE (Schulz *et al.*, 1999). Des mutations systématiques du motif riche en tryptophane de CcmC inhibent l'incorporation de l'hème dans CcmE soulignant le rôle fondamental de ce motif hydrophobe dans l'étape de transfert de l'hème (Schulz *et al.*, 2000). La substitution des deux histidines conduit également à l'abolition de la liaison de l'hème à CcmE (Ren and Thony-Meyer, 2001). Cependant, contrairement aux premières suggestions (Schulz *et al.*, 2000), les résidus conservés de CcmC ne seraient pas essentiels à la liaison de l'hème mais seraient plutôt impliqués dans la formation d'un complexe CcmC-CcmE (Ren and Thony-Meyer, 2001). De plus, alors que CcmE co-immunoprécipite individuellement avec CcmC et CcmF, la co-immunoprécipitation de CcmC et de CcmF n'est pas détectable. Ces observations contredisent l'idée d'un supercomplexe CcmCEF mais favoriseraient plutôt le modèle selon lequel CcmE ferait la navette entre CcmC et CcmF au moment de la livraison de l'hème (Ahuja and Thony-Meyer, 2003). Ce modèle est présenté dans la figure 16.

Un orthologue de CcmC codé par le génome mitochondrial chez *A. thaliana* a également été mis en évidence (Bonnard and Grienenberger, 1995; Giege and Brennicke, 1999) mais aucune caractérisation fonctionnelle de la protéine n'a été effectuée à ce jour.

2.4. Liaison de l'hème à l'apocytochrome : rôle de CcmF.

CcmF est une protéine essentielle à la maturation des cytochromes de type *c*, requise pour l'étape de transfert de l'hème de CcmE à l'apocytochrome. En effet, chez *E. coli*, un mutant *ccmF*, tout comme *ccmGH*, produit de l'holo-CcmE mais pas de cytochrome de type *c*. CcmF est donc souvent nommée « hème lyase bactérienne des cytochromes de type *c* », bien qu'aucune preuve expérimentale ne confirme cette fonction. CcmF est une protéine membranaire intégrale composée de 11 hélices transmembranaires. Outre le motif riche en tryptophane, CcmF présente cinq histidines conservées localisées pour la plupart dans le compartiment périplasmique ; la majorité de ces motifs est requise pour la fonctionnalité de CcmF. De plus, des expériences de co-immunoprécipitation montrent que CcmF interagirait

directement avec la chaperonne CcmE et la thiol:disulfide oxydoréductase CcmH mais pas avec l'apocytochrome : CcmFH pourrait donc former un complexe *hème lyase* pour le transfert de l'hème de CcmE jusqu'à l'apocytochrome *c* (Ren *et al.*, 2002 et figure 16). Enfin, *E. coli* possède également un paralogue de CcmF nommé NrfE et codé par l'opéron *nrfABCDEFG* (*nrf*:nitrite reduction by formate). Un mutant *nrfE* peut former tous les cytochromes de type *c* excepté la nitrite réductase NrfA périplasmique présente chez tous les organismes contenant NrfE. NrfE est en réalité spécifiquement impliquée dans la liaison d'un des cinq hèmes de NrfA, au niveau du site particulier CW^SCK (Eaves *et al.*, 1998), les autres hèmes étant liés au niveau de la séquence classique de type CXXCH.

Chez *A. thaliana*, trois gènes mitochondriaux codant des protéines similaires à différents domaines de CcmF d'*E. coli* ont été identifiés (Gonzalez *et al.*, 1993 ??). CcmF_C, similaire au domaine C-terminal de CcmF d'*E. coli*, a été récemment étudié dans les mitochondries de blé (Giege *et al.*, 2004). Notez qu'un mécanisme d'édition de l'ARN a été mis en évidence lors de la maturation du transcrite du gène mitochondrial *ccmF_C*. La protéine CcmF_C, localisée dans la membrane interne mitochondriale, fait partie d'un complexe protéique de haut poids moléculaire (700kDa) qui pourrait constituer un complexe d'assemblage des cytochromes de type *c*. L'identification des constituants de ce complexe devrait permettre de mieux comprendre les étapes de maturation des cytochromes de type *c* dans les mitochondries de plante.

3. Assemblage des cytochromes de type *c* selon le système II

3.1. Vue générale du système II.

Des études génétiques menées principalement sur le chloroplaste de l'algue unicellulaire *Chlamydomonas reinhardtii* (revue Xie and Merchant, 1998), chez la bactérie Gram-positif *Bacillus subtilis* (Le Brun *et al.*, 2000) et la bactérie Gram-négative *Bordetella pertussis* (Feissner *et al.*, 2005) ont permis de mettre en évidence un système singulier de maturation des cytochromes de type *c* nommé système II. Ce système est opérationnel chez les bactéries Gram-positives, certaines β- δ- et ε-protéobactéries Gram-négatives (dont *Helicobacter pylori*), les chloroplastes de plantes et d'algue verte ainsi que chez les cyanobactéries. *C. reinhardtii* est un excellent modèle pour l'étude de la biogenèse des cytochromes de type *c* dans la mesure où les mutants déficients pour la photosynthèse peuvent être maintenus sur un milieu contenant un substrat carboné réduit (acétate). Les mutants *ccs*

(cytochrome *c* synthesis) isolés chez *C. reinhardtii* sur la base d'une double déficience en cytochromes *c₆* et *f* (voir paragraphe II.4.1.2), sont spécifiquement déficients en cytochromes de type *c* chloroplastiques : ces mutants sont toujours capables d'importer les apocytochromes dans les thylakoïdes mais n'accumulent plus la forme holocytochrome dans le lumen. Six loci nucléaires (*CCS1* à *CCS6*) et un locus chloroplastique (*ccsA*) ont ainsi été identifiés comme étant requis pour les dernières étapes de maturation des cytochromes de type *c* chloroplastiques (Xie *et al.*, 1998, Page *et al.*, 2004). A ce jour, seules les protéines membranaires CcsA (Xie and Merchant, 1996) et Ccs1 (Inoue *et al.*, 1997) ont été caractérisées au niveau moléculaire chez *C. reinhardtii*. Comme les mutants *ccs4* et *ccs5* sont sauvés par l'ajout de thiols exogènes, il est probable que Ccs4 et Ccs5 fonctionnent dans le métabolisme redox (Page *et al.*, 2004). L'étude du système II chez *B. subtilis* a permis de caractériser deux facteurs supplémentaires, CcdA et CcsX, impliqués dans le métabolisme redox. Le système II a également été étudié chez *B. pertussis* (Beckett *et al.*, 2000, Feissner *et al.*, 2005). La figure 17 décrit brièvement le système II. Tout comme le cas des autres systèmes de maturation, la question du transport de l'hème reste ouverte.

3.2. Adressage des apocytochromes.

Tous les apocytochromes de type *c* présents dans les bactéries utilisant le système II possèdent une séquence signal d'adressage dépendante du système Sec et sont donc transportés à travers la membrane cytoplasmique de la même façon que les bactéries utilisant le système I (voir paragraphe III.2.2.1).

Les protéines destinées au compartiment chloroplastique (voir figure 18 pour l'organisation du chloroplaste) possèdent une ou deux séquences signal selon qu'elles soient codées par le génome nucléaire ou chloroplastique. La revue (Soll and Schleiff, 2004) résume les dernières données obtenues sur l'import des protéines dans le chloroplaste. Les protéines du thylakoïde codées par le génome nucléaire traversent les membranes externes et internes du chloroplaste *via* les complexes TOC/TIC puis sont dirigées vers la membrane thylakoïdienne par au moins trois voies différentes (Sec, Tat ou Srp/Alb3). Le précurseur du cytochrome *c₆*, codé par le génome nucléaire, possède deux séquences d'adressage clivées suite à la traversée de l'enveloppe du chloroplaste et de la membrane thylakoïdienne. L'import et la maturation du préapocytochrome *c₆* ne dépend pas de l'attachement de l'hème (Howe and Merchant, 1994). Le précurseur du cytochrome *f*, codé par le génome chloroplastique, est inséré dans la membrane thylakoïdienne d'une façon co-translationnelle. La séquence signal N-terminale, requise pour l'insertion de la protéine dans la membrane

thylakoïdienne, est clivée dans le lumen du thylakoïde au niveau d'une séquence consensus. Contrairement au cytochrome c_1 mitochondrial, la maturation du précytochrome f ne dépend pas de l'attachement de l'hème. Enfin, les apocytochromes non convertis en holocytochromes sont rapidement dégradés (voir revue Kranz *et al.*, 1998).

3.3. Rôles de CcsA et Ccs1.

Tout comme les protéines CcmC et CcmF du système I, CcsA contient un motif riche en résidus tryptophanes WG $X\phi$ WXWD (où ϕ est un résidu aromatique) ainsi que des histidines conservées (Hamel *et al.*, 2003). Toutefois, en dépit de ces ressemblances, CcsA n'est pas un véritable homologue de CcmC et CcmF et définit plutôt un membre singulier de la famille des protéines à motif WG $X\phi$ WXWD (Xie and Merchant, 1998). L'analyse topologique de CcsA basée sur l'utilisation des rapporteurs PhoA et LacZ révèle une protéine à cinq segments transmembranaires et place le motif riche en tryptophane et la majorité des histidines conservées vers le lumen, c'est à dire le compartiment d'assemblage des cytochromes de type c chloroplastiques. La présence de ces motifs suggère une interaction probable de CcsA avec l'hème. De plus, le complexe de 200kDa contenant Ccs1, détecté par BN-PAGE dans les membranes thylakoïdiennes, est absent dans un mutant *ccsA*, suggérant que CcsA et Ccs1 sont physiquement associés au sein de ce complexe. Le fait que, chez *B. pertussis*, la protéine CcsB (Ccs1) est absente dans un mutant *ccsA* suggère l'existence d'un complexe CcsA/CcsB similaire (Feissner *et al.*, 2005). Il est possible que ce complexe agisse comme un site de maturation des cytochromes de type c et soit constitué de facteurs requis pour la maturation de ces cytochromes, en particulier l'équivalent d'une hème lyase putative et des facteurs redox nécessaire au maintien de l'hème et des cystéines de l'apocytochrome dans un état réduit.

Ccs1 est une protéine hautement divergente dont la séquence primaire ne semble pas contenir de motifs apparents qui seraient caractéristiques d'une fonction biochimique. L'analyse topologique de Ccs1 confirme la présence de trois segments transmembranaires et d'un large domaine C-terminal essentiel à la fonction de la protéine et localisé dans le lumen (Tichy and Vermaas, 1999, Beckett *et al.*, 2000, Dreyfuss *et al.*, 2003). Le fait que l'accumulation de Ccs1 se trouve réduite dans les mutants *ccs2*, *ccs3*, *ccs4* et *ccsA* suggère que Ccs1 interagisse avec tous ces facteurs (éventuellement au sein du complexe de 200kDa détecté par BN-PAGE).

3.4. Un système redox : rôles de CcdA et ResA.

Une souche déficiente pour *resA* chez *Bacillus subtilis* n'accumule pas de cytochromes de type *c*. La synthèse des cytochromes de type *c* peut cependant être restaurée suite à l'addition d'un réducteur (DTT) dans le milieu de croissance ou suite à la délétion simultanée de la BdbD, une thiol disulphide oxydoréductase dont certains proposent qu'elle catalyse la formation d'un pont disulfure intramoléculaire dans les apocytochromes (Erlendsson and Hederstedt, 2002). ResA est associée à la membrane cytoplasmique par un seul segment transmembranaire et contient un domaine thioredoxine extracellulaire comprenant deux cystéines redox actives (Erlendsson *et al.*, 2003). La structure cristallographique de ResA (sous forme réduite et oxydée) confirme la présence de ce domaine thioredoxine (Crow *et al.*, 2004, Crow *et al.*, 2005). ResA agirait donc comme une thiol disulphide oxydoréductase qui pourrait maintenir les cystéines du motif CXXCH de l'apocytochrome dans un état réduit (Figure 17). HCF164, une protéine impliquée dans la biogenèse du complexe *b₆f* et présentant des similarités avec ResA a également été identifiée chez *A. thaliana* (Lennartz *et al.*, 2001).

Une souche *ccdA* de *B. subtilis* est non seulement déficiente en cytochromes de type *c* mais perd également sa capacité de sporuler. De façon intéressante, l'addition d'agents réducteurs dans le milieu de croissance ainsi que des mutations dans les gènes *bdbC* et *bdbD* codant des thiol-disulfide oxydoréductases peuvent supprimer les défauts liés à l'absence de CcdA. BdbC et BdbD semblent être les homologues apparents des protéines DsbB et DsbA d'*E. coli* et pourraient, tout comme leurs homologues, être responsables de l'oxydation des cystéines du motif CXXCH des apocytochromes, bien qu'aucune expérience ne permette à ce jour de conclure définitivement (Erlendsson and Hederstedt, 2002). La protéine membranaire CcdA, requise pour les dernières étapes de maturation des cytochromes de type *c* (Schiott *et al.*, 1997b; Schiott *et al.*, 1997a) est similaire à la partie centrale de DsbD de *E. coli* et pourrait être le donneur d'électrons de ResA. Des expériences de complémentation fonctionnelle hétérologue réciproque effectuées entre les espèces *R. capsulatus* (système II) et *E. coli* (système I) montrent que, en dépit de leur différence structurale, CcdA et DsbD sont des homologues fonctionnels (Katzen *et al.*, 2002). CcdA est composée de six segments transmembranaires et contient deux cystéines conservées. Le modèle actuel propose que ces cystéines permettent le transfert d'équivalents réducteurs à travers la membrane par une série d'échanges de ponts disulfures intramoléculaires. L'homologue de CcdA a été identifié chez *Arabidopsis thaliana* : il s'agit d'une protéine membranaire chloroplastique, polytopique,

contenant des résidus cystéines conservés, et impliquée dans la biogenèse du complexe *b₆f* (Page *et al.*, 2004).

4. Assemblage des cytochromes de type *c* selon le système III

4.1. Vue générale du système III

Le système III a été originellement découvert dans les mitochondries de *N. crassa* et de *S. cerevisiae*. L'analyse de différents génomes suggèrent que ce système opère également dans les mitochondries de champignons, de vertébrés et d'invertébrés, de parasites apicomplexes et de mitochondries d'algues vertes. De façon surprenante, des études génétiques et biochimiques menées chez *N. crassa* et de *S. cerevisiae* suggèrent que seulement deux facteurs seraient requis pour la maturation des cytochromes de type *c* mitochondriaux : l'hème lyase du cytochrome *c*, ou CCHL, codée par le gène *CYC3* (Dumont *et al.*, 1987; Drygas *et al.*, 1989) et l'hème lyase du cytochrome *c*₁, ou CC₁HL, codée par le gène *CYT2*⁵(Zollner *et al.*, 1992). Le rôle fonctionnel des hème lyases n'est que partiellement éclairci. Ces protéines, localisées dans l'espace intermembranaire et associées à la membrane interne mitochondriale (Enosawa and Ohashi, 1986), sont impliquées dans l'étape de fixation covalente de l'hème sur les apocytochromes respectifs (voir Figure 19). Contrairement à la CC₁HL, La CCHL est également requise pour l'import de l'apocytochrome *c* dans l'espace intermembranaire. L'analyse des séquences des génomes de vertébrés et d'invertébrés révèlent la présence d'une seule hème lyase chez ces organismes, l'holocytocrome c synthétase ou HCCS, dont la déficience est responsable d'une pathologie chez l'homme (Prakash *et al.*, 2002).

4.2. Rôle des hème lyases dans l'import mitochondrial des apocytochromes de type *c*

4.2.1. Import de l'apocytochrome *c*

Tout comme la plupart des petites protéines solubles destinées à l'espace intermembranaire, l'import de l'apocytochrome *c* ne dépend ni de l'ATP ni d'un potentiel électrochimique de part et d'autre la membrane interne. Contrairement au premier modèle selon lequel l'apocytochrome *c* diffuserait librement à travers la membrane externe sans

⁵ Dans un souci de simplification de la nomenclature, les gènes codant la CCHL et la CC₁HL seront respectivement nommés *CCHL* et *CC₁HL*, tout le long de ce manuscrit.

l'assistance d'un transporteur (Stuart and Neupert, 1990), l'apocytochrome *c* (codé par le génome nucléaire) serait importé dans l'espace intermembranaire de la mitochondrie *via* la translocase de la membrane externe TOM (voir chapitre I.3.2 et Figure 19) (Diekert *et al.*, 2001), dans un état déplié et sensible aux protéases (Jordi *et al.*, 1992). L'import de l'apocytochrome *c* dans l'espace intermembranaire semble toutefois définir une voie particulière dans la mesure où seuls deux composants du complexe TOM, la protéine Tom22 et le pore général composé de Tom40, paraissent être directement impliqués dans l'import de l'apocytochrome *c* à travers le complexe TOM (Wiedemann *et al.*, 2003a). Puisque l'apocytochrome *c* ne contient pas de préséquence d'adressage clivable en N-terminal, l'adressage mitochondrial de l'apocytochrome *c* dépendrait plutôt de signaux internes (Wang *et al.*, 1996).

L'import de l'apocytochrome *c* dans des vésicules de membranes externes de mitochondries de *N. crassa* n'est observé que dans des conditions où un anticorps anti-cytochrome *c* est ajouté dans le lumen de ces vésicules : ainsi, de part son affinité avec l'apocytochrome *c*, l'anticorps anti-cytochrome *c* piège l'apocytochrome *c* au sein des vésicules (Mayer *et al.*, 1995). Dans les mitochondries *in vivo*, l'hème lyase du cytochrome *c* (CCHL), qui s'associerait à l'apocytochrome dans un complexe détectable par co-immunoprécipitation (Mayer *et al.*, 1995), servirait de site de haute affinité pour l'apocytochrome *c*. Un mutant $\Delta cchl$ ne peut donc pas accumuler d'apocytochrome *c* dans la mitochondrie (Nargang *et al.*, 1988; Dumont *et al.*, 1988; Nicholson *et al.*, 1988) et accumule l'apocytochrome *c* dans le cytoplasme (Dumont *et al.*, 1991). La modification du sens de l'équilibre de la réaction d'import dépendrait non seulement de la fonction de récepteur de la CCHL mais également du changement de conformation de l'apo/holocytochrome *c* dans l'espace intermembranaire : la forme native et résistante aux protéases du cytochrome *c*, qui apparaît suite à la liaison covalente de l'hème à l'apocytochrome *c*, assistée par la CCHL, reste piégée dans l'espace intermembranaire. La CCHL joue donc un rôle fondamental dans l'import de l'apocytochrome *c*.

4.2.2. Import et maturation de l'apocytochrome c_1

L'import du cytochrome c_1 apparaît plus complexe que celui du cytochrome *c* (Figure 20). Le précurseur du cytochrome c_1 (p-cyt c_1), codé par le génome nucléaire, contient une longue séquence signal bipartite qui est clivée en deux étapes distinctes au cours de l'import. Le précurseur traverse la membrane externe mitochondriale par le complexe TOM et s'insère

dans la membrane interne *via* le complexe Tim23 (voir paragraphe I.3.2.), sans pénétrer dans la matrice (Wachter *et al.*, 1992), puis la première partie de la préséquence est clivée par une peptidase matricielle, générant ainsi une forme intermédiaire du cytochrome c_1 (i-cyt c_1). Cette étape n'est pas strictement requise pour la suite des évènements. La protéine, alors ancrée dans la membrane interne, lie l'hème de façon covalente dans l'espace intermembranaire puis subit un second clivage protéolytique catalysé par Imp2p, générant ainsi la forme mature du cytochrome c_1 (m-cyt c_1). Durant cette dernière étape, le cytochrome c_1 est ancré dans la membrane interne grâce à un segment d'acides aminés hydrophobes localisé en C-terminal puis s'associe aux autres sous-unités du complexe bc_1 . La fixation de l'hème, assistée par la CC₁HL, est un prérequis pour le clivage de la forme intermédiaire du cytochrome c_1 . Des expériences *in organello* de chasse du cytochrome c_1 marqué au [³⁵S] montrent que l'étape de fixation de l'hème sur la forme intermédiaire du cytochrome c_1 requiert la présence d'agents réducteurs, de NADH et d'une flavine (FAD ou FMN) (Nicholson *et al.*, 1989). L'absence de la CC₁HL conduit à l'accumulation d'une forme intermédiaire du cytochrome c_1 et s'accompagne d'un défaut de l'assemblage du complexe III (Zollner *et al.*, 1992).

4.3. Rôle des hème lyases dans la formation d'holocytochromes c et c_1

4.3.1. Analyse des mutants de levure déficients en hème lyase

Chez *S. cerevisiae*, un mutant $\Delta cchl$ n'accumule aucune des holoformes du cytochrome c , nommées iso1- et iso2- cytochrome c et codées par les gènes *CYC1* et *CYC7* respectivement (Matner and Sherman, 1982) et est donc déficient pour la respiration. Notez que dans les mutants *cyc3⁻* (*cchl⁻*) isolés par Sherman, alors que les ARN messagers des deux isoformes sont présents dans des quantités sauvages, la quantité d'apo-iso1-cytochrome est fortement diminuée, voire nulle, par rapport à une souche sauvage et celle d'apo-iso2-cytochrome est abondante (Matner and Sherman, 1982). L'absence d'apo-iso1-cytochrome serait due à sa rapide dégradation médiée par une voie dépendante de l'ubiquitine et du protéasome (Pearce and Sherman, 1997). Un mutant $\Delta cchl$ conduit également à un défaut d'assemblage de la cytochrome oxydase, conséquence directe de l'absence d'holocytochrome c (voir chapitre II.4.1.1.).

Des expériences d'incorporation d'hème radiomarqué au ⁵⁵Fe au sein d'apocytochrome c (dérivées des études de Basile *et al.*, 1980) ont été effectuées en présence

de mitochondries issues de souches sauvages de *S. cerevisiae* et de souches mutées au niveau du gène *CCHL* ou surexprimant le gène *CCHL* (Dumont *et al.*, 1987). La baisse significative de l'activité cytochrome *c* hème lyase observée dans les extraits mitochondriaux de souches *cchl* ainsi que l'augmentation de cette activité dans les extraits mitochondriaux surexprimant *CCHL* suggèrent que le gène *CCHL* code l'hème lyase du cytochrome *c*. On ne peut cependant pas exclure la possibilité que *CYC3* (*CCHL*) code un facteur de stabilité ou de régulation d'une hème lyase.

Chez *S. cerevisiae*, un mutant Δcc_1hl accumule la forme intermédiaire du cytochrome *c*₁ sans accumulation de la forme mature et est donc également déficient pour la respiration (Zollner *et al.*, 1992). Peu d'études *in organello* ont été réalisées dans des contextes mutants Δcc_1hl .

4.3.2. Mesure de l'activité hème lyase

Malgré ce que suggère l'appellation *hème lyase*, l'activité biochimique de la CCHL (EC 4.4.4.17) et de la CC₁HL n'a jamais été définitivement établie à ce jour par des études *in vitro*. Tous les systèmes développés jusqu'à présent reposent en effet sur la production hétérologue de la CCHL dans *E. coli* (Pollock *et al.*, 1998) ou sur l'utilisation de mitochondries purifiées comme source d'hème lyase (Basile *et al.*, 1980; Veloso *et al.*, 1984; Enosawa and Ohashi, 1987) et non sur l'utilisation d'une préparation pure d'enzyme. La surexpression des gènes *CYC1* et *CCHL* dans *E. coli* conduit à la formation d'holocytochrome *c* dans le cytoplasme bactérien (Pollock *et al.*, 1998). De plus, l'activité 'cytochrome *c* hème lyase' a par exemple pu être mesurée par HPLC à partir d'apocytochrome *c* purifié de *D. melanogaster* et d'hème, en présence de mitochondries issues de *S. cerevisiae* et d'agents réducteurs (Tong and Margoliash, 1998). La réaction suit une cinétique de type Michaelis-Menten et l'holocytochrome *c* s'avère être un inhibiteur compétitif de cette activité. Ces résultats suggèrent que le niveau d'holocytochrome *c* dans les mitochondries pourrait être autorégulé *in vivo* par l'holocytochrome *c*.

Des études *in organello* menées chez *N. crassa* montrent que la formation d'holocytochrome *c* est stimulée par la présence de NADPH ou de NADH (Nicholson *et al.*, 1987) et d'une flavine (FAD ou FMN) et requiert la présence d'hème sous forme réduite. Plus précisément, il semblerait que la flavine et le NADH soient spécifiquement requis pour l'étape de réduction de l'hème (Nicholson and Neupert, 1989). Puisque l'import et la maturation du cytochrome *c*₁ nécessitent également la présence de NADH, il semblerait que

l'étape de réduction de l'hème constitue un prérequis général pour la maturation des cytochromes de type *c* mitochondriaux.

4.3.3. Rôle des motifs conservés CPX

Des comparaisons de séquences d'ADN génomique issues de différents organismes modèles eucaryotes permettent de définir la famille des hème lyases. Les deux hème lyases de *S. cerevisiae* partagent environ 35% d'identité de séquences. L'alignement de ces séquences protéiques, présenté en Annexe 1, révèle la présence de domaines protéiques conservés, probablement importants pour la fonctionnalité de ces protéines. La région N-terminale des hème lyases présente toutefois très peu de conservation de séquences, à l'exception des motifs CPX (où X=V, M, I, L), nommés également motifs de régulation par l'hème (soulignés en jaune dans l'annexe 1). Ces motifs sont présents en deux ou trois exemplaires chez les CCHLs et en un seul exemplaire chez les CC₁HLs. Des motifs CPX sont également présents au sein de protéines possédant la particularité d'interagir avec l'hème. Par exemple, l'activateur transcriptionnel Hap1p contient sept motifs CPV (Pfeifer *et al.*, 1989): la liaison de l'hème sur ces motifs induirait une dissociation du complexe Hsp70/Hsp90-Hap1p, libérant ainsi ce dernier qui pourrait alors se fixer à l'ADN et activer la transcription de gènes cibles (Fytlovich *et al.*, 1993; Zhang and Guarente, 1994; Lee *et al.*, 2003). Deux copies d'un motif similaire sont également présentes au niveau de la préséquence du précurseur de la δ -aminolevulinate synthétase de mammifère : l'hème, *via* son interaction avec les motifs CPV, peut inhiber l'import de ces précurseurs dans la mitochondrie (Lathrop and Timko, 1993). Des expériences complémentaires *in vitro* démontrent que l'hème peut effectivement se lier spécifiquement à un peptide contenant un motif consensus de type CPX (Zhang and Guarente, 1995). Un mode de régulation par l'hème, *via* les motifs CPX, a également été mis en évidence pour la protéine kinase HRI de réticulocytes qui contrôle le facteur d'initiation de la traduction eIF2 α (Chen and London, 1995), ainsi que pour la protéine Bach, répresseur transcriptionnel chez les mammifères (Ogawa *et al.*, 2001).

La délétion du motif CPV (ou la substitution de la cystéine) de la CC₁HL de *N. crassa* (Steiner *et al.*, 1996) conduit à l'accumulation partielle de la forme intermédiaire i-cyt *c*₁ et affecte donc la maturation de l'holocytochrome *c*₁ sans toutefois abolir la croissance respiratoire. Ce motif CPV joue donc un rôle important, mais pas strictement essentiel à la maturation du cytochrome *c*₁. Cette étude montre d'autre part, par une méthode indirecte, qu'un mutant Δ CPV n'est plus capable de fixer l'hème, et souligne donc l'importance de ce

motif pour l'interaction avec l'hème. Une des méthodes indirectes utilisées par Steiner *et al* repose sur le fait que l'hydrolyse partielle de la CCHL (conduisant à une forme plus courte résistante aux protéases) obtenue suite à un traitement trypsique de mitoplastes est supprimée par l'addition d'hème ; l'effet de l'hème n'est plus observé dans un contexte mutant *SPV*. Notez qu'aucune étude directe de la liaison physique entre l'hème lyase et l'hème n'a pu être mise au point en raison de la difficulté à purifier les hème lyases dans un état biochimiquement actif.

4.3.4. Import des hème lyases

Les hème lyases de levure sont associées à la membrane interne mitochondriale, du côté de l'espace intermembranaire (Enosawa and Ohashi, 1986; Dumont *et al.*, 1991). Les hème lyases ne contiennent aucun segment transmembranaire putatif et leur mode d'attachement à la membrane interne demeure inconnu.

Les hème lyases ne contiennent pas de préséquences d'adressage en N-terminal et font donc partie de ces protéines mitochondriales importées *via* des signaux d'adressage internes. Des expériences d'import menées sur la CCHL de *N. crassa* et sur les deux hème lyases de *S. cerevisiae* montrent que les hème lyases empruntent le complexe TOM pour atteindre l'espace intermembranaire. Puisque l'import ne dépend pas d'un potentiel membranaire ni de la présence d'ATP dans l'espace intermembranaire, les translocases TIM23 et TIM22 ne seraient pas requises pour l'import des hème lyases (Lill *et al.*, 1992; Steiner *et al.*, 1995). La présence, dans les hème lyases, d'un large domaine résistant à un traitement trypsique fut utilisée pour étudier la cinétique de repliement des hème lyases au cours de leur import. Cette expérience suggère que les hème lyases se replieraient dans une conformation résistante aux protéases au cours de l'import. Puisque cette étape de repliement ne dépend pas de la présence d'ATP, il semblerait que des chaperonnes fonctionnant comme Hsp60 ou Hsp70 ne soient pas impliquées dans ce processus (Steiner *et al.*, 1995). Des délétions partielles de la CCHL de *N. crassa* ont permis d'identifier une région interne hydrophile requise pour l'import de la protéine, située dans le troisième quart de la séquence primaire (Diekert *et al.*, 1999). Cette séquence (signalée dans l'annexe 1), hautement conservée, est nécessaire et suffisante pour importer dans l'espace intermembranaire une protéine hybride contenant cette séquence.

4.4. Pathologie associée à une déficience en hème lyase chez l'humain

Chez l'humain, la perte de l'unique hème lyase putative (nommée HCCS pour holocytocrome c-type synthetase), à l'état hétérozygote, perte causée par des délétions de

certaines régions du chromosome X, entraîne un défaut neurodéveloppemental majeur et rare, à transmission dominante (Schaefer *et al.*, 1996; Prakash *et al.*, 2002; Schwarz and Cox, 2002). Ce syndrome, nommé MLS pour «Microphthalmia with Linear Skin defects », se caractérise par la présence massive d'érythèmes faciaux et de défauts au niveau des yeux, parfois associés à des anomalies du cerveau et du coeur. La plupart des patients sont des femmes ; les rares hommes atteints par cette maladie portent le chromosome X en deux exemplaires. La délétion de la région du chromosome X chez ces patients a été générée dans des souris pour analyser les bases moléculaires de ce syndrome (Prakash *et al.*, 2002). Cette délétion conduit à la létalité des embryons hémizygotés, homozygotés et hétérozygotés dans une étape précoce du développement⁶. Cette létalité est supprimée quand le gène humain *HCCS* est apporté *en trans*, sans phénotype supplémentaire apparent, et confirme donc que la perte de *HCCS* est bien la cause du syndrome MLS.

4.5. Autres facteurs de maturation ?

Une recherche intensive de gènes affectant la biosynthèse du cytochrome *c* dans la levure a été menée par l'équipe de Sherman au cours des quarante dernières années. Cette recherche, basée notamment sur l'étude du phénotype respiratoire sur un milieu contenant du chlorolactate comme unique source de carbone, permit d'identifier quatre gènes (nommés *CYCx*) qui, une fois mutés, présentaient une déficience spécifique en holocytochrome *c* (Rothstein and Sherman, 1980). Deux d'entre eux, *CYC1* et *CYC7*, correspondent aux gènes de structure codant respectivement les isoformes 1 et 2 du cytochrome *c*. *CYC3* s'est révélé être le gène codant l'hème lyase du cytochrome *c* (CCHL). Enfin, des mutations localisées dans le gène baptisé *CYC2* et qui conduisaient à une déficience partielle des deux isoformes du cytochrome *c* ont également été obtenues. Puisque de l'apocytochrome *c* s'accumulait dans ces mutants, il a été proposé que Cyc2p intervienne dans la biosynthèse du cytochrome *c* au niveau post-traductionnel, en tant que facteur facilitant l'import de l'apocytochrome *c* (Matner and Sherman, 1982). Une caractérisation plus fine de mutants *cyc2* montre que l'holo-iso1-cytochrome *c* est plus affecté que l'holo-iso2-cytochrome *c* (probablement en raison de sa plus faible stabilité) et que le niveau de CCHL ou de cytochrome *b₂* n'est pas affecté dans un mutant *cyc2* (Dumont *et al.*, 1993). Cette étude montre également que la protéine Cyc2p est localisée dans la mitochondrie. La délétion du gène *CYC2* semblerait toutefois avoir un effet pléiotrope au niveau de diverses fonctions mitochondriale incluant la

⁶ Une souris femelle hétérozygote a toutefois été obtenue. Ce très faible pourcentage de survie est corrélé à la prévalence de la délétion MLS à l'état hétérozygote chez l'humain.

biosynthèse du cytochrome *c* mais également la maintien de la stabilité ionique et de l'intégrité de la mitochondrie. L'unique argument appuyant ces dernières hypothèses repose sur l'observation d'un retard de croissance d'un mutant $\Delta cyc2$ sur un milieu hyperionique, phénotype comparable à un mutant $\Delta por1$. *Cyc2p* a donc plus récemment été décrit comme un facteur général de biogenèse mitochondriale (Pearce *et al.*, 1998; Sanchez *et al.*, 2001).

Etant donnée la complexité des systèmes de maturation des cytochromes de type *c* décrits chez les bactéries, les mitochondries de plantes et les chloroplastes, on peut penser que de nouveaux facteurs de maturation devraient pouvoir être identifiés dans les mitochondries de champignons et d'humain, en particulier pour accomplir les fonctions de transport et de livraison de l'hème, et de contrôle redox de la réaction. Puisque l'hème et les cystéines du motif CXXCH de l'apocytochrome doivent être maintenus réduits pour rendre possible l'étape de ligation, on peut penser que des oxydoréductases soient également requises pour maturer les cytochromes de type *c* dans l'espace intermembranaire des mitochondries de champignons ou d'humain. L'approche génétique proposée par Sherman n'a pas permis d'isoler de nouveaux facteurs de maturation, suggérant l'existence d'une redondance fonctionnelle ou traduisant le caractère essentiel à la viabilité cellulaire de certains de ces gènes. Une approche biochimique complémentaire, reposant par exemple sur la recherche de partenaires des hème lyases pourrait permettre d'identifier de nouveaux facteurs de maturation. Bien entendu, on ne peut toutefois pas exclure que la maturation des cytochromes de type *c* dans les mitochondries animales suive une voie plus simplifiée que celle des mitochondries de plantes ou des bactéries, pour des raisons qu'il serait intéressant d'identifier. Cette réflexion sera plus largement développée au moment de la discussion.

5. Autres systèmes de maturation des cytochromes de type *c* ?

Les cytochromes *c* et *c*₁ des mitochondries de trypanosomes et d'euglènes ont la particularité de contenir une seule cystéine au niveau du site de liaison à l'hème XXXCH (voir tableau 3). Cette observation est corrélée aux résultats d'une analyse bioinformatique de six génomes de trypanosomes et d'euglènes qui révèle l'absence de gènes codant des facteurs de maturation décrits dans les systèmes I, II et III (Allen *et al.*, 2004). Le cytochrome *c*₁ de *Trypanosoma brucei* serait de plus importé dans la mitochondrie par une voie particulière (Priest and Hajduk, 2003). Des expériences d'expression hétérologue menées chez *E. coli* montrent de plus que la machinerie de maturation *ccm* n'est pas capable de maturer le cytochrome *c*₁ de *T. brucei* mais peut toutefois maturer une version mutée CXXCH de ce cytochrome. Ce résultat confirme la nécessité de la présence de deux cystéines pour les cytochromes maturés par le système I et montre que le cytochrome *c* de *T. brucei* peut s'accomoder du motif CXXCH. Un quatrième système de maturation des cytochromes de type *c*, probablement corrélé à la présence d'une seule cystéine dans le site de liaison à l'hème, semble donc s'opérer dans les mitochondries de trypanosomes et d'euglènes.

La structure cristallographique des complexes *b₆f* de *C. reinhardtii* et de la cyanobactérie *Mastigocladus laminosus* révèle la présence d'un nouvel hème lié de façon covalente au polypeptide *via* une seule cystéine (Stroebel *et al.*, 2003; Kurisu *et al.*, 2003). Quatre mutants incapables de former cette liaison covalente ont été isolés. La caractérisation de ces mutants pourrait permettre d'identifier un nouveau système de biogenèse des cytochromes de type *c*, proche ou distinct de celui développé par les trypanosomes (Gumpel *et al.*, 1995, Kuras *et al.*, 1997, de Vitry *et al.*, 2004).

6. Formation *in vitro* d'holocytochrome *c*.

L'équipe de Ferguson a pu montrer qu'un cytochrome de type *c* pouvait être formé *in vitro* en présence d'apocytochrome et d'hème, dans des conditions réductrices et de pH physiologique, et en l'absence de facteurs de maturation (Daltrop *et al.*, 2002), dans un laps de temps certes incompatible avec la vie. En l'absence d'agent réducteur, un pont disulfure intramoléculaire se forme au niveau des cystéines du site de liaison à l'hème de l'apocytochrome. Au début de la réaction et dans des conditions réductrices, l'apocytochrome *c*₅₅₂ de *Hydrogenobacter thermophilus* lie l'hème de façon non covalente formant ainsi un

cytochrome de type *b* intermédiaire (grâce à la coordination de l'atome de fer); la réaction est d'autant plus rapide que l'hème se trouve dans la juste orientation. Puis les liaisons thioéthers se forment, probablement du fait de la proximité des groupes vinyl de l'hème et des résidus cystéines de l'apocytochrome. La présence de l'hème dans un état réduit éviterait la formation de produits subsidiaires. La nécessité d'une conformation correcte de l'apocytochrome préalable à la formation de la liaison covalente, mis en évidence ici lors de la première étape de la réaction, paraît être une donnée importante. Le cytochrome *c* de coeur de bœuf et le cytochrome *c*₅₅₀ de *P. denitrificans* ont également pu être maturés *in vitro*, avec la formation d'un cytochrome de type *b* intermédiaire (Daltrop and Ferguson, 2003). Ces études soulignent l'importance de facteurs de maturation comme les hème lyases pour la maturation des cytochromes de type *c* *in vivo*. En effet, on peut penser qu'un (ou plusieurs) facteur(s) comme l'hème lyase, pourraient favoriser la stabilisation d'une conformation spécifique de l'apoprotéine puis assister l'étape de présentation de l'hème à l'apocytochrome, d'une façon stéréospécifique.

IV. Problématique abordée au cours de la thèse

L'étonnante diversité des trois systèmes majeurs de maturation des cytochromes de type *c* décrits jusqu'à présent dans le monde vivant (Figure 12) soulèvent des questions d'ordre phylogénétique. Toutefois, l'apparente simplicité du système III de maturation mitochondrial dans les cellules animales et fongiques pourrait également refléter un manque de données expérimentales concernant ce dernier système de maturation. Aussi, la question de la présence éventuelle de facteurs redox contrôlant la maturation des cytochromes de type *c* dans l'espace intermembranaire des mitochondries devait également être abordée. Mon travail de thèse a donc consisté à explorer le système III de maturation des cytochromes de type *c* dans la mitochondrie de levure, afin d'identifier de nouveaux partenaires protéiques éventuels des hème lyases, par une approche couplée de génétique (classique et moléculaire) et de biochimie. La levure de boulangerie *Saccharomyces cerevisiae* est un excellent modèle pour l'étude de la maturation des cytochromes de type *c* dans la mesure où des mutants déficients en cytochrome *c* ou *c*₁ (comme tout autre mutant respiratoire) sont viables chez cet organisme, la production d'énergie pouvant être assurée par la fermentation.

La première partie de ce travail, présentée dans le chapitre I, consistait à préciser la spécificité de substrats des deux hème lyases de levure et à étudier l'expression hétérologue de l'unique hème lyase humaine chez *Saccharomyces cerevisiae*. Une analyse génétique a également été entreprise dans l'objectif d'identifier de nouveaux partenaires putatifs des hème lyases, permettant ainsi l'isolement du gène *CYC2*.

La deuxième partie de ce travail, décrite dans le chapitre II, a porté sur la caractérisation de Cyc2p et a permis de préciser le rôle de cette protéine dans la maturation des cytochromes de type *c*.

L'étude de la fonction de certains motifs de la CCHL, en particulier les motifs CPX de régulation par l'hème, a été envisagée dans le chapitre III.

Enfin, la recherche de nouveaux partenaires des hème lyases a été poursuivie par une approche biochimique fondée sur la mise en évidence et la purification de complexes protéiques contenant la CCHL. Cette dernière étude, en cours de réalisation, fait l'objet du chapitre IV.

- RESULTATS -

Chapitre I : Etude de la spécificité de substrats des hème lyases

1. Cadre de l'étude

Les hème lyases des cytochromes c et c_1 sont des composants essentiels à la biogenèse des cytochromes de type c dans les mitochondries de champignons. L'hème lyase du cytochrome c (CCHL) et l'hème lyase du cytochrome c_1 (CC₁HL) sont requises pour l'étape d'attachement covalent de l'hème sur l'apocytochrome c et c_1 , respectivement. Les travaux de recherche effectués jusqu'alors suggéraient que ces deux hème lyases présentaient des spécificités de substrats distinctes. Toutefois, l'observation du phénotype respiratoire des mutants $\Delta cchl$ et Δcc_1hl effectuée au laboratoire suppose un autre mode d'action. Puisque les cytochromes c et c_1 sont essentiels au transfert d'électrons au sein de la chaîne respiratoire, les mutants nuls $\Delta cchl$ et Δcc_1hl ne devraient pas pousser sur un milieu contenant un substrat uniquement respirable comme source de carbone (glycérol, éthanol, lactate). De façon surprenante, alors que l'absence de CCHL conduit à une déficience respiratoire absolue, l'absence de CC₁HL n'abolit pas complètement la respiration, comme en témoigne la croissance résiduelle d'un mutant Δcc_1hl sur un milieu non fermentescible (voir la Figure 1 de l'article I). Une petite quantité de cytochrome c_1 semble donc être assemblée dans un contexte Δcc_1hl , probablement grâce à l'autre hème lyase, la CCHL. Cette observation nous a donc conduit, dans un premier temps, à réexaminer la spécificité de substrats des deux hème lyases de levure. D'autre part, la comparaison de séquences protéiques de différents organismes indique qu'une seule hème lyase putative serait présente chez les vertébrés et invertébrés. Il nous a donc paru intéressant d'examiner le rôle de l'unique hème lyase humaine, en particulier vis à vis de ses substrats potentiels.

Méthodologie :

Étant donnée la nature des mutants d'hème lyase (déficients pour la respiration), l'étude de la spécificité de substrat des hème lyases a été abordée par l'approche de la génétique classique. Les mutants $\Delta cchl$ et Δcc_1hl ont tout d'abord été plus finement caractérisés vis à vis de leur contenu en holocytochrome c et c_1 , grâce à une technique sensible fondée sur la détection de l'activité pseudoperoxydase intrinsèque de l'hème (*heme staining*). L'étude de l'effet de la surexpression de la CCHL ou de la CC₁HL sur la croissance respiratoire des

mutants Δcc_1hl et $\Delta cchl$ respectivement, a ensuite été entreprise afin de préciser la spécificité de substrat de chacune des hème lyases de levure.

La fonction de l'unique hème lyase humaine (et de souris) a été analysée par un système d'expression hétérologue chez la levure *S. cerevisiae*. L'ADNc codant l'unique hème lyase humaine (HCCS) putative a été cloné dans un plasmide multicopie sous contrôle d'un promoteur fort (PGK). L'effet de la surexpression de ce gène sur la croissance respiratoire des mutants Δcc_1hl et $\Delta cchl$ a ensuite été analysé.

Enfin, une recherche de supprimeurs génétiques et multicopies capables de restaurer la croissance respiratoire de mutants d'hème lyases a été entreprise pour tenter de préciser les modalités de contrôle de la spécificité de substrats des hème lyases et d'identifier d'éventuels nouveaux facteurs de maturation des cytochromes de type *c* dans la mitochondrie. L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication (Bernard *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2003 : "Overlapping specificities of the mitochondrial cytochrome *c* and *c*₁ heme lyases") dont les résultats sont résumés dans le paragraphe suivant.

2. Résumé de l'article I :

1.1. Conversion de l'apocytochrome *c*₁ en holocytochrome *c*₁ médiée par la CCHL

Figure 2

Le niveau d'holocytochrome *c*₁ dans les mutants nuls d'hème lyases a été mesuré par la technique d'*heme staining*. La quantité résiduelle d'holocytochrome *c*₁ accumulée dans un mutant Δcc_1hl (environ 5%) explique la croissance résiduelle de ce mutant sur un milieu non fermentescible. De plus, cette faible accumulation d'holocytochrome *c*₁ n'est plus observée dans un contexte $\Delta cc_1hl \Delta cchl$. Ce résultat suggère donc que la CCHL présente une faible activité de maturation de l'holocytochrome *c*₁.

2.2. La surexpression de la CCHL compense l'absence de la CC₁HL

Figure 3

Afin de préciser le résultat précédent, les gènes codant la CCHL et la CC₁HL ont été clonés dans un plasmide multicopie (pFL44) puis exprimés chez les mutants Δcc_1hl et $\Delta cchl$, respectivement. La surexpression du gène *CCHL* supprime partiellement le défaut respiratoire d'un mutant Δcc_1hl ; ce résultat conforte l'hypothèse précédente. En revanche, la surexpression du gène *CC₁HL* dans un mutant $\Delta cchl$ ne rétablit pas la croissance

respiratoire. Ces résultats montrent clairement que la CC₁HL présente une spécificité de substrat stricte alors que la CCHL possède une spécificité plus large, puisqu'elle peut être impliquée dans la fixation de l'hème sur l'apocytochrome c₁.

2.3. L'hème lyase humaine peut assembler les cytochromes *c* et *c*₁ chez la levure.

Figure 3 et Tableau II

La surproduction de l'hème lyase putative humaine ou de souris dans des souches de levure Δcc_1hl , $\Delta cchl$ et $\Delta cc_1hl \Delta cchl$ restaure la croissance respiratoire. De plus, les quantités d'holocytochrome *c* et d'holocytochrome *c*₁ observées spectralement sont proches de celles d'une souche sauvage. Les temps de génération de ces transformants (dans un milieu respirable) sont également comparables à celui d'une souche sauvage. L'hème lyase humaine (ou de souris) porte donc les deux activités holocytochrome *c* et *c*₁ synthétase, contrairement à ce qui avait été suggéré précédemment (Schwarz and Cox, 2002).

2.4. Des supresseurs génétiques compensent l'absence de la CC₁HL

Figure 5 et Tableau III

Des révertants (spontanés et induits aux UV) capables de compenser le défaut respiratoire lié à l'absence de la CC₁HL ont été isolés sur un milieu non fermentescible. En revanche, aucun révertant du mutant $\Delta cchl$ n'a pu être isolé, même après mutagenèse aux UV.

Les révertants ont été classés selon des critères de croissance respiratoire, de thermosensibilité et selon le caractère dominant ou récessif de la mutation supresseur. Ceci m'a permis d'établir quatre classes de révertants (Table III) et d'étudier par la suite un représentant de chaque classe. Les révertants spontanés forment deux classes phénotypiques différentes et la mutation supresseur impliquée dans chaque cas est nucléaire récessive. Les révertants UV forment deux autres classes, distinguables par la thermosensibilité, et la mutation supresseur impliquée dans chaque cas est nucléaire semi-dominante. Il a également été vérifié que les révertants UV différaient de la souche mutante Δcc_1hl par un seul évènement mutationnel. Les spectres de cytochromes et la quantification de l'activité peroxydase intrinsèque de l'hème (*heme staining*) montrent que le niveau d'holocytochrome *c*₁ est partiellement restauré chez ces révertants.

2.4.1. L'expression du cytochrome *c* ou de la CCHL est altérée chez les révertants récessifs.

Figures 6, 7 et tableau III

L'analyse biochimique des révertants spontanés révèle une faible augmentation du niveau de la CCHL pour le révertant R2 et une baisse d'accumulation du cytochrome *c* pour le révertant R19. Dans le cas de R2, le mécanisme de suppression serait directement médié par la CCHL (équivalent à l'effet multicopie discuté au point 2.2). Dans le cas de R19, la mutation supprimeur agit au niveau transcriptionnel ou post-transcriptionnel, comme en témoigne la baisse d'accumulation du niveau d'ARNm de *CYC1* et *CYC7* (codant les deux isoformes du cytochrome *c*) observée par Northern Blot chez ce révertant. Le mécanisme de suppression est probablement lié à la diminution du niveau du cytochrome *c*, substrat principal de la CCHL: la CCHL deviendrait alors plus disponible pour son substrat secondaire, le cytochrome *c*₁.

2.4.2. Les mutations supprimeurs semi-dominantes touchent les gènes codant la CCHL et le cytochrome *c*₁.

Figure 7 et tableau III

Une analyse génétique des révertants obtenus par mutagenèse UV, couplée à la séquence de gènes candidats, a permis de localiser les mutations supprimeurs au niveau de deux loci, reflétant deux mécanismes différents de suppression :

(1) *Modification de l'enzyme* : Le révertant UV9, qui présente une légère baisse d'accumulation de la CCHL et du cytochrome *c*, possède deux mutations contiguës au niveau du gène codant la CCHL, entraînant un double changement d'acides aminés F₁₃₀L-L₁₃₀I, signalé dans l'alignement de séquences présenté en Annexe 1. On peut supposer que ce changement d'acides aminés entraîne un changement de spécificité de substrat : la CCHL deviendrait plus affine pour l'apocytochrome *c*₁, augmentant ainsi le niveau d'accumulation de l'holocytochrome *c*₁. On ne peut toutefois pas exclure la possibilité que cette substitution rende la catalyse (de la réaction d'addition de l'hème sur l'apocytochrome *c*₁ *via* la CCHL) plus efficace.

(2) *Modification du substrat* : Les révertants UV14, UV34 et UV48 présentent chacun une mutation différente au niveau du gène codant le cytochrome *c*₁ (Annexe 1). La localisation spatiale des acides aminés ainsi modifiés est présentée dans la Figure 21. Deux de ces mutations, cyt1-34 et cyt1-48, modifient le site de liaison à l'hème CXXCH du cytochrome *c*₁ : CAPCH et CADCH au lieu de CAACH. La troisième mutation (cyt1-14) conduit à la substitution d'un acide aminé exposé du côté de l'espace intermembranaire, dans la partie N-terminale du cytochrome *c*₁. Tout comme précédemment, nous pourrions envisager que ces substitutions d'acides aminés :

(1) modifient les propriétés d'affinité entre la CCHL et le substrat apocytochrome c_1 , en modifiant l'interaction avec la CCHL et donc en modulant la spécificité de substrats.

(2) rendent la catalyse⁷ enzymatique plus efficace : la modification des sites de fixation à l'hème (observés chez les révertants UV34 et UV48) pourrait par exemple conduire à un changement de l'état redox des cystéines, modifiant ainsi les conditions physicochimiques de la réaction d'addition de l'hème.

Dans les deux cas, la vitesse de la réaction se trouve augmentée.

La conformation de la 'poche' dans lequel l'hème serait positionné juste avant l'étape de fixation covalente pourrait également être modifiée en faveur d'une augmentation d'affinité pour la CCHL ou d'une meilleure efficacité catalytique.

2.5. Isolement de *CYC2*, suppresseur en copie multiple de l'absence d'hème c_1 lyase.

Figure 4

Une recherche de suppresseurs multicopies capables de supprimer le défaut respiratoire des mutants $\Delta cchl$ et Δcc_1hl a été entreprise afin de rechercher d'éventuels nouveaux partenaires des hème lyases. Les mutants $\Delta cchl$ et Δcc_1hl ont donc été transformés par une banque d'ADN génomique sauvage (préparée par François Lacroute), sélectionnés sur un milieu approprié puis testés pour leur capacité à croître sur un milieu non fermentescible. Aucun suppresseur multicopie n'a été obtenu à partir du mutant $\Delta cchl$. En revanche, il est apparu que la surexpression du gène *CYC2* était capable de restaurer la croissance respiratoire d'un mutant Δcc_1hl . Cette suppression n'est pas due à une augmentation du niveau de la CCHL (Figure 3C).

2.6. Conclusion

L'analyse des suppresseurs génétiques et multicopies obtenus à partir du mutant Δcc_1hl révèle que l'activité de la CCHL envers l'apocytochrome c_1 peut être favorisée : (1) en réduisant l'abondance de son substrat principal, l'apocytochrome c_1 , (2) en augmentant l'accumulation de la CCHL, (3) en modifiant la relation enzyme-substrat *via* des mutations touchant la CCHL ou le cytochrome c_1 , (4) en surexprimant le gène *CYC2*. Cette étude a permis d'identifier la protéine Cyc2p comme un nouveau partenaire des hème lyases chez la levure. La caractérisation de cette protéine fera l'objet de la seconde partie de ce travail.

⁷ En terme de réactivité chimique

Article I

“Overlapping specificities of the mitochondrial cytochrome *c* and *c*₁ heme lyases”⁸

⁸ J’aimerais signaler deux erreurs dans le tableau de souches de cet article : la souche YPH1 est de type sexuel α et la souche YCT1-11A est $\Delta cyc2$:Hyb et non Δcc_1hl :HIS3.

Overlapping Specificities of the Mitochondrial Cytochrome *c* and *c*₁ Heme Lyases*[§]

Received for publication, August 12, 2003, and in revised form, September 17, 2003
Published, JBC Papers in Press, September 26, 2003, DOI 10.1074/jbc.M308881200

Delphine G. Bernard^{‡§}, Stéphane T. Gabilly[§], Geneviève Dujardin[‡], Sabeeha Merchant[§],
and Patrice P. Hamel^{§¶}

From the [‡]Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, Avenue de la Terrasse, 97198 Gif-sur-Yvette, France
and the [§]Department of Chemistry and Biochemistry, UCLA, Los Angeles, California 90095-1569

Heme attachment to the apoforms of fungal mitochondrial cytochrome *c* and *c*₁ requires the activity of cytochrome *c* and *c*₁ heme lyases (CCHL and CC₁HL), which are enzymes with distinct substrate specificity. However, the presence of a single heme lyase in higher eukaryotes is suggestive of broader substrate specificity. Here, we demonstrate that yeast CCHL is active toward the non-cognate substrate apocytochrome *c*₁, *i.e.* CCHL promotes low levels of apocytochrome *c*₁ conversion to its holoform in the absence of CC₁HL. Moreover, that the single human heme lyase also displays a broader cytochrome specificity is evident from its ability to substitute for both yeast CCHL and CC₁HL. Multicopy and genetic suppressors of the absence of CC₁HL were isolated and their analysis revealed that the activity of CCHL toward cytochrome *c*₁ can be enhanced by: 1) reducing the abundance of the cognate substrate apocytochrome *c*, 2) increasing the accumulation of CCHL, 3) modifying the substrate-enzyme interaction through point mutations in CCHL or cytochrome *c*₁, or 4) over-expressing Cyc2p, a protein known previously only as a mitochondrial biogenesis factor. Based on the functional interaction of Cyc2p with CCHL and the presence of a putative FAD-binding site in the protein, we hypothesize that Cyc2p controls the redox chemistry of the heme lyase reaction.

The *c*-type cytochromes are a widespread class of essential metalloproteins that are located on the positive side of energy-transducing membrane systems. They function in electron transfer (1) but are also involved in the cellular death pathways in vertebrates by signaling mitochondrial status (2). Their distinctive feature is the covalent attachment of the prosthetic group via thioether linkages between the vinyl chains of heme and the cysteines of the CXXCH motif on the apocytochrome. If cytochromes *c* are among the best characterized molecules at the structural level (3, 4), the biochemistry of their maturation is poorly understood and needs to be deciphered. Key questions in defining the steps and the biochemi-

cal requirement to complete holocytochrome *c* maturation have been addressed and the general conclusion is that heme and apocytochromes need to be transported to the positive side of the energy-transducing membrane and maintained in a reduced form prior to catalysis of heme attachment, the terminal step of the maturation process (1, 5–9). Remarkably, three distinct assembly pathways (systems I, II, and III) have been recognized through genetic analysis of *c*-type cytochrome maturation in prokaryotic and eukaryotic organisms (for review see Refs. 1, 3, and 8–12). Experimental investigations in bacterial and plastid models for systems I and II led to the view that cytochrome *c* maturation is a complex process that requires the activity of numerous gene products (1, 11–16). Common to systems I and II is the operation of a cytochrome *c* assembly machinery with heme delivery/handling systems (8, 17–21) and multiple redox components dedicated to the maintenance of co-factor and cysteine sulphydryls in a reduced state prior to the heme lyase reaction (9, 15, 22–26).

System III was discovered through studies in *Neurospora crassa* and *Saccharomyces cerevisiae* and seems to be restricted to mitochondria of vertebrates, invertebrates, apicomplexan parasites, and green algae as gauged from genome analysis (see Fig. 1 of Supplemental Materials and Ref. 8). In contrast to systems I and II, system III appears surprisingly less complex as extensive genetic screens led to the discovery of only two assembly factors, the cytochrome *c* heme lyase (CCHL)¹ and the cytochrome *c*₁ heme lyase (CC₁HL), for the two *c*-type cytochromes found in the mitochondrial intermembrane space, cytochrome *c* and cytochrome *c*₁, respectively (27–30). It is conceivable that other assembly factors have escaped genetic identification because of redundancy of function or participation in essential mitochondrial processes.

The specificity of each lyase for its respective substrate was established through genetics in the yeast system (28, 31, 32) but needs to be re-examined in the context of the situation where genomes of multicellular eukaryotes, including human, reveal one heme lyase (referred to as HCCS) for both cytochrome *c* and cytochrome *c*₁ (see Fig. 1 of Supplemental Materials). The relevance of the study of the system III assembly pathway to human health has now become obvious with the finding that loss of CCHL causes a neurodevelopmental disorder with cardiomyopathic manifestations (33). The CCHL and CC₁HL are related in sequence (35% amino acid identity) and display, with the notable exception of *Plasmodium falciparum* and *Chlamydomonas reinhardtii* CC₁HL, one to four typical heme regulatory motifs (see Fig. 1 of Supplemental Materials)

* This work was supported by National Institutes of Health Grant GM48350 (to S. M.), an Association Française contre les Myopathies grant (to G. D.), American Heart Association Postdoctoral Fellowship 0120100Y (to P. P. H.), and a Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie fellowship (to D. G. B.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[§] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. 1 and 2.

[¶] To whom correspondence should be addressed: Dept. of Chemistry and Biochemistry, UCLA, Box 951569, Los Angeles, CA 90095-1569. Tel.: 310-825-8300; Fax: 310-206-1035; E-mail: hamel@chem.ucla.edu.

¹ The abbreviations used are: CCHL, cytochrome *c* heme lyase; CC₁HL, cytochrome *c*₁ heme lyase; HCCS, holocytochrome *c* synthetase; LDS, lithium dodecyl sulfate; ORF, open reading frame; BLAST, basic local alignment search tool; DTT, dithiothreitol.

TABLE I
Genotypes and sources of yeast strains

Strain	Genotype	Source
W303-1A	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	R. Rothstein ^a
W303-1B	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	R. Rothstein ^a
SMY4	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyc3::loxP-kan-loxP</i>	This study
SMY1	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyt2::his5⁺</i>	This study
YCT1-11A	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyt2::his5⁺</i>	This study ^b
UV9	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 CYC3-9 cyt2::his5⁺</i>	This study
UV14	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 CYT1-14 cyt2::his5⁺</i>	This study
UV17,48	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 CYT1-48 cyt2::his5⁺</i>	This study
UV16,18,34,43,50	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 CYT1-34 cyt2::his5⁺</i>	This study
R2	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyt2::his5⁺ su2</i>	This study
R19	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyt2::his5⁺ su19</i>	This study
CC1-2D (CC1-5A)	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyc3::loxP-kan-loxP cyt2::his5⁺</i>	This study ^c
YPH1	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph</i>	This study
PHT3	<i>α ade2-1 can1-100 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyt1::LEU2</i>	Ref. 53
YPH9-2A	<i>a leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 cyc1::kan</i>	This study ^d
W303ΔCYC7	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyc7Δ::TRP1</i>	A. Tzagoloff
JNY33	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 imp2::LEU2</i>	Ref. 68

^a Department of Human Genetics, Columbia University.

^b YCT1-11A is a spore from the cross between SMY1 and YPH1.

^c CC1-2D (α) and CC1-5A (a) are spores from the cross between SMY1 and SMY4.

^d YPH9-2A is a spore from the cross between YPH1 and a strain carrying a null-allele (*cyc1::kan*) in the *CYC1* gene.

that are present also in several other heme-binding proteins such as the transcription factor HapI (34) and heme oxygenase (35). The interaction of CCHLs with heme via the heme regulatory motif (36) and apocytochrome (37, 38) led to the proposal that these assembly factors participate in the biogenesis of cytochromes *c* by catalyzing thioether bond formation. Despite the considerable body of work from the groups of Neupert and Sherman on the mechanism of the heme lyase reaction, including the *in organello* reconstitution of heme linkage to apocytochrome *c* (reviewed in Refs. 39 and 40), the function of the CCHLs has not been thoroughly detailed. Ultimate biochemical proof of their function awaits a direct enzymatic assay of cytochrome heme lyase activity of the purified proteins (28, 41, 42). It is also not known whether other accessory factors assist the heme lyases in the formation of holocytochromes *c*. One such factor was suspected to be Cyc2p, a mitochondrial inner membrane protein identified through a genetic screen for mutants deficient in holocytochrome *c*. The function of Cyc2p in the CCHL pathway remains undeciphered (31, 43). However, on the basis that *cyc2* mutations display a pleiotropic phenotype, it was concluded that Cyc2p controls some general aspect of mitochondrial biogenesis and influences holocytochrome *c* synthesis only indirectly (44, 45).

In this paper, we have addressed the question of heme lyase specificities in yeast. We show that whereas CC₁HL is only active in the assembly of cytochrome *c*₁, CCHL in addition to its well established function in the biogenesis of holocytochrome *c* is also able to participate in the conversion of apocytochrome *c*₁ to its holoform. We also demonstrate by functional complementation of the yeast *cchl* and *cc₁hl* mutants that the single heme lyase in human and mouse exhibits both the CCHL and CC₁HL activities. Through multicopy and genetic suppressor analyses, we revealed different mechanisms by which CCHL specificity is modified in favor of its non-cognate substrate apocytochrome *c*₁. We also provide evidence that Cyc2p interacts functionally with CCHL in the assembly of holocytochrome *c*₁ and have identified a putative FAD-binding site in a domain predicted to be exposed to the mitochondrial intermembrane space. The cytochrome specificity of the heme lyases and the putative function of Cyc2p in the CCHL pathway are discussed.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Construction, Manipulation, and Growth of Yeast Strains—All the yeast strains used in the course of this study are listed in Table I. *S. cerevisiae* wild type strains W303-1A and W303-1B are labeled WT in the figures. Strains carrying null alleles in the *CYC1*, *CYC2*, *CYC3*,

CYC7, *CYT1*, *CYT2*, or *IMP2* genes are, respectively, labeled Δ*cyc1*, Δ*cyc2*, Δ*cchl*, Δ*cyc7*, Δ*cyt1*, Δ*cc₁hl*, or Δ*imp2* in the figures. The suppressed strains obtained spontaneously (Rx) or after UV-induced mutagenesis (UVx) are designated Δ*cc₁hl* *sux* when the suppressor allele is recessive and Δ*cc₁hl* *SUx* when the suppressor allele is dominant. Null alleles of yeast genes in the W303 background were constructed using a PCR-based method. The *hphMX4* (46), *loxP-kanMX-loxP* (47), and *HIS3MX6* (48) modules were chosen to inactivate the wild type copy of the *CYC2*, *CYC3*, and *CYT2* genes, respectively. Cells were transformed by the lithium acetate procedure of Schiestl and Gietz (49) or the one-step technique (50). The multicopy wild type genomic library constructed in the *URA3*-based pFL44L vector (a generous gift from F. Lacroute) was used to search for suppressor genes able to alleviate the respiratory deficiency of the Δ*cchl* and Δ*cc₁hl* mutants. Transformants were plated on medium lacking uracil and replicated on glycerol medium to select for respiratory proficiency. Plasmids retrieved through the multicopy suppressor screen were extracted from yeast transformants and propagated in *Escherichia coli* strains (51). Media used for *S. cerevisiae* have been described elsewhere (52–54). Glucose or galactose were used as fermentable substrates and glycerol, ethanol, ethanol/glycerol, or lactate as respiratory substrates.

Genetic Methods—Spontaneous or UV-induced respiratory-competent revertants were selected from the SMY1 strain (Δ*cc₁hl*). Spontaneous revertants were isolated from cells grown to stationary phase, which were plated on lactate medium and incubated at 28 °C for 15 days. UV mutagenesis was performed using a UV source (254 nm) placed at a distance of 12 cm from yeast cells. Cells were collected at a late logarithmic phase and plated on glucose medium before mutagenesis. Plates were then irradiated in the dark for 10 s, incubated for 3 days at 28 °C, and replica-plated on glycerol medium. Under these conditions, 38% lethality was observed and ~10⁸ revertants were recovered from 2 × 10⁹ irradiated cells. No spontaneous (<10⁻¹⁰) or UV-induced revertants (<2 × 10⁻⁹) could be isolated from the SMY4 strain (Δ*cchl*). All the methods employed for the genetic analysis of the suppressor strains have been published elsewhere (52). Molecular identification of the mutations in the mapped suppressor genes was achieved by PCR amplification of the candidate ORF from genomic DNAs of the suppressed strains. Sequencing of the PCR product on both strands confirmed the presence of the suppressor mutation.

Plasmids Construction—DNA manipulations were carried out following published procedures (55). *E. coli* strains XL1-blue, MR32 (a *recA*⁻ derivative of MC1061, a generous gift from Dr E. Petrochilo) and DH5α were used as hosts for recombinant DNA techniques. The heterologous expression of human and mouse *HCCS* cDNAs was achieved by using the multicopy yeast expression vector pFL61 (56). Human and mouse *HCCS* ORFs were amplified using NotI-engineered oligonucleotides as primers and plasmids harboring the cloned cDNAs as templates (57). NotI-digested PCR products were cloned at the NotI site of pFL61 and recombinant plasmids expressing the human (pFL61-*HCCS* *Hs*) and mouse *HCCS* (pFL61-*HCCS* *Mm*) in the sense orientation with respect to the *PGK* promoter in pFL61 were chosen for this study. The plasmids pFL61-*CCHL* *Sc* and pFL61-*CC₁HL* *Sc* were constructed in a

similar way by cloning the ORFs of the yeast *CYC3* and *CYT2* genes, respectively, in pFL61. The plasmids pFL44L-CCHL, pFL44L-CC₁HL, and pFL44L-CYC2 were generated as follows: a 1.3-kb SspI-Sall genomic fragment containing the entire CCHL-encoding gene was cut from plasmid pRS316-CYC3 (a gift from R. Lill) and cloned into the PvuII-Sall sites of pFL44L; the CC₁HL encoding gene was cloned into pFL44L as a 1-kb SacI-SphI fragment from plasmid pGEM4-CYT2 (58). *CYC2* was cloned into pFL44L as a 1.7-kb PCR fragment using primers with engineered SacI and Sall sites and the *CYC2*-harboring plasmid retrieved from the multicopy suppressor screen as a template.

RNA Analysis—RNAs were extracted from cells grown in complete galactose medium (59). 20 μ g of total RNAs was prepared as in Chanfreau *et al.* (59) and separated by electrophoresis in a 1.5% agarose denaturing gel. RNAs were immobilized by transfer to nylon membranes (N+ Amersham Biosciences) followed by UV cross-linking. Probes were labeled with [α -³²P]dCTP by random primer labeling of PCR amplified DNA using the "Ready-to-go DNA labeling beads" kit (Amersham Biosciences). The abundance of *CYC1* and *CYC7* mRNAs was monitored using a 354-bp PCR product amplified with *CYC1*-specific oligonucleotides (5'-GACTGAATCAAGGCCGGTCTG-3' and 5'-GATATCGACAAAGGAAAAGGGG-3') and a 355-bp PCR product amplified with *CYC7*-specific oligonucleotides (5'-CAAGAAGATCA-CATACAAGC-3' and 5'-GCAAACGCCATCTTGGTACCAGG-3') as probes. Membranes were pre-hybridized for 30 min in 15 ml of Rapid hybridization buffer (Amersham Biosciences), and hybridized for 1 h at 65 °C (~2.5 \times 10⁵ cpm/ml). Stringent washes were performed as described in Laz *et al.* (60). Under these conditions, no significant cross-hybridization was observed between the *CYC1* probe and *CYC7* mRNA and between the *CYC7* probe and *CYC1* mRNA. For quantification of transcripts, signals were normalized to that for *RPL18A* mRNA, which encodes the cytosolic ribosomal protein L18A (61).

Protein Preparation and Analysis—Mitochondria were purified from yeast grown in galactose medium as described earlier (62) and the mitochondrial protein concentration was determined using the Bradford reagent (Sigma) or the Coomassie protein assay reagent (Pierce). Soluble cytochrome *c* and membrane-bound cytochrome *c*₁ were fractionated by sodium carbonate treatment of mitochondrial proteins according to Kermorgant *et al.* (62). Extraction of proteins from whole cells was performed as detailed in Yaffe (63) and the protein concentration was assayed using Folin-Ciocalteu's phenol reagent (Merck). Protein samples were analyzed through LDS-PAGE (4 °C) or SDS-PAGE (room temperature) and subsequently immobilized by electrotransfer to polyvinylidene difluoride or nitrocellulose membranes (0.45 μ m). The different intermediates of cytochrome *c*₁ maturation were resolved by overnight electrophoresis (18 mA) using a 1.5 mm \times 14 cm resolving gel. For heme stain of mitochondrial cytochromes *c*, samples were reduced with DTT on ice prior to electrophoresis. Carbonate-treated pellet and supernatant fractions (5 mM final concentration of DTT in the extraction buffer) or DTT-treated mitochondrial proteins (50 mM DTT) were separated by LDS-PAGE (64). The heme-associated peroxidase activity was revealed directly on membrane-transferred *c*-type cytochromes by the enhanced chemiluminescence method from Pierce (Super Signal West Dura or West Pico). Polyclonal antibodies raised against CCHL (R. Lill, University of Marburg, Marburg), cytochrome *c* and Tim54 (C. Koehler, UCLA, Los Angeles), cytochrome *c*₁ (A. Tzagoloff, Columbia University, New York), and monoclonal antibody against porin (Molecular Probes) were used for immunodetection of immobilized proteins. Bound antibodies were detected by horseradish peroxidase- or alkaline phosphatase-conjugated secondary antibodies or ¹²⁵I-protein A, as indicated in the legends.

RESULTS

Conversion of Apo to Holocytochrome *c*₁ by the Non-cognate Lyase CCHL—To re-investigate the question of the substrate specificities of the heme lyases, we constructed null mutations in the yeast *CCHL*² and *CC₁HL* genes and analyzed the phenotypes associated with those mutations at the level of respiratory growth and *c*-type cytochromes assembly. Because cytochrome *c* and cytochrome *c*₁ are both essential for electron transfer, the absence of either heme lyase was predicted to result in complete loss of respiratory growth. Surprisingly, we

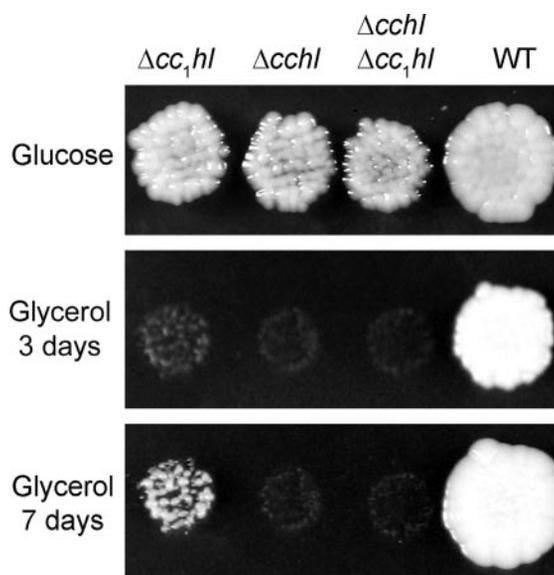


FIG. 1. Respiratory growth of heme lyase mutants. WT (W303-1A), Δcc_1hl (SYM1), $\Delta cchl$ (SMY4), and $\Delta cchl \Delta cc_1hl$ (CC1-5A) strains were grown on fermentable (glucose) or respiratory (glycerol) substrates for 3 or 7 days at 28 °C.

found that whereas the absence of CCHL leads to a tight respiratory deficiency, the absence of CC₁HL does not completely abolish the respiratory growth and results in a leaky phenotype on all the respiratory substrates we tested (Fig. 1 and data not shown). The slow respiratory growth phenotype³ of the Δcc_1hl strain segregated along with the null-allele in a genetic cross and was compensated upon expression of the CC₁HL-encoding gene (Fig. 3A). It is likely that the low respiratory activity of the Δcc_1hl mutant is attributable to the formation of holocytochrome *c*₁ by the weak activity of the non-cognate CCHL.

Spectral and heme staining analyses showed that the *cchl*-null strain was deficient only in the assembly of holocytochrome *c* and displays wild type abundance of holocytochrome *c*₁ (Fig. 2, A and B), confirming previous work that holocytochrome *c*₁ is synthesized in a separate pathway (31). No cytochromes *aa*₃ were spectrally detectable in the $\Delta cchl$ mutant. This phenotype, however, is not a specific trait of the *cchl*-null mutant but results from loss of cytochrome *c* oxidase assembly as a secondary effect in the absence of holocytochrome *c* (65, 66).

In the Δcc_1hl mutant, the abundance of holocytochrome *c*₁ could not be monitored by whole cell spectral analysis because of the increased level of holocytochrome *c* (see Fig. 2A and also Ref. 30) that masked the absorption peak of holocytochrome *c*₁. Enhanced levels of holocytochrome *c* have already been reported for many nuclear and mitochondrial yeast respiratory deficient mutants (67). A sensitive heme staining procedure on the pellet fraction enabled us to estimate that ~5% of wild type holocytochrome *c*₁ was synthesized in the *cc_1hl* mutant (Fig. 2C). The finding that this residual amount of holocytochrome *c*₁ was no longer observed in the absence of both heme lyases indicates that CCHL displays some activity in the maturation of holocytochrome *c*₁ (Fig. 2C). Immunoblotting analyses using an anti-cytochrome *c*₁ antibody showed that the intermediate form of apocytochrome *c*₁, which is the substrate for the heme attachment reaction, accumulated in the Δcc_1hl and $\Delta cchl \Delta cc_1hl$ mutants (data not shown). As a control, we used a null-mutant in the *IMP2* gene that encodes the protease re-

² For simplification, the *CYC3* gene specifying CCHL and the *CYT2* gene encoding CC₁HL will be referred to as *CCHL* and *CC₁HL* genes, respectively, throughout the manuscript.

³ We also observed a slow respiratory growth phenotype with the YS10 strain carrying a disrupted allele of the *CC₁HL* gene (30).

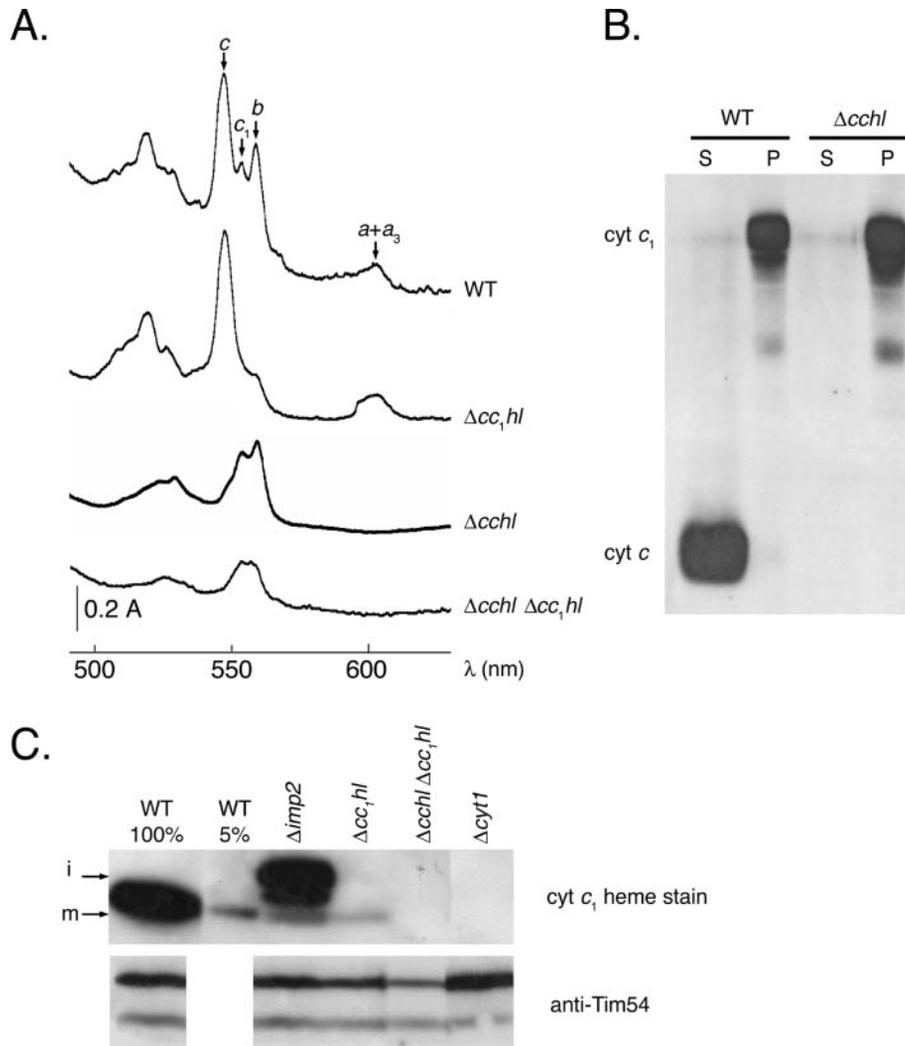


FIG. 2. Assembly of cytochrome *c* and *c*₁ in heme lyase mutants. Strains used were: WT (W303-1A), Δcc_1hl (SMY1), $\Delta cchl$ (SMY4), $\Delta cchl \Delta cc_1hl$ (CC1-2D), $\Delta cyt1$ (PHT3), $\Delta imp2$ (JNY33). **Panel A**, cytochrome absorption spectra of heme lyase mutants. Low temperature absorption spectra of cells grown in galactose were recorded with a Cary 400 spectrophotometer as described by Claisse *et al.* (81). The arrows indicate the absorption maxima of the α bands of cytochromes *c* (546 nm), *c*₁ (552 nm), *b* (558 nm), and *a* + *a*₃ (602 nm). Absorption peaks (554 and 557–559 nm) detected in the $\Delta cchl \Delta cc_1hl$ mutant are also present in a $\Delta cyt1 \Delta cc_1hl$ strain and correspond to unidentified species, presumably intermediates of the tetrapyrrole pathway. **Panel B**, heme stain of mitochondrial protein purified from cells grown on galactose medium was treated with sodium carbonate. Under these conditions, soluble holocytochrome *c* is extracted in the supernatant (S), whereas membrane-bound holocytochrome *c*₁ is found in the pellet (P). The supernatant and pellet fractions were separated by electrophoresis in a 12.5% LDS-polyacrylamide gel and transferred to nitrocellulose membrane. Detection of holocytochrome *c* and *c*₁ was performed by heme staining using the Super Signal West Pico (Pierce). **Panel C**, accumulation of holocytochrome *c*₁ in heme lyase mutants. 140 μ g of mitochondrial protein from cells grown at 28 °C in galactose medium was analyzed for the abundance of holocytochrome *c*₁. DTT-treated samples were separated in a 12% LDS-polyacrylamide gel at 4 °C. For an estimation of the cytochrome *c*₁ abundance, a dilution of the wild type sample was loaded on the gel. Following electrophoresis, the gel was transferred to polyvinylidene difluoride membrane before heme staining by chemiluminescence and immunodecoration with antisera against cytochrome *c*₁ or Tim54 as a loading control. Heme staining was performed using the Super Signal West Dura (Pierce). Bound anti-Tim54 antibodies were detected with ¹²⁵I-Protein A. Heme staining and autoradiographic exposures were performed under the same conditions for all samples. *i*, intermediate form of holocytochrome *c*₁; *m*, mature holocytochrome *c*₁. The minor heme-containing species of cytochrome *c*₁ that accumulates in the $\Delta imp2$ mutant is probably not a kinetically competent pathway intermediate and might result from degradation of the *i*-form. However, the accumulation of some mature holocytochrome *c*₁ in the absence of Imp2p indicates that *i*-cytochrome *c*₁ can be cleaved by an Imp2p-independent processing activity (68).

responsible for the processing of the intermediate form of cytochrome *c*₁ to its mature holoform (68). In agreement with the previous finding that heme attachment precedes proteolytic processing by Imp2p (38, 68, 69), the $\Delta imp2$ mutant accumulated predominantly the heme-containing intermediate form of cytochrome *c*₁ (Fig. 2C and data not shown). Taken together, these results demonstrate that CCHL displays a weak activity toward the intermediate form of apocytochrome *c*₁ and is able to catalyze its assembly to the mature holoform, whereas CC₁HL activity appears restricted to apocytochrome *c*₁.

Overexpression of CCHL Compensates for the Absence of CC₁HL—If CCHL can promote heme attachment to its non-cognate substrate apocytochrome *c*₁, then it might be possible

that CC₁HL catalyzes a reaction with apocytochrome *c*, because both heme lyases are in the same compartment (30, 38, 70, 71). To assess cross-catalysis of the heme lyases, we tested whether overexpression of CCHL or CC₁HL from a multicopy expression vector could result in increased activity of each lyase for its non-cognate cytochrome substrate. As shown in Fig. 3A, overexpression of CCHL suppresses the respiratory deficiency of the Δcc_1hl and $\Delta cchl \Delta cc_1hl$ mutants. Doubling times of transformants growing in liquid respiratory medium and expressing CCHL indicated that suppression mediated by CCHL is less effective than complementation by wild type CC₁HL (see Table II). Indeed, the amount of spectrally detected holocytochrome *c*₁ was not restored to wild type upon expres-

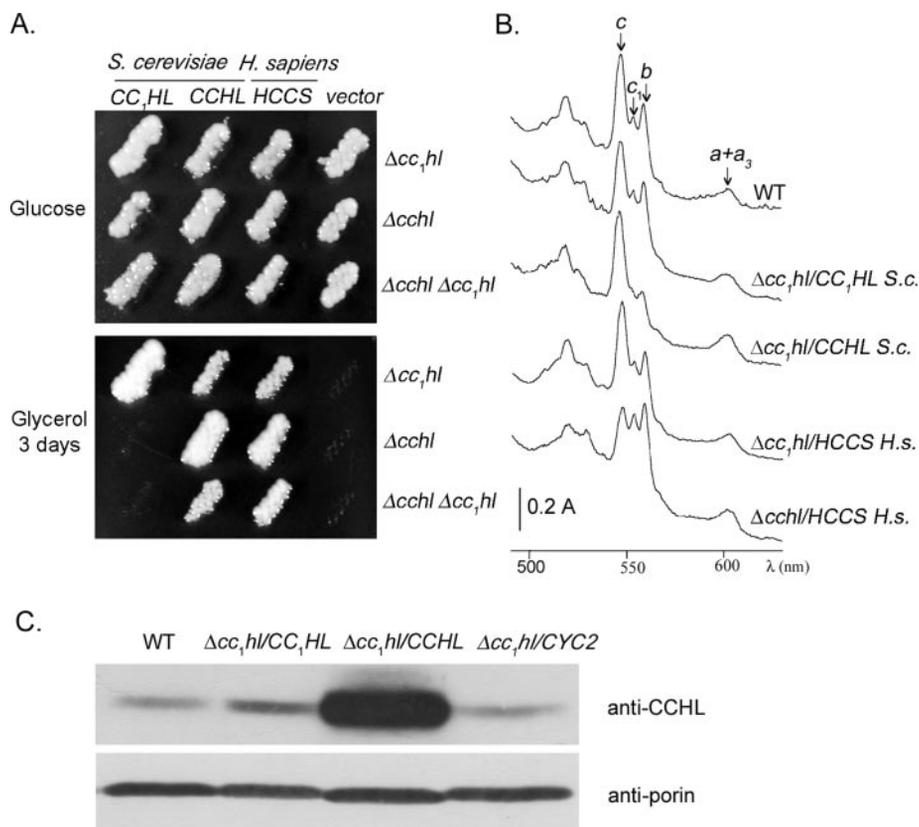


FIG. 3. Effect of the overexpression of human HCCS, yeast CCHLs or Cyc2p in heme lyase mutants. Strains used were: WT (W303-1A), Δcc_1hl (SMY1), $\Delta cchl$ (SMY4), and $\Delta cchl \Delta cc_1hl$ (CC1-5A). **Panel A**, respiratory growth of the heme lyase mutants expressing yeast CCHLs or human HCCS. Δcc_1hl , $\Delta cchl$, and $\Delta cchl \Delta cc_1hl$ strains were transformed by the multicopy expression vector pFL61 (vector) or pFL61-based plasmids expressing *S. cerevisiae* (*s.c.*) CC₁HL, CCHL, or *Homo sapiens* (*H.s.*) HCCS. Transformants were selected on minimal glucose medium, replica-plated on glycerol media, and incubated for 3 days at 28 °C. **Panel B**, cytochrome spectra of the heme lyase mutants expressing yeast CCHLs or human HCCS. Low temperature absorption spectra of cells grown in glycerol were recorded with a Cary 400 spectrophotometer as already described (81). The arrows indicate the absorption maxima of the α bands of cytochromes *c* (546 nm), *c*₁ (552 nm), *b* (558 nm), and *a* + *a*₃ (602 nm). The spectrum of the $\Delta cchl/CCHL$ *S.c.* transformant is not shown but was found to be identical to that of $\Delta cc_1hl/CC_1HL$ *S.c.* The spectra of the $\Delta cc_1hl/CCHL$ *S.c.* and $\Delta cchl \Delta cc_1hl/CCHL$ *S.c.* transformants were also comparable. Similarly, expression of human HCCS in the $\Delta cchl$ and $\Delta cchl \Delta cc_1hl$ results in identical spectra. **Panel C**, abundance of CCHL upon overexpression of CCHL, CC₁HL, or CYC2-encoding genes in the Δcc_1hl mutant. WT strain or Δcc_1hl mutant transformed by multicopy plasmids pFL61-CC₁HL, pFL61-CCHL, or pFL61-CYC2 were grown at 28 °C in glycerol medium and analyzed for the accumulation of CCHL. Samples corresponding to 160 μ g of whole cell protein extracts were separated on a 16% acrylamide, 0.5% bisacrylamide SDS gel and transferred to a nitrocellulose membrane. Immunodecoration was performed with antibodies against CCHL and porin as a loading control. Bound antibodies were visualized using horseradish peroxidase-conjugated secondary antibody.

TABLE II
Doubling times of yeast strains grown in glycerol medium (28 °C)

Strain	Plasmid	Duplication time
W303-1A		2 h 30
$\Delta cchl$	pFL61-CCHL <i>Sc</i>	2 h 20
Δcc_1hl	pFL61-CC ₁ HL <i>Sc</i>	2 h 20
Δcc_1hl	pFL61-CCHL <i>Sc</i>	6 h 15
$\Delta cchl \Delta cc_1hl$	pFL61-CCHL <i>Sc</i>	7 h 10
$\Delta cchl$	pFL61-HCCS <i>Hs</i>	2 h 20
Δcc_1hl	pFL61-HCCS <i>Hs</i>	2 h 45
$\Delta cchl \Delta cc_1hl$	pFL61-HCCS <i>Hs</i>	2 h 45

sion of CCHL in the Δcc_1hl and $\Delta cchl \Delta cc_1hl$ strains (Fig. 3B and data not shown). This partial restoration of holo-cytochrome *c*₁ could account for the weak suppression of the respiratory growth deficiency and suggests that the abundance of cytochrome *c*₁ is limiting for respiratory activity. We verified by immunoblot analysis with an anti-CCHL antibody that overexpression of the CCHL-encoding gene in the *cc_1hl*-null mutant led to an increased amount of the CCHL protein (Fig. 3C). On the other hand, overexpression of CC₁HL did not suppress the tight respiratory phenotype due to the absence of CCHL, suggesting that CC₁HL cannot promote assembly of holo-cytochrome *c* in the absence of its cognate lyase CCHL (Fig. 3A).

Human and Mouse HCCS Function in the Assembly of Cytochrome *c* and Cytochrome *c*₁—Only one heme lyase (HCCS) is present in the human genome and its strict specificity toward cytochrome *c* was ascertained from its ability to complement a *cchl*-null mutant and failure to compensate for the lack of CC₁HL (72). This led to the proposal that insertion of heme into apocytochrome *c*₁ in human is catalyzed by an enzyme other than HCCS or one that is considerably divergent from CC₁HL (72). However, the demonstration in this work that yeast CCHL harbors both CCHL and CC₁HL activities and the fact that only one heme lyase is present in the genomes of multicellular eukaryotes (Fig. 1 in Supplemental Materials) suggest a broader cytochrome specificity for HCCS. We therefore decided to re-examine the role of the single HCCS in *c*-type cytochrome maturation. We expressed the human cDNA encoding HCCS in heme lyase-deficient mutants and tested its capacity to compensate for respiratory deficiency and restore *c*-type holo-cytochrome assembly. As shown in Fig. 3A, the respiratory growth deficiency of mutants lacking either or both heme lyases was complemented upon expression of the human HCCS. An estimate of the functional complementation by determination of the doubling time indicated that human HCCS substitutes equally well for the absence of either or both heme lyases (see Table II). Notably, heterologous or homologous

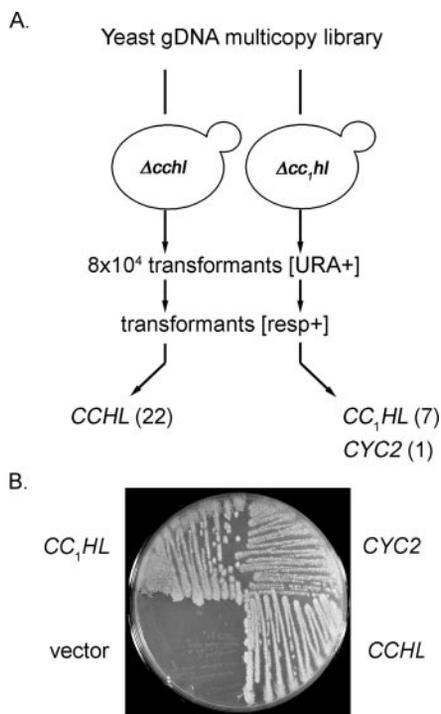


FIG. 4. Isolation of *CYC2*, a multicopy suppressor of the Δcc_1hl mutant. *Panel A*, schematic representation of the multicopy suppressor strategy. The $\Delta cchl$ (SMY4) and Δcc_1hl (SMY1) strains were transformed by a wild-type yeast genomic DNA library in multicopy plasmid pFL44L. [URA+] transformants were selected on minimal glucose medium lacking uracil, replica-plated on glycerol media, and incubated for 4 days at 28 °C. 22 and 8 [resp+] transformants that are restored for the respiratory growth were obtained from $\Delta cchl$ and Δcc_1hl strains, respectively. *Panel B*, compensation for the respiratory deficiency by *CYC2* multicopy suppressor. The Δcc_1hl (YCT1-11B) transformants carrying pFL44L (vector), pFL44L-*CC₁HL*, pFL44L-*CCHL*, or pFL44L-*CYC2* were grown on glucose, replicated on glycerol medium, and incubated 5 days at 28 °C.

complementation of each heme lyase mutant resulted in similar recovery of respiratory proficiency (see Table II). Nevertheless, although HCCS can fully compensate for the defect in cytochrome c_1 assembly, it can only partially alleviate holo-cytochrome c deficiency (Fig. 3B). Therefore, in contrast to cytochrome c_1 (see above), it seems that the level of holo-cytochrome c is not limiting for the respiratory activity. We found that, like the human HCCS, the single mouse HCCS also functions in the assembly of both cytochrome c and cytochrome c_1 (data not shown). We think that the contrast between our results and those of Schwarz and Cox (72) is not because of a difference in the mutant strain used for the complementation experiments as we verified that the human HCCS can also restore the respiratory growth to the cc_1hl -disrupted allele used in their study (data not shown). Instead, the difference in the expression system chosen for the functional complementation experiments (*S. cerevisiae* PGK promoter versus *Schizosaccharomyces pombe* ADH promoter) could explain the discrepancy we observed. We conclude from our study that human and mouse HCCS display a broader cytochrome specificity than do the yeast orthologs.

Isolation of *CYC2*, a Multicopy Suppressor of the Absence of *CC₁HL*—The finding that broader substrate specificity exists for human and mouse heme lyases or can be enhanced by overexpression of CCHL raises the question of the existence of additional yeast mitochondrial factors that can modulate CCHL and *CC₁HL* cytochrome specificity. To reveal potential modifiers of the heme lyase activity, we undertook a search for multicopy suppressors able to alleviate the respiratory defi-

ciency of $\Delta cchl$ or Δcc_1hl (Fig. 4A and “Experimental Procedures”). 22 and 8 respiratory-competent transformants were selected after transformation of the $\Delta cchl$ and Δcc_1hl strains, respectively. Diagnostic PCR amplification using CCHL and *CC₁HL* specific primers showed that all of the 22 transformants carried a plasmid containing the CCHL-encoding gene, whereas of the group of 8 transformants, 7 harbored a plasmid with the *CC₁HL*-encoding gene (data not shown). The remaining Δcc_1hl transformant displayed a slow growth phenotype and PCR amplification failed to reveal the presence of *CC₁HL* or CCHL genes in the transforming plasmid. We analyzed this plasmid by sequencing the ends of the genomic insert. A search in the yeast genome data base indicated that the plasmid carried a 3.5-kb colinear fragment of chromosome XV that encompassed the *CYC2* ORF encoding a mitochondrial protein with a proposed role in apocytochrome c import (43). A plasmid containing solely the entire *CYC2* gene retained the Δcc_1hl suppression activity but was unable to suppress the $\Delta cchl$ and $\Delta cchl \Delta cc_1hl$ mutants (Fig. 4B and data not shown).

We were unable to monitor the level of c -type cytochromes by spectral analysis owing to the fact that overexpression of Cyc2p appears to be toxic to the cells (data not shown). Nevertheless, it is reasonable to assume that the level of holo-cytochrome c_1 in the cc_1hl -null mutant suppressed by overexpression of Cyc2p is above the 5% wild type level of holoprotein detected in the cc_1hl -null mutant (Fig. 2) because we have established through this study that restoration of the respiratory growth of the cc_1hl -null mutant results systematically in enhanced levels of holo-cytochrome c_1 (see below and Fig. 5).

Interestingly, a BLAST search identified a putative FAD-binding motif in the COOH-terminal region of Cyc2p ($E = 2 \times 10^{-16}$), predicted to be exposed in the intermembrane space. As already reported (43), we have corroborated that inactivation of the *CYC2* gene does not abolish the respiratory growth and results only in a marginal decrease of spectral holo-cytochrome c (data not shown). The finding that a cc_1hl -null *cyc2*-null mutant exhibits a synthetic tight respiratory block that is no longer suppressed by overexpression of CCHL solidifies the placement of Cyc2p in the CCHL-dependent assembly pathway of cytochrome c_1 (data not shown). That multicopy suppression of Cyc2p does not result in overexpression of CCHL speaks in favor of a distinct mechanism of suppression for Cyc2p (Fig. 3C). This also strengthens the view that Cyc2p suppression operates by modulating the CCHL activity.

Recessive and Dominant Genetic Suppressors Compensate for the Absence of *CC₁HL*—In search of other genetic interactions in the CCHL pathway, we used a second approach based on the isolation of suppressor mutations able to by-pass the absence of CCHL or *CC₁HL* and compensate for the respiratory deficiency. We were unable to isolate any suppressors from the $\Delta cchl$ mutant but spontaneous and UV-induced suppressors of the absence of *CC₁HL* were recovered. The degree of restoration of respiratory growth at 28 and 36 °C (data not shown) and the genetic nature of the suppressor mutation were used as criteria in the choice of the two spontaneous (R2, R19) and nine UV-induced suppressors (UV9, -14, -16, -17, -18, -34, -43, -48, -50) that we analyzed further (see Table III). Spontaneous suppressors harbor nuclear recessive mutations, whereas UV-induced suppressors carry nuclear dominant mutations. Genetic analysis concluded that all dominant suppressor mutations lay in two distinct unlinked loci (I and II). Locus I was defined by the suppressor mutations *SU14*, -16, -17, -18, -34, -43, -48, and -50, whereas locus II was defined only by the *SU9* allele. Heme stain of cytochrome c_1 and spectral analysis on a subset of suppressed strains showed that recessive and dominant suppressor mutations resulted in partial restoration of

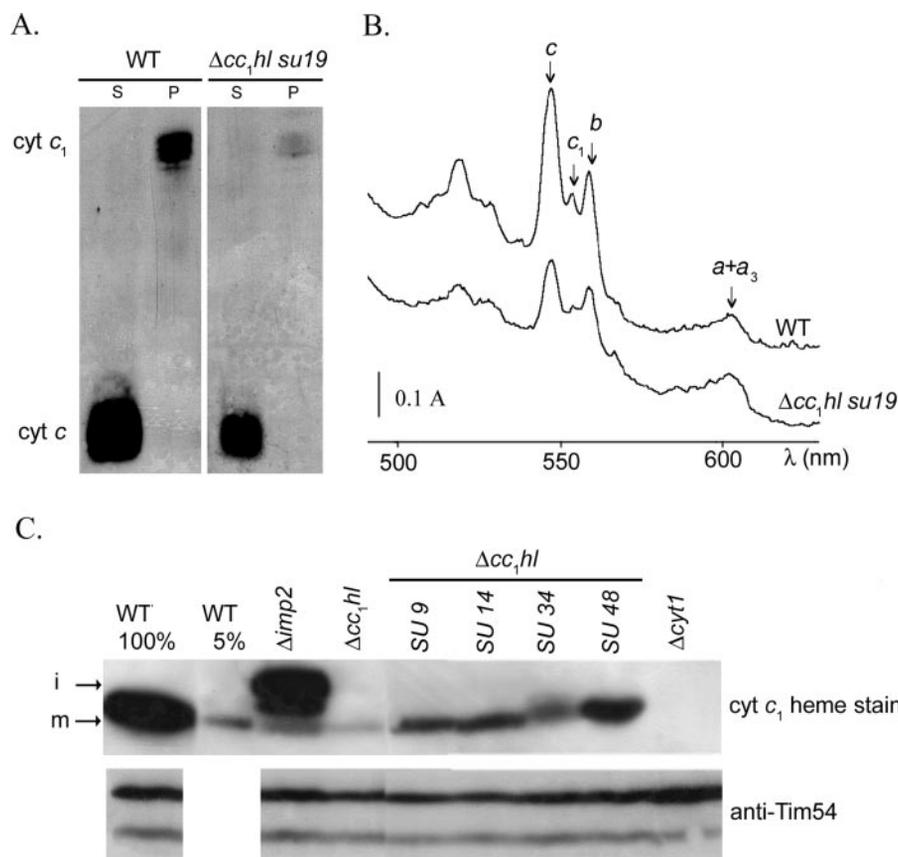


FIG. 5. Restoration of holocytochrome c_1 in the suppressor strains. Strains used were: WT (W303-1A), Δcc_1hl (SMY1), $\Delta cyt1$ (PHT3), $\Delta imp2$ (JNY33), $\Delta cc_1hl su19$ (R19), $\Delta cc_1hl SU9$ (UV9), $\Delta cc_1hl SU14$ (UV14), $\Delta cc_1hl SU34$ (UV34), and $\Delta cc_1hl SU48$ (UV48). *Panel A*, accumulation of mitochondrial c -type cytochromes in the $\Delta cc_1hl su19$ suppressor. 300 μ g of mitochondrial protein purified from cells grown on galactose medium was treated with sodium carbonate. The supernatant (S; soluble fraction) and pellet (P; membrane fraction) were separated in 12.5% LDS-polyacrylamide gels and transferred to nitrocellulose filters. Heme staining of holocytochrome c and c_1 was performed using the Super Signal West Pico (Pierce). Equal loading of the samples was confirmed by red Ponceau staining of the membrane (not shown). *Panel B*, cytochrome spectra of the $\Delta cc_1hl su19$ suppressor strain. Cytochrome absorption spectra of galactose-grown cells from WT and $\Delta cc_1hl su19$ strains were recorded with a Cary 400 spectrophotometer (81). The absorption maxima of the α bands of cytochromes c (546 nm), c_1 (552 nm), b (558 nm), and $a + a_3$ (602 nm) are indicated with *arrows*. *Panel C*, accumulation of holocytochrome c_1 in the suppressor strains. 140 μ g of mitochondrial protein from cells grown at 28 °C in galactose medium was analyzed for the abundance of holocytochrome c_1 . DTT-treated samples were separated in a 12% LDS-polyacrylamide gel at 4 °C. For an estimation of the cytochrome c_1 abundance, a dilution of the wild type sample was loaded on the gel. Following electrophoresis, the gel was transferred to a polyvinylidene difluoride membrane before heme staining by chemiluminescence and immunodetection with antisera against cytochrome c_1 or Tim54 as a loading control. Heme staining was performed using the Super Signal West Dura (Pierce). Bound anti-Tim54 antibodies were detected with 125 I-Protein A. Heme staining and autoradiographic exposures were performed under the same conditions for all samples. *i*, intermediate form of holocytochrome c_1 ; *m*, mature holocytochrome c_1 .

TABLE III
Genetic suppressors of Δcc_1hl

Suppressor	Genetic nature	Respiratory growth ^a	Remarkable trait ^b	Molecular identification ^c
$\Delta cc_1hl su2$	Recessive	+/-	θ^S	ND ^d
$\Delta cc_1hl su19$	Recessive	+	θ^R	ND
$\Delta cc_1hl SU9$	Dominant	++	θ^R	CCHL NF ₁₃₀ LN → NLIN
$\Delta cc_1hl SU14$	Dominant	++	θ^S	Cytochrome c_1 WS ₁₆ H → WYH
$\Delta cc_1hl SU34$	Dominant	++	θ^S	Cytochrome c_1 CAA ₄₂ CH → CAPCH
$\Delta cc_1hl SU48$	Dominant	++	θ^S	Cytochrome c_1 CAA ₄₂ CH → CADCH

^a Growth on glycerol solid medium. In this classification, WT and Δcc_1hl growth correspond to +++ and ϵ , respectively. θ^S and θ^R indicate the thermosensitivity (S) or the thermoresistance (R) of strains grown on glycerol solid medium at 37 °C. WT strain is θ^R and Δcc_1hl is θ^S .

^b Down accumulation (\downarrow) or up accumulation (\uparrow) of CCHL or cytochrome c , as observed in Fig. 7.

^c The bold letter corresponds to the residue that is mutated in the suppressor. The position of the amino acid replacement is indicated in subscript. Position 1 in cytochrome c_1 corresponds to the first amino acid of the mature protein.

^d ND, not determined.

holocytochrome c_1 compared with the residual level detected in the Δcc_1hl mutant (Fig. 5 and data not shown).

Alteration of the Expression of Cytochrome c or CCHL in the Recessive Suppressors—Surprisingly, restoration of holocytochrome c_1 assembly by the suppressor mutation $su19$ coincided with loss of holocytochrome c accumulation (Fig. 5, A and B). Because of the genetic nature of the suppressor mutation, it is conceivable that loss of cytochrome c is the recessive trait

causing restoration of holocytochrome c_1 . Two possible mechanisms accounting for the down accumulation of cytochrome c through the mutation $su19$ can be envisaged. One hypothesis is that the mutation acts at the transcriptional/post-transcriptional level by regulating the levels of cytochrome c structural mRNAs. Another possibility is that a translational or post-translational step of the synthesis of cytochrome c is affected by the suppressor mutation. To discriminate between these two

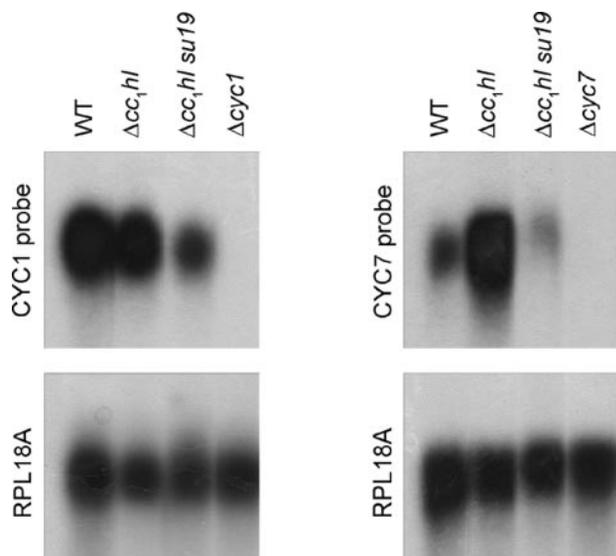


FIG. 6. Reduced accumulation of *CYC1* and *CYC7* mRNAs in the Δcc_1hl *su19* suppressor. RNA was extracted from wild type (WT) (W303-1A), Δcc_1hl (SMY1), Δcc_1hl *su19* (R19), $\Delta cyc1$ (YPH9-2A), and $\Delta cyc7$ (W303 Δ CYC7), and analyzed as described under "Experimental Procedures" using [α - 32]dCTP-labeled *CYC1*, *CYC7*, or *RPL18A* probes. Autoradiographic exposures using an amplifying screen were 4 days for the *CYC1* probe, 8 days for the *CYC7* probe, and 2 days for the *RPL18A* probe.

hypotheses, we performed RNA blot hybridization and assessed the accumulation of *CYC1* and *CYC7* mRNAs encoding isoforms 1 and 2 of holocytochrome *c*, respectively (Fig. 6). It appears that both *CYC1* and *CYC7* mRNA levels were significantly diminished in the Δcc_1hl *su19* suppressor strain. Interestingly, the absence of CC₁HL led to an increase in the accumulation of the *CYC7* transcript, whereas the abundance of the *CYC1* transcript was not affected. Up-regulation of the *CYC7* mRNA probably accounts for the increase in the level of holocytochrome *c* that we have observed in the cytochrome spectra of the *cc_1hl*-null allele (see Fig. 2A). We concluded from this experiment that the decrease of cytochrome *c* in the Δcc_1hl *su19* suppressor is caused by a reduction in the abundance of the *CYC1* and *CYC7* mRNAs. Because our interest lies primarily in the study of the post-translational steps of *c*-type cytochrome synthesis, we did not pursue the molecular identification of the *su19* mutation.

The hypothesis that the suppressor mutation *su2* may lie within the CCHL-encoding gene was inferred from the slight increase (\approx 2-fold) in the accumulation of CCHL in the Δcc_1hl *su2* strain (Fig. 7). However, molecular sequencing of the entire CCHL ORF and 1 kb upstream of the initiation codon did not reveal any mutation and negated this hypothesis. We did not devote efforts toward the identification of the suppressor mutation *su2* in the course of this study based on the fact that, similarly to multicopy suppression by CCHL, we believed that *su2* mediates suppression through an enhanced level of CCHL.

Dominant Suppressor Mutations Map to the Cytochrome *c*₁ and CCHL-encoding Genes—To identify the dominant suppressor mutations at the molecular level, we carried out a candidate gene approach based on our prediction of the mechanism of suppression. *A priori*, we assumed that restoration of holocytochrome *c*₁ assembly resulted from enhanced specificity of the CCHL for its non-cognate substrate cytochrome *c*₁. This could occur through altered specificity of the enzyme (CCHL) for its non-cognate substrate (cytochrome *c*₁) or modulation of CCHL activity by Cyc2p or unknown modifiers.

Based on the observation that both CCHL and cytochrome *c* abundance are affected by the suppressor mutation *SU9* (Fig.

7), we suspected that this mutation mapped to the CCHL gene. We tested this hypothesis through genetics by performing a recombination test, crossing the Δcc_1hl *SU9* suppressor with a $\Delta cchl$ mutant. The observation that all the single mutant Δcc_1hl spores that we examined displayed a suppressed phenotype (*i.e.* restored respiratory growth in the absence of CC₁HL) led us to conclude that locus I is linked to the CCHL-encoding gene. We sequenced the entire CCHL gene in the Δcc_1hl *SU9* suppressor and confirmed the presence of two contiguous mutations (TTTCTA to CTAATA) changing the FL residues in the coding sequence to LI (see Fig. 1 of Supplemental Materials).

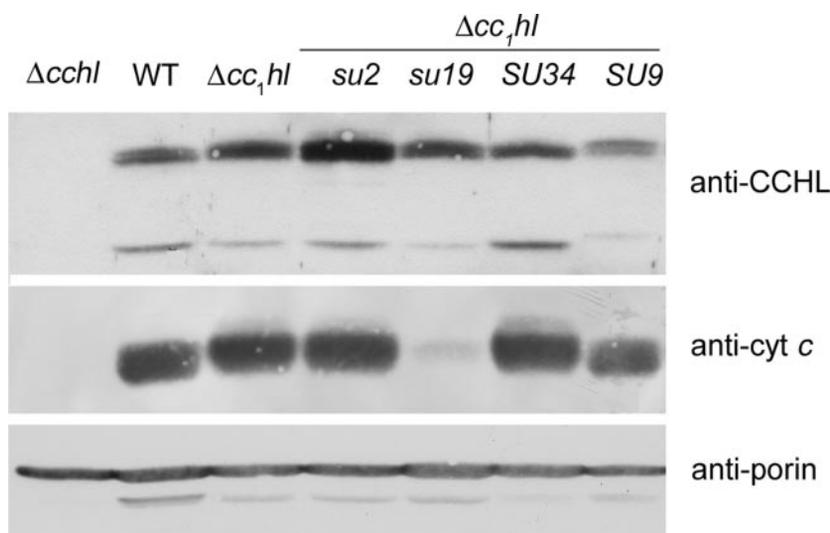
Similarly, we deduced that locus II is linked to the *CYT1* gene encoding apocytochrome *c*₁ on the basis that all the single mutant Δcc_1hl spores from a cross between a Δcc_1hl *SU34* strain and a $\Delta cyc1$ mutant exhibited a suppressed phenotype. Sequencing of the *CYT1* ORF in all the allelic suppressor strains confirmed the genetic results at the molecular level. Three mutations (referred to as *CYT1-14*, -34, and -48) were found. Two of them (*CYT1-34* and -48) lay in the heme binding motif of cytochrome *c*₁ (CAACH) and one (*CYT1-14*) occurred in a conserved region of the protein, 24 residues upstream of the heme-binding site (see Fig. 2 of Supplemental Materials). The *SU14* allele resulted in a serine (TCC) to tyrosine (TAC) change, *SU16*, -18, -34, -43, and -50 corresponded to an alanine (GCC) to proline (CCC) substitution and *SU17* and -48 led to an alanine (GCC) to aspartic (GAC) mutation. We concluded from the study of the dominant suppressors that mutations in the substrate (cytochrome *c*₁) or the enzyme (CCHL) were able to change the specificity of the cytochrome/heme lyase interaction.

DISCUSSION

Whereas considerable detail is known of bacterial and plastid cytochrome *c* maturation, the biogenesis of mitochondrial *c*-type cytochromes (system III) has remained so far poorly understood despite the fact it was the first cytochrome assembly pathway to be described (8, 29, 40). In this paper, we have re-examined the participation of its central components, namely the CCHL and CC₁HL, using a genetic approach in yeast as an experimental model system. We show that (i) yeast CCHL and the single heme lyase in human and mouse are active toward both cytochrome *c* and *c*₁, whereas the specificity of yeast CC₁HL is indeed restricted only to cytochrome *c*₁, (ii) yeast CCHL activity toward apocytochrome *c*₁ is enhanced by increasing the expression of CCHL, decreasing the expression of cytochrome *c*, or through missense mutations in CCHL or cytochrome *c*₁, and (iii) Cyc2p, a putative flavoprotein, is required for the activity of CCHL.

Overlapping Specificities in the Heme Lyase Family—Earlier work in the yeast system led to the proposal that CCHL and CC₁HL are distinct in their substrate specificity in that each heme lyase can only convert its own apocytochrome substrate into the holoform (30–32, 39). However, our work provides several lines of evidence that *in vivo*, both cytochrome *c* and *c*₁ can be acted upon by a single heme lyase. First, we have observed that the deletion of the entire CC₁HL gene does not lead to a complete block of the respiratory activity indicating that a functionally overlapping factor must display some CC₁HL activity. Then, we have demonstrated that the *cc_1hl*-null mutant synthesizes low levels of holocytochrome *c*₁ that are attributable to the weak activity of CCHL and account for the residual respiratory growth of the mutant. This result proves unambiguously that CCHL is intrinsically able to act upon both apocytochrome *c* and apocytochrome *c*₁. That the broader cytochrome specificity of heme lyase is not a peculiarity of yeast but extends to other organisms is deduced from our complementation experiments where we demonstrate that the

FIG. 7. Accumulation of CCHL and cytochrome *c* in suppressor strains. Strains used were: wild type (WT) (W303-1A), Δcc_1hl (SMY1), $\Delta cchl$ (SMY4), $\Delta cc_1hl su2$ (R2), $\Delta cc_1hl su19$ (R19), $\Delta cc_1hl SU34$ (UV34), and $\Delta cc_1hl SU9$ (UV9). 160 μ g of mitochondrial protein from cells grown at 28 °C in galactose medium was separated on a 16% acrylamide, 0.5% bisacrylamide SDS gel and transferred to nitrocellulose membrane. Immunodetection was carried out with antisera against CCHL, cytochrome *c* and porin (loading control), and horseradish-conjugated secondary antibody.



single human and mouse HCCS carries both CCHL and CC_1HL activities. This indicates that in multicellular eukaryotes cytochrome *c* and cytochrome c_1 are presumably assembled via the activity of one heme lyase.

Strict Specificity of the Yeast CC_1HL —The complete lack of cytochrome *c* in the yeast *cchl*-null mutant indicates that cytochrome *c* cannot be acted upon *in vivo* by CC_1HL . One possibility is that CC_1HL cannot promote holo-cytochrome *c* assembly in the absence of CCHL because of the lack of import of apocytochrome *c* in the mitochondria. Indeed, in addition to facilitating covalent heme attachment, CCHL unlike CC_1HL is also known to play a role in the import of its own apocytochrome substrate (73, 74). However, the delivery of cytochrome *c* to the mitochondria through the cytochrome c_1 import pathway by fusing at its amino terminus the bipartite targeting sequence of apocytochrome c_1 does not result in conversion of the fusion protein to a holoform (75). It is thus probable that cytochrome *c* cannot be a substrate of CC_1HL because the proper recognition elements for apocytochrome *c* are normally lacking in CC_1HL . Furthermore, the observation that no multicopy or genetic suppressors able to substitute for the absence of CCHL could be isolated reinforces the view that the specificity of CC_1HL toward apocytochrome c_1 is strict and cannot be altered in favor of its non-cognate substrate apocytochrome *c*. Nevertheless, it is possible that mutations can convert CC_1HL into a CCHL but could not be revealed in our screen because of their deleterious effect on holo-cytochrome c_1 assembly. Alternatively, more than one mutational event might be required for CC_1HL to act upon apocytochrome *c*.

Alterations of the Expression of CCHL or Cytochrome *c* Favor CCHL Activity Toward Cytochrome c_1 —Increased accumulation of CCHL through multicopy or genetic suppression yields enhanced activity of CCHL toward its non-cognate substrate apocytochrome c_1 . Interestingly, we found that a modest increase (~2-fold) in the abundance of CCHL can suppress the absence of CC_1HL in the *su2* suppressor. This is consistent with the observation that suppression of the *cc_1hl*-null mutant also occurs upon expression of CCHL from a centromeric vector (data not shown) and suggests that only a slight modification of CCHL abundance is sufficient to compensate for the absence of CC_1HL . This slight increase may generate some excess CCHL that is not already bound to apocytochrome *c* and therefore can act on apocytochrome c_1 . This view is corroborated by the fact that reduced accumulation of the cytochrome *c* substrate in a *cc_1hl*-null background leads to an increase in holo-cytochrome c_1 accumulation. This suggests that, in the absence of CC_1HL , holo-cytochrome c_1 assembly is favored whenever there is a

decrease in the ratio of apocytochrome *c* to CCHL. In accord with this model, it is conceivable that up-regulation of the *CYC7* mRNA in the *cc_1hl* strain results in an increase in apocytochrome *c* that favors the activity of CCHL toward its preferred substrate apocytochrome *c* over the activity toward non-cognate apocytochrome c_1 .

Mutations in CCHL or Cytochrome c_1 Increase CCHL Activity Toward Cytochrome c_1 —The view that cytochrome c_1 is a substrate for the heme lyase reaction catalyzed by CCHL is further substantiated by the isolation of dominant mutations in the *CYT1* and *CCHL* genes that are able to by-pass the lack of CC_1HL . Because wild type CCHL has the intrinsic ability to function as a CC_1HL , it is conceivable that the suppressor mutations modify residues involved in the interaction between CCHL and apocytochrome c_1 and improve affinity of the enzyme for the apocytochrome c_1 substrate. Limited information is available regarding the sequence requirements for recognition of apocytochrome *c* and c_1 by their heme lyases. It is only known that partially purified yeast CCHL can attach heme to fruit fly and horse apocytochrome *c* and also to a synthetic peptide corresponding to the first 25 residues of horse cytochrome *c* in an *in vitro* reaction (42, 76). Because the amino acid sequences of fruit fly, horse, and yeast cytochrome *c* differ considerably, it is possible that CCHL may recognize only a limited region of the apoprotein presumably contained in the sequence encompassed by the 25-residue peptide. However, the failure of alleles of iso-2 cytochrome *c* containing small deletions in the COOH-terminal part to undergo covalent heme attachment *in vivo*, despite normal import in the mitochondria, seems to indicate that the requirement for CCHL action is much more stringent in the *in vivo* mitochondrial context (77).

That seven suppressor alleles corresponding to two classes of mutation map to the second alanine of the CAACH motif underscores the importance of the heme-binding site of apocytochrome c_1 as a recognition site for CCHL *in vivo*. Mutation of the serine residue located 24 residues upstream of the CXXCH motif into a tyrosine in the *CYT1-14* allele points to another potential interaction site for CCHL (see Fig. 2 of Supplemental Materials). On the other hand, only one suppressor allele (*CYC3-9*) in the *CCHL* gene was identified through the mutagenesis screen and similarly to the mutations in cytochrome c_1 , we hypothesize that this mutation modifies the interaction of CCHL to favor cytochrome c_1 . There is the possibility that other sites of interaction in CCHL and cytochrome c_1 exist but could not be uncovered because our screen is based on restoration of respiratory activity that relies on both functional holo-cytochrome *c* and c_1 .

Cyc2p, a Putative Flavoprotein in the Heme Lyase Pathway—Previous investigations have led to the conclusion that the *CYC2* gene product is a membrane component required for normal mitochondrial integrity. Loss of *Cyc2p* causes partial defects in various mitochondrial processes including the biogenesis of holo-cytochrome *c* (31, 43–45). Yeast strains with a complete deletion of the *CYC2* gene display normal levels of holo-cytochrome *c*₁ but contain at least 10% of the normal content of holo-cytochrome *c* and accumulate apocytochrome *c* in the cytoplasm. To explain the effects of *cyc2* mutations on holo-cytochrome *c* maturation, a function of *Cyc2p* in the translocation of apocytochrome *c* or as an accessory factor in the heme attachment reaction was initially postulated (31, 40, 43). Our discovery that overexpression of *Cyc2p* can restore holo-cytochrome *c*₁ assembly in the absence of *CC₁HL* reveals that the function of this protein is not limited to the biogenesis of holo-cytochrome *c* but also extends to that of holo-cytochrome *c*₁. We hypothesized that *Cyc2p* suppresses the absence of *CC₁HL* by modulating the activity of CCHL in favor of its non-cognate substrate apocytochrome *c*₁. The fact that we did not retrieve CCHL as a multicopy suppressor of Δcc_1hl indicates that our screen for suppressors is not saturated and that other modulators of CCHL activity could still be revealed. That *Cyc2p* interacts functionally with CCHL and participates in the heme attachment reaction is inferred from our finding that a *cyc2*-null *cc₁hl*-null mutant displays a synthetic respiratory block that can no longer be suppressed by overexpression of CCHL or the suppressor mutations in CCHL or cytochrome *c*₁. Therefore, whereas the function performed by *Cyc2p* in cytochrome *c* biogenesis appears redundant in a wild type background, it becomes essential when *CC₁HL* is inactive. The mechanism by which *Cyc2p* could control the activity of CCHL remains unclear but the identification of a putative FAD binding motif, distinctive for the FAD fold of the ferredoxin reductase family (78) and predicted to be exposed in the intermembrane space, suggests a function in the redox chemistry of the heme lyase reaction. The need for redox chemistry to maintain the heme and apocytochrome substrates in a reduced state in the heme attachment reaction has been under investigated in system III because of the belief that the mitochondrial intermembrane space was a reducing compartment. Yet, the previous biochemical studies by Neupert and co-workers (38, 79) had established the necessity for redox cofactors NADH and flavin nucleotides in the heme attachment reaction to apocytochrome *c* and apocytochrome *c*₁ *in organello*. This was also confirmed recently *in vitro* by the discovery that the reaction of mitochondrial apocytochrome *c* with heme yields thioether bond formation only when the appropriate redox conditions are provided (80). Moreover, cytochrome *c* assembly pathways in bacteria and plastids have been shown genetically to have a definite requirement for redox chemistry (9, 21, 23). We therefore believe that the *in vivo* oxidation state of the cysteine residues in mitochondrial apocytochrome *c* and *c*₁ is also under the control of as yet unidentified components. An attractive hypothesis is that *Cyc2p* operates in a redox subpathway in the context of the heme lyase reaction. It remains to be demonstrated that *Cyc2p* is a flavoprotein and to establish the link between co-factor binding and the activity of the protein in the CCHL pathway. We are currently investigating the function of *Cyc2p* to define the participation of this unique assembly factor in the heme lyase pathway.

Acknowledgments—We thank C. Terry and N. Lachacinski for technical assistance, Dr. C. Lemaire for biochemical expertise, Dr. B. Guiard for stimulating discussion, and Dr. M. D. Page for critical reading of the manuscript. We also gratefully acknowledge the Schekman laboratory (University of California, Berkeley), especially Edina Harsay and Sebastian Springer, who hosted S. M. during the

initial steps of the project and all the members of the Chanfreau, C. Clarke, and Koehler groups (UCLA) for help during the course of this study. We are grateful to Prof. I. B. Van den Veyver for providing the human and mouse *HCCS* cDNAs, Prof. A. Tzagoloff for the gift of anti-cytochrome *c*₁ antibody and the yeast cytochrome *c*-deficient mutants, Prof. C. Koehler for the gift of anti-Tim54 and anti-cytochrome *c* antibodies, Prof. R. Lill for the gift of anti-CCHL antibody, the *cyc2* disrupted allele, and the plasmids carrying the *CCHL* and *CC₁HL* genes, Prof. J. Nunnari for the gift of the *imp2*-null strain and Profs. C. Koehler and G. Payne for providing the yeast knock-outs.

REFERENCES

- Thöny-Meyer, L. (1997) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 337–376
- Lim, M. L., Lum, M. G., Hansen, T. M., Roucou, X., and Nagley, P. (2002) *J. Biomed. Sci.* **9**, 488–506
- Barker, P. D., and Ferguson, S. J. (1999) *Structure Fold Des.* **7**, R281–290
- Allen, J. W., Daltrop, O., Stevens, J. M., and Ferguson, S. J. (2003) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* **358**, 255–266
- Gonzales, D. H., and Neupert, W. (1990) *J. Bioenerg. Biomembr.* **22**, 753–768
- Howe, G., and Merchant, S. (1994) *Photosyn. Res.* **40**, 147–165
- Kranz, R. G., and Beckman, D. L. (1995) in *Anoxygenic Photosynthetic Bacteria* (Blankenship, R. E., Madigan, M. T., and Bauer, C. E., eds) pp. 709–723, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands
- Kranz, R., Lill, R., Goldman, B., Bonnard, G., and Merchant, S. (1998) *Mol. Microbiol.* **29**, 383–396
- Nakamoto, S. S., Hamel, P., and Merchant, S. (2000) *Biochimie (Paris)* **82**, 603–614
- Page, M. D., Sambongi, Y., and Ferguson, S. J. (1998) *Trends Biochem. Sci.* **23**, 103–108
- Xie, Z., and Merchant, S. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 309–318
- O'Brian, M. R., and Thöny-Meyer, L. (2002) *Adv. Microb. Physiol.* **46**, 257–318
- Xie, Z., Culler, D., Dreyfuss, B. W., Kuras, R., Wollman, F. A., Girard-Bascou, J., and Merchant, S. (1998) *Genetics* **148**, 681–692
- Dreyfuss, B. W., and Merchant, S. (1999) in *Proceedings of the XIth International Congress on Photosynthesis* (Pusztaí, J., and Garab, G., eds) Vol. IV, pp. 3139–3142, Kluwer Academic Publishers, The Netherlands
- Beckett, C. S., Loughman, J. A., Karberg, K. A., Donato, G. M., Goldman, W. E., and Kranz, R. G. (2000) *Mol. Microbiol.* **38**, 465–481
- Le Brun, N. E., Bengtsson, J., and Hederstedt, L. (2000) *Mol. Microbiol.* **36**, 638–650
- Thöny-Meyer, L. (2000) *Biochim. Biophys. Acta* **1459**, 316–324
- Goldman, B. S., and Kranz, R. G. (2001) *Res. Microbiol.* **152**, 323–329
- Thöny-Meyer, L. (2002) *Biochem. Soc. Trans.* **30**, 633–638
- Dreyfuss, B. W., Hamel, P. P., Nakamoto, S. S., and Merchant, S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 2604–2613
- Hamel, P. P., Dreyfuss, B. W., Xie, Z., Gabilly, S. T., and Merchant, S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 2593–2603
- Deshmukh, M., Brasseur, G., and Daldal, F. (2000) *Mol. Microbiol.* **35**, 123–138
- Fabianek, R. A., Hennecke, H., and Thöny-Meyer, L. (2000) *FEMS Microbiol. Rev.* **24**, 303–316
- Reid, E., Cole, J., and Eaves, D. J. (2001) *Biochem. J.* **355**, 51–58
- Kranz, R. G., Beckett, C. S., and Goldman, B. S. (2002) *Res. Microbiol.* **153**, 1–6
- Erlendsson, L. S., Acheson, R. M., Hederstedt, L., and Le Brun, N. E. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 17852–17858
- Lang, B. F., and Kaudewitz, F. (1982) *Curr. Genet.* **6**, 229–235
- Dumont, M. E., Ernst, J. F., Hampsey, D. M., and Sherman, F. (1987) *EMBO J.* **6**, 235–241
- Sherman, F. (1990) *Genetics* **125**, 9–12
- Zollner, A., Rodel, G., and Haid, A. (1992) *Eur. J. Biochem.* **207**, 1093–1100
- Matner, R. R., and Sherman, F. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 9811–9821
- Stuart, R. A., Nicholson, D. W., Wienhues, U., and Neupert, W. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 20210–20219
- Prakash, S. K., Cormier, T. A., McCall, A. E., Garcia, J. J., Sierra, R., Haupt, B., Zoghbi, H. Y., and Van Den Veyver, I. B. (2002) *Hum. Mol. Genet.* **11**, 3237–3248
- Zhang, L., and Hach, A. (1999) *Cell. Mol. Life Sci.* **56**, 415–426
- Wilks, A. (2002) *Antioxid. Redox Signal* **4**, 603–614
- Steiner, H., Kispal, G., Zollner, A., Haid, A., Neupert, W., and Lill, R. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 32605–32611
- Mayer, A., Neupert, W., and Lill, R. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 12390–12397
- Nicholson, D. W., Stuart, R. A., and Neupert, W. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 10156–10168
- Stuart, R. A., and Neupert, W. (1990) *Biochimie (Paris)* **72**, 115–121
- Dumont, M. E. (1996) in *Advances in Molecular and Cell Biology* (Hart, F.-U., ed) pp. 103–126, JAI Press, Greenwich, United Kingdom
- Nargang, F. E., Drygas, M. E., Kwong, P. L., Nicholson, D. W., and Neupert, W. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 9388–9394
- Tong, J., and Margoliash, E. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 25695–25702
- Dumont, M. E., Schlichter, J. B., Cardillo, T. S., Hayes, M. K., Bethlendy, G., and Sherman, F. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 6442–6451
- Pearce, D. A., Cardillo, T. S., and Sherman, F. (1998) *FEBS Lett.* **439**, 307–311
- Sanchez, N. S., Pearce, D. A., Cardillo, T. S., Uribe, S., and Sherman, F. (2001) *Arch. Biochem. Biophys.* **392**, 326–332
- Goldstein, A. L., and McCusker, J. H. (1999) *Yeast* **15**, 1541–1553
- Gueldener, U., Heinisch, J., Koehler, G. J., Voss, D., and Hegemann, J. H. (2002) *Nucleic Acids Res.* **30**, e23
- Wach, A., Brachat, A., Alberti-Segui, C., Rebischung, C., and Philippsen, P. (1997) *Yeast* **13**, 1065–1075
- Schiestl, R. H., and Gietz, R. D. (1989) *Curr. Genet.* **16**, 339–346
- Chen, D. C., Yang, B. C., and Kuo, T. T. (1992) *Curr. Genet.* **21**, 83–84
- Hoffman, C. S., and Winston, F. (1987) *Gene (Amst.)* **57**, 267–272

52. Dujardin, G., Pajot, P., Groudinsky, O., and Slonimski, P. P. (1980) *Mol. Gen. Genet.* **179**, 469–482
53. Hamel, P., Lemaire, C., Bonnefoy, N., Brivet-Chevillotte, P., and Dujardin, G. (1998) *Genetics* **150**, 601–611
54. Saint-Georges, Y., Bonnefoy, N., di Rago, J. P., Chiron, S., and Dujardin, G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 49397–49402
55. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) in *Molecular Cloning A Laboratory Manual* (Nolan, C., ed) 2nd Ed., Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY
56. Minet, M., Dufour, M. E., and Lacroute, F. (1992) *Plant J.* **2**, 417–422
57. Schaefer, L., Ballabio, A., and Zoghbi, H. Y. (1996) *Genomics* **34**, 166–172
58. Steiner, H., Zollner, A., Haid, A., Neupert, W., and Lill, R. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 22842–22849
59. Chanfreau, G., Rotondo, G., Legrain, P., and Jacquier, A. (1998) *EMBO J.* **17**, 3726–3737
60. Laz, T. M., Pietras, D. F., and Sherman, F. (1984) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **81**, 4475–4479
61. Danin-Kreiselman, M., Lee, C. Y., and Chanfreau, G. (2003) *Mol. Cell* **11**, 1279–1289
62. Kermorgant, M., Bonnefoy, N., and Dujardin, G. (1997) *Curr. Genet.* **31**, 302–307
63. Yaffe, M. P. (1991) *Methods Enzymol.* **194**, 627–643
64. Dutta, C., and Henry, H. L. (1990) *Anal. Biochem.* **184**, 96–99
65. Sherman, F., Taber, H., and Campbell, W. (1965) *J. Mol. Biol.* **13**, 21–39
66. Pearce, D. A., and Sherman, F. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 20879–20882
67. Sherman, F., and Slonimski, P. P. (1964) *Biochim. Biophys. Acta* **90**, 1–15
68. Nunnari, J., Fox, T. D., and Walter, P. (1993) *Science* **262**, 1997–2004
69. Ohashi, A., Gibson, J., Gregor, I., and Schatz, G. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 13042–13047
70. Lill, R., Stuart, R. A., Drygas, M. E., Nargang, F. E., and Neupert, W. (1992) *EMBO J.* **11**, 449–456
71. Dumont, M. E., Cardillo, T. S., Hayes, M. K., and Sherman, F. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5487–5496
72. Schwarz, Q. P., and Cox, T. C. (2002) *Genomics* **79**, 51–57
73. Dumont, M. E., Ernst, J. F., and Sherman, F. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 15928–15937
74. Nicholson, D. W., Hergersberg, C., and Neupert, W. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 19034–19042
75. Stuart, R. A., Nicholson, D. W., and Neupert, W. (1990) *Cell* **60**, 31–43
76. Veloso, D., Juillerat, M., and Taniuch, I. H. (1984) *J. Biol. Chem.* **258**, 10963–10966
77. Wang, X., Dumont, M. E., and Sherman, F. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 6594–6604
78. Dym, O., and Eisenberg, D. (2001) *Protein Sci.* **10**, 1712–1728
79. Nicholson, D. W., and Neupert, W. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 4340–4344
80. Daltrop, O., and Ferguson, S. J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 4404–4409
81. Claisse, M. L., Pere-Aubert, G. A., Clavilier, L. P., and Slonimski, P. P. (1970) *Eur. J. Biochem.* **16**, 430–438

3. Résultats complémentaires

3.1. La mutation suppresseur *su19* ne serait pas localisée dans le gène *HAP1*

Cadre de l'étude : Etant donnée la diminution du niveau des ARNm *CYC1* et *CYC7* observée chez le révertant R19, l'hypothèse d'une mutation suppresseur dans le gène *HAP1* devait être discutée. En effet, l'activateur transcriptionnel Hap1p est connu pour activer conjointement la transcription des gènes *CYC1* et *CYC7*. Une mutation abolissant le fonction de Hap1p devrait donc conduire à une baisse d'accumulation des ARNm *CYC1* et *CYC7*. Ce type de mutation reste compatible avec le caractère récessif de la mutation suppresseur *su19* et avec le phénotype spectral du mutant $\Delta hap1$ (partiellement déficient en holo cytochrome *c*).

Méthode : Afin de tester cette hypothèse, sans recourir à la séquence des 4500 paires de bases du gène *HAP1*, j'ai réalisé le croisement suivant : YBG4 ($\Delta cc_1hl \Delta hap1$) x R19 ($\Delta cc_1hl su19$), récupéré les zygotes au micromanipulateur puis observé le phénotype respiratoire du diploïde obtenu. Notez que la délétion du gène *HAP1* est récessive.

- Hypothèse 1 : la mutation suppresseur n'est pas localisée dans le gène *HAP1*
Génotype du diploïde : $\Delta cc_1hl \Delta hap1 su+ / \Delta cc_1hl HAP1+ su19$
Phénotype attendu du diploïde : identique à celui de la souche Δcc_1hl
- Hypothèse 2 : la mutation suppresseur est localisée dans le gène *HAP1* (allèle *hap1-19*)
Génotype du diploïde : $\Delta cc_1hl \Delta hap1 / \Delta cc_1hl hap1-19$
Phénotype attendu du diploïde : identique à celui de la souche R19

Résultats : Le phénotype du diploïde étant proche de celui d'une souche Δcc_1hl (Figure 22), j'en ai conclu que la mutation suppresseur *su19* n'était probablement pas localisée dans le gène *HAP1*. Ces résultats sont compatibles avec le phénotype [resp⁻] de la souche parentale YBG4 ($\Delta cc_1hl \Delta hap1$) qui montre que la délétion de *HAP1* ne supprime pas le défaut respiratoire d'un mutant Δcc_1hl (Figure 22). La mutation suppresseur *su19* pourrait donc être située dans un gène codant un facteur transcriptionnel impliqué dans la régulation conjointe du niveau d'accumulation des ARNm *CYC1* et *CYC7* : s'agirait-il d'un nouvel activateur transcriptionnel des gènes *CYC1* et *CYC7* ? On ne peut toutefois pas exclure la possibilité que

la mutation su19 soit située dans un gène codant un facteur impliqué dans la stabilité de ces ARNm.

3.2. Modification par mutagenèse dirigée du site muté chez le révertant UV9 : variations sur un même thème

Cadre de l'étude : Le changement F₁₃₀L₁₃₁:LI de la CCHL permet de supprimer partiellement le défaut respiratoire du mutant Δcc_1hl . D'après l'analyse des séquences primaires, cette mutation touche des acides aminés non conservés, mais situés dans une région elle-même hautement conservée (voir Annexe 1). Une partie du signal interne d'import mitochondrial des hème lyases serait située dans ce domaine (Diekert *et al.*, 1999, et paragraphe III.4.3.4). On peut toutefois supposer que la mutation F₁₃₀L₁₃₁:LI modifie la spécificité de substrat de la CCHL en faveur de l'apocytochrome c_1 sans pour autant abolir son import mitochondrial, comme en témoigne l'accumulation de la CCHL dans les mitochondries issues de ce mutant (Figure 7 de l'article 1). Notez que les acides aminés FL se trouvent conservés au sein des hème c lyases de champignons, mais pas chez les hème c_1 lyases qui possèdent, en cette position, les acides aminés AV, LV ou SI (chez *S. cerevisiae*). En revanche, chez les organismes présentant une seule hème lyase (HCCS), une asparagine est systématiquement située en position 131; la nature de l'acide aminé 130 est en revanche assez variable. Nous avons donc cherché à savoir si une CCHL de levure qui présenterait la modification F₁₃₀L₁₃₁:QN, et qui serait donc partiellement « humanisée », serait plus apte à fixer l'hème sur l'apocytochrome c_1 .

Méthode : La mutation conduisant à la substitution F₁₃₀L₁₃₁:QN a été introduite dans le gène codant la CCHL par une méthode de mutagenèse dirigée fondée sur la PCR (*QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis kit, Stratagene*). Le plasmide pFL44-CCHL F₁₃₀L₁₃₁:QN ainsi obtenu a été utilisé pour transformer une souche Δcc_1hl et pour étudier sa capacité à supprimer, en multicopie, le défaut respiratoire de ce mutant. La mutation a également été introduite au locus par recombinaison homologue après transformation intégrative de la souche YDB4 (*cyc3 :URA3*), générant ainsi la souche YDC4. Les intégrants résistants au 5FO ont été sélectionnés puis la présence de la mutation a été vérifiée par séquençage du gène codant la CCHL.

Résultats : La surproduction de la forme CCHL F₁₃₀L₁₃₁:QN permet de compléter le mutant $\Delta cchl$ (Figure 23A) mais, contrairement à ce qui avait été prédit, ne permet pas de

supprimer le défaut respiratoire du mutant Δcc_1hl (Figure 23B). Cette substitution $F_{130}L_{131}:QN$ ne modifie pourtant pas la stabilité de la protéine, comme en témoigne le niveau constant de la CCHL observé dans les mitochondries isolées à partir de la souche YDC4 (Figure 24). Cette modification ne perturbe donc pas l'import de la protéine. En revanche, la modification $F_{130}L_{131}:QN$, contrairement à $F_{130}L_{131}:LI$, entraîne une diminution drastique du niveau d'holocytochrome *c* (Figures 24 et 25). Cette substitution affecte donc les activités cyt *c* et cyt *c*₁ hème lyase. De plus, le taux d'holocytochrome *c* accumulé dans la souche YDC4 suffit à maintenir un niveau sauvage de cytochrome oxydase (Figure 25). Au moins 5% d'holocytochrome *c* serait donc présent chez ce mutant (voir le paragraphe II.4.1.1. de l'introduction), ce qui expliquerait le maintien d'une croissance sur un milieu non fermentescible. Enfin, la surproduction de cette protéine modifiée rétablit la croissance respiratoire d'un mutant $\Delta cchl$ (Figure 23) sans pour autant restaurer un niveau sauvage d'holocytochrome *c* (Figure 26). Ce résultat suppose donc que la modification $F_{130}L_{131}:QN$ n'abolit pas complètement l'activité cytochrome *c* hème lyase.

Les substitutions $F_{130}L_{131}:QN$ et $F_{130}L_{131}:LI$ ne conduisent donc pas aux mêmes conséquences. Alors que le changement $F_{130}L_{131}:LI$ stimule l'activité cytochrome *c*₁ hème lyase de la CCHL tout en conservant l'activité cytochrome *c* hème lyase, la version $F_{130}L_{131}:QN$ inhibe complètement l'activité cyt *c*₁ hème lyase (réduisant ainsi la spécificité de substrat de l'enzyme) et affecte de façon drastique l'activité cyt *c* hème lyase. Ces résultats soulignent l'importance des acides aminés situés en position 130 et 131 pour l'activité de l'enzyme. Plus précisément, ces acides aminés pourraient définir un site d'affinité de la CCHL envers l'apocytochrome *c*₁. Ils pourraient également correspondre à des résidus du site actif, si l'on admet que la CCHL soit directement impliquée dans la catalyse de la réaction d'addition.

3.3. La suppression des mutants $\Delta cchl$ et Δcc_1hl médiée par l'hème lyase humaine (HCCS) ne dépend pas de la présence de Cyc2p

Le gène *CCHL* supprime en multcopie le défaut respiratoire du mutant Δcc_1hl mais pas celui du mutant $\Delta cc_1hl \Delta cyc2$. La protéine Cyc2p est donc requise pour l'activité de suppression médiée par la CCHL. Des comparaisons de séquences protéiques indiquent qu'aucun homologue de Cyc2p n'existerait chez l'homme et que la protéine Cyc2p semblerait être spécifique des champignons. Toutefois, on pouvait se demander si l'unique hème lyase humaine serait toujours apte à compléter les mutants Δcc_1hl et $\Delta cchl$ en l'absence de

Cyc2p. Les mutants $\Delta cc_1hl \Delta cyc2$, $\Delta cchl \Delta cyc2$ et $\Delta cchl \Delta cc_1hl \Delta cyc2$ ont donc été transformés par la plasmide pFL61-*HCCS*, sélectionnés sur un milieu approprié (sans uracile) puis leur phénotype respiratoire a été évalué. Puisque de tels transformants poussent sur un milieu non fermentescible, il semblerait que la protéine Cyc2p ne soit pas requise pour l'activité cytochrome *c* et cytochrome c_1 hème lyase médiée par l'enzyme humaine *HCCS* chez la levure.

3.4. Une seconde recherche de supresseurs multicopies

La transformation du mutant Δcc_1hl par une banque d'ADN génomique sauvage a permis d'identifier le gène *CYC2* (Article 1, Figure 4). Toutefois, en raison du faible taux de transformation obtenu lors de cette expérience, une seconde recherche de supresseurs en copie multiple a été réalisée dans le but d'identifier d'autres partenaires éventuels. Les mutants $\Delta cchl$, Δcc_1hl , ainsi que le double mutant $\Delta cc_1hl \Delta cyc2$ ont donc été transformés par une banque d'ADN génomique sauvage (clonée dans pFL44 par F. Lacroute) puis les transformants (*ura*⁺) ont été sélectionnés. Les transformants qui respiraient ont ensuite été recueillis puis classés selon leur phénotype respiratoire. Pour un tiers d'entre eux, les plasmides ont été extraits puis amplifiés chez *E. coli*. L'insert a ensuite été analysé par PCR, en utilisant des oligonucléotides spécifiques des gènes *CCHL*, *CC₁HL* et *CYC2*. Les résultats sont résumés dans la figure 27. Le fait que chaque gène supresseur ait été obtenu une trentaine de fois au minimum reflète la bonne représentativité de la banque et la haute efficacité de transformation ; le crible génétique a donc été probablement saturé. Il semblerait donc que seuls les gènes *CCHL* et *CYC2* peuvent supprimer en multicopie le défaut respiratoire du mutant Δcc_1hl .

4. Conclusion et discussion autour du chapitre I

La recherche de supresseurs génétiques et multicopies capables de restaurer la croissance respiratoire du mutant nul Δcc_1hl a permis de préciser la spécificité de substrats des hème lyases de levure et d'identifier Cyc2p comme un nouveau facteur de maturation du cytochrome *c*.

Alors que la *CC₁HL* apparaît spécifique du substrat apocytochrome c_1 , la *CCHL* possède une spécificité de substrats plus large. Le fait que seuls des supresseurs de l'absence de la *CC₁HL* aient pu être obtenus pourrait être dû à une différence de propriétés entre la *CCHL* et la *CC₁HL*. En effet, la *CCHL*, en plus de son rôle dans la fixation de l'hème, est

directement impliquée dans l'import de l'apocytochrome *c*, par rétention de ce dernier dans l'espace intermembranaire (*via* une interaction physique transitoire ?). Ce n'est pas le cas de la CC₁HL, qui n'intervient que dans la dernière étape de maturation du cytochrome *c*₁ : la fixation de l'hème constitue dans ce cas un prérequis pour l'étape successive de coupure protéolytique catalysée par Imp2p et qui conduit à la forme mature du cytochrome *c*₁ (voir introduction, III.4.2 et la Figure 20). Dans cette perspective, l'absence de suppresseurs du mutant nul $\Delta cchl$ est probablement due au fait qu'il soit peu probable de sélectionner un seul événement mutationnel dans le gène *CC₁HL* capable de rétablir ou de contourner simultanément les deux fonctions de la CCHL.

Le fait que la CC₁HL ne soit pas capable de remplacer la CCHL peut être dû au fait que la CC₁HL ne puisse pas reconnaître l'apocytochrome *c* comme substrat pour la fixation de l'hème, mais on ne peut toutefois pas exclure la possibilité que la CC₁HL ne puisse pas tout simplement remplacer la fonction de la CCHL relative à l'import de l'apocytochrome *c*!

L'analyse des suppresseurs génétiques restaurant la croissance respiratoire du mutant Δcc_1hl montre que l'activité de la CCHL envers l'apocytochrome *c*₁ peut être augmentée : (1) par une diminution du substrat principal de la CCHL, l'apocytochrome *c*, (2) par une augmentation du niveau de la CCHL (équivalent à l'effet multicopie) ou (3) par une modification de la CCHL ou du substrat 'secondaire', l'apocytochrome *c*₁. On peut envisager que les résidus ainsi modifiés de la CCHL et de l'apocytochrome *c*₁ pourraient être impliqués dans une interaction physique transitoire, définissant ainsi un site d'interaction enzyme-substrat. En particulier, les résidus FL modifiés de la CCHL pourraient favoriser la stabilisation d'une certaine conformation de l'apocytochrome, le rendant plus apte à fixer l'hème. Il serait donc intéressant de construire le double mutant présentant la version modifiée de la CCHL ainsi que les différentes versions modifiées du cytochrome *c*₁ afin d'étudier la capacité de ces mutations à supprimer ensemble le défaut respiratoire de Δcc_1hl . En effet, si chacune de ces mutations permet une meilleure interaction entre le cytochrome *c*₁ et la CCHL au niveau des acides aminés modifiés, le fait de les combiner pourrait accentuer ou diminuer l'effet suppresseur, et favoriser ainsi l'hypothèse selon laquelle ces résidus seraient proches dans l'espace (lors de l'interaction des deux molécules).

De façon intéressante, les acides aminés modifiés de l'apocytochrome *c*₁ correspondent majoritairement à une position située entre les deux cystéines du site de fixation à l'hème : CADCH et CAPCH au lieu de CAACH (voir figure 21). L'effet de ces substitutions consiste en l'introduction d'une charge négative (pour l'acide aspartique) ou en

l'introduction de contraintes stériques (pour la proline), au niveau du site de liaison à l'hème. Ces changements pourraient éventuellement interférer avec les deux ligands axiaux de l'hème, en particulier l'histidine située à proximité des cystéines et affecter ainsi la conformation du domaine au sein duquel l'hème se positionnerait (avant sa fixation). On peut également envisager que ces mutations modifient la réactivité des thiols des cystéines, influençant ainsi la catalyse de la réaction d'addition de l'hème. Il reste envisageable que ces changements conformationnels conduisent à un repliement local qui se rapprocherait de celui de l'apocytochrome *c*, d'autant plus que tous les cytochromes *c* possèdent en cette position un acide aminé polaire, la glutamine (tableau 3). Il serait donc intéressant de construire par mutagenèse dirigée, dans un contexte génétique Δcc_1hl , un cytochrome c_1 possédant le site de fixation à l'hème du cytochrome *c* (CLQCH) afin d'analyser l'assemblage CCHL-dépendant de cet holocytochrome c_1 (analyse de la croissance respiratoire de cette souche et du niveau d'holocytochrome c_1). Le domaine défini par le site de liaison à l'hème pourrait en effet faire partie du site de reconnaissance cytochrome-CCHL.

Chapitre II : Cyc2p, une flavoprotéine impliquée dans la maturation des cytochromes de type *c*.

1. Cadre de l'étude

La recherche de suppresseurs multicopies capables de restaurer la croissance respiratoire d'un mutant nul d'hème *c*₁ lyase a permis d'identifier le gène *CYC2*. La protéine Cyc2p pourrait donc intervenir dans la maturation des cytochromes de type *c* mitochondriaux. Ce gène avait été initialement découvert par Sherman lors d'un crible génétique visant à sélectionner des mutants déficients en cytochrome *c*. Un mutant $\Delta cyc2$ n'accumule en effet que 10% d'holocytochrome *c* dans la mitochondrie. En dépit du manque de données expérimentales, Cyc2p a récemment été décrit comme un facteur général de biogenèse mitochondriale (voir introduction, paragraphe III. 4.4.5). Une question centrale persiste donc : quelle est la fonction de la protéine Cyc2p ?

L'analyse de la séquence protéique de Cyc2p nous a permis d'identifier un domaine putatif de liaison au FAD/FMN, typique de la famille des ferredoxine réductases et localisé en C-terminal de la protéine. La présence d'un tel domaine nous a particulièrement intéressés dans la mesure où la maturation des cytochromes de type *c* dans les systèmes I et II nécessite la présence de facteurs redox, en particulier pour maintenir l'hème et les cystéines du site de liaison à l'hème sous une forme réduite. Ceci nous a conduit à formuler l'hypothèse selon laquelle Cyc2p agirait comme une réductase, dans le cadre de la maturation des cytochromes de type *c* mitochondriaux. Curieusement, la comparaison des séquences protéiques de différents génomes semble indiquer que la protéine Cyc2p ne serait présente que chez les champignons (voir l'alignement de séquences protéique en Annexe 1). Ceci n'exclut toutefois pas la possibilité qu'un homologue fonctionnel puisse exister chez les eucaryotes multicellulaires. Ce chapitre présente la caractérisation de la protéine Cyc2p abordée par une approche couplée de génétique et de biochimie.

Méthodologie :

La construction et l'analyse des doubles mutants $\Delta cyc2 \Delta cc_1hl$ et $\Delta cyc2 \Delta cyt1-x$ nous a tout d'abord permis de confirmer et de préciser le rôle de Cyc2p dans la voie des hème lyases.

La caractérisation biochimique de la protéine Cyc2p nous a ensuite amené à élaborer un premier modèle, discuté au cours de ce chapitre. La démarche expérimentale a consisté à : (1) mettre en évidence la présence du cofacteur flavinique puis à identifier ce cofacteur par

spectrométrie de masse ; (2) établir la topologie de la protéine Cyc2p dans la mitochondrie ; (3) montrer que la protéine Cyc2p pouvait agir comme une réductase *in vitro*. L'ensemble de ces travaux a fait l'objet d'une publication (Bernard *et al.*, *J. Biol. Chem.*, 2005 : "Cyc2p, a membrane-bound flavoprotein involved in the maturation of mitochondrial *c*-type cytochromes") dont les résultats sont résumés dans le chapitre suivant.

2. Résumé de l'article 2

2.1. Cyc2p est requise pour l'activité de la CCHL.

Figure 1

Un mutant nul $\Delta cyc2$ accumule moins de 10% d'holocytochrome *c* dans la mitochondrie mais présente une croissance respiratoire proche d'une souche sauvage⁹. Un léger défaut de croissance est cependant décelable sur un milieu contenant du lactate comme unique source de carbone.

Nous avons précédemment montré que les 5% d'holocytochrome *c*₁ accumulés dans une souche Δcc_1hl étaient dus à l'activité de la CCHL. Or un double mutant $\Delta cc_1hl \Delta cyc2$ ne présente aucune trace d'holocytochrome *c*₁, comme en témoigne l'expérience d'*heme staining* présentée sur la figure 1. Ces résultats indiquent que Cyc2p est donc nécessaire pour l'activité de la CCHL. Puisque le niveau de CCHL n'est pas affecté dans les mutants $\Delta cc_1hl \Delta cyc2$ et $\Delta cyc2$, Cyc2p modulerait l'activité et non l'accumulation de la CCHL. De plus, l'accumulation normale d'holocytochrome *c*₁ chez le mutant $\Delta cyc2$ indique que Cyc2p n'est pas nécessaire pour l'activité de la CCHL. Cyc2p apparaît donc comme un facteur spécifique de la CCHL.

2.2. Cyc2p devient essentielle pour la respiration quand le site de liaison à l'hème du cytochrome *c*₁ est modifié (CAPCH au lieu de CAACH).

Figures 2 et 3

Nous avons précédemment mis en évidence que des modifications du site de liaison à l'hème du cytochrome *c*₁ (CAPCH et CADCH au lieu de CAACH) pouvaient supprimer partiellement le défaut respiratoire d'une souche Δcc_1hl . Au cours de l'analyse génétique de ces supresseurs, nous avons pu montrer que ces deux mutations, en combinaison avec la délétion $\Delta cyc2$, présentaient un phénotype respiratoire distinct. Curieusement, alors que la

⁹ Rappelons que seuls des mutants possédant moins de 5% d'holocytochrome *c* ont une croissance respiratoire significativement affectée.

substitution CAPCH (*cyt1-34*) conduit à un blocage complet de la respiration dans un contexte Δ *cyc2*, la substitution CADCH (*cyt1-48*) ne modifie pas le phénotype du mutant Δ *cyc2*. La perte de la capacité à respirer du mutant Δ *cyc2 cyt1-34* correspond à un phénotype synthétique dans la mesure où une souche portant la mutation *cyt1-34* dans un contexte sauvage est capable de respirer, la croissance n'étant que très légèrement affectée sur un milieu contenant du glycérol comme unique source de carbone (Figure 2). L'analyse du contenu en holocytochromes (*heme staining*) et la réalisation des spectres de cytochromes à basse température (Figure 3) montrent que l'assemblage du cytochrome c_1 et du cytochrome *c* est dramatiquement affecté chez le mutant Δ *cyc2 cyt1-34*. La détection spectrale des cytochromes aa_3 (oxydase) prouve qu'au moins 5% de cytochrome *c* reste toutefois assemblé dans ce contexte génétique¹⁰. La protéine Cyc2p devient donc essentielle pour l'assemblage du cytochrome c_1 lorsque celui-ci possède un site de liaison à l'hème modifié, de type CAPCH.

Comment expliquer ce phénotype respiratoire synthétique ? Le fait que les mutants Δ *cyc2 cyt1-34* et Δ *cyc2 \Delta cc_1hl* soient sévèrement affectés pour l'assemblage des cytochromes de type *c* suggèrent que les activités CC₁HL et CCHL sont sévèrement affectées chez le mutant Δ *cyc2 cyt1-34*. On peut raisonnablement formuler l'hypothèse selon laquelle la mutation *cyt1-34*, initialement sélectionnée pour augmenter l'affinité de l'apocytochrome c_1 envers la CCHL, pourrait favoriser l'interaction de l'apocytochrome c_1 envers la CCHL, au détriment de son interaction avec la CC₁HL. La perte de l'assemblage des deux cytochromes de type *c* chez le mutant Δ *cyc2 cyt1-34* pourrait donc résulter de la combinaison de deux effets : (1) la CC₁HL n'a plus accès à l'apocytochrome c_1 , la CCHL ayant une affinité particulièrement élevée pour ce substrat, et (2) la CCHL, bien que particulièrement affine pour l'apocytochrome c_1 modifié, ne peut pas être active en raison de l'absence de Cyc2p. Cette hypothèse est corroborée par le fait que la surexpression de la CC₁HL restaure partiellement le défaut respiratoire de la souche Δ *cyc2 cyt1-34*, en déplaçant probablement l'équilibre de la réaction en faveur de la CC₁HL. Le fait que la mutation *cyt1-48* (CADCH) se comporte différemment de la mutation *cyt1-34* (CAPCH) dans un contexte Δ *cyc2* pourrait alors être dû à une différence d'affinité de la CCHL envers les deux formes du cytochrome c_1 . Les sites de liaison à l'hème CADCH et CAPCH pourraient également différer au niveau de la réactivité des thiols des cystéines lors de la réaction d'hème lyase.

¹⁰ Une faible quantité de cytochrome *c* (5%) suffit à stabiliser la cytochrome oxydase (Barrientos, A., Pierre, D., Lee, J. and Tzagoloff, A. (2003) Cytochrome oxidase assembly does not require catalytically active cytochrome *c*. *J Biol Chem*, 278, 8881-8887.).

2.3. Cyc2p est une flavoprotéine capable d'utiliser le NADPH comme donneur d'électrons.

Figure 4 et tableau 2

L'analyse de la séquence protéique de Cyc2p révèle la présence d'un site putatif de liaison au FAD/FMN. Afin de confirmer la présence d'un tel cofacteur, nous avons produit la partie soluble de Cyc2p-His₆ dans *E. coli* puis purifier la protéine recombinante par chromatographie en conditions natives. Un spectre d'absorption effectué sur la protéine Cyc2p-His₆ purifiée ainsi que sur des préparations pures de FAD et FMN montre que Cyc2p-His₆ présente les caractéristiques spectrales d'une flavoprotéine (Figure 4A). Puisqu'une telle technique ne permet pas de différencier le FAD du FMN, nous avons précisé l'identité du cofacteur par spectrométrie de masse. Le cofacteur a d'abord été isolé après traitement de la protéine recombinante au chlorure de guanidine, séparé des contaminants éventuels par chromatographie HPLC puis soumis à la spectrométrie de masse (Figure 4B). Ces résultats montrent sans ambiguïté que Cyc2p lie le FAD, avec une stoechiométrie probable de type 1 :1.

La présence de cette flavine nous a amené à proposer l'hypothèse selon laquelle Cyc2p pourrait agir comme une réductase. La fonctionnalité de ce cofacteur a donc été examinée dans un système *in vitro*. Nous avons plus précisément étudié la capacité de la protéine Cyc2p-His₆ à réduire un accepteur d'électrons artificiel, le ferricyanure, en présence de NAD(P)H comme donneur d'électrons (Tableau 2). Ceci nous a permis de montrer que Cyc2p était capable de réduire le ferricyanure lorsque du NADH ou du NADPH était ajouté au milieu réactionnel, avec une meilleure affinité pour le NADPH.

2.4. Cyc2p est associée à la membrane interne mitochondriale avec son domaine de liaison au FAD localisé dans l'espace intermembranaire.

Figure 5

Des logiciels informatiques de prédiction de segments transmembranaires prédisaient l'existence d'un segment hydrophobe en N-terminal de la protéine Cyc2p, suggérant ainsi la présence d'un large domaine fonctionnel soluble. Afin d'établir la topologie de Cyc2p dans la mitochondrie, et en particulier de préciser la localisation du domaine de liaison au FAD, une étiquette HA₃ qui ne modifiait ni l'import, ni la fonctionnalité de la protéine, a été ajoutée en C-terminal de la protéine (souche YDB2). Les mitochondries issues de cette souche ont été purifiées puis soumises à différentes techniques d'analyse :

(1) Les mitochondries ont tout d'abord été fragmentées par sonication puis centrifugées à haute vitesse. Les protéines du surnageant et du culot ont ensuite été analysées par SDS-PAGE et immunodétection. Le fait que la protéine Cyc2p-HA₃, détectée par un anticorps dirigé contre l'étiquette HA, soit associée au culot indique qu'il s'agit bien d'une protéine membranaire (Figure 5A).

(2) L'association de Cyc2p à la membrane a ensuite été étudiée par un traitement à pH alcalin : il s'avère que la protéine Cyc2p, contrairement au cytochrome *c*₁ (monotopique), est partiellement extractible au carbonate¹¹ (Figure 5B), suggérant que le mode d'attachement de la protéine à la membrane pourrait ne pas faire intervenir un segment transmembranaire classique.

(3) Afin de préciser la nature de la membrane à laquelle Cyc2p se trouve associée, les membranes mitochondriales internes et externes ont été séparées sur un gradient de saccharose puis les fractions ont été analysées par SDS-PAGE et immunodétection: la protéine Cyc2p se trouve associée aux fractions enrichies en membranes internes, au même titre que le transporteur AAC et la CCHL (Figure 5C).

(4) Enfin, la localisation du domaine de fixation au FAD a été déterminée par la technique de *swelling* (lyse de la membrane externe suite à un choc osmotique) suivie de l'étude de l'accessibilité à la protéinase K de l'étiquette HA₃. Le fait que celle-ci soit accessible à la protéinase K montre que le domaine de liaison au FAD, situé du côté C-terminal, est localisé dans l'espace intermembranaire (Figure 5D).

L'ensemble de ces résultats prouve que Cyc2p est une protéine associée à la membrane interne et dont le domaine de liaison au FAD est localisé dans l'espace intermembranaire, le compartiment d'assemblage des cytochromes de type *c*.

2.5. Conclusion, discussion et modèle fonctionnel

2.5.1. Cyc2p, un partenaire de la CCHL.

La protéine Cyc2p joue un rôle important dans l'assemblage du cytochrome *c*. Cyc2p n'est cependant pas strictement essentielle puisque ce processus n'est pas complètement aboli chez un mutant $\Delta cyc2$. Ce travail montre toutefois que l'activité de la protéine Cyc2p devient essentielle pour l'assemblage des cytochromes de type *c* dans certains contextes génétiques : (1) En absence de CC₁HL, la CCHL ne peut assembler l'holocytochrome *c*₁ qu'en présence de

¹¹ Notez que la CCHL, bien qu'associée à la membrane interne, est totalement extractible au carbonate. La CC₁HL reste résistante à l'extraction au carbonate.

Cyc2p. (2) L'augmentation de « l'activité » de la CCHL dans un contexte Δcc_1hl via des mutations touchant le cytochrome c_1 ou la CCHL (ou lorsque la CCHL est surproduite) dépend de la présence de Cyc2p. (3) La protéine Cyc2p est strictement requise lorsque le site de liaison à l'hème du cytochrome c_1 est de type CAPCH au lieu de CAACH (voir paragraphe 2.2). Cyc2p devient donc essentielle à la maturation des cytochromes de type c lorsque la CCHL est l'unique hème lyase disponible. L'ensemble de ces résultats définissent donc Cyc2p comme un partenaire crucial de la CCHL.

2.5.2. Cyc2p, une flavoprotéine membranaire impliquée dans la réduction de l'hème ?

De précédentes études ont montré que la formation d'holocytocrome c dans la mitochondrie nécessite la réduction préalable de l'hème, une étape qui requiert la présence d'une flavine et du NAD(P)H¹² (Nicholson and Neupert, 1989). Or, la protéine Cyc2p possède un cofacteur FAD dans un domaine localisé dans l'espace intermembranaire et présente une activité NADPH-ferricyanure réductase *in vitro*. De plus, des recherches d'homologies de séquences, via le programme informatique BLASTP, montrent que Cyc2p présente des ressemblances avec la NADH cytochrome b_5 -réductase de levure, enzyme catalysant la réduction de l'hème du cytochrome b_5 dans l'espace intermembranaire. L'ensemble de ces caractéristiques suggère que Cyc2p pourrait intervenir dans l'étape de réduction de l'hème dépendante du NADPH (juste avant l'attachement de l'hème sur l'apocytochrome c).

On ne peut cependant pas exclure la possibilité que Cyc2p intervienne dans la réduction des cystéines du site de liaison à l'hème de l'apocytochrome c . Toutefois, dans le système I de maturation des cytochromes de type c , cette étape de réduction est médiée par des échanges de ponts disulfures entre des résidus cystéines de différentes thiorédoxines (souvent caractérisées par les motifs CXXC) et de l'apocytochrome. Puisque l'alignement de séquences des protéines Cyc2p fongiques ne fait pas apparaître de résidus cystéines conservés, il est peu probable que Cyc2p soit directement impliquée dans la réduction des cystéines du site de liaison à l'hème.

Enfin, la découverte d'une réductase liée à l'activité de la CCHL pose la question de la nécessité d'un mécanisme semblable pour l'assemblage du cytochrome c_1 dépendant de la CCHL. Alors que Cyc2p n'exerce aucune influence sur ce dernier processus, la nécessité des cofacteurs NADH et FMN pour la réduction de l'hème précédant l'attachement de l'hème à

¹² L'identité du donneur d'électrons (NADH ou NADPH) n'est pas claire.

l'apocytochrome c_1 (Nicholson *et al.*, 1989) supposerait l'existence d'un mécanisme distinct pour la réduction de l'hème destiné au cytochrome c_1 .

2.5.3. Modèle fonctionnel

Figure 6

L'ensemble de ces données nous conduit à proposer le modèle selon lequel les protéines CCHL et Cyc2p coopèreraient pour l'étape d'attachement de l'hème à l'apocytochrome c dans l'espace intermembranaire: l'hème est transporté à travers la membrane interne depuis la matrice jusque dans l'espace intermembranaire par un mécanisme inconnu (impliquant peut-être la ferrochelatase?). L'hème serait ensuite pris en charge par la CCHL, *via* les motifs de régulation par l'hème (CPV), puis maintenu réduit par la flavoprotéine membranaire Cyc2p, avant sa fixation sur l'apocytochrome c . La réduction des cystéines du site de liaison à l'hème pourrait être assurée par des facteurs redox mitochondriaux qu'il reste à identifier.

Article II

**“Cyc2p, a membrane-bound flavoprotein involved in the maturation
of mitochondrial *c*-type cytochromes”**

Cyc2p, a Membrane-bound Flavoprotein Involved in the Maturation of Mitochondrial *c*-Type Cytochromes^{*[5]}

Received for publication, August 4, 2005, and in revised form, September 29, 2005. Published, JBC Papers in Press, October 5, 2005, DOI 10.1074/jbc.M508574200

Delphine G. Bernard^{‡§}, Sophie Quevillon-Cheruel[¶], Sabeeha Merchant[‡], Bernard Guiard^{§1}, and Patrice P. Hamel^{‡2}

From the [‡]Department of Chemistry and Biochemistry, UCLA, Los Angeles, California 90095-1569, [§]Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, 91198 Gif-sur-Yvette, France and [¶]Institut de Biochimie et de Biophysique Moléculaire et Cellulaire, Université Paris-Sud, Orsay 91405, France

Mitochondrial apocytochrome *c* and *c*₁ are converted to their holoforms in the intermembrane space by attachment of heme to the cysteines of the CXXCH motif through the activity of assembly factors cytochrome *c* heme lyase and cytochrome *c*₁ heme lyase (CCHL and CC₁HL). The maintenance of apocytochrome sulfhydryls and heme substrates in a reduced state is critical for the ligation of heme. Factors that control the redox chemistry of the heme attachment reaction to apocytochrome *c* are known in bacteria and plastids but not in mitochondria. We have explored the function of Cyc2p, a candidate redox cytochrome *c* assembly component in yeast mitochondria. We show that Cyc2p is required for the activity of CCHL toward apocytochrome *c* and *c*₁ and becomes essential for the heme attachment to apocytochrome *c*₁ carrying a CAPCH instead of CAACH heme binding site. A redox function for Cyc2p in the heme lyase reaction is suggested from 1) the presence of a non-covalently bound FAD molecule in the C-terminal domain of Cyc2p, 2) the localization of Cyc2p in the inner membrane with the FAD binding domain exposed to the intermembrane space, and 3) the ability of recombinant Cyc2p to carry the NADPH-dependent reduction of ferricyanide. We postulate that, *in vivo*, Cyc2p interacts with CCHL and is involved in the reduction of heme prior to its ligation to apocytochrome *c* by CCHL.

Cytochromes define a large and structurally diverse class of heme containing proteins that are active in electron transfer (1, 2) or catalysis of oxidoreduction reactions. Since they were first recognized in the 1920s, cytochromes have been the focus of intense investigation from mechanism to structure and now to the details of their maturation. Type *c* cytochromes are a distinct subgroup of cytochromes characterized by a covalently attached protoheme IX prosthetic group that is linked via thioether bonds to cysteine residues in a CXXCH motif (where *X* can represent any amino acid except cysteine), also referred to as a heme binding site (1–3). Besides their well recognized role in bioenergetic redox chemistry, *c*-type cytochromes can also be recruited to function in antioxidative pathways, signaling, and regulation (4). This

diversity in terms of function is paralleled by a diversity in terms of assembly pathways and a surprising finding was the discovery that three pathways (Systems I–III) for the biogenesis of *c*-type cytochromes have evolved in bacteria, plastids, and mitochondria (for reviews, see Refs. 1, 2, and 4–6). The definition of the three systems is based on the occurrence of specific assembly components that are unique to each maturation pathway (4). The basis for such a diversity is not obvious, because it appears that the biochemistry to complete holo-cytochrome *c* formation is the same regardless of the assembly system under study (4). The biochemical requirements for holo-cytochrome *c* formation can be divided into functions needed for the transport and delivery of heme, the reduction of apoprotein cysteinyl thiol and heme co-factor prior to the heme ligation reaction, and the catalysis of thioether bond formation (4). This view was substantiated by the genetic and biochemical analysis of Systems I and II in bacteria and plastids, which led to the identification of multiple assembly factors with proposed or established activity in the transport and chaperoning of heme (4, 7–9), the provision of reducing equivalents for maintenance of reduced apocytochromes/heme substrates (4, 10–15), and the heme ligation reaction (8, 9, 16).

Mitochondrial *c*-type cytochromes from fungi, green algae, and animals are assembled through System III, but despite saturating genetic screens in fungal experimental models such as *Saccharomyces cerevisiae* (reviewed in Refs. 17 and 18), the mechanisms of heme delivery and how reductants are supplied to the site of assembly have escaped identification and remain so far completely unknown in this pathway. The composition of System III appears unexpectedly simple in the context of the known biochemical requirements for compartmentalized holo-cytochrome *c* formation. Either a pair of related proteins, the so-called cytochrome *c* and cytochrome *c*₁ heme lyase (CCHL³ and CC₁HL), or a single cytochrome *c* heme lyase, also named holo-cytochrome *c* synthase, is needed to attach heme to the apoforms of soluble cytochrome *c* and membrane-bound cytochrome *c*₁ in the mitochondrial IMS (19, 20). The occurrence of distinct CCHL and CC₁HL, originally described to display strict specificity toward their respective apocytochrome *c* and *c*₁ substrates (19, 21, 22), seems to be restricted to fungi and green algae (23). A recent reinvestigation of the heme lyase substrate specificity in yeast showed that whereas CC₁HL activity toward cytochrome *c*₁ is strict, CCHL is able to act on both apocytochrome *c* and *c*₁ substrates (23). On the other hand, the single heme lyase (HCCS) present in animals is able to assemble both cytochrome *c* and *c*₁ (23). Despite considerable effort toward the reconstitution of the cytochrome *c* and *c*₁ heme lyase reaction in isolated mitochondria (19, 24–29) or with partially purified enzyme (27, 30), and despite the demonstration that heme and apocytochromes *c* and *c*₁ substrates interact with the CCHL and CC₁HL

* The project was supported by the National Research Initiative of the United States Department of Agriculture Cooperative State Research, Education and Extension Service, Grant 2004-35318-14953 (to S. M.), Muscular Dystrophy Association Grant 3618 (to P. P. H.), and a Ministère de l'Éducation Nationale, de la Recherche et de la Technologie Fellowship (to D. G. B.). The costs of publication of this article were defrayed in part by the payment of page charges. This article must therefore be hereby marked "advertisement" in accordance with 18 U.S.C. Section 1734 solely to indicate this fact.

[5] The on-line version of this article (available at <http://www.jbc.org>) contains supplemental Figs. 1 and 2.

¹ To whom correspondence may be addressed: Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, Ave. de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France. Tel.: 33-1-69-82-31-84; Fax: 33-1-69-82-31-50; E-mail: guiard@cgm.cnrs-gif.fr.

² To whom correspondence may be addressed: Plant Cellular and Molecular Biology, 500 Aronoff Laboratory, 318 W. 12th Ave., The Ohio State University, Columbus, OH 43210. Tel.: 614-292-3817; Fax: 614-292-6345; E-mail: hamel.16@osu.edu.

³ The abbreviations used are: CCHL, cytochrome *c* heme lyase; CC₁HL, cytochrome *c*₁ heme lyase; HA, hemagglutinin; HPLC, high performance liquid chromatography; IMS, intermembrane space; AAC, ADP/ATP carrier.

TABLE ONE

Genotypes and sources of yeast strains

Strain	Genotype	Source
W303-1A	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>	R. Rothstein ^a
W303-1B	α <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100</i>	R. Rothstein ^a
SMY1	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 cyt2::his5⁺</i>	Ref. 23
YPH1	α <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 cyc2::hph</i>	Ref. 23
UV48	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 CYT1-48 cyt2::his5⁺</i>	Ref. 23
UV34	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 CYT1-34 cyt2::his5⁺</i>	Ref. 23
YCT1-7D	α <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 cyt2::his5⁺ cyc2::hph</i>	This study ^b
YDB8	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 CYT1-48 cyc2::hph</i>	This study ^c
YPH10-8A	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 CYT1-48</i>	This study ^d
YPH6-9C	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 cyt1-34 cyc2::hph</i>	This study ^e
YPH71-14B	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 CYT1-34</i>	This study ^f
YDB2	α <i>ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 can1-100 CYC2-(HA)₃-HIS3</i>	This study ^g

^a Department of Human Genetics, Columbia University.

^b YCT1-7D is a spore issued from the cross between SMY1 and YPH1.

^c YDB8 was obtained by inactivation of *CYC2* in YPH10-8A.

^d YPH10-8A is a spore issued from the cross between UV48 and PHT3 (42).

^e YPH6-9C is a spore issued from the cross between UV34 and YPH1.

^f YPH71-14B are spores issued from crosses between UV34 and PHT3 (42).

^g YDB2 was engineered in the W303-1B background.

(18, 28, 31–33), the enzymology of the heme attachment reaction is currently not known.

The existence of well defined reductant delivery mechanisms, candidate heme transporter, and chaperone in Systems I and II suggests that additional factors might be recruited to complete the maturation of mitochondrial cytochromes *c* in System III. Cyc2p, a mitochondrial protein identified in a screen for yeast mutants deficient for holocytochrome *c* was postulated to be such a factor (34). However, the observation that some *cyc2* mutations do not solely affect cytochrome *c* but also impact other unrelated mitochondrial processes led to the perception that Cyc2p acts as a “general” factor for mitochondrial biogenesis (35, 36). The recent reisolation of the *CYC2* gene as a multicopy suppressor of the absence of *CC₁HL* has stimulated renewed interest in the function of this accessory component in *c*-type cytochrome biogenesis (23). The recognition of an FAD-binding fold in the protein sequence led to the proposal that Cyc2p is a System III assembly factor with a redox function in the maturation of *c*-type cytochromes (23). In this work, we have explored the function of candidate redox component Cyc2p. We discuss the implications of this unique factor in the control of the redox chemistry of the heme lyase reaction.

EXPERIMENTAL PROCEDURES

Construction, Manipulation, and Growth of Yeast Strains—All of the yeast strains used in the course of this study are listed in TABLE ONE. *S. cerevisiae* wild type strains W303-1A and W303-1B are labeled *WT* in Figs. 1–3. Strains carrying null alleles in the *CYC2* or *CC₁HL* genes are labeled Δ *cyc2* and Δ *cc₁hl*, respectively, in the figures. Null alleles of yeast genes in the W303 background were constructed using a PCR-based method. The *hphMX4* (37) and *HIS3MX6* (38) modules were chosen to inactivate the wild type copy of the *CYC2* and *CC₁HL* genes, respectively. A triple histidine tag was engineered at the 3'-end of the *CYC2* gene using plasmid pFA6a-3HA-HIS3MX6 as a template (39) and integrated at the *CYC2* chromosomal locus by transformation of the W303-1B strain. Yeast cells were transformed by the lithium acetate procedure of Schiestl and Gietz (40). The media used for *S. cerevisiae* have been described elsewhere (41–43). Glucose or galactose was used

as fermentable carbon source, and glycerol, glycerol/ethanol, ethanol, or lactate was used as respiratory carbon source.

Plasmid Construction—DNA manipulations were carried out following published procedures (44). A DNA fragment encoding amino acids Glu⁵³–Ser³⁶⁶ of Cyc2p was amplified using W303-1A genomic DNA as a template and the following *NheI* and *XhoI* engineered oligonucleotides as primers: 5'-GCTAGCTAGCGAGGAGGGAAAACAAACATGAGTTATCTCC-3'; 5'-CCGCTCGAGTGAAATTTATACACATTATCGGAGTTC-3'.

The *NheI*/*XhoI*-digested PCR product was cloned into the *NheI*/*XhoI* sites of the hexahistidiny tag vector pET-24a (Novagen). In the same way, the *CCHL* open reading frame was amplified using W303-1A genomic DNA as template and the following *NdeI* and *XhoI* engineered oligonucleotides as primers: 5'-GGAATTCATATGGGTTGGTTT-TGGGCAGATCAAAAAC-3'; 5'-CCGCTCGAGAGGGGCGGAG-GACGAAGAGGACGGACC-3'.

The *NdeI*/*XhoI*-digested PCR product was cloned into the *NdeI*/*XhoI* sites of pET-24a. *Escherichia coli* strain BL21-CodonPlus(DE3)-RIL (Novagen) was used for the expression of recombinant His₆-tagged Cyc2p and CCHL proteins.

Purification of Native Cyc2p-His₆—*E. coli* BL21 transformants carrying the pET-24a plasmid expressing the Cyc2p-His₆ protein were grown at 37 °C to an *A*₆₀₀ of 0.5 and induced at 20 °C with 1 mM isopropyl 1-thio- β -D-galactopyranoside. Cells were collected 6 h after induction and disrupted by sonication. In these conditions, Cyc2p was found to be mainly soluble in the supernatant after a 15,000 \times *g*, 30-min centrifugation. The presence of the hexahistidiny tag at the carboxyl terminus of the protein allowed rapid purification on nickel-agarose under native conditions in a buffer consisting of 200 mM NaCl, 20 mM Tris-Cl, pH 7.5. The protein was bound to nickel-agarose (Qiagen), eluted with 400 mM imidazole, and further purified on a Superdex75 column. The concentration of the purified enzyme was measured by absorbance at 280 nm, and the purity was assessed by SDS-PAGE.

Enzymatic Activities—NAD(P)H-ferricyanide reductase activities were assayed at 25 °C in 50 mM Tris-Cl, pH 7.5, in the presence of 400 mM ferricyanide and 2.5 mM recombinant soluble Cyc2p-His₆. The reduction of ferricyanide was monitored by measuring the decrease of absorbance at 340 nm in a Cary 400 spectrophotometer. Kinetic param-

⁴ For simplification, the *CYC3* gene specifying CCHL and the *CYT2* gene encoding *CC₁HL* will be referred to as *CCHL* and *CC₁HL* genes, respectively, throughout this work.

A Cytochrome *c* Assembly Flavoprotein

eters were determined by measuring initial velocities at different substrate concentrations. Rates were calculated using a $\Delta\epsilon$ of $1.04 \text{ mM}^{-1} \text{ cm}^{-1}$ for the conversion of ferricyanide. NADH and NADPH were obtained from Sigma.

Identification of the Flavin Cofactor—Recombinant Cyc2p-His₆ protein was denatured in 4.5 M guanidine chloride and analyzed by reversed phase HPLC using negative electrospray and coupled to mass spectrometry. Pure FAD and FMN, obtained from Sigma, were treated in the same fashion and used as mass standards.

Production of Antibodies—For generation of anti-Cyc2p and anti-CCHL antisera, rabbits were injected with native Cyc2p (prepared as described above) or denatured CCHL prepared according to QIAexpress purification protocol (Qiagen), respectively. As expected, both anti-Cyc2p and anti-CCHL antibodies immunoreact against mitochondrial proteins of ~40 and 33 kDa, respectively (see Fig. 3; data not shown).

Protein Preparation and Analysis—Mitochondria were purified from yeast grown in galactose medium as described earlier (45), and the mitochondrial protein concentration was determined using the Bradford reagent (Sigma) or the Coomassie protein assay reagent (Pierce). Protein samples were analyzed through lithium dodecyl sulfate-PAGE (4 °C) or SDS-PAGE (room temperature) and subsequently immobilized by electrotransfer to polyvinylidene difluoride or nitrocellulose membranes (0.45 mm). For heme staining of mitochondrial *c* type cytochromes, samples were reduced with dithiothreitol on ice for 30 min and separated by lithium dodecyl sulfate-PAGE at 4 °C (46). The heme-associated peroxidase activity was revealed directly on membrane-transferred *c*-type cytochromes by the enhanced chemiluminescence method from Pierce. Polyclonal antibodies raised against CCHL, Cyc2p (this work), cytochrome *b*₂, AAC, Hsp60 (Dr. C. Meisinger, Freiburg, Germany), and cytochrome *c*₁ (Dr. C. Lemaire, Gif-sur-Yvette, France), and monoclonal antibody against HA epitope (Santa Cruz Biotechnology, Inc., Santa Cruz, CA) and porin (Molecular Probes, Inc., Eugene, OR) were used for immunodetection of immobilized proteins. Bound antibodies were detected by horseradish peroxidase-conjugated secondary antibodies.

Biochemical Methods—Hypotonic swelling of mitochondria, subsequent treatment with proteinase K, and carbonate extraction were performed as described (47), except that trichloroacetic precipitation was omitted. When indicated, mitochondria were treated with 30 or 60 mg/ml proteinase K for 20 min on ice. After the addition of phenylmethylsulfonyl fluoride and 10-min incubation on ice, mitochondria were reisolated after centrifugation at $15,000 \times g$ for 30 min and resuspended in sample buffer for SDS-PAGE analysis. Mitochondria were sonicated on ice (Bioblock Scientific, 3×30 s, duty cycle 40%, output 5), and the soluble fraction was separated from the membrane fraction by centrifugation at $100,000 \times g$ for 1 h at 4 °C. For carbonate extraction, mitochondria were treated with 0.1 M Na₂CO₃, pH 11.5 or 10.8 (adjusted with HCl), incubated for 20 min on ice, and subjected to centrifugation at $100,000 \times g$ for 1 h at 4 °C. Total (*T*), pellet (*P*), and supernatant (*S*) fractions were then analyzed by SDS-PAGE. For submitochondrial fractionation, 8 mg of mitochondria were resuspended in 4 ml of swelling buffer (20 mM Hepes/KOH, pH 7.4, 0.5 mM EDTA, and 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride). After 30 min incubation on ice, sucrose was added to 0.45 M final concentration, and mitochondria were further incubated for 10 min on ice. After sonication (Bioblock Scientific, 3×30 s, duty cycle 80%), the remaining intact mitochondria and large fragments were removed by centrifugation ($15,000 \times g$, 10 min). The supernatant was centrifuged at $200,000 \times g$ for 45 min at 4 °C. The pellet was resuspended in 300 μ l of buffer containing 5 mM Hepes/KOH, pH 7.4,

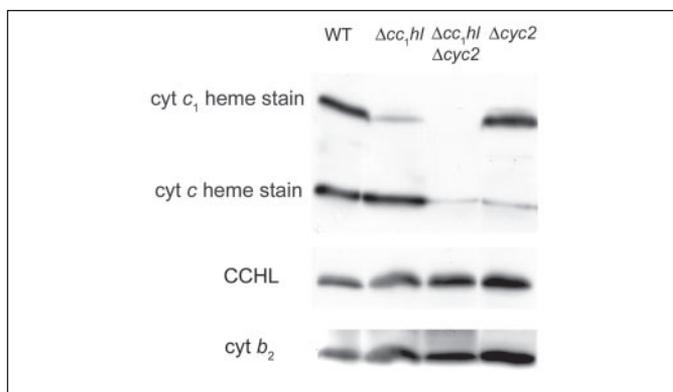


FIGURE 1. Cyc2p is required for CCHL function. Heme stain of mitochondrial *c*-type cytochromes. 70 μ g of mitochondrial protein from wild type (WT) (W303-1B), SMY1 ($\Delta cc_1 hl$), YCT1-7D ($\Delta cyc2 \Delta cc_1 hl$), and YPH1 ($\Delta cyc2$) strains grown at 28 °C in galactose medium were analyzed for the abundance of the holoforms of cytochrome *c* and cytochrome *c*₁. Dithiothreitol-treated samples were separated by electrophoresis in a 12% lithium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel at 4 °C. The level of holoforms of cytochromes *c* and *c*₁ was assessed by heme staining. CCHL and cytochrome *b*₂ (loading control) were detected by immunodecoration.

10 mM KCl, 1 mM phenylmethylsulfonyl fluoride. After a clarifying spin ($15,000 \times g$, 10 min), the supernatant was loaded onto a discontinuous sucrose gradient (made with 1.4 ml of 55%, 5.1 ml of 46%, 2.3 ml of 38%, and 1.4 ml of 29% (w/v) sucrose in 10 mM KCl, 5 mM Hepes/KOH, pH 7.4). After centrifugation ($100,000 \times g$, 16 h, 4 °C), 700-ml fractions were collected from bottom to top.

RESULTS

Cyc2p Is Required for the Activity of CCHL toward Cytochrome *c* and Cytochrome *c*₁—Cyc2p was originally described as an accessory cytochrome *c* assembly factor on the basis that strains carrying mutations in the *CYC2* gene accumulate at least 10% of the wild type complement of holoform of cytochrome *c* (34–36). A $\Delta cyc2$ mutant displays a very slight respiration-deficient growth phenotype, consistent with the observation that only levels of holoform of cytochrome *c* below 5% of the normal level will impact appreciably the respiratory growth. The partial deficiency in holoform of cytochrome *c* cannot be attributed to loss of its cognate assembly factor, since the abundance of CCHL does not appear to be affected by the absence of Cyc2p (Fig. 1). Note that the accumulation of wild type level of holoform of cytochrome *c*₁ in the $\Delta cyc2$ mutant indicates that Cyc2p is not required for the CC₁HL-dependent assembly of cytochrome *c*₁ (Fig. 1).

We have previously established that CCHL exhibits intrinsic activity toward apocytochrome *c*₁ and is able to promote low level of holoform of cytochrome *c*₁ formation in the $\Delta cc_1 hl$ mutant (Fig. 1) (see Ref. 23). The fact that the $\Delta cyc2 \Delta cc_1 hl$ mutant is no longer able to assemble holoform of cytochrome *c*₁ indicates that Cyc2p is also required for the activity of CCHL toward apocytochrome *c*₁ (Fig. 1) and accounts for the synthetic respiration-deficient phenotype of the $\Delta cc_1 hl \Delta cyc2$ mutant (Fig. 1) (see Ref. 23). Immunoblotting analysis showed that, similar to the $\Delta cyc2$ mutant, the accumulation of CCHL is not modified in the absence of both Cyc2p and CC₁HL. This latter result solidifies the view that Cyc2p modulates the activity of CCHL in the assembly process (23). We concluded that Cyc2p is required for the CCHL-dependent assembly of cytochrome *c* and cytochrome *c*₁ but not for the assembly of cytochrome *c*₁ when catalyzed by CC₁HL.

Cyc2p Becomes Essential for Respiration When Cytochrome *c*₁ Carries a Mutant CAPCH Heme Binding Site—A previous hunt for suppressors for which holoform of cytochrome *c*₁ assembly was enhanced in the absence of

CC₁HL uncovered nuclear dominant mutations in the *CYT1*⁵ gene (23). During the genetic analysis of the suppressed strains, we discovered that the *CYT1-34* and *CYT1-48* suppressor mutations that both map to the heme binding site of cytochrome *c*₁ (23) displayed a distinct respiratory phenotype in combination with a Δ *cyc2* allele (not shown). Whereas an alanine to proline substitution in *CYT1-34* (CAPCH) results in a complete respiratory block in a Δ *cyc2* background, the same alanine, when mutated to aspartic acid in *CYT1-48* (CADCH), does not cause any visible phenotype (Fig. 2). The loss of respiratory competence in the Δ *cyc2* *cyt1-34* is a synthetic phenotype, because a strain carrying the *CYT1-34* mutation in an otherwise wild type context is respiration-proficient and only slightly affected for growth compared with a wild type strain (Fig. 2). We also verified that transformation of the Δ *cyc2* *cyt1-34* mutant with a plasmid carrying the wild type *CYT1* or *CYC2* gene restores the ability to grow on respiratory substrates (not shown). Spectral and heme staining analyses showed that there is a dramatic loss of holocytochrome *c*₁ assembly in the Δ *cyc2* *cyt1-34* mutant (Fig. 3) but no visible change in the steady state abundance of both CCHL and CC₁HL (Fig. 3B; data not shown). Consistent with the slow respiratory growth phenotype, decreased levels of holocytochrome *c*₁ are detected

in a strain carrying the *CYT1-34* mutation in an otherwise wild type background (Fig. 3). As expected, the *CYT1-48* mutation does not affect the assembly of holocytochrome *c*₁ and could not be distinguished from the *CYT1* allele, either in an otherwise wild type background or when combined with the absence of Cyc2p (Fig. 3). We concluded from this study that Cyc2p becomes essential for the assembly of cytochrome *c*₁ with a CAPCH heme binding site.

Cyc2p Is a Flavoprotein with a Redox Active Co-factor—We have hypothesized that Cyc2p might be a flavoprotein, because sequence analysis revealed an FAD binding fold typical of the ferredoxin reductase family (48) in the C-terminal part of the protein (supplemental Fig. 1). In order to test this hypothesis, we engineered a hexahistidinyl-tagged version of the C-terminal domain of the protein for expression in *E. coli*. This domain was chosen, because it is predicted to be soluble and includes the entire FAD binding fold (supplemental Fig. 1). The recombinant protein was found to be mostly soluble when produced at 20 °C and could be further purified to homogeneity using metal chelate chromatography (data not shown). Spectroscopic analysis was performed on purified Cyc2p-His₆ to detect absorbance peaks at around 382 and 454 nm, indicative of bound FAD. Bound FAD exhibits small but distinct spectroscopic differences from free FAD (49–51). As shown in Fig. 4A, the recombinant Cyc2p-His₆ displays a spectrum typical of a flavoprotein with a maximum absorbance peak shifted by 6 nm compared with free FAD. Because FAD and FMN are not easily distinguishable on the basis of their spectroscopic properties, we decided to confirm the identity of the flavin group by mass spectrometry.

As the predicted FAD-binding fold present in Cyc2p suggests noncovalent binding of the cofactor (48), purified Cyc2p-His₆ was treated with 4.5 M guanidine chloride in order to liberate the flavin group. The mass of the cofactor was then determined by mass spectrometric analysis after purification via HPLC and compared with the mass of pure FAD or pure FMN in order to discriminate between the two flavin cofactors. From the data obtained by mass spectrometry, we were able to establish unambiguously that the cofactor bound to the C-terminal domain of Cyc2p is FAD (Fig. 4B). The cofactor to protein molar ratio was found to be ~1:1 indicative of a stoichiometry of one bound molecule of FAD per molecule of Cyc2p (not shown).

The presence of a flavin molecule in Cyc2p prompted us to examine the functionality of the cofactor in an *in vitro* assay. Our experimental design was driven by the proposed model that Cyc2p operates in a reducing pathway in cytochrome *c* assembly and therefore exhibits redox activity (23). A standard demonstration of the redox activity of a

⁵ *CYT1* encodes apocytochrome *c*₁.

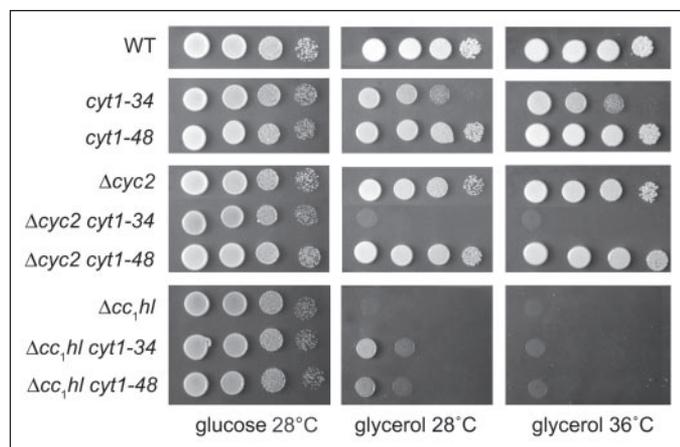
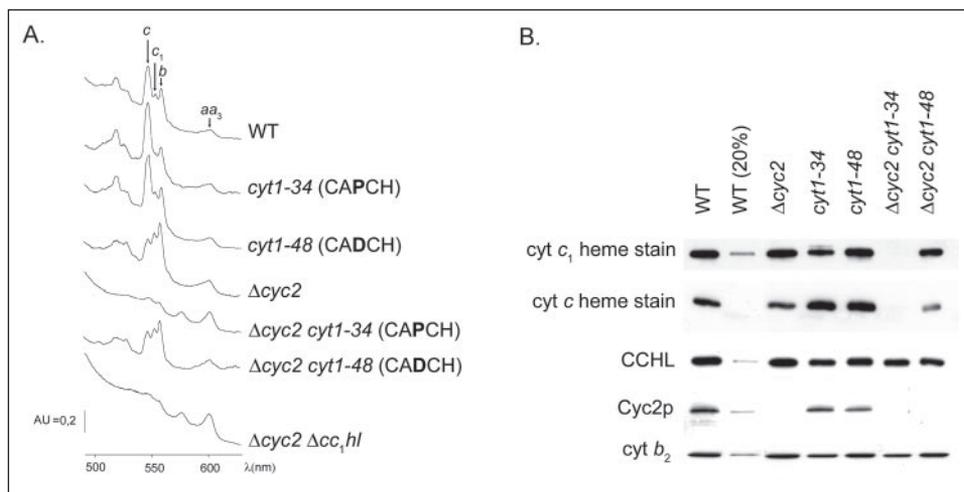


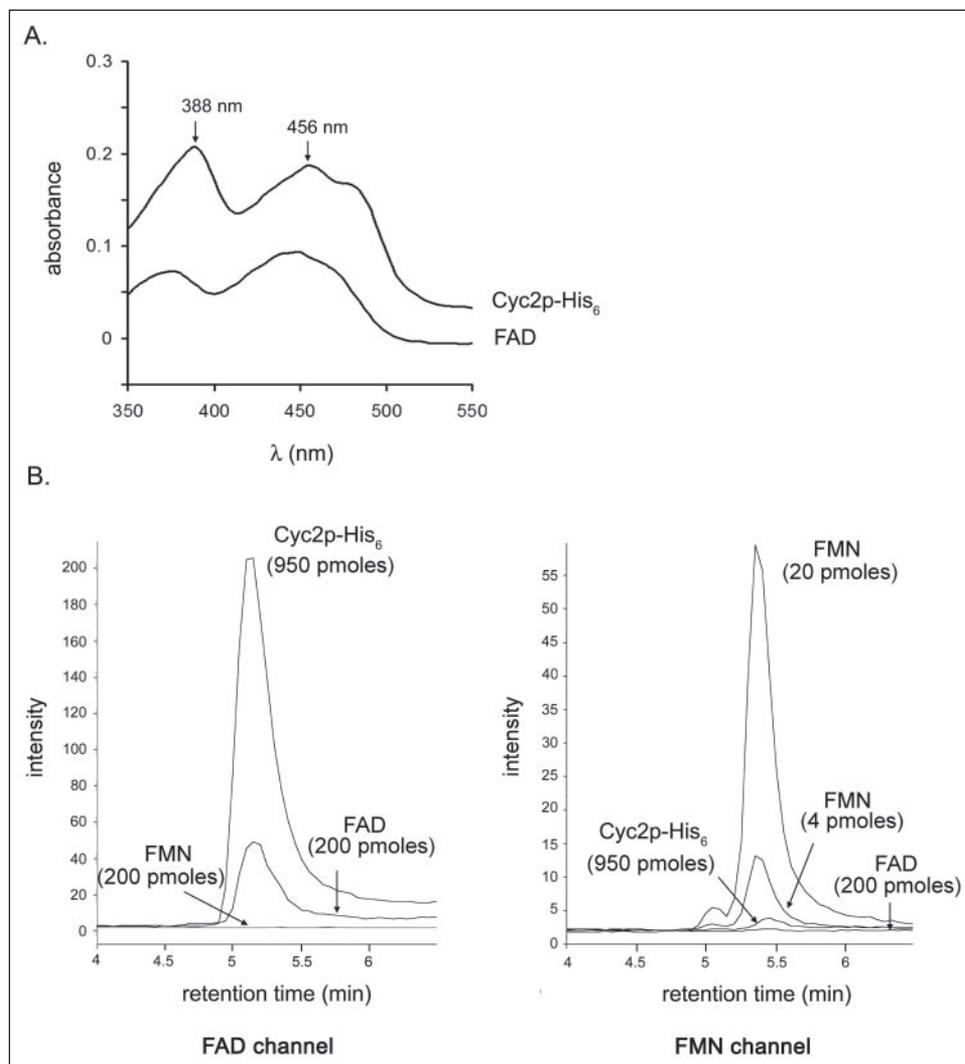
FIGURE 2. Respiratory growth of cytochrome *c* assembly mutants. Dilution series of wild type (WT) (W303-1A), *cyt1-34* (YPH71-14B), *cyt1-48* (YPH10-8A), Δ *cyc2* (YPH1), Δ *cyc2* *cyt1-34* (YPH6-9C), Δ *cyc2* *cyt1-48* (YDB8), Δ *cc₁hl* (SMY1), Δ *cc₁hl* *cyt1-34* (UV34), and Δ *cc₁hl* *cyt1-48* (UV48) strains were grown on medium containing fermentable (glucose) or respiratory (glycerol) substrates and incubated for 3 days at 28 or 36 °C.

FIGURE 3. Loss of holocytochrome *c*₁ assembly in the Δ *cyc2* *cyt1-34* mutant. A, cytochrome absorption spectra. Low temperature absorption spectra of cells (see Fig. 2) grown in galactose were recorded with a Cary 400 spectrophotometer as already described (65). The arrows indicate the absorption maxima of the a bands of cytochromes *c* (546 nm), *c*₁ (552 nm), *b* (558 nm), and *a* + *a*₃ (602 nm). Note that cytochromes *aa*₃ of cytochrome *c* oxidase are spectrally detectable in the Δ *cyc2* *cyt1-34* mutant that still assembles a residual level of holocytochrome *c* (see B). Only low levels of holocytochrome *c* are required to maintain assembly of cytochrome *c* oxidase (66, 67). B, heme stain of mitochondrial *c*-type cytochromes. 6 μ g of mitochondrial protein from cells grown at 28 °C in galactose medium were analyzed for the abundance of the holofoms of cytochrome *c* and cytochrome *c*₁. Dithiothreitol-treated samples were separated in a 12% lithium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel at 4 °C. The level of holocytochrome *c* and *c*₁ was assessed by heme staining. CCHL, Cyc2p, and cytochrome *b*₂ (loading control) were detected by immunodetection. WT, wild type.



A Cytochrome *c* Assembly Flavoprotein

FIGURE 4. Cyc2p is a FAD-binding protein. *A*, Cyc2p exhibits the spectrum of a flavoprotein. The absorbance spectrum was recorded in the range of 350–550 nm using purified Cyc2p-His₆ or pure FAD. *B*, identification of the cofactor by reverse phase HPLC coupled to mass spectrometry. A solution of Cyc2p-His₆ was treated with guanidine 4.5 M in order to liberate the flavin cofactor. The mass of the cofactor was then determined by mass spectrometry analysis and compared with the mass of pure FAD or pure FMN. FAD channel and FMN channel indicate the peak intensity at molar mass = 784.29 and 455.4 g/mol, respectively. The quantity of protein or flavin injected is indicated on the graph.



flavoprotein is the assay for the NAD(P)H-dependent reduction of an artificial electron acceptor like ferricyanide (52, 53). As shown in TABLE TWO, recombinant Cyc2p is able to catalyze the reduction of ferricyanide when NADH or NADPH is used as an electron donor in the reaction. This result is in accord with the presence of a consensus binding site for NAD(P)H in Cyc2p (supplemental Fig. 1). The determination of the kinetic parameters indicates that Cyc2p has the same maximum velocity in the NADH- or NADPH-dependent reduction of ferricyanide but has a much higher affinity for NADPH *versus* NADH as the donor substrate (TABLE TWO).

Based on our results, we concluded that the C-terminal domain of Cyc2p binds one molecule of FAD co-factor and displays redox activity in an *in vitro* assay.

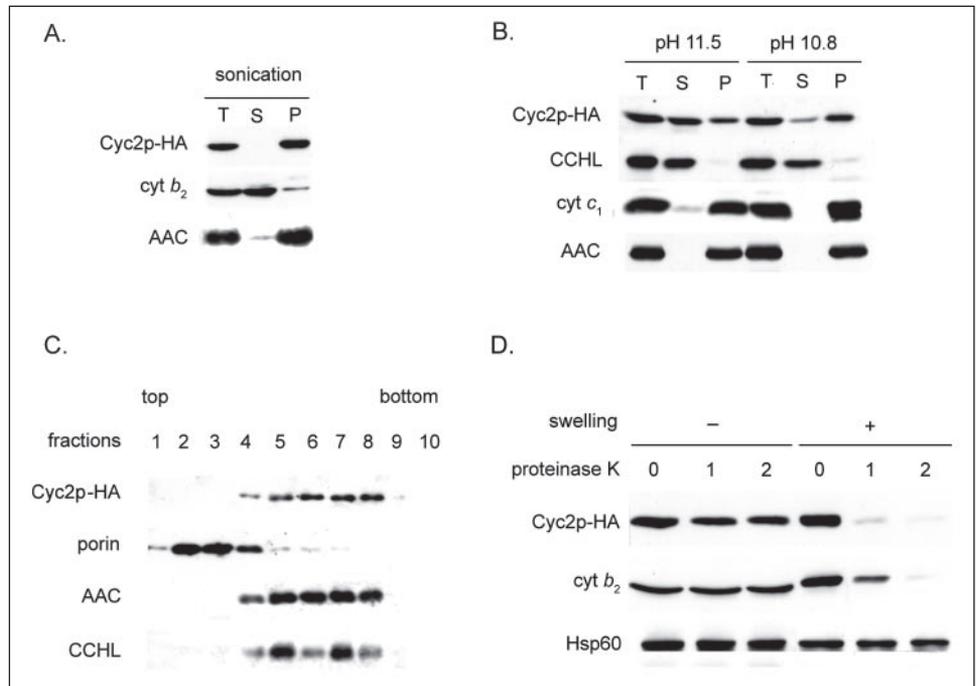
Cyc2p Is a Mitochondrial Inner Membrane Protein with FAD Binding Domain in the IMS—One key question in terms of deducing Cyc2p function in the heme lyase pathway is to define its topological arrangement, particularly with respect to the FAD binding domain. The predicted monotopic arrangement with a matrix-side N terminus and IMS-side C-terminal FAD-containing domain is compatible with the known location of CCHL in the IMS (31, 54) and the proposed model for redox function of Cyc2p (23). In order to verify this model experimentally, an HA tag was engineered by PCR at the C terminus of Cyc2p. The strain expressing Cyc2p-HA displayed a wild type cytochrome absorption spectrum, showing that the tagged protein is functional (not shown).

TABLE TWO
Initial rate kinetic parameters obtained for the ferricyanide reductase activity of the recombinant soluble Cyc2p

Substrate	V_{\max} $\mu\text{mol substrate}/\text{min}/\text{nmol enzyme}$	K_m μM	V_{\max}/K_m
NADH	0.11	3×10^4	3.7×10^{-6}
NADPH	0.13	10^2	1.4×10^{-3}

Using an anti-HA antibody, we determined that Cyc2p-HA is associated with the membrane fraction in purified mitochondria and co-fractionates with AAC, a mitochondrial inner membrane embedded carrier (Fig. 5A). Cyc2p association to the membrane was further examined by carbonate extraction, a standard protocol that serves for the separation of integral from peripherally associated membrane proteins. Cyc2p could be mostly extracted by carbonate treatment at pH 11.5, whereas cytochrome *c*₁ and AAC, a monotopic and polytopic membrane protein, respectively, which are tightly anchored to the membrane, are resistant to carbonate extraction (Fig. 5B). Interestingly, the complete extractability of CCHL from mitochondrial membranes at pH 10.8 indicates that, like Cyc2p, the protein is peripherally associated to the inner membrane as already reported in former studies (55). By contrast, CC₁HL behaves like an integral membrane protein and is completely resistant to carbonate extraction (data not shown) (55). To identify the

FIGURE 5. Sublocalization and topological study of Cyc2p in mitochondria. *A*, Cyc2p is a membrane-bound protein. Mitochondria from yeast cells expressing HA-tagged Cyc2p were sonicated in the presence of 500 mM NaCl. Samples were left untreated (*T*) or subjected to ultracentrifugation at $100,000 \times g$ (*S*, supernatant; *P*, pellet) and then analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. *B*, Cyc2p is partially extractable by sodium carbonate. Mitochondria from yeast cells expressing HA-tagged Cyc2p were treated at pH 11.5 or 10.8, followed by an ultracentrifugation at $100,000 \times g$ for 1 h. Samples were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. *C*, Cyc2p is associated with the mitochondrial inner membrane. Mitochondrial outer and inner membrane vesicles were separated on a sucrose gradient, and fractions were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting. *D*, the C-terminal domain of Cyc2p is exposed to the IMS. Mitochondria from yeast cells expressing HA-tagged Cyc2p were either directly treated with proteinase K or subjected to hypotonic swelling before proteinase K treatment (*1*, 30 mg/ml; *2*, 60 mg/ml). Samples were analyzed by SDS-PAGE and immunoblotting.



mitochondrial membranes with which Cyc2p is associated, we performed a mitochondrial subfractionation under conditions that allow separation of the inner and outer membranes. Immunoblotting with anti-porin antibody enabled the identification of the outer membrane enriched fractions (Fig. 5C). Fractions containing the inner membranes were revealed with antibodies against AAC and CCHL, which are known inner membrane resident proteins (Fig. 5C). Immunodetection of Cyc2p-HA in the different fractions shows that its distribution matches closely that of AAC and CCHL. This suggests that like CCHL, Cyc2p is bound to the inner membrane of the mitochondria. To assess sublocalization of the FAD binding domain of Cyc2p, HA epitope exposure studies by limited proteolysis were carried out in isolated mitoplasts. The HA tag was found to be accessible to degradation by added proteinase K, similarly to cytochrome *b*₂, an IMS resident protein (Fig. 5D). As a control, we verified that matrix located Hsp60 was protected from proteolytic degradation by proteinase K. This result enabled us to deduce that the FAD binding domain of Cyc2p is exposed to the IMS. Taken together, these results established that Cyc2p is localized in the mitochondrial inner membrane with the FAD binding domain in the IMS.

DISCUSSION

Numerous *in organello* and *in vitro* studies on the assembly of mitochondrial cytochrome *c* have established that the chemistry of thioether bond formation can only proceed when the appropriate redox conditions are provided (*i.e.* apocytochrome *c* sulfhydryls and heme substrates are maintained reduced prior to the ligation of heme) (24, 29, 56–58), yet the fact that no mitochondrial cytochrome *c* assembly proteins besides the so-called heme lyases have been identified led to the assumption that *in vivo* the redox chemistry of the heme lyase reaction was not under the control of dedicated factors and occurred spontaneously in the “reducing” environment of the IMS. In this paper, we have challenged this thinking through the study of Cyc2p, a cytochrome *c* assembly component. We provide evidence that Cyc2p may fulfill a redox function in the heme lyase reaction based on the finding that the protein is (i) required for the activity of CCHL toward cytochrome *c* and

cytochrome *c*₁, (ii) carries a FAD cofactor and exhibits diaphorase activity *in vitro*, and (iii) localizes to the inner membrane with the FAD binding site exposed to the IMS.

Cyc2p, a Partner of CCHL in the Heme Lyase Reaction—Detailed phenotypic analysis of *cyc2* mutants led to the view that Cyc2p is not strictly necessary for the maturation process of mitochondrial *c*-type cytochromes (34–36). Indeed, in a $\Delta cyc2$ mutant, holocytochrome *c* formation still takes place, albeit less effectively, and holocytochrome *c*₁ assembly proceeds normally (Fig. 3). However, we found that in certain conditions, the activity of Cyc2p becomes critical for the assembly of *c*-type cytochromes. First, in the absence of CC₁HL, CCHL can only assemble cytochrome *c*₁ when Cyc2p is present (Fig. 1). The dependence of CCHL upon Cyc2p does not seem to be restricted to the cytochrome *c*₁ substrate, since holocytochrome *c* accumulation is significantly more affected in a $\Delta cc_1hl \Delta cyc2$ strain than in a $\Delta cyc2$ mutant (Fig. 3A). Note that in the absence of both CC₁HL and Cyc2p, holocytochrome *c* assembly is not completely abolished, and some residual level of holocytochrome *c* still accumulates (Fig. 1). We have verified that the abundance of CCHL is not modified in a $\Delta cc_1hl \Delta cyc2$ mutant, and it is likely that Cyc2p exerts its effect on cytochrome *c* maturation by modulating the activity of CCHL (Fig. 1). Second, we have also observed that in a Δcc_1hl mutant, enhanced activity of CCHL toward apocytochrome *c*₁ through missense mutations in cytochrome *c*₁ or CCHL or overexpression of CCHL is strictly dependent on the participation of Cyc2p (23). Thus, it appears that Cyc2p becomes essential for *c*-type cytochrome maturation when CCHL is the only lyase promoting the assembly of both holocytochrome *c* and *c*₁. Third, intriguingly, whereas Cyc2p is not needed for the assembly of cytochrome *c*₁ with a wild type or CADCH heme binding site (CYT1–48), it is absolutely required when cytochrome *c*₁ carries a CAPCH heme binding site (CYT1–34). The concomitant loss of holocytochrome *c* and *c*₁ assembly in the absence of Cyc2p and the presence of the CYT1–34 mutation is somehow very similar to the phenotype displayed by the $\Delta cc_1hl \Delta cyc2$ mutant (Fig. 3A) and suggests that both CCHL and CC₁HL activities are severely compromised in the $\Delta cyc2$ *cyt1–34* strain.

A Cytochrome *c* Assembly Flavoprotein

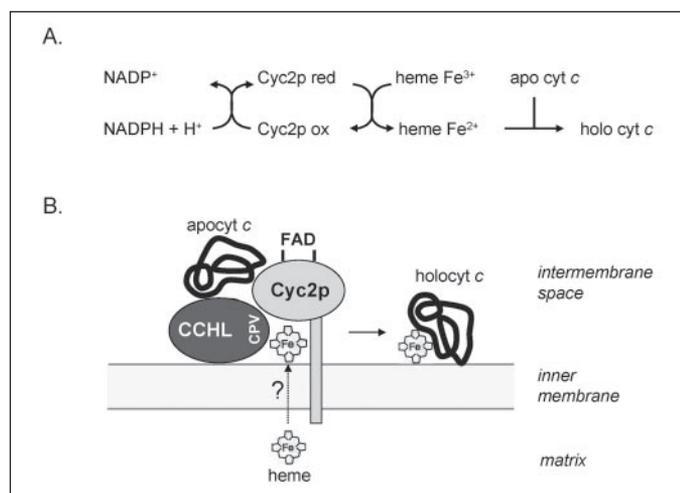


FIGURE 6. Functional model for Cyc2p in the mitochondria. *A*, schematic representation of Cyc2p activity. *B*, CCHL and Cyc2p cooperate in the heme lyase reaction in the mitochondrial IMS. Heme is transported from its site of synthesis in the matrix across the mitochondrial inner membrane by an unknown mechanism (?). Once emerged from the inner membrane, heme is handled by CCHL via the heme regulatory motifs (CPV) and maintained reduced by the activity of membrane-bound flavoprotein Cyc2p. We postulate that yet to be identified components are required to maintain the apocytochrome *c* sulfhydryls reduced prior to the heme ligation by CCHL.

We think that the *CYT1-34* mutation, which was selected to increase the affinity of CCHL toward cytochrome *c*₁ (23), could act by favoring the interaction of apocytochrome *c*₁ with CCHL to the detriment of its interaction with CC₁HL, its cognate lyase. Loss of assembly of both cytochrome *c* and *c*₁ in the Δ *cyc2 cyt1-34* mutant can therefore be explained by the fact that, similarly to the Δ *cc₁hl* Δ *cyc2* mutant, Cyc2p is essential when the assembly of both cytochrome *c* and *c*₁ relies solely on CCHL. This hypothesis is further solidified by the observation that CC₁HL when overexpressed from a multicopy plasmid alleviates the respiratory deficiency of the Δ *cyc2 cyt1-34* mutant (data not shown). We believe that in this situation, overexpression of CC₁HL outcompetes CCHL in the interaction with apocytochrome *c*₁, which can be converted to its holoform by action of its cognate lyase. As expected, overexpression of CCHL in the Δ *cyc2 cyt1-34* mutant did not restore the respiratory proficiency (data not shown).

At present, there is no straightforward answer as to why the *CYT1-48* mutation which, like *CYT1-34* was selected to enhance the affinity of CCHL for cytochrome *c*₁, behaves differently than *CYT1-34* in the absence of Cyc2p (Fig. 3). One possibility is that the affinity of CCHL for cytochrome *c*₁ is higher when it carries a CAPCH (*CYT1-34*) instead of a CADCH heme binding (*CYT1-48*). Notably, the *CYT1-34* and *CYT1-48* mutations alter the same alanine residue that lies in between the two cysteines of the CXXCH motif. It is known that between cysteine mutations in CXXC motifs of redox proteins such as thioredoxin DsbA or protein-disulfide isomerase affect the reactivity in thiol-disulfide exchange (59–61). It is thus conceivable that the CAPCH and CADCH heme binding sites of cytochrome *c*₁ differ as to the reactivity of their cysteine thiols in the heme attachment reaction.

Based on the results presented in this study, we favor a model where Cyc2p is a partner of CCHL and becomes critical for the maturation process of cytochrome *c* and *c*₁ when CC₁HL is absent or unable to act on its cognate substrate. The localization of both CCHL and Cyc2p in the inner membrane with domains of the proteins exposed to the IMS is compatible with such a model (Fig. 6B).

A Putative Heme Reductase Activity for Cyc2p?—Pioneer studies have established that the reduction of heme in the *in organello* heme lyase reaction is mediated through the action of pyridine nucleotides and a

flavin-linked electron transfer (24, 57). However, the identity of the electron donor, whether NADPH or NADH, still remains unclear. Our discovery that Cyc2p harbors a bound FAD in a domain that localizes to the mitochondrial IMS and exhibits NAD(P)H-ferricyanide oxidoreductase activity *in vitro* suggests that *in vivo*, Cyc2p could function in reducing heme prior to its ligation by CCHL. The greater affinity of Cyc2p for the NADPH substrate *in vitro* makes it likely that NADPH acts as the electron donor to Cyc2p in the mitochondrial IMS. Because the requirement for reductants applies to both heme and apocytochrome *c* substrates, it is conceivable that Cyc2p reduces both the cofactor and the apocytochrome *c* sulfhydryls *in vivo*. However, based on the similarity of Cyc2p with cytochrome *b*₅ reductase-like proteins that reduce heme in cytochrome *b*₅ (supplemental Fig. 2), we favor a model where Cyc2p catalyzes the NADPH-dependent reduction of the heme co-factor only (Fig. 6A). In such a model, heme is handled by CCHL through the heme regulatory motif after its transport from the matrix across the inner membrane, maintained reduced through the activity of Cyc2p and ligated to the apocytochrome *c* substrate by action of CCHL (Fig. 6B). Additional experimental work is required to establish whether heme and/or apocytochrome *c* are the relevant targets of action of Cyc2p *in vivo*.

If Cyc2p is active as a heme and/or apocytochrome reductase in cytochrome *c* maturation, its function is clearly redundant based on the observation that a Δ *cyc2* mutant is still able to assemble holo cytochrome *c* (Fig. 3). The function performed by Cyc2p appears essential only when the assembly of both cytochrome *c* and *c*₁ is dependent upon CCHL. It is possible that the activity of Cyc2p becomes limiting for the assembly process when two apocytochrome substrates instead of one need to be converted to their holoforms by CCHL. This hypothesis is supported by our initial discovery that *CYC2* acts as a multicopy suppressor of the absence of CC₁HL by enhancing holo cytochrome *c*₁ formation (23). Other genes carrying a *CYC2*-like activity could be identified by such a multicopy suppressor approach. However, a saturating multicopy suppressor screen of the Δ *cc₁hl* mutant fail to identify other genes beside the *CYC2* gene (data not shown).

The discovery of a reductase linked to the activity of CCHL also raises the question of the need for a reductase in the CC₁HL-dependent assembly of cytochrome *c*₁. Whereas it is clear that Cyc2p exerts no influence on the CC₁HL-catalyzed assembly of cytochrome *c*₁, the requirement for NADH and FMN co-factors for the reduction of heme prior to its linkage to apocytochrome *c*₁ *in organello* (28) speaks for the existence of a distinct system for the reduction of heme. Whether the *in vivo* redox status of the apocytochrome *c*₁ sulfhydryls is under the control of the same system or a different one is currently unknown.

The recent identification in the *Arabidopsis thaliana* mitochondria of AtCCMH, a thiol-disulfide oxidoreductase with a postulated function in System I cytochrome *c* maturation suggests that similar factors might also exist in fungal, animal, and green algal mitochondria that use System III (62, 63). The components of the thiol-metabolizing pathways are not known in the mitochondrial IMS because of the dogma that this compartment is reducing. This topic has now received attention with the discovery that a disulfide exchange system is recruited for the import of a subset of proteins in the mitochondrial IMS (64, 68, 69).

Acknowledgments—We thank S. Gabilly, I. Aboulfath, and B. Dray for technical assistance and Drs. A. Chacinska and C. Meisinger for technical advice. We thank Dr. Denis Pompon for expertise in mass spectrometry and Dr. G. Dujardin for stimulating discussion and critical reading of the manuscript. We are grateful to Dr. Chris Meisinger for the gift of anti-AAC and anti-Hsp60 antibodies and Dr. Lemaire for anti-cytochrome *c*₁ antiserum.

REFERENCES

1. Thöny-Meyer, L. (1997) *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* **61**, 337–376
2. Allen, J. W., Daltrop, O., Stevens, J. M., and Ferguson, S. J. (2003) *Philos. Trans. R. Soc. Lond. Ser. B* **358**, 255–266
3. Stevens, J. M., Daltrop, O., Allen, J. W., and Ferguson, S. J. (2004) *Acc. Chem. Res.* **37**, 999–1007
4. Kranz, R., Lill, R., Goldman, B., Bonnard, G., and Merchant, S. (1998) *Mol. Microbiol.* **29**, 383–396
5. Xie, Z., and Merchant, S. (1998) *Biochim. Biophys. Acta* **1365**, 309–318
6. Nakamoto, S. S., Hamel, P., and Merchant, S. (2000) *Biochimie (Paris)* **82**, 603–614
7. Goldman, B. S., and Kranz, R. G. (2001) *Res. Microbiol.* **152**, 323–329
8. Dreyfuss, B. W., Hamel, P. P., Nakamoto, S. S., and Merchant, S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 2604–2613
9. Hamel, P. P., Dreyfuss, B. W., Xie, Z., Gabilly, S. T., and Merchant, S. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 2593–2603
10. Beckett, C. S., Loughman, J. A., Karberg, K. A., Donato, G. M., Goldman, W. E., and Kranz, R. G. (2000) *Mol. Microbiol.* **38**, 465–481
11. Deshmukh, M., Brasseur, G., and Daldal, F. (2000) *Mol. Microbiol.* **35**, 123–138
12. Reid, E., Cole, J., and Eaves, D. J. (2001) *Biochem. J.* **355**, 51–58
13. Erlendsson, L. S., Acheson, R. M., Hederstedt, L., and Le Brun, N. E. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 17852–17858
14. Page, M. L., Hamel, P. P., Gabilly, S. T., Zegzouti, H., Perea, J. V., Alonso, J. M., Ecker, J. R., Theg, S. M., Christensen, S. K., and Merchant, S. (2004) *J. Biol. Chem.* **279**, 32474–32482
15. Feissner, R. E., Beckett, C. S., Loughman, J. A., and Kranz, R. G. (2005) *J. Bacteriol.* **187**, 3941–3949
16. Ren, Q., Ahuja, U., and Thöny-Meyer, L. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 7657–7663
17. Sherman, F. (1990) *Genetics* **125**, 9–12
18. Dumont, M. E. (1996) in *Advances in Molecular and Cell Biology* (Hart, F.-U., ed), pp. 103–126, JAI Press, Greenwich, UK
19. Dumont, M. E., Ernst, J. F., Hampsey, D. M., and Sherman, F. (1987) *EMBO J.* **6**, 235–241
20. Zollner, A., Rodel, G., and Haid, A. (1992) *Eur. J. Biochem.* **207**, 1093–1100
21. Matner, R. R., and Sherman, F. (1982) *J. Biol. Chem.* **257**, 9811–9821
22. Stuart, R. A., Nicholson, D. W., Wienhues, U., and Neupert, W. (1990) *J. Biol. Chem.* **265**, 20210–20219
23. Bernard, D. G., Gabilly, S. T., Dujardin, G., Merchant, S., and Hamel, P. P. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 49732–49742
24. Basile, G., Di Bello, C., and Taniuchi, H. (1980) *J. Biol. Chem.* **255**, 7181–7191
25. Veloso, D., Basile, G., and Taniuchi, H. (1981) *J. Biol. Chem.* **256**, 8646–8651
26. Veloso, D., Juillerat, M., and Taniuchi, I. H. (1984) *J. Biol. Chem.* **259**, 6067–6073
27. Dumont, M. E., Ernst, J. F., and Sherman, F. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 15928–15937
28. Nicholson, D. W., Stuart, R. A., and Neupert, W. (1989) *J. Biol. Chem.* **264**, 10156–10168
29. Tong, J., and Margoliash, E. (1998) *J. Biol. Chem.* **273**, 25695–25702
30. Taniuchi, H., Basile, G., Taniuchi, M., and Veloso, D. (1983) *J. Biol. Chem.* **258**, 10963–10966
31. Nicholson, D. W., Hergersberg, C., and Neupert, W. (1988) *J. Biol. Chem.* **263**, 19034–19042
32. Mayer, A., Neupert, W., and Lill, R. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 12390–12397
33. Steiner, H., Kispal, G., Zollner, A., Haid, A., Neupert, W., and Lill, R. (1996) *J. Biol. Chem.* **271**, 32605–32611
34. Dumont, M. E., Schlichter, J. B., Cardillo, T. S., Hayes, M. K., Bethlendy, G., and Sherman, F. (1993) *Mol. Cell. Biol.* **13**, 6442–6451
35. Sanchez, N. S., Pearce, D. A., Cardillo, T. S., Uribe, S., and Sherman, F. (2001) *Arch. Biochem. Biophys.* **392**, 326–332
36. Pearce, D. A., Cardillo, T. S., and Sherman, F. (1998) *FEBS Lett.* **439**, 307–311
37. Goldstein, A. L., and McCusker, J. H. (1999) *Yeast* **15**, 1541–1553
38. Wach, A., Brachat, A., Pohlmann, R., and Philippsen, P. (1994) *Yeast* **10**, 1793–1808
39. Longtine, M. S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D. J., Shah, N. G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P., and Pringle, J. R. (1998) *Yeast* **14**, 953–961
40. Schiestl, R. H., and Gietz, R. D. (1989) *Curr. Genet.* **16**, 339–346
41. Dujardin, G., Pajot, P., Groudinsky, O., and Slonimski, P. P. (1980) *Mol. Gen. Genet.* **179**, 469–482
42. Hamel, P., Lemaire, C., Bonnefoy, N., Brivet-Chevillotte, P., and Dujardin, G. (1998) *Genetics* **150**, 601–611
43. Saint-Georges, Y., Bonnefoy, N., di Rago, J. P., Chiron, S., and Dujardin, G. (2002) *J. Biol. Chem.* **277**, 49397–49402
44. Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989) *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 2nd Ed. (Nolan, C., ed) Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY
45. Kermorgant, M., Bonnefoy, N., and Dujardin, G. (1997) *Curr. Genet.* **31**, 302–307
46. Dutta, C., and Henry, H. L. (1990) *Anal. Biochem.* **184**, 96–99
47. Ryan, M. T., Voos, W., and Pfanner, N. (2001) *Methods Cell Biol.* **65**, 189–215
48. Dym, O., and Eisenberg, D. (2001) *Protein Sci.* **10**, 1712–1728
49. Sevier, C. S., Cuoazzo, J. W., Vala, A., Aslund, F., and Kaiser, C. A. (2001) *Nat. Cell Biol.* **3**, 874–882
50. Lee, J., Hofhaus, G., and Lisowsky, T. (2000) *FEBS Lett.* **477**, 62–66
51. Gerber, J., Muhlenhoff, U., Hofhaus, G., Lill, R., and Lisowsky, T. (2001) *J. Biol. Chem.* **276**, 23486–23491
52. Quinn, G. B., Trimboli, A. J., Prosser, I. M., and Barber, M. J. (1996) *Arch. Biochem. Biophys.* **327**, 151–160
53. Barber, M. J., and Quinn, G. B. (1996) *Protein Expression Purif.* **8**, 41–47
54. Dumont, M. E., Cardillo, T. S., Hayes, M. K., and Sherman, F. (1991) *Mol. Cell. Biol.* **11**, 5487–5496
55. Steiner, H., Zollner, A., Haid, A., Neupert, W., and Lill, R. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 22842–22849
56. Nicholson, D. W., Kohler, H., and Neupert, W. (1987) *Eur. J. Biochem.* **164**, 147–157
57. Nicholson, D. W., and Neupert, W. (1989) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **86**, 4340–4344
58. Daltrop, O., and Ferguson, S. J. (2003) *J. Biol. Chem.* **278**, 4404–4409
59. Grauschopf, U., Winther, J. R., Korber, P., Zander, T., Dallinger, P., and Bardwell, J. C. (1995) *Cell* **83**, 947–955
60. Chivers, P. T., Laboissiere, M. C., and Raines, R. T. (1996) *EMBO J.* **15**, 2659–2667
61. Mossner, E., Huber-Wunderlich, M., Rietsch, A., Beckwith, J., Glockshuber, R., and Aslund, F. (1999) *J. Biol. Chem.* **274**, 25254–25259
62. Heazlewood, J. L., Tonti-Filippini, J. S., Gout, A. M., Day, D. A., Whelan, J., and Millar, A. H. (2004) *Plant Cell* **16**, 241–256
63. Meyer, E. H., Giegé, P., Gelhaye, E., Rayapuram, N., Ahuja, U., Thöny-Meyer, L., Grienenberger, J. M., and Bonnard, G. (2005) *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, in press
64. Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K., and Herrmann, J. M. (2005) *Cell* **121**, 1059–1069
65. Claissé, M. L., Pere-Aubert, G. A., Clavilier, L. P., and Slonimski, P. P. (1970) *Eur. J. Biochem.* **16**, 430–438
66. Sherman, F., Taber, H., and Campbell, W. (1965) *J. Mol. Biol.* **13**, 21–39
67. Pearce, D. A., and Sherman, F. (1995) *J. Biol. Chem.* **270**, 20879–20882
68. Rissler, M., Wiedemann, N., Pfannschmidt, S., Gabriel, K., Guiord, B., Pfanner, N., and Chacinska, A. (2005) *J. Mol. Biol.* **353**, 485–492
69. Allen, S., Balabanidou, V., Sideris, D. P., Lisowsky, T., and Tokatlidis, K. (2005) *J. Mol. Biol.* **353**, 937–944.

3. Résultats complémentaires

3.1. Recherche de nouveaux facteurs d'oxydoréduction mitochondriaux

Cadre de l'étude : Le fait qu'un mutant $\Delta cyc2$ ne conduise pas à une absence totale d'holocytochrome *c* pourrait traduire l'existence d'une redondance fonctionnelle entre Cyc2p et une autre réductase¹³. De plus, la formation d'holocytochrome *c*₁ dépendante de la CC₁HL pourrait également dépendre de la présence de nouveaux facteurs redox. Il nous a donc paru intéressant de rechercher d'autres facteurs redox susceptibles d'être impliqués dans la maturation des cytochromes de type *c* mitochondriaux.

Une recherche d'homologie de séquences protéiques a donc été effectuée grâce au programme informatique BLASTP afin de proposer des candidats susceptibles d'assurer une fonction similaire à celle de Cyc2p. Il s'avère que deux protéines mitochondriales de levure présentent des similarités avec Cyc2p : Mcr1p et Cbr1p (avec une E-value de 10⁻⁵ et 10⁻³ respectivement). Ces protéines possèdent un certain nombre de motifs communs à Cyc2p, comme en témoigne l'alignement de séquence présentée en Annexe 1. Ces motifs correspondent aux acides aminés du site de fixation au FAD et au NAD(P)H.

- La protéine Mcr1p, nommée également NADH-cytochrome *b*₅ réductase, est une enzyme impliquée dans la réduction de l'hème destiné au cytochrome *b*₅. Curieusement, cette protéine présente une double localisation mitochondriale : la membrane externe et l'espace intermembranaire (Haucke *et al.*, 1997). La structure cristallographique de la cytochrome *b*₅ réductase humaine révèle la présence d'un domaine de liaison au FAD et d'un domaine de liaison au NADH (Bando *et al.*, 2004, Figure 28).

- La protéine Cbr1p serait localisée au niveau de deux compartiments de la cellule : le réticulum endoplasmique et la mitochondrie (d'après l'analyse du protéome mitochondrial Sickmann *et al.*, 2003). En raison des homologies de séquences entre Cbr1p et les cytochrome *b*₅ réductases, il a été proposé que Cbr1p appartienne à la famille des flavoprotéines *pyridine-nucleotide cytochrome réductases* (Csukai *et al.*, 1994).

L'étude de l'effet de la délétion des gènes *MCR1* et *CBR1* sur la maturation des cytochromes de type *c* a donc été entreprise. L'analyse des doubles mutants $\Delta cyc2 \Delta mcr1$ et $\Delta cyc2 \Delta cbr1$ ainsi que celle du triple mutant $\Delta cyc2 \Delta mcr1 \Delta cbr1$ a également été réalisée.

¹³ On ne peut toutefois pas exclure la possibilité qu'une partie du pool d'hème de l'espace intermembranaire reste 'spontanément' sous une forme réduite, conduisant ainsi à l'accumulation de 10% d'holocytochrome *c* observée chez un mutant $\Delta cyc2$. Cyc2p augmenterait l'efficacité de l'assemblage du cytochrome *c*, sans être pour autant strictement nécessaire à ce processus.

Méthode : Les gènes *MCR1* et *CBR1* ont été inactivés dans la souche W303-1A, par recombinaison homologue avec un fragment de PCR amplifié à partir des plasmides pFA6a-His3MX6 et pFA6a-kanMX6 (Longtine *et al.*, 1998), générant ainsi les souches YDB5 (*mcr1::HIS3*) et YDB16 (*cbr1::Kan*). L'inactivation du gène a ensuite été vérifiée par PCR.

Les doubles mutants $\Delta cyc2 \Delta mcr1$ (DB14-1A) et $\Delta cyc2 \Delta cbr1$ (DB10-3D) ont été obtenus suite aux croisements YPH1 x YDB5 et YPH1 x YDB16 respectivement, le triple mutant suite au croisement YDB5 x DB10-3D. Des spectres de cytochromes à basse température ont ensuite été réalisés à partir de ces souches afin d'en analyser le contenu en cytochromes *c* et *c*₁.

Résultats : Les mutants $\Delta mcr1$ et $\Delta cbr1$, ainsi que le double mutant $\Delta mcr1 \Delta cbr1$, présentent une croissance respiratoire et une accumulation des cytochromes *c* et *c*₁ identiques à celles d'une souche sauvage (Figure 29). De plus, les mutants $\Delta cyc2 \Delta mcr1$, $\Delta cyc2 \Delta cbr1$ et $\Delta cyc2 \Delta mcr1 \Delta cbr1$ ont le même phénotype spectral que la souche $\Delta cyc2$: la délétion des gènes *CBR1* et *MCR1* n'aggrave donc pas le phénotype du mutant $\Delta cyc2$. L'ensemble de ces résultats suggèrent que les protéines Cbr1p et Mcr1p ne participent pas à la biogenèse des cytochromes de type *c* mitochondriaux.

3.2. Recherche de suppresseurs génétiques à partir du mutant $\Delta cyc2 cyt1-34$

Afin d'identifier d'éventuels nouveaux facteurs de maturation, des suppresseurs génétiques restaurant la croissance respiratoire du mutant $\Delta cyc2 cyt1-34$ (CAPCH) ont été sélectionnés sur un milieu contenant du lactate ou du glycérol/éthanol comme unique source de carbone. Le mutant $\Delta cyc2 cyt1-34$ possède la particularité de former des papilles à une fréquence relativement élevée.

Avant de poursuivre l'analyse génétique de ces papilles/révertants, quatorze révertants spontanés obtenus de façon indépendante ont été séquencés au niveau du gène *CYT1*. Tous possèdent une mutation qui modifie le site de liaison à l'hème du cytochrome *c*₁ de façon à substituer la proline (Tableau 4) et présentent un spectre de cytochromes identiques à celui d'une souche $\Delta cyc2$. La variété des acides aminés (T, H, L, S, A) obtenus au niveau de cette position reflète toutes les possibilités offertes par le code génétique pour changer un acide aminé à partir de la substitution d'un seul nucléotide dans le codon CCC, à l'exception de l'arginine. Si l'analyse d'un plus grand nombre de révertants ne permet pas l'obtention de cet acide aminé, on pourrait être amené à penser que l'arginine, en cette position, puisse

également avoir un effet négatif sur la structure/fonction du cytochrome c_1 . Parmi tous les sites de liaison à l'hème étudiés ici, seule la proline conduit à un phénotype respiratoire synthétique en combinaison avec $\Delta cyc2$. Le fait que ces révertants soient obtenus avec une fréquence élevée indique que la proline exerce une pression forte et défavorable sur la structure du cytochrome c_1 de levure. Notez que les cytochromes c_1 de mitochondries de trypanosomes et d'euglènes, qui ont la particularité de contenir une seule cystéine au niveau du site de liaison à l'hème **XXPCH**, possèdent une proline en amont de cette cystéine (Tableau 3). Dans ce dernier cas, la proline n'exerce probablement pas de contraintes stériques défavorables¹⁴.

Enfin, il paraissait intéressant de tester si ces nouvelles versions du cytochrome c_1 pouvaient supprimer le défaut respiratoire d'un mutant Δcc_1hl , au même titre que les supprimeurs UV34 (**CADCH**) et UV48 (**CAPCH**). Le révertant RYPH10-1A #2, qui possède un site de liaison à l'hème de type **CATCH**, a donc été croisé par la souche YCT1-11C ($\Delta cc_1hl::HIS3$). Une spore $\Delta cc_1hl::HIS3\ cyt1_{CATCH}$ (pour laquelle la mutation a été vérifiée par séquence) a été spécifiquement analysée sur un milieu uniquement respirable. Il s'est avéré que cette spore poussait sur milieu glycérol à 28°C (toutefois moins bien que les révertants UV34 et UV48): la mutation $cyt1:CATCH$ permettrait donc de restaurer partiellement le défaut respiratoire du mutant Δcc_1hl .

3.3. Essais de cristallisation de la protéine Cyc2p

La protéine Cyc2p présente des similarités de séquences protéiques avec la cytochrome b_5 réductase de levure, en particulier au niveau du domaine putatif de liaison au FAD. Les structures cristallographiques des cytochrome b_5 réductases de plusieurs organismes dont l'homme ont été déterminées (Nishida *et al.*, 1995, Marohnic *et al.*, 2003, Bando *et al.*, 2004 et Figure 28). Elle révèle la présence d'un domaine de fixation au FAD et d'un domaine de fixation au NADH, connectés par une boucle comportant un feuillet β constitué de 3 brins β (domaine de liaison). La comparaison des séquences primaires de Cyc2p et de Mcr1p suggèrent que Cyc2p posséderait un domaine de liaison plus long, qui pourrait éventuellement spécifier la fonction de Cyc2p.

La comparaison des structures de la protéine Cyc2p et de la cytochrome b_5 réductase pourrait donc nous apporter des informations quant à la nature du substrat de Cyc2p, en

¹⁴ Il existe toutefois des cytochromes de type c multihèmes bactériens qui possèdent un site de liaison à l'hème de type **CAPCH** (par exemple FixP chez *Rhizobium leguminosarum*).

particulier en ce qui concerne le domaine de liaison. Aussi, avons-nous collaboré avec le laboratoire de Herman van Tilbeurgh (en particulier Sophie Cheruel, Nathalie Ulryck et Marc Graille) pour tenter de déterminer la structure cristallographique de Cyc2p. La partie soluble de Cyc2p a été exprimée et produite chez *E. coli*, purifiée sur colonne de nickel et colonne Superdex70 puis soumise à des études de cristallogénèse. Différentes conditions de cristallisation ont été testées. Malheureusement, seuls des petits cristaux qui diffractaient à une faible résolution (4Å) ont pu être obtenus. Une modélisation de la structure de Cyc2p à partir des structures de cytochrome *b*₅ réductases va donc être entreprise afin de localiser les zones d'insertions et de délétions (présentes ou absentes dans Cyc2p mais pas dans la cytochrome *b*₅ réductase). Cela servira de base de travail pour la caractérisation génétique de Cyc2p : l'effet de la délétion de ces régions, ou de la substitution d'acides aminés conservés (situés au niveau de ces régions) sur la fonction de Cyc2p pourra en particulier être analysé.

4. Conclusion du chapitre II.

L'assemblage d'un cytochrome de type *c* requiert la réduction préalable de l'hème et des cystéines du site de liaison à l'hème de l'apocytochrome. Parmi les trois systèmes majeurs de maturation des cytochromes de type *c* décrits jusqu'à présent, le système III, développé principalement dans les mitochondries des cellules animales et fongiques, était l'unique système pour lequel aucun facteur redox n'avait été identifié. Seules les hème lyases semblaient être requises pour ce processus dans les mitochondries de champignons. L'environnement 'réducteur' de l'espace intermembranaire était considéré comme suffisant pour maintenir l'hème et les cystéines de l'apocytochrome dans un état réduit. Or ce travail montre que Cyc2p, une oxydoréductase de l'espace intermembranaire, est nécessaire pour la maturation des cytochromes de type *c* dépendante de la CCHL. Cyc2p est une protéine de 40kDa, associée à la membrane interne, et dont le domaine de liaison au FAD est situé dans l'espace intermembranaire, le compartiment d'assemblage des cytochromes de type *c*. Cyc2p présente une activité NADPH ferricyanure réductase *in vitro*, suggérant une activité similaire dans la mitochondrie *in vivo*. L'homologie de séquence entre Cyc2p et la cytochrome *b*₅ réductase, associée au fait que l'étape de réduction de l'hème requiert la présence d'une flavine et du NAD(P)H (Nicholson and Neupert, 1989), nous a amené à proposer le modèle selon lequel Cyc2p réduirait l'hème plutôt que les cystéines du site CXXCH de l'apocytochrome.

Chapitre III : Analyse des hème lyases par mutagenèse dirigée

1. Rôle des motifs CPV de régulation par l'hème de la CCHL

1.1. Contexte de l'étude

L'analyse de la séquence protéique des hème lyases révèle la présence de *motifs de régulation par l'hème (CPX)*. Ces motifs sont généralement la signature de protéines présentant la propriété d'interagir avec l'hème, de façon transitoire (voir introduction, III.4.3.4). En particulier, la CC₁HL et la CCHL de *S. cerevisiae* possèdent respectivement un et deux de ces motifs. La délétion du motif CPV de la CC₁HL chez *N. crassa* conduit à l'accumulation partielle de la forme intermédiaire du cytochrome *c*₁ sans toutefois abolir la croissance respiratoire (Steiner *et al.*, 1996). Ce motif joue donc un rôle important, mais pas strictement essentiel à la maturation du cytochrome *c*₁. Afin de mieux comprendre le rôle des motifs CPV de la CCHL de *S. cerevisiae*, nous avons étudié l'effet de la délétion de ces motifs sur l'assemblage du cytochrome *c* d'une part, et sur la capacité du variant CCHL-ΔCPV à supprimer en multicopie le défaut respiratoire du mutant Δ*cc*₁hl d'autre part.

Méthodes : Pour des raisons pratiques, l'ensemble de la région recouvrant les deux motifs CPV de la CCHL a été retirée, ce qui correspond à la délétion des 24 acides aminés situés entre les positions 23 et 47 (Sabeeha Merchant). L'allèle *cchl*_{ΔCPV}, obtenu par PCR, a ensuite été cloné au niveau des sites PvuII-SalI du plasmide multicopie pFL44L. L'allèle *cchl*_{ΔCPV} a été amplifié par PCR en utilisant comme matrice le plasmide pFL44-*cchl*_{ΔCPV} puis a été intégré au locus par recombinaison homologue, générant ainsi la souche YDC3. La séquence du gène *cchl* a ensuite été effectuée pour vérifier l'absence de nouvelles mutations.

1.2. Analyse du variant CCHL-ΔCPV dans un contexte Δ*cyc2*

L'analyse du spectre de cytochromes de la souche YDC3 (Figure 31) ainsi que la détection de l'activité peroxydase intrinsèque de l'hème (Figure 32) montrent que la délétion des deux motifs CPV de la CCHL conduit à une baisse du niveau d'holocytochrome *c*. Ce défaut de maturation du cytochrome *c* ne provoque pas un retard de croissance notable sur un milieu respirable¹⁵. De plus, la stabilité de la protéine CCHL-ΔCPV (plus courte), ne semble

¹⁵ Le cytochrome *c* est naturellement présent en large excès; seules des souches présentant moins de 5% d'holocytochrome *c* présentent un défaut de croissance sur un milieu contenant du glycérol comme unique source de carbone.

être que très légèrement affectée¹⁶. Les motifs CPV, supposés être impliqués dans l'interaction avec l'hème, jouent donc un rôle important dans la réaction d'hème lyase ; ils ne sont toutefois pas strictement essentiels pour ce processus dans la mesure où environ 20% d'holocytocrome *c* reste assemblé.

Afin de déceler une éventuelle interaction génétique de type épistasie, le mutant $\Delta cyc2$ *cchl* _{Δ CPV} a été construit par croisement des souches YCT1-11A et YDC3. Les spores d'intérêt, résistantes à l'hygromycine (de génotype $\Delta cyc2$:Hyb), ont été identifiées suite à l'amplification du gène *cchl* par PCR, l'allèle *cchl* _{Δ CPV} étant plus court que l'allèle sauvage *CCHL*. Le phénotype spectral du double mutant $\Delta cyc2$ *cchl* _{Δ CPV} ne correspond pas au phénotype d'un des simples mutants (Figure 31): il ne s'agit donc pas d'épistasie. Le double mutant $\Delta cyc2$ *cchl* _{Δ CPV} présente au contraire un phénotype aggravé, conséquence possible de l'addition des deux phénotypes (environ 20% des 10% d'holocytocrome *c*). Ceci suggère seulement que la protéine Cyc2p et les motifs CPV de la CCHL interviendraient au niveau de deux voies qui convergeraient vers l'assemblage final du cytochrome *c*. Ce résultat ne nous permet donc pas d'affiner le modèle, présenté dans le chapitre II, selon lequel la CCHL présenterait l'hème à Cyc2p *via* les motifs CPV.

1.3. Effet de la surproduction de CCHL- Δ CPV dans le mutant Δcc_1hl

L'effet de la délétion des motifs CPV sur la capacité de la CCHL à supprimer, en copies multiples, le défaut respiratoire du mutant Δcc_1hl a également été analysé. Les mutants $\Delta cchl$ et Δcc_1hl ont donc été transformés par le plasmide pFL44-CCHL- Δ CPV. La surproduction de la CCHL- Δ CPV complémente parfaitement le mutant $\Delta cchl$ et supprime également le défaut respiratoire du mutant Δcc_1hl à 28°C (Figures 33 et 34). Les motifs CPV de la CCHL ne sont donc pas essentiels pour l'activité de suppression multicopie du mutant Δcc_1hl . Toutefois, l'effet éventuel de la délétion des motifs CPV pourrait être masqué par l'effet multicopie. Il serait donc intéressant de construire le double mutant Δcc_1hl *cchl* _{Δ CPV} afin de comparer le niveau d'accumulation d'holocytocrome *c*₁ dans les mutants Δcc_1hl ¹⁷ et Δcc_1hl *cchl* _{Δ CPV}, par la technique sensible de détection de l'activité peroxydase intrinsèque de l'hème (*heme staining*).

¹⁶ Sous réserve que la délétion Δ CPV n'entraîne pas la perte d'un épitope.

¹⁷ Environ 5% d'holocytocrome *c*₁ s'accumule dans un mutant Δcc_1hl grâce à l'activité de la CCHL.

2. Rôle de certains résidus dans l'accrochage des hème lyases à la membrane

2.1. Contexte de l'étude

L'analyse de la séquence protéique de l'hème lyase humaine révèle la présence d'un site putatif de myristoylation en N-terminal (Maurer-Stroh *et al.*, 2002a, Maurer-Stroh *et al.*, 2002b). La N-myristoylation consiste en l'attachement covalent d'un acide gras saturé à 14 carbones sur un résidu glycine localisé en N-terminal (généralement) des protéines eucaryotes et virales, facilitant ainsi l'interaction avec des membranes ou des domaines protéiques hydrophobes (pour revue : Towler *et al.*, 1988). C'est la protéine myristoyl-CoA : N-myristoyltransferase (NMT) qui reconnaît spécifiquement le domaine N-terminal du substrat, et catalyse l'attachement de l'acide gras sur une glycine particulière (absolument requise). La comparaison de séquences des protéines connues pour être myristoylées ainsi que l'analyse de la structure tridimensionnelle de l'enzyme NMT de différentes espèces ont permis à Maurer *et al.* de définir une région de 17 acides aminés, impliquée dans l'interaction avec la NMT, et de proposer un logiciel de prédiction des sites putatifs de myristoylation (disponible sur le site <http://mendel.imp.univie.ac.at/myrystate/>). Cette région comporte trois motifs, dont le premier répondrait aux règles suivantes, chez les eucaryotes supérieurs : MG-{EDRHPFYW}-X₂-[STAGCNDEF], où {} = aucun de ces résidus et [] = un de ces résidus.

La prédiction d'un site putatif de myristoylation dans l'hème lyase humaine HCCS (d'après le logiciel cité précédemment et la nature du premier motif MGLSPSA) nous a amené à étudier l'effet de la substitution G2A sur la fonctionnalité de la protéine HCCS. Cette glycine pourrait en effet être myristoylée et constituer ainsi un point d'ancrage dans la membrane mitochondriale interne. L'unique test fonctionnel simple disponible consistait à analyser l'effet de cette substitution sur la capacité de la protéine à compléter les mutants $\Delta cchl$ et Δcc_1hl chez la levure.

De plus, l'analyse des séquences d'hèmes lyases montre que toutes les HCCS et les CCHL comportent une glycine conservée en deuxième position¹⁸ (à l'exception de la CCHL de *S. pombe* dont la séquence apparaît particulièrement longue ; la glycine n°14 pourrait par exemple faire office de site de myristoylation !), ce qui n'est pas le cas des CC₁HL. Or les deux hème lyases de levure, toutes deux associées à la membrane interne, ne présentent pas les mêmes propriétés à pH alcalin : alors que la CC₁HL n'est pas extractible aux carbonates

¹⁸ Les séquences d'hème lyases de *P. falciparum* et de *A. gambiae* ne semblent pas complètes.

(ref), la CCHL devient soluble à un tel pH (Article II, Figure 5). Les hème lyases présentent donc probablement un mode différent d'attachement à la membrane interne. Nous avons donc voulu tester l'influence de cette glycine sur l'attachement à la membrane, tout en sachant que la CCHL (et la CC₁HL) ne semblaient pas posséder de site putatif de myristoylation (d'après le logiciel de prédiction). Un variant G2A de la CCHL a donc été construit.

Enfin, dans la mesure où l'attachement à la membrane interne de l'hème lyase humaine pourrait se faire grâce à la myristoylation en N-terminal, on peut faire l'hypothèse que l'attachement de la CCHL et de la CC₁HL à la membrane interne se fasse également *via* le domaine N-terminal, si l'on admet que cet ancrage est important pour la fonction des hème lyases. En particulier, les acides aminés hydrophobes WFW situés à l'extrémité N-terminale des CCHL de champignons (à l'exception de *S. pombe*) pourraient, par leur caractère hydrophobe, être impliqués dans l'interaction à la membrane. Nous avons donc construit le variant WFW₃₋₅:AAA₃₋₅ de la CCHL afin d'analyser son association à la membrane et sa capacité à compléter et à supprimer les mutants $\Delta cchl$ et Δcc_1hl , respectivement.

2.2. Analyse du variant G2A de l'hème lyase humaine (HCCS)

2.2.1. Méthodologie.

La mutation conduisant à la substitution G2A de la HCCS a été introduite par une technique de mutagenèse dirigée fondée sur la PCR (*QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis kit, Stratagene*), en utilisant les oligonucléotides *HCCSmutG-1* et *HCCSmutG-2* et le plasmide muticopie pFL61-*HCCS* comme matrice. Le produit de PCR ainsi obtenu (correspondant à la totalité du plasmide) a été digéré par *DpnI* puis utilisé pour transformer *E. coli*. L'ADN plasmidique de quelques clones bactériens a ensuite été préparé puis la présence de la mutation a été vérifiée par séquençage. Les mutants $\Delta cchl$ et Δcc_1hl ont ensuite été transformés par le plasmide pFL61-*HCCS*_{G2A} ainsi obtenu puis analysés vis à vis de leur croissance respiratoire et de l'assemblage des cytochromes de type *c*.

2.2.2. Effet de la surproduction du variant G2A de HCCS chez la levure

La surproduction du variant G2A de l'hème lyase humaine restaure la croissance respiratoire des mutants $\Delta cchl$ et Δcc_1hl . Les spectres de cytochromes de ces transformants montrent toutefois que le niveau de restauration d'holocytochrome *c* chez le transformant $\Delta cchl$ + pFL61-*HCCS* G2A est légèrement inférieur à celui du transformant $\Delta cchl$ + pFL61-

HCCS (Figure 35). Notez qu'un léger effet sur l'assemblage du cytochrome c_1 serait difficile à déceler par spectres, à cause de la largeur du pic de cytochrome c . La substitution G2A provoque donc un effet mineur sur la capacité de l'hème lyase à assembler l'holocytochrome c , en multicopie. Ce test fonctionnel présente néanmoins des limites dans la mesure où l'allèle $HCCS_{G2A}$ est placé sur un plasmide multicopie, sous contrôle d'un promoteur fort (PGK). L'effet éventuel de la substitution pourrait donc être masqué par cet effet multicopie. L'abondance de la protéine au sein de la mitochondrie pourrait par exemple suffire à maintenir une activité hème lyase globale suffisante pour assembler l'holocytochrome c , malgré le défaut éventuel d'accrochage à la membrane causé par la substitution G2A. On peut également faire l'hypothèse que la myristoylation ne serait pas strictement requise pour la fonctionnalité de la protéine HCCS chez la levure, ou bien que la HCCS ne serait pas myristoylée chez la levure. La limite du test fonctionnel utilisé (effet multicopie) ne permet toutefois pas de trancher parmi ces trois hypothèses. Il serait intéressant de réaliser le même type d'expérience en utilisant un plasmide centromérique, et en plaçant éventuellement l'allèle $HCCS_{G2A}$ sous contrôle du promoteur de la CCHL, en espérant que ces conditions permettent toujours à l'hème lyase humaine sauvage de remplacer les deux hèmes lyases de levure. L'étude de la présence d'un myristate pourrait également être envisagée par spectrométrie de masse, à partir de la protéine purifiée.

2.3. Analyse des variants G2A et WFW₃₋₅:AAA₃₋₅ de la CCHL

2.3.1. Méthodologie.

Les mutations conduisant aux substitutions G2A et WFW₃₋₅:AAA₃₋₅ de la CCHL ont été introduites par une technique de mutagenèse dirigée fondée sur la PCR (*QuickChange II XL Site-Directed Mutagenesis kit, Stratagene*), en utilisant les oligonucléotides *CCHL-mutG1* et *CCHL-mutG2* d'une part, et *CCHL-mutWFW-1* et *CCHL-mutWFW-2* d'autre part, et le plasmide multicopie pFL44-CCHL comme matrice. Les produits de PCR ainsi obtenus (correspondant à la totalité du plasmide) ont été digérés par *DpnI* puis utilisés pour transformer *E. coli*. L'ADN plasmidique de quelques clones bactériens a ensuite été préparé puis la présence de la mutation a été vérifiée par séquençage. Les plasmides pFL44-*cchl*_{G2A} et pFL44-*cchl*_{WFW:AAA} ont été digérés par les enzymes de restriction *DraI* et *SalI* puis la bande de 1180 pb correspondant au gène CCHL a été purifiée sur gel et utilisée pour transformer la souche YDB4 (*cchl::URA3*). Les intégrants YDC5 (*cchl*_{G2A}) et YDC6 (*cchl*_{WFW:AAA}), obtenus

par recombinaison homologue, ont été sélectionnés pour leur caractère de résistance au 5FOA puis l'intégration au locus a été vérifiée par PCR.

2.3.2. Effet des substitutions sur l'assemblage des cytochromes de type *c*.

Les mutants *cchl*_{G2A} et *cchl*_{WFW:AAA} présentent une croissance respiratoire identique à celle de la souche sauvage, sur tous les milieux non fermentescibles testés (glycérol; éthanol-glycérol ; lactate), à 28°C et à 36°C. L'accumulation des cytochromes de type *c* est également identique à celle d'une souche sauvage, comme en témoignent les spectres de cytochromes présentés dans la figure 36. Les substitutions G2A et WFW₃₋₅:AAA₃₋₅ de la CCHL ne semblent donc pas altérer la fonctionnalité de la protéine.

En dépit de ces résultats négatifs, l'effet de ces substitutions sur la capacité de la CCHL à supprimer en multicopie un mutant Δcc_1hl a été analysée à 28°C et 36°C (Figure 37). La surproduction des variants G2A et WFW₃₋₅:AAA₃₋₅ de la CCHL, tout comme celle de la CCHL, restaure le défaut respiratoire du mutant Δcc_1hl à 28°C. Toutefois, la surexpression de l'allèle *cchl*_{WFW:AAA} ne restaure pas la croissance respiratoire du mutant Δcc_1hl à 36°C. La substitution WFW₃₋₅:AAA₃₋₅, qui diminue l'hydrophobicité du domaine N-terminal, altère donc les capacités de suppression de la CCHL à 36°C. Cette observation pourrait suggérer que l'interaction de la CCHL avec la membrane interne mitochondriale a été modifiée. Afin de tester cette dernière hypothèse, une analyse biochimique a été entreprise afin d'étudier l'effet de la substitution WFW₃₋₅:AAA₃₋₅ sur l'interaction à la membrane.

2.3.3. Effet des substitutions sur l'interaction à la membrane.

Les mitochondries des mutants *cchl*_{G2A} (YDC5) et *cchl*_{WFW:AAA} (YDC6) ont été purifiées, puis l'interaction de la CCHL à la membrane a été étudiée à deux températures différentes (28°C et 37°C), après sonication des mitochondries, ultracentrifugation et analyse des fractions membranaire et soluble (Figure 38). Dans cette expérience, le cytochrome *b*₂, soluble, se trouve majoritairement associé au surnageant (S) mais une certaine fraction reste toutefois associée au culot (P); les conditions de sonication ne sont donc pas optimales. Dans la souche sauvage et le mutant *cchl*_{G2A}, la CCHL est entièrement associée à la fraction membranaire. Il en est pratiquement de même pour la souche *cchl*_{WFW:AAA}: notez toutefois qu'une très faible fraction de CCHL apparaît dans le surnageant (aux deux températures 28°C et 36°C). La substitution WFW₃₋₅:AAA₃₋₅ ne conduit donc pas à un changement drastique des propriétés d'interaction de la CCHL à la membrane (interne).

2.4. Discussion.

La substitution G2A de la CCHL n'altère pas les propriétés de la CCHL. Ce résultat n'est pas surprenant dans la mesure où, contrairement à l'hème lyase humaine, aucun site de myristoylation n'était prédit pour la CCHL de *S. cerevisiae*. En revanche, la substitution WFW₃₋₅:AAA₃₋₅, qui entraîne probablement une diminution de l'hydrophobicité du domaine N-terminal de la CCHL, altère la propriété de la CCHL (en copie multiple) à assembler le cytochrome *c*₁ à 36°C. Pour confirmer ce résultat, il serait intéressant de construire le mutant Δcc_1hl *cchl*_{WFW:AAA} et de vérifier que la version WFW₃₋₅:AAA₃₋₅ de la CCHL ne permet plus l'assemblage du cytochrome *c*₁ à un niveau basal¹⁹ (cela permettrait de s'affranchir de l'effet multicopie).

De plus, il est intéressant de rappeler que la CCHL est extractible de la membrane à pH alcalin, contrairement à la CC₁HL ; cette dernière est donc plus fortement ancrée à la membrane interne. L'assemblage du cytochrome *c*₁, membranaire, pourrait donc nécessiter la présence d'une hème lyase associée étroitement à la membrane interne, ce qui ne serait pas le cas pour l'assemblage du cytochrome *c*, soluble, la substitution WFW₃₋₅:AAA₃₋₅ n'altérant pas ce dernier processus. L'approche biochimique utilisée au cours de ce travail n'a toutefois pas pu montrer que la substitution WFW₃₋₅:AAA₃₋₅ conduisait à un changement drastique des propriétés d'attachement de la CCHL à la membrane. Ceci n'exclut cependant pas la possibilité qu'un changement mineur de ces propriétés soient la cause de l'incapacité du variant CCHL à supprimer le défaut respiratoire du mutant Δcc_1hl à 36°C.

3. Autres mutations touchant le gène codant la CCHL

3.1. Analyse de la substitution E143L de la CCHL

La souche VP174, isolée initialement par Jacqueline Verdière, présente une déficience absolue en cytochrome *c*. La séquence du gène *CCHL* de cette souche a révélé la présence d'une mutation ponctuelle conduisant à la substitution E143L. J'ai donc réintroduit cette mutation dans un contexte génétique W303, par recombinaison homologue à partir du produit de PCR de l'allèle muté. Cette souche, nommée YDC1, présente une déficience respiratoire absolue et un spectre de cytochromes identique à celui du mutant $\Delta cchl$ (Figure 39). Des mitochondries ont également été purifiées afin d'analyser le niveau de protéine CCHL

¹⁹ identique à celui d'une souche Δcc_1hl (soit 5% environ d'holocytochrome *c*₁)

accumulée : il s'est avéré que la souche YDC1 ne contenait pas de CCHL dans la mitochondrie. La substitution E143L, qui touche un domaine conservé des hème lyases, requis pour l'import de la CCHL (Diekert *et al.*, 1999), pourrait donc conduire à un défaut d'import dans la mitochondrie ou à une déstabilisation de la protéine importée qui aboutirait à sa dégradation. Cette dernière hypothèse pourrait en particulier être testée en analysant l'effet de la substitution E143L sur l'accumulation de la CCHL dans un contexte génétique déficient pour certaines protéases de l'espace intermembranaire (ex : $\Delta yme1$). Enfin, des révertants capables de restaurer la croissance respiratoire de ce mutant ont été recherchés : tous correspondaient à une réversion vraie.

3.2. Mutations obtenues par des 'dommages collatéraux'

Je vous rappelle que les variants FL₁₃₀₋₁₃₁:QN et Δ CPV ont été intégrés au locus par recombinaison homologue, en utilisant en particulier un produit de PCR amplifié à partir des plasmides pFL44-*cchl*_{FL:QN} ou pFL44-*cchl* _{Δ CPV}. Quelques uns de ces intégrants ont ensuite été séquencés au niveau du gène *CCHL* pour vérifier l'absence de mutations supplémentaires. Or il est apparu que l'ADN polymérase Advantage2 (utilisée lors de la PCR) introduisait des erreurs : l'obtention de ces intégrants s'est donc accompagnée de dommages collatéraux inhérents à l'utilisation de cette enzyme !

Ce paragraphe a pour unique objectif de recenser les mutations ainsi obtenues au cours de ce travail. Ce début de collection de mutants aléatoires prendra tout son sens dans le cadre d'une étude générale future de la CCHL par mutagenèse aléatoire et dirigée. Les spectres d'absorption des cytochromes de ces mutants sont présentés dans la figure 39. Puisque aucun crible de sélection n'a été à l'origine de ces mutants, ces derniers ne seront que très brièvement décrits.

Les mutations obtenues lors de l'intégration de l'allèle *cchl*_{FL:QN} touchent des régions non conservées. Alors que les substitutions S150N et S36P n'aggravent pas le phénotype spectral du mutant *cchl*_{FL:QN}, la substitution Q8K semble rétablir partiellement le niveau de cytochrome *c*₁ (à confirmer). Parmi les mutations aléatoires obtenues lors de l'intégration de l'allèle *cchl* _{Δ CPV}, la substitution D419N, qui touche un résidu conservé, n'aggrave pas le phénotype du mutant *cchl* _{Δ CPV} (il a été vérifié que la substitution Q137R, présente également dans la souche YDC2-2, n'induisait par ailleurs aucun phénotype). En revanche, au moins une des substitutions L188P et/ou F211S aggrave le phénotype du mutant *cchl* _{Δ CPV}, sans

néanmoins abolir complètement la fonction de la CCHL²⁰. Ces résidus touchent un domaine C-terminal conservé.

En conclusion, aucune de ces mutations ne s'est révélée être informative. Il aurait été pourtant fort intéressant d'obtenir des mutations qui abolissent complètement la fonction de la CCHL sans modifier l'accumulation de la protéine dans la mitochondrie. Ce genre de mutant ponctuel peut en particulier être utilisé pour rechercher des suppresseurs génétiques intragéniques et extragéniques permettant de restaurer la croissance respiratoire du mutant d'origine, afin de préciser certaines interactions moléculaires et d'identifier de nouveaux partenaires potentiels de la CCHL.

²⁰ De part la nature du changement et la position (le résidu L est présent dans plusieurs hème lyases), il est probable que la substitution L188P soit à l'origine de ce phénotype.

Chapitre IV: Identification d'un complexe d'assemblage putatif ?

1. Contexte de l'étude

Les résultats présentés au cours des trois premiers chapitres de ce manuscrit montrent qu'il existe une interaction génétique claire entre les hème lyases, la réductase Cyc2p et les apocytochromes. Les cribles génétiques utilisés au cours de ce travail n'ont toutefois pas permis d'isoler de nouveaux facteurs de maturation autres que la protéine Cyc2p. Cela peut être du : (1) à la nature même du crible qui oblige à se passer complètement de la CC₁HL, (2) à l'existence d'une redondance fonctionnelle entre certains facteurs de maturation, par exemple une protéine présentant une fonction similaire à Cyc2p, et (3) au fait que certains facteurs de maturation puissent être impliqués dans plusieurs processus dont un qui serait essentiel à la viabilité cellulaire et limiterait ainsi le champ des possibilités. Une approche biochimique complémentaire a donc été entreprise afin d'isoler d'éventuels nouveaux partenaires des hème lyases et de Cyc2p. En particulier, la technique du BN-PAGE (Blue Native PolyAcrylamide Gel Electrophoresis), qui permet de mettre en évidence des complexes multiprotéiques membranaires de haut poids moléculaire, a été utilisée afin d'étudier la possibilité que les hèmes lyases et la protéine Cyc2p s'associent au sein de complexes multiprotéiques.

2. Mise en évidence d'un complexe protéique de 300 kDa contenant la CCHL

2.1. Procédure expérimentale

Les mitochondries purifiées à partir de la souche sauvage W303-1A, et des mutants nuls $\Delta cchl$, Δcc_1hl et $\Delta cyc2$, ont été solubilisées pendant 30 minutes à 4°C dans un tampon contenant un détergent doux (1% digitonine ou 0,16% dodecylmaltoside) puis le matériel insoluble a été éliminé par ultracentrifugation. Les échantillons ont ensuite été analysés par électrophorèse à 4°C dans des conditions non dénaturantes (BN-PAGE), sur un gradient 8%-18% ou 6%-16% de polyacrylamide. Ces types de gradients présentent l'avantage de pouvoir identifier le monomère en cas d'absence de formation de complexes²¹. Le gel a ensuite été transféré sur une membrane PVDF puis la présence éventuelle de complexes a été mise en

²¹ Environ 32 kDa pour la CCHL et la CC₁HL.

évidence par immunodétection, en utilisant la protéine A iodée comme mode de révélation²² (sauf indication contraire). Dans certains cas, une seconde dimension en conditions dénaturantes a été réalisée (SDS-PAGE). Le protocole expérimental détaillé est décrit en Annexe 2.

2.2. Détection d'un complexe de 300 kDa par BN-PAGE

Dans les conditions expérimentales exposées ci dessus, l'anticorps dirigé contre la CCHL (fourni par Cardillo, Dumont *et al.*, 1993) permet la détection d'un complexe de haut poids moléculaire d'environ 300 kDa (Figure 40). Ce complexe est spécifique de la protéine CCHL car il n'est pas détecté dans un contexte $\Delta cchl$. De plus, il a été vérifié que les conditions de solubilisation des mitochondries étaient correctes puisqu'elles permettent la détection du complexe membranaire TIM22 contenant la protéine Tim54p (Murphy *et al.*, 2001). Bien que l'on ne puisse pas exclure la possibilité que le complexe 300 kDa corresponde à une forme multimérique de la CCHL, il est possible que ce dernier contienne d'autres protéines impliquées dans la maturation du cytochrome *c*.

La même expérience a été réalisée en utilisant l'anticorps anti-CC₁HL (fourni par Rolland Lill) : seule une bande est détectée, sous le marqueur 67 kDa ; il pourrait donc s'agir du monomère (Figure 41). Ce résultat souligne encore une fois la différence de propriétés des deux hème lyases de levure.

Etant donnée l'interaction génétique mise en évidence entre Cyc2p et la CCHL, il était raisonnable d'envisager une interaction physique de ces deux protéines au sein du complexe de 300 kDa. Or nous avons observé que la mobilité du complexe de 300 kDa n'était pas affectée dans un contexte $\Delta cyc2$: il est donc peu probable que la protéine Cyc2p appartienne à ce dernier (Figure 42). Ce résultat n'exclut évidemment pas la possibilité d'une interaction physique transitoire entre Cyc2p et la CCHL, ce type d'interaction ne pouvant pas être détecté par cette approche expérimentale.

Il semblait également raisonnable de tester l'hypothèse selon laquelle le cytochrome *c* et la CCHL interagiraient physiquement au sein de ce complexe de haut poids moléculaire. Des expériences de BN-PAGE ont donc été réalisées dans les conditions de solubilisation permettant l'observation du complexe de 300 kDa. L'anticorps anti-cytochrome *c* a permis de visualiser une 'traînée' entre le marqueur 232 kDa et le front du gel (Figure 43A). Le fait qu'un complexe de 300 kDa n'ait pu être détecté exclut la possibilité que le cytochrome *c* et la

²² Nous avons préféré révéler le premier anticorps par la protéine A iodée I¹²⁵ plutôt que par un anticorps secondaire lié à la HRP afin d'éviter tout bruit de fond lié à l'activité pseudoperoxydase intrinsèque de l'hème.

CCHL interagissent physiquement de façon stable. De plus, l'observation de cette 'trainée' suppose que le cytochrome *c* forme des agrégats, des oligomères ou s'associe avec d'autres protéines. Une seconde dimension en conditions dénaturantes a été réalisée et confirme le résultat du BN-PAGE (Figure 43B).

2.3. Tentative d'identification des composants du complexe.

Afin d'identifier les éventuels partenaires de la CCHL présents au sein du complexe de 300 kDa, les protéines mitochondriales issues d'une souche sauvage et d'une souche $\Delta cchl$ (contrôle) ont été traitées comme précédemment, puis une seconde dimension a été effectuée dans des conditions dénaturantes pour séparer les composants éventuels du complexe et procéder à l'analyse par spectrométrie de masse des différentes bandes obtenues. Le gel en deux dimensions a été transféré sur une membrane PVDF puis le marqueur fluorescent Sypro Ruby, choisi pour sa sensibilité et sa compatibilité avec la spectrométrie de masse, a été utilisé pour détecter la totalité des protéines. Les profils de migration obtenus à partir de la souche sauvage et de la souche contrôle $\Delta cchl$ ont été comparés en utilisant le logiciel PDQuest et en observant plus particulièrement la zone correspondant à 300 kDa. Malheureusement, aucune différence de profil n'a été détectée (Figure 44). Ce fait traduit probablement la faible abondance de la CCHL (et du complexe éventuel) dans la mitochondrie. Afin de pouvoir poursuivre cette approche, une étape d'enrichissement/purification du complexe s'avère donc nécessaire.

3. La protéine Cyc2p-TAP migrerait au niveau de deux sous-complexes.

Afin d'isoler des partenaires éventuels de Cyc2p, des expériences de BN-PAGE ont également été menées à partir de la souche exprimant la protéine Cyc2p-TAP²³. L'anticorps commercial PAP²⁴, qui reconnaît la protéine A, permet la détection d'un complexe majoritaire d'environ 180 kDa et d'un complexe minoritaire d'environ 300 kDa (Figure 45). Ces deux sous-complexes pourraient correspondre à une forme dimérique et tétramérique de la protéine étiquetée (2x70 kDa et 4x70 kDa) ou bien contenir des protéines partenaires de Cyc2p. L'identification des composants de ce complexe représente une de nos priorités dans la mesure où cela pourrait permettre d'isoler de nouveaux facteurs de maturation des cytochromes de type *c*.

²³ Il a été vérifié, par la réalisation d'un spectre de cytochromes, que l'insertion de l'étiquette n'induisait pas de phénotype. La protéine étiquetée a une masse moléculaire de 70 kDa environ.

²⁴ PAP : anticorps Peroxydase Anti Peroxydase (*Sigma*), révélé directement par ECL.

4. Essai préliminaire de purification du complexe de 300 kDa contenant la CCHL

4.1. Procédure expérimentale

Les expériences précédentes suggèrent que le complexe de 300 kDa contenant la CCHL est peu abondant dans la mitochondrie; une étape de purification du complexe s'avérait donc nécessaire. Dans cet objectif, deux souches exprimant au locus *CCHL* la protéine CCHL-His₆ (YDB1) ou la protéine CCHL-TEV-protéineA-His₆ (YDB6) ont donc été construites, dans un contexte génétique W303.

4.1.1. Construction des souches :

L'étiquette His₆ a été ajoutée en C-terminal de la CCHL par amplification PCR à partir du plasmide pRS426-*CCHL* (fourni par Rolland Lill) et des oligonucléotides *cyc3-1* et *cyc3-C-His6*. Le produit de PCR a été purifié sur gel puis utilisé pour transformer la souche SMY4 ($\Delta cchl :: G418$), en présence du plasmide pFL61 (possédant le marqueur *URA3*). Les transformants (ura⁺) ont été sélectionnés puis répliqués sur un milieu glycérol et un milieu G418. Quelques clones (resp⁺) et (G418)^S ont été analysés et l'addition des nucléotides codant l'étiquette His₆ a été vérifiée par séquençage (souche YDB1).

L'étiquette TEV-protéineA-His₆ a été ajoutée en C-terminal de la CCHL par amplification PCR à partir du plasmide pYM10²⁵ (Knop *et al.*, 1999) et des oligonucléotides *cyc3-S2* et *cyc3-S3*. Le produit de PCR a été purifié sur gel puis utilisé pour transformer la souche sauvage W303-1A. Les intégrants (his⁺) ont été sélectionnés puis, pour certains d'entre eux, l'addition des nucléotides codant l'étiquette a été vérifiée par séquençage (souche YDB6).

Afin de vérifier que l'addition de ces étiquettes n'altérerait pas la fonction de la protéine, un spectre de cytochromes à basse température a été réalisé pour ces deux souches. La figure 46 montre que l'addition de ces étiquettes ne modifie pas le niveau d'holocytochrome *c* accumulé et n'altère donc pas la fonction de la CCHL.

4.1.2. Purification du complexe en une étape à partir de la souche YDB6 (CCHL-TEV-protéineA-His₆).

Les mitochondries ont été purifiées à partir de la souche YDB6 et de la souche sauvage (contrôle) cultivées en milieu lactate à 28°C. 14 mg de protéines mitochondriales,

²⁵ Le plasmide pYM10 contient en particulier la séquence correspondant à l'étiquette, ainsi que le gène His3MX6 comme marqueur de sélection.

équivalent à 1,5 litres de culture en phase exponentielle de croissance, ont été solubilisées pendant 30 minutes à 4°C, dans le tampon utilisé lors des expériences de BN-PAGE (1% de digitonine), en présence d'inhibiteurs de protéases. Le matériel non solubilisé a été éliminé par centrifugation. Les mitochondries solubilisées ont été incubées pendant 3h en présence de billes IgG sépharose puis une série de lavages a été effectuée. La protéine CCHL-TEV-protéineA-His₆ a ensuite été éluée par traitement à la protéase TEV pendant toute la nuit à 4°C. Puisque la protéase TEV possède une étiquette His, l'excès de protéases a été éliminé en utilisant des billes Ni-NTA. L'éluat a ensuite été analysé par SDS-PAGE sur un gradient 8%-20% (16cm x16cm x0,1mm) puis les protéines totales ont été colorées au bleu de Coomassie et au nitrate d'argent. Les différentes étapes de la purification ont été contrôlées en analysant, par SDS-PAGE et Western-Blot, les échantillons récoltés à différents stades de l'expérience: fraction totale, fraction non liée aux billes IgG et éluat. Le protocole expérimental est détaillé dans l'annexe 3.

4.2. Résultats préliminaires.

La purification du complexe de 300 kDa *via* la souche CCHL-TEV-protéineA devrait permettre d'isoler les différents constituants potentiels de ce complexe, dans l'hypothèse où ce complexe ne correspondrait pas à une forme multimérique de la CCHL. Une première expérience de purification a été réalisée afin de contrôler les différentes étapes de la purification. La comparaison des fractions totales (T) et non liées à la colonne (U), présentée dans la figure 47, montrent que l'étape de fixation aux IgG se fait de façon efficace. En revanche, l'éluat par la protéase TEV ne permet pas d'obtenir la protéine CCHL avec un rendement suffisant. Ce mode d'éluat avait été choisi en raison de sa spécificité, afin d'éviter l'éluat d'un trop grand nombre de contaminants et le décrochage partiel d'IgG, observé généralement lors de l'éluat par un tampon dénaturant Laemli-SDS. Ces résultats préliminaires nous orientent toutefois vers un autre mode d'éluat (Laemli-SDS par exemple). En conclusion, l'amélioration des conditions de lavage et d'éluat devrait permettre d'obtenir une quantité raisonnable du complexe contenant la CCHL, compatible avec la détection des protéines par bleu de Coomassie ou coloration au nitrate d'argent.

5. Conclusion du chapitre IV.

Les expériences de BN-PAGE ont permis de mettre en évidence la présence d'un complexe de 300 kDa contenant la CCHL. Bien que l'on ne puisse pas exclure la possibilité que ce complexe corresponde à une forme multimérique de la CCHL, il est possible que ce

dernier contienne d'autres protéines impliquées dans la maturation du cytochrome *c*. Le fait que la mobilité de ce complexe n'est pas affectée dans un mutant $\Delta cyc2$ et que la protéine Cyc2p-TAP ne forme pas un complexe de même taille suppose que la CCHL et la protéine Cyc2p n'interagissent pas de façon stable au sein du même complexe. Ceci n'exclut toutefois pas la possibilité d'une interaction physique transitoire entre les deux protéines. De plus, ce complexe ne contiendrait ni la CC₁HL ni le cytochrome *c*. Enfin, la technique du BN-PAGE nous a également permis de détecter la présence de deux sous-complexes contenant la protéine Cyc2p : ceux-ci pourraient correspondre aux formes dimériques et tétramériques de la protéine mais pourraient également refléter l'existence de nouveaux partenaires de Cyc2p. L'identification des constituants de ces deux complexes de haut poids moléculaire constitue donc une de nos priorités, dans la mesure où de nouveaux facteurs d'assemblage du cytochrome *c* pourraient ainsi être isolés.

- DISCUSSION ET PERSPECTIVES -

I. Une vue nouvelle de l'assemblage des cytochromes de type *c* dans la mitochondrie chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

1. Fonctions des hèmes lyases.

1.1. Fonction de la CCHL.

1.1.1. Activité cytochrome *c* hème lyase

L'activité cytochrome *c* hème lyase de la CCHL n'a jamais été démontrée *in vitro* à partir de la protéine purifiée. Toutefois, la baisse significative de l'activité cytochrome *c* hème lyase²⁶ observée dans les extraits mitochondriaux de mutants *cchl* ainsi que l'augmentation de cette activité dans les extraits mitochondriaux surexprimant *CCHL* suggèrent que le gène *CCHL* code l'hème lyase du cytochrome *c* (Dumont *et al.*, 1987, Tong and Margoliash, 1998). Le fait que la coexpression des gènes *CYCI* et *CCHL* dans le cytoplasme de *E. coli* permet la synthèse d'holocytochrome *c* conforte également cette hypothèse (Pollock *et al.*, 1998). On peut imaginer que la CCHL pourrait :

- 1) recruter l'hème *via* les motifs CPV et favoriser le rapprochement spatial de l'hème et des cystéines de l'apocytochrome *c* (sans intervenir au niveau de la catalyse de la réaction d'addition de l'hème)
- 2) apporter les conditions physicochimiques compatibles avec la réaction d'addition de l'hème. Une chaîne latérale d'un résidu de la CCHL pourrait par exemple favoriser la protonation du groupement vinyle de l'hème (Stevens *et al.*, 2004).

Les résultats de l'analyse génétique menée au cours de ce travail suggèrent que la CCHL se comporte effectivement comme une hème lyase. Il faut rappeler ici que des mutations supprimeuses capables de restaurer la croissance respiratoire du mutant Δcc_1hl ont été sélectionnées sur un milieu non fermentescible (Bernard *et al.*, 2003). La nature même de ces mutations, qui modifient la CCHL ou le site de liaison à l'hème CXXCH de l'apocytochrome *c*₁, est en effet compatible avec la fonction hème lyase : les sites ainsi modifiés de l'enzyme ou du substrat pourraient augmenter l'affinité entre la CCHL et l'apocytochrome *c*₁, ou rendre plus efficace la réaction d'addition de l'hème (en particulier pour les mutations localisées au niveau du site de liaison à l'hème).

²⁶ L'activité a été mesurée par l'incorporation d'hème radiomarqué au ⁵⁵Fe au sein de l'apocytochrome *c*.

1.1.2. Interaction de la CCHL et de l'hème.

La délétion des motifs CPV (*motif de régulation par l'hème*) de la CCHL affecte l'assemblage du cytochrome *c* (chapitre III). Toutefois, le fait que ce processus ne soit pas complètement aboli suggère que d'autres régions de la CCHL pourraient être impliquées dans le recrutement de l'hème. Etant donné le fonctionnement de la protéine CcmE dans le système I (Schulz *et al.*, 1998, paragraphe III.2.3.2.1. de l'introduction), on pourrait envisager l'éventualité que la CCHL puisse lier l'hème de façon covalente, mais transitoire, au niveau d'un résidu histidine conservé, tout comme la protéine CcmE. Si un intermédiaire covalent CCHL-hème existe, celui-ci ne pourrait vraisemblablement pas être détecté (par *heme staining*) que dans un contexte où le transfert de l'hème à l'apocytochrome *c* serait bloqué²⁷ ou/et dans des conditions de surproduction de l'hème lyase. L'analyse des séquences des hème lyases fait apparaître la présence de deux histidines conservées : l'histidine128, localisée à proximité du site F₁₃₀L₁₃₁ étudié au cours de ce travail, et l'histidine 193. L'importance fonctionnelle de ces résidus pourrait par exemple être testée en générant les variants H128A et H193A et en étudiant l'effet de ces substitutions sur l'assemblage du cytochrome *c*.

1.2.3. Rôle de la CCHL dans l'import de l'apocytochrome *c*.

Outre son implication dans l'étape de fixation de l'hème à l'apocytochrome *c*, la CCHL est absolument requise pour l'import de l'apocytochrome *c* dans la mitochondrie²⁸. Peut-on toutefois séparer aisément les deux fonctions ? Puisque la forme holocytochrome *c* ne peut pas sortir de la mitochondrie, il est possible que la fixation de l'hème médiée par la CCHL soit l'unique événement responsable de la rétention du cytochrome *c* dans l'espace intermembranaire : il y aurait alors couplage entre l'attachement de l'hème à l'apocytochrome et l'import de ce dernier (Nargang *et al.*, 1988). Toutefois, des études *in vitro* suggèrent que les premières étapes de l'import de l'apocytochrome *c* pourraient avoir lieu indépendamment de l'étape d'attachement de l'hème (Hakvoort *et al.*, 1990). Des expériences menées *in vivo* chez *S. cerevisiae*, à partir d'une forme d'apocytochrome *c* mutée au niveau des deux cystéines du site de liaison à l'hème CXXCH, suggèrent également ce type de mécanisme (Dumont *et al.*, 1991). En effet, les auteurs montrent, d'une part, qu'une quantité détectable

²⁷ Par exemple, un mutant ponctuel modifiant un résidu conservé de la CCHL ou les cystéines de l'apocytochrome *c* pourrait être généré.

²⁸ Dans un mutant $\Delta cchl$, l'apocytochrome *c* n'est pas importé dans la mitochondrie.

de ce variant d'apocytochrome c^{29} (incapable de lier l'hème) est importée dans la mitochondrie, et d'autre part, que le niveau d'internalisation de cette forme altérée de l'apocytochrome c décroît dans un mutant $\Delta cchl$ et augmente dans une souche surexprimant la CCHL. Ces expériences suggèrent donc que la CCHL pourrait piéger l'apocytochrome c dans l'espace intermembranaire par une interaction physique transitoire, *via* des sites de haute affinité pour l'apocytochrome c , puis catalyser la fixation de l'hème sur l'apocytochrome c (de façon à obtenir la forme mature du cytochrome c et à piéger définitivement le cytochrome c dans l'espace intermembranaire).

1.2. La CCHL et la CC_1HL ont des propriétés différentes

En dépit des similarités de séquences protéiques de la CCHL et de la CC_1HL , un certain nombre de données expérimentales suggèrent que les deux hème lyases de levure possèdent des propriétés différentes :

(1) en terme fonctionnel : Alors que la CCHL est requise pour l'import du cytochrome c , la CC_1HL ne serait impliquée que dans l'étape de fixation de l'hème à l'apocytochrome c_1 , étape qui toutefois conditionne le clivage protéolytique catalysé par Imp2, générant ainsi la forme mature du cytochrome c_1 (voir paragraphe III.3.4.2.2.).

(2) en terme d'association à la membrane : les expériences d'extractibilité au carbonate montrent que les hèmes lyases présentent un mode différent d'association à la membrane interne mitochondriale, qui correspond d'ailleurs à celui de leur substrat principal: alors que la CC_1HL n'est pas extractible à pH alcalin, la CCHL devient soluble à un tel pH (Steiner *et al.*, 1995, Bernard *et al.*, 2005).

(3) en terme de formation de complexes : les expériences de BN-PAGE montrent que, dans les mêmes conditions de solubilisation, la CCHL est associée à un complexe de haut poids moléculaire (300 kDa) alors que la CC_1HL semble migrer comme un monomère.

(4) en terme de spécificité de substrats : alors que la CC_1HL présente une spécificité de substrats stricte, la CCHL, outre son activité de maturation du cytochrome c , présente la particularité de pouvoir lier l'hème à l'apocytochrome c_1 .

Il est possible que la spécificité de substrat soit déterminée par la nature de certains résidus des hème lyases. Toutefois, étant données les différences de propriétés biochimiques des deux hèmes lyases de levure, il n'est pas exclu que la spécificité de substrats soit

²⁹ En raison de la haute instabilité de l'isoforme 1, les auteurs ont réalisé ces expériences à partir d'une souche surexprimant l'isoforme 2 du cytochrome c .

conditionnée par la localisation submitochondriale des deux hème lyases et donc par l'accessibilité aux substrats apocytochrome *c* et *c*₁.

1.3. Un complexe d'assemblage putatif ?

Des expériences d'électrophorèse en conditions natives (BN-PAGE) nous ont permis de détecter un complexe de haut poids moléculaire (300 kDa) contenant la CCHL. Ce complexe ne contiendrait ni le cytochrome *c*, ni la protéine Cyc2p, ce qui n'exclut toutefois pas une interaction transitoire entre ces protéines. Bien que ce complexe pourrait correspondre à une forme multimérique de la CCHL, il est possible que ce complexe contienne de nouveaux facteurs de maturation du cytochrome *c*. La détection d'un tel complexe est d'autant plus intéressante que des complexes de haut poids moléculaires ont également été mis en évidence dans les systèmes I (Giege *et al.*, 2004) et II (Hamel *et al.*, 2003). D'un point de vue catalytique, le regroupement d'activités biochimiques requises pour un processus donné (i.e. assemblage de l'holocytochrome *c*) au sein d'un complexe constitue un avantage certain pour la cellule. La purification du complexe de 300kDa, associée à la détection de ses constituants par spectrométrie de masse, pourrait permettre d'identifier de nouveaux facteurs de maturation dans le système III. L'implication de ces protéines dans ce processus pourra être confirmée en analysant l'effet de l'inactivation des gènes correspondants sur l'assemblage du cytochrome *c*. Si ces gènes sont essentiels, des mutants thermosensibles pourront être générés et analysés.

1.4. Comment poursuivre l'analyse de la CCHL ?

La recherche de partenaires de la CCHL pourra être poursuivie par la méthodologie biochimique exposée ci-dessus. Une approche génétique pourrait également être envisagée. Bien qu'aucun suppresseur génétique et multicopie restaurant la croissance respiratoire d'un mutant nul $\Delta cchl$ n'ait pu être obtenu au cours de travail, cette même approche pourrait être mis en œuvre à partir de mutants ponctuels de la CCHL, déficients pour la respiration, et pour lesquels une accumulation mitochondriale de la protéine serait conservée. Ces mutants pourront être générés par mutagenèse dirigée et aléatoire.

Les suppresseurs génétiques restaurant la croissance de tels mutants pourraient correspondre à : (1) des suppresseurs intragéniques qui permettraient de mettre en évidence de possibles interactions spatiales entre certains acides aminés, et (2) des suppresseurs extragéniques qui permettraient d'identifier d'éventuels partenaires directs de la CCHL et de proposer des modèles d'interaction physique. En particulier, des mutations dans les gènes

codant le substrat cytochrome *c*, l'enzyme CC₁HL ou la protéine Cyc2p pourraient être mises en évidence. La présence de mutations suppresseurs dans le gène *CYC2* renforcerait notamment l'hypothèse d'une interaction physique entre Cyc2p et la CCHL.

La résolution de la structure cristallographique de la CCHL enrichirait grandement la compréhension du fonctionnement de cette enzyme. Les essais de purification de la CCHL n'ont toutefois pas été concluants en raison du caractère insoluble de la CCHL produite chez *E. coli*. L'amélioration des conditions de solubilité de la CCHL, ou l'utilisation d'un autre système d'expression, pourrait donc permettre de poursuivre les études de cristallogénèse de cette protéine.

2. Contrôle redox de l'assemblage des cytochromes de type *c*

2.1. Contexte de l'étude

L'étude de l'assemblage des cytochromes de type *c* dans les systèmes I, II et III a permis de montrer que ce processus nécessitait le maintien des substrats, hème et cystéines de l'apocytochrome, dans un état redox compatible avec la réaction d'addition de l'hème sur l'apocytochrome. Le système I requiert en particulier la participation d'une voie d'oxydation³⁰ (DsbA et DsbB) et d'une voie de réduction (CcmG, CcmH et DsbD)³¹ impliquée spécifiquement dans la réduction des cystéines du site de liaison à l'hème des apocytochromes. Des facteurs redox ont également été identifiés dans le système II, en particulier la thioredoxine ResA et la protéine CcdA, similaire à la partie centrale de DsbD. En revanche, la participation de tels facteurs n'a jamais été suspectée dans les mitochondries de champignons et de métazoaires, en particulier du fait que l'environnement 'réducteur' fourni par l'espace intermembranaire était considéré comme suffisant pour maintenir l'hème et les cystéines de l'apocytochrome dans un état réduit. Toutefois, des études *in organello* montrent que l'assemblage du cytochrome *c* (Nicholson and Neupert, 1989) et du cytochrome *c*₁ (Nicholson *et al.*, 1989) requiert la présence d'une flavine et du NAD(P)H : ces résultats suggèrent donc l'existence d'un mécanisme spécifique de réduction contrôlant l'assemblage des cytochromes de type *c*, dans l'espace intermembranaire mitochondrial.

2.2. Rôle de la réductase Cyc2p chez *S. cerevisiae*

³⁰ L'implication de DsbA dans l'assemblage des cytochromes de type *c* n'est cependant pas claire.

³¹ Les mitochondries de plantes ne possèdent toutefois pas d'homologues de CcmG et DsbD.

2.2.1. Caractérisation de Cyc2p

La recherche de supresseurs multicopies capables de restaurer la croissance respiratoire du mutant Δcc_1hl m'a permis d'isoler le gène *CYC2* au tout début de ma thèse. L'implication de Cyc2p dans la voie des hème lyases a alors été confirmée par plusieurs approches génétiques. En particulier, nous avons montré que la protéine Cyc2p est essentielle à la maturation des cytochromes de type *c* lorsque l'assemblage du cytochrome c_1 repose sur la seule présence de la CCHL (lire la discussion des résultats II.2.5.). Cyc2p apparaît donc comme un partenaire crucial de la CCHL. De plus, puisqu'un mutant $\Delta cyc2$ n'altère pas le niveau d'holocytochrome c_1 , il semblerait que Cyc2p agit spécifiquement au niveau de la CCHL, et non de la CC_1HL .

Nous avons également montré que Cyc2p est une flavoprotéine membranaire, associée à la membrane interne mitochondriale et dont le domaine de fixation au FAD se situe du côté de l'espace intermembranaire, le compartiment d'assemblage des cytochromes de type *c*. En outre, un test d'activité *in vitro* a permis d'établir que Cyc2p est capable de réduire le ferricyanure, en présence du NADPH comme donneur d'électrons. Cyc2p apparaît donc comme une flavoprotéine à activité réductase, partenaire de la CCHL et requise pour l'assemblage du cytochrome *c*.

2.2.2. Quel est le substrat de la flavoprotéine Cyc2p ?

La question du substrat de Cyc2p reste cependant ouverte. Etant données les règles d'assemblage d'un cytochrome de type *c*, on peut raisonnablement penser que Cyc2p pourrait agir à deux niveaux : la réduction de l'hème et/ou la réduction des cystéines de l'apocytochrome. Or, dans le système I, ce dernier processus fait intervenir des échanges de ponts disulfures médiés par des thioredoxines et thioredoxines réductases, protéines caractérisées par la présence du motif CXXC. Puisque Cyc2p ne contient pas de telles cystéines conservées, il est peu probable que Cyc2p soit directement impliquée dans la réduction des cystéines de l'apocytochrome. L'absence de résidus cystéines conservés, l'homologie de séquence entre Cyc2p et la cytochrome b_5 réductase, associée au fait que l'étape de réduction de l'hème requiert la présence d'une flavine et du NAD(P)H (Nicholson and Neupert, 1989), nous a donc amené à privilégier le modèle selon lequel Cyc2p réduirait l'hème plutôt que les cystéines du site CXXCH de l'apocytochrome.

Toutefois, le phénotype respiratoire synthétique du mutant $\Delta cyc2$ *cytI*_{CAPCH} peut laisser perplexe. Bien que ce phénotype peut s'expliquer par des différences d'affinité de la

CCHL et de la CC₁HL envers ce variant du cytochrome *c*₁ (lire la discussion II.2.2.), une seconde hypothèse pourrait éventuellement être envisagée. En effet, il a été montré que la modification des résidus situés entre les cystéines du motif CxxC de thioredoxines affecte la réactivité des échanges de ponts disulfures (pour revue : Ortenberg and Beckwith, 2003). On peut alors penser que la substitution A42P (du motif CAACH), du cytochrome *c*₁ pourrait également modifier le potentiel redox des cystéines du site de liaison à l'hème de telle sorte que Cyc2p devienne essentielle dans ce contexte génétique. L'étape de réduction des cystéines de l'apocytochrome *c*₁ pourrait ainsi être affectée dans un mutant $\Delta cyc2\ cytI_{CAPCH}$. Cette hypothèse reste néanmoins difficile à relier avec le phénotype du mutant $\Delta cyc2$ pour lequel seul l'assemblage du cytochrome *c* est affecté. Toutefois, cette hypothèse pourrait être testée expérimentalement en analysant le statut des groupements thiols de la forme intermédiaire de l'apocytochrome *c*₁³² dans un contexte $\Delta cyc2\ cytI_{CAPCH}$, en comparaison avec le mutant $\Delta cc_1hl\ cytI_{CAPCH}$ (Tyagarajan *et al.*, 2003).

2.2. Existe-il un homologue fonctionnel de Cyc2p chez l'homme ?

L'alignement de séquences des Cyc2p de champignons montre que seuls quelques motifs, correspondant aux sites de liaison au FAD et au NADPH, sont conservés³³ : ceci suppose donc que la protéine a divergé, au sein même du règne des champignons. Lorsque l'on recherche des homologues de Cyc2p chez les animaux par BLASTP, on ne retrouve qu'une isoforme de la cytochrome *b*₅ réductase, avec une E-value non significative. Ceci tendrait à penser qu'il n'existe pas d'orthologue de Cyc2p chez les animaux (Tableau 5). Toutefois, en raison de l'extrême divergence de séquences de Cyc2p-*'like'* au sein même du règne des champignons, il est fort probable que la présence d'un homologue fonctionnel de Cyc2p chez les métazoaires ne soit pas détectable par des comparaisons de séquences protéiques. L'unique argument fonctionnel qui favoriserait l'hypothèse selon laquelle il n'existerait pas d'orthologue humain de Cyc2p repose sur le fait que la surexpression de l'hème lyase humaine complémente les mutants d'hème lyases de levure, même en l'absence de Cyc2p. Puisque les cytochromes *b*₅ réductases sont plus conservées que les Cyc2p-*'like'*, on pourrait penser que le gène *CYC2* provienne d'une duplication d'un gène ancestral (le gène

³² Notez que l'analyse du statut des thiols de l'apocytochrome *c* serait difficile à mettre en oeuvre dans la mesure où l'apocytochrome *c* est rapidement dégradé.

³³ La conservation des acides aminés participant au site de liaison au FAD ou au NADPH est probablement liée aux contraintes structurales définies par ce type de domaine fonctionnel.

codant la cytochrome b_5 réductase) survenue chez les champignons et que ce gène aurait divergé au sein même du règne des champignons.

Si l'on s'en tient au fait que Cyc2p ne serait présente que chez les champignons, on peut remarquer qu'il existe une corrélation entre la présence de cette flavoprotéine et la présence de deux hème lyases (tableau 5). L'algue verte *C. reinhardtii* et le parasite *P. falciparum*, qui possèdent deux hème lyases mais à priori pas le gène *CYC2*, pourraient toutefois constituer une exception. Cette corrélation pourrait nous amener à penser que la protéine Cyc2p conférerait une spécificité d'action à la CCHL, chez les organismes possédant deux hème lyases.

2.3. Comment poursuivre l'étude de la protéine Cyc2p ?

Bien que les essais de cristallisation de la protéine Cyc2p n'aient pas été concluants, un modèle structural nous a été proposé par l'équipe de Herman van Tilbeurgh. Ce modèle est basé sur l'homologie de séquence entre Cyc2p et la cytochrome b_5 réductase humaine (Figure 28). Les séquences de la cytochrome b_5 réductase humaine et de Cyc2p ont été finement comparées de façon à identifier les régions spécifiques de Cyc2p (Figures 48 et 49). Il apparaît, d'une part, que les résidus strictement conservés sont principalement localisés au niveau du site de fixation du FAD ainsi que sur la face externe du 'domaine en tonneau β ' (les résidus conservés situés au niveau du second domaine auraient vraisemblablement un rôle structural). D'autre part, les boucles contenant les insertions et les délétions sont spatialement localisées au niveau de deux régions. L'étude de ces deux régions pouvant nous aider à spécifier la fonction de Cyc2p, l'effet des délétions partielles de ces régions (et de certaines substitutions) sur l'assemblage du cytochrome *c* pourra être analysé.

L'étude pourra également être poursuivie par la recherche de mutants synthétiques déficients pour la respiration, c'est à dire des mutants qui, en combinaison avec $\Delta cyc2$, conduisent à un phénotype respiratoire absolu (resp⁻). Dans cette perspective, une approche de mutants synthétiques par la méthode SGA (synthetic genetic array, Tong and Boone) a été entreprise à l'UCLA. Cette approche consiste à croiser un mutant $\Delta cyc2$ par la collection de mutants nuls viables de levure et à étudier le phénotype respiratoire de la descendance après croisement. Les étapes de croisement, sporulation et croissance sur milieux fermentescible et respiratoire sont réalisées à l'aide d'un robot. Si un gène *X* conduit à une interaction génétique synthétique (synthétique respiratoire par exemple) combinée à l'absence de Cyc2p, les spores portant les allèles nuls ne pousseront pas sur milieu respiratoire.

2.4. Les systèmes redox de l'espace intermembranaire mitochondrial

Le fait qu'un mutant $\Delta cyc2$ accumule environ 10% d'holocytochrome *c* dans l'espace intermembranaire pourrait traduire l'existence d'une redondance fonctionnelle entre Cyc2p et un autre facteur de maturation accomplissant une fonction similaire³⁴. De plus, la découverte d'une réductase liée à l'activité de la CCHL pose la question d'un mécanisme semblable pour l'assemblage du cytochrome c_1 dépendant de la CC₁HL (Nicholson *et al.*, 1989). Il est donc probable que d'autres facteurs redox de l'espace intermembranaire participent à l'assemblage des cytochromes de type *c* mitochondriaux, en particulier des oxydoréductases connues pour intervenir au niveau d'autres processus. L'objectif de ce paragraphe est de recenser brièvement les différents systèmes redox de l'espace intermembranaire découverts au cours de ces dernières années.

2.4.1. Un système d'échanges de ponts disulfures médié par Erv1p et Mia40p.

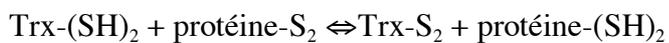
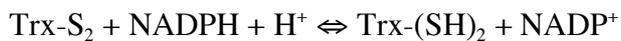
Un système d'échanges de ponts disulfures, impliqué dans l'import et le repliement de petites protéines riches en cystéines de l'espace intermembranaire (dont Cox17p et les petites Tim), a tout récemment été identifié (pour revue : Tokatlidis, 2005). Ce système fait intervenir deux protéines essentielles, riches en résidus cystéines conservés : la FAD-sulfhydryl oxydase Erv1p et la protéine Mia40p. Mia40p, qui prend en charge les précurseurs des petites protéines destinées à l'espace intermembranaire, présenterait la particularité de former un pont disulfure intermoléculaire transitoire avec ces derniers (Mesecke *et al.*, 2005). La forme réduite de Mia40p serait alors oxydée par Erv1p (Figure 50). On ignore la façon dont Erv1p serait de nouveau oxydée.

Alors que le niveau d'accumulation des petites protéines Tim est affecté chez un mutant thermosensible *erv1* (Allen *et al.*, 2005b), celui de la CCHL (Mesecke *et al.*, 2005) et du cytochrome *c* (Rissler *et al.*, 2005) n'est pas modifié : il est donc peu probable que Erv1p intervienne dans l'assemblage du cytochrome *c*. Il est toutefois intéressant de souligner le parallèle entre l'import des petites protéines riches en cystéines de l'espace intermembranaire et celui du cytochrome *c*. En effet, tous deux nécessitent une étape de piégeage du précurseur dans l'espace intermembranaire (médiée par Mia40p et la CCHL respectivement) et leur maturation nécessite un contrôle redox.

³⁴ On ne peut toutefois pas exclure la possibilité que Cyc2p augmenterait l'efficacité de l'assemblage du cytochrome *c*, sans pour autant être strictement nécessaire à ce processus (dans un contexte sauvage).

2.4.2. Le système thioredoxine/thioredoxine réductase (Trx3p et Trr2p).

Les membres de la famille thioredoxine se définissent par la présence d'un motif de type CXXC, correspondant à une structure bien singulière. Tous les eucaryotes possèdent un système thioredoxine mitochondrial, similaire au système cytoplasmique (Miranda-Vizuete *et al.*, 2000). Les thioredoxines mitochondriales de levure sont des monomères d'environ 12 kDa, qui contiennent le site conservé WCGPC. Ces protéines alternent entre un état réduit Trx-(SH)₂ et un état oxydé Trx-S₂. La forme oxydée peut être à son tour réduite par le NADPH *via* la flavo-thioredoxine réductase (homodimère) :



La thioredoxine Trx3p et la thioredoxine réductase Trr2p sont mitochondriales, mais leur sublocalisation n'est toutefois pas connue (Pedrajas *et al.*, 1999). Ces protéines seraient notamment impliquées dans la protection contre le stress oxydatif, ce qui n'exclut pas d'autres types de fonctions. L'étude de la redondance des systèmes cytoplasmiques et mitochondriaux suggèrent que l'état redox des deux systèmes est maintenu de façon indépendante (Trotter and Grant, 2005)³⁵. De façon intéressante, en absence du système cytoplasmique, la protéine Trr2p est requise pour la croissance respiratoire, indépendamment de la présence de Trx3p.

L'implication de ce système dans la maturation des cytochromes de type *c* mérite donc d'être étudiée. En effet, on pourrait imaginer que les cystéines de l'apocytochrome *c* soient maintenues sous une forme réduite par ce type de système. Il serait donc intéressant d'établir la localisation submitochondriale de ces deux protéines et, dans le cas d'une localisation dans l'espace intermembranaire, d'étudier l'effet des délétions $\Delta trx3$ et $\Delta trr2$ sur l'assemblage des cytochromes de type *c*, éventuellement dans un contexte $\Delta cyc2$.

³⁵ Notez que la délétion des systèmes cytoplasmique et mitochondrial n'est pas létale.

II. Comparaison des trois systèmes de biogenèse des cytochromes *c*

1. Comment relier l'existence de ces trois systèmes à la phylogénie ?

L'étonnante diversité des trois systèmes majeurs de maturation des cytochromes de type *c* décrits jusqu'à présent dans le monde vivant (Figure 12) et leur répartition dans l'arbre de la vie soulèvent des questions d'ordre phylogénétique. En particulier, comment expliquer la présence de deux systèmes différents (exclusifs) dans les mitochondries (plante *versus* animaux/champignons) ? Comment interpréter la coexistence dans le monde vivant de ces trois systèmes complexes du point de vue de la 'physiologie' de l'assemblage des cytochromes de type *c* ?

Rappelons que le système I comprendrait au moins 11 facteurs de maturation, impliqués en particulier dans les étapes de livraison et de transfert de l'hème ainsi que dans le contrôle redox de la réaction d'addition de l'hème (Figure 13). Le système II comporterait au moins 9 facteurs de maturation dont la fonction de la plupart demeure encore inconnue (Figure 17). Enfin, la maturation des cytochromes de type *c* selon le système III requiert la participation de deux types de protéines : l'hème lyase et le facteur redox Cyc2p (chez les champignons). Il est toutefois possible que de nouveaux facteurs de maturation des cytochromes de type *c*, qui pourraient également intervenir dans d'autres fonctions mitochondriales, soient identifiés dans le système III au cours de ces prochaines années.

Les systèmes I et II : Les données de la littérature concernant la répartition de ces trois grands systèmes au sein du monde vivant ont été regroupées au sein du tableau 6. Il apparaît notamment que les β - δ - et γ - protéobactéries utilisent soit le système I soit le système II, ce qui pose des problèmes quant à l'origine évolutive de ces deux systèmes. Il est possible que des transferts horizontaux de gènes soient à l'origine de ce mélange de systèmes au sein de ces groupes bactériens (Goldman and Kranz, 1998); cela mériterait une analyse bioinformatique fine des opérons *ccm* et des gènes de la voie de maturation des cytochromes de type *c*, issus d'un grand nombre de génomes bactériens. Remarquez toutefois que les génomes de certaines β -protéobactéries contiendraient simultanément les composants des systèmes I et II³⁶ (Allen *et al.*, 2005a). On pourrait donc ainsi imaginer qu'il existe une corrélation entre la complexité du répertoire des cytochromes de type *c* dans un organisme

³⁶ La fonctionnalité de ces systèmes n'a cependant pas été testée.

donnée et la présence d'un système particulier de biogenèse. Enfin, il est intéressant de noter que les systèmes I et II présentent des similarités dans la mesure où certaines protéines partagent des motifs protéiques communs³⁷ et peuvent être fonctionnellement interchangeables. On retrouve en particulier le motif WXWD dans CcmC, CcmF (système I) et CcsA (système II). De plus, CcdA, découvert originellement dans le système II (*Bacillus subtilis*) est présent dans certaines bactéries qui ont le système I (*Rhodobacter capsulatus*), et réciproquement DsbD, découvert dans le système I (*E. coli*) est présent dans certaines bactéries du système II (*Bordetella*). Enfin, il a de plus été montré, par des expériences de complémentation hétérologue, que CcdA (système II) et DsbD (système I), impliquées dans le contrôle redox, sont fonctionnellement interchangeables. L'origine évolutive des systèmes I et II n'est donc pas élucidée : quel serait le système ancestral ? Existerait-il un ancêtre commun à ces deux systèmes ?

Les systèmes I et III mitochondriaux : La comparaison des séquences de génomes mitochondriaux associée à l'étude de la phylogénie basée sur les séquences de protéines mitochondriales renforcent l'hypothèse d'une origine monophylétique du génome mitochondrial, qui proviendrait d'une α -protéobactérie (*Rickettsia prowazekii*). Etant donné que le protiste *Reclinomonas americana* et l' α -protéobactérie *Rickettsia prowazekii* utilisent le système I, il est fort probable que le système III mitochondrial soit apparu après le système I mitochondrial³⁸. La 'raison' fonctionnelle pour laquelle les plantes auraient conservé ce système ancestral reste mystérieuse. Dans tous les cas, d'un point de vue phylogénétique, le fait que les mitochondries de plantes et d'animaux/champignons possèdent un système différent n'est pas si surprenant : en effet, plusieurs études phylogénétiques convergent dans le sens de l'existence d'un ancêtre commun entre les animaux et les champignons, ce qui n'est pas le cas des plantes qui formeraient un groupe à part (Bullerwell and Gray, 2004, Lang *et al.*, 2002, Figure 51). Le fait que les mitochondries de *Chlamydomonas reinhardtii*, algue unicellulaire flagellée, utilisent le système III est toutefois difficile à concilier avec les données de phylogénie moléculaire (figure 51).

L'ensemble de ces observations suggèrent donc que le système I mitochondrial aurait été remplacé au cours de l'évolution par le système III. Dans cette hypothèse, on devrait donc

³⁷ En revanche, le système III ne comporte aucune homologie apparente avec les deux autres systèmes.

³⁸ On peut souligner que *Rickettsia prowazekii*, tout comme les mitochondries, ne possède pas de voie transmembranaire réductrice.

être à même d'identifier, dans le futur, des organismes (des protistes par exemple, Gray *et al.*, 2004), pour lesquels les deux systèmes I et III coexisteraient, au moins en partie.

2. Comment trois systèmes différents peuvent permettre l'assemblage d'une hémoprotéine ubiquitaire?

L'ensemble des études génétiques et biochimiques des différents systèmes de maturation des cytochromes de type *c*, associées à des études *in vitro*, montrent que l'assemblage d'une telle molécule requiert plusieurs étapes : le transport des substrats - hème et apocytochrome - à travers une bicouche lipidique, le maintien de l'hème et des cystéines du site de liaison à l'hème dans un état réduit et la formation d'une liaison thioéther entre les cystéines et les groupements vinyles de l'hème, d'une façon stéréospécifique. L'existence de ces règles communes suggérerait une voie commune d'assemblage.

La présence de trois systèmes différents de maturation de cytochromes de type *c* pourrait donc traduire l'existence de différences fonctionnelles et structurales. En particulier, on pourrait penser que la maturation de cytochromes de type *c* multihémiques, présents uniquement dans le monde bactérien, nécessite un mécanisme d'assemblage plus élaboré, et donc un nombre de facteurs de maturation plus important (systèmes I et II). Ceci aurait pu donc amener les mitochondries de champignons et de métazoaires, qui ne possèdent que les cytochromes *c* et *c*₁, à développer un système apparemment plus simple³⁹ (système III). Toutefois, l'identification de Cyc2p, une flavoprotéine partenaire de la CCHL, laisse penser que d'autres systèmes redox de l'espace intermembranaire pourraient être mis en évidence dans le système III, en particulier des thiorédoxines. Il est intéressant de noter qu'un nouveau système de thiorédoxines a récemment été identifié dans les mitochondries de plantes chez *A. thaliana* (Laloi *et al.*, 2001, Balmer *et al.*, 2004).

Le fait que plusieurs systèmes de biogenèse des cytochromes de type *c* coexistent pourrait indiquer que la formation d'une telle molécule ne nécessite pas de fortes contraintes structurales ou physicochimiques, comme peut l'être par exemple la voie de biosynthèse de l'hème, extrêmement conservée dans le monde vivant (Figure 9). On peut également imaginer que la différence entre le système I et le système III soit liée à la spécificité de ces facteurs de maturation. Alors que les facteurs de maturation des cytochromes de type *c* dans le système I semblent être spécifiques de ce type de molécules⁴⁰, on pourrait imaginer que les facteurs de maturation des cytochromes *c* et *c*₁ mitochondriaux du système III soient impliqués dans

³⁹ Dans ce cas, les mitochondries constitueraient alors une exception.

⁴⁰ Certains facteurs d'assemblage pourraient toutefois avoir un rôle additionnel (voir paragraphe III.2.1.1.)

plusieurs fonctions, ce qui expliquerait la raison pour laquelle des cribles génétiques basés sur une modification spécifique du niveau de c ou de c_1 ne permettent pas de trouver de nouveaux facteurs de maturation. La réflexion sur la comparaison des trois systèmes de maturation pourra être enrichie par des expériences de complémentation fonctionnelle hétérologue.

Enfin, en dépit des nombreuses approches expérimentales mises en oeuvre, la question du transport de l'hème dans ces différents systèmes reste ouverte. Alors que des candidats pour une telle fonction ont été proposés pour les systèmes I et II (CcmAB pour le système I, CcsA/Ccs1 pour le système II), aucun candidat impliqué dans le transport et la livraison de l'hème n'apparaît dans le système III. Les propriétés toxiques de l'hème libre suggèrent pourtant la nécessité d'un transporteur de l'hème à travers la membrane interne.

- BIBLIOGRAPHIE -

-A-

- Ahuja, U. and Thony-Meyer, L. (2003) Dynamic features of a heme delivery system for cytochrome *c* maturation. *J Biol Chem*, 278, 52061-52070.
- Ahuja, U. and Thony-Meyer, L. (2005) CcmD is involved in complex formation between CcmC and the heme chaperone CcmE during cytochrome *c* maturation. *J Biol Chem*, 280, 236-243.
- Allen, J.W., Daltrop, O., Stevens, J.M. and Ferguson, S.J. (2003) *c*-type cytochromes: diverse structures and biogenesis systems pose evolutionary problems. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci*, 358, 255-266.
- Allen, J.W., Ginger, M.L. and Ferguson, S.J. (2004) Maturation of the unusual single-cysteine (XXXCH) mitochondrial *c*-type cytochromes found in trypanosomatids must occur through a novel biogenesis pathway. *Biochem J*, 383, 537-542.
- Allen, J.W., Ginger, M.L. and Ferguson, S.J. (2005a) Complexity and diversity in *c*-type cytochrome biogenesis systems. *Biochem Soc Trans*, 33, 145-146.
- Allen, J.W., Tomlinson, E.J., Hong, L. and Ferguson, S.J. (2002) The *Escherichia coli* cytochrome *c* maturation (Ccm) system does not detectably attach heme to single cysteine variants of an apocytochrome *c*. *J Biol Chem*, 277, 33559-33563.
- Allen, S., Balabanidou, V., Sideris, D.P., Lisowsky, T. and Tokatlidis, K. (2005b) Erv1 mediates the Mia40-dependent protein import pathway and provides a functional link to the respiratory chain by shuttling electrons to cytochrome *c*. *J Mol Biol*, 353, 937-944.
- Andreoli, C., Prokisch, H., Hortnagel, K., Mueller, J.C., Munsterkotter, M., Scharfe, C. and Meitinger, T. (2004) MitoP2, an integrated database on mitochondrial proteins in yeast and man. *Nucleic Acids Res*, 32, D459-462.
- Arnesano, F., Banci, L., Barker, P.D., Bertini, I., Rosato, A., Su, X.C. and Viezzoli, M.S. (2002) Solution structure and characterization of the heme chaperone CcmE. *Biochemistry*, 41, 13587-13594.
- Arslan, E., Schulz, H., Zufferey, R., Kunzler, P. and Thony-Meyer, L. (1998) Overproduction of the *Bradyrhizobium japonicum* *c*-type cytochrome subunits of the *cbb*₃ oxidase in *Escherichia coli*. *Biochem Biophys Res Commun*, 251, 744-747.

-B-

- Balk, J. and Lill, R. (2004) The cell's cookbook for iron--sulfur clusters: recipes for fool's gold? *Chembiochem*, 5, 1044-1049.
- Balmer, Y. and Buchanan, B.B. (2002) Yet another plant thioredoxin. *Trends Plant Sci*, 7, 191-193.
- Balmer, Y., Vensel, W.H., Tanaka, C.K., Hurkman, W.J., Gelhaye, E., Rouhier, N., Jacquot, J.P., Manieri, W., Schurmann, P., Droux, M. and Buchanan, B.B. (2004) Thioredoxin links redox to the regulation of fundamental processes of plant mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 101, 2642-2647.
- Bando, S., Takano, T., Yubisui, T., Shirabe, K., Takeshita, M. and Nakagawa, A. (2004) Structure of human erythrocyte NADH-cytochrome *b*₅ reductase. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 60, 1929-1934.
- Barrientos, A. (2003) Yeast models of human mitochondrial diseases. *IUBMB Life*, 55, 83-95.
- Barrientos, A., Pierre, D., Lee, J. and Tzagoloff, A. (2003) Cytochrome oxidase assembly does not require catalytically active cytochrome *c*. *J Biol Chem*, 278, 8881-8887.
- Basile, G., Di Bello, C. and Taniuchi, H. (1980) Formation of an iso-1-cytochrome *c*-like species containing a covalently bonded heme group from the apoprotein by a yeast cell-free system in the presence of hemin. *J. Biol. Chem.*, 255, 7181-7191.

- Bayly, A.M., Berglez, J.M., Patel, O., Castelli, L.A., Hankins, E.G., Coloe, P., Hopkins Sibley, C. and Macreadie, I.G. (2001) Folic acid utilisation related to sulfa drug resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEMS Microbiol Lett*, 204, 387-390.
- Beckett, C.S., Loughman, J.A., Karberg, K.A., Donato, G.M., Goldman, W.E. and Kranz, R.G. (2000) Four genes are required for the system II cytochrome *c* biogenesis pathway in *Bordetella pertussis*, a unique bacterial model. *Mol Microbiol*, 38, 465-481.
- Beckman, D.L. and Kranz, R.G. (1993) Cytochromes *c* biogenesis in a photosynthetic bacterium requires a periplasmic thioredoxin-like protein. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 90, 2179-2183.
- Bernard, D.G., Gabilly, S.T., Dujardin, G., Merchant, S. and Hamel, P.P. (2003) Overlapping specificities of the mitochondrial cytochrome *c* and *c*₁ heme lyases. *J. Biol Chem.*, 278, 49732-49742.
- Bernard, D.G., Quevillon-Cheruel, S., Merchant, S., Guiard, B. and Hamel, P.P. (2005) Cyc2p, a membrane-bound flavoprotein involved in the maturation of mitochondrial *c*-type cytochromes. *J Biol Chem*, 280, 39852-39859.
- Bonnard, G. and Grienenberger, J.M. (1995) A gene proposed to encode a transmembrane domain of an ABC transporter is expressed in wheat mitochondria. *Mol Gen Genet*, 246, 91-99.
- Boxma, B., de Graaf, R.M., van der Staay, G.W., van Alen, T.A., Ricard, G., Gabaldon, T., van Hoek, A.H., Moon-van der Staay, S.Y., Koopman, W.J., van Hellemond, J.J., Tielens, A.G., Friedrich, T., Veenhuis, M., Huynen, M.A. and Hackstein, J.H. (2005) An anaerobic mitochondrion that produces hydrogen. *Nature*, 434, 74-79.
- Brody, S., Oh, C., Hoja, U. and Schweizer, E. (1997) Mitochondrial acyl carrier protein is involved in lipoic acid synthesis in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 408, 217-220.
- Bullerwell, C.E. and Gray, M.W. (2004) Evolution of the mitochondrial genome: protist connections to animals, fungi and plants. *Curr Opin Microbiol*, 7, 528-534.
- Burke, P.V., Raitt, D.C., Allen, L.A., Kellogg, E.A. and Poyton, R.O. (1997) Effects of oxygen concentration on the expression of cytochrome *c* and cytochrome *c* oxidase genes in yeast. *J Biol Chem*, 272, 14705-14712.
- Burri, L., Vascotto, K., Fredersdorf, S., Tiedt, R., Hall, M.N. and Lithgow, T. (2004) Zim17, a novel zinc finger protein essential for protein import into mitochondria. *J Biol Chem*, 279, 50243-50249.
- Bushnell, G.W., Louie, G.V. and Brayer, G.D. (1990) High-resolution three-dimensional structure of horse heart cytochrome *c*. *J Mol Biol*, 214, 585-595.

-C-

- Chacinska, A., Lind, M., Frazier, A.E., Dudek, J., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H.E., Truscott, K.N., Guiard, B., Pfanner, N. and Rehling, P. (2005) Mitochondrial presequence translocase: switching between TOM tethering and motor recruitment involves Tim21 and Tim17. *Cell*, 120, 817-829.
- Chacinska, A., Pfannschmidt, S., Wiedemann, N., Kozjak, V., Sanjuan Szklarz, L.K., Schulze-Specking, A., Truscott, K.N., Guiard, B., Meisinger, C. and Pfanner, N. (2004) Essential role of Mia40 in import and assembly of mitochondrial intermembrane space proteins. *Embo J*, 23, 3735-3746.
- Chen, J.J. and London, I.M. (1995) Regulation of protein synthesis by heme-regulated eIF-2 alpha kinase. *Trends Biochem Sci*, 20, 105-108.
- Cheng, M.Y., Hartl, F.U., Martin, J., Pollock, R.A., Kalousek, F., Neupert, W., Hallberg, E.M., Hallberg, R.L. and Horwich, A.L. (1989) Mitochondrial heat-shock protein hsp60 is essential for assembly of proteins imported into yeast mitochondria. *Nature*, 337, 620-625.
- Cianciotto, N.P., Cornelis, P. and Baysse, C. (2005) Impact of the bacterial type I cytochrome *c* maturation system on different biological processes. *Mol Microbiol*, 56, 1408-1415.

- Cook, G.M. and Poole, R.K. (2000) Oxidase and periplasmic cytochrome assembly in *Escherichia coli* K-12: CydDC and CcmAB are not required for haem-membrane association. *Microbiology*, 146 (Pt 2), 527-536.
- Corral-Debrinski, M., Blugeon, C. and Jacq, C. (2000) In yeast, the 3' untranslated region or the presequence of ATM1 is required for the exclusive localization of its mRNA to the vicinity of mitochondria. *Mol Cell Biol*, 20, 7881-7892.
- Crow, A., Acheson, R.M., Le Brun, N.E. and Oubrie, A. (2004) Structural basis of Redox-coupled protein substrate selection by the cytochrome *c* biosynthesis protein ResA. *J Biol Chem*, 279, 23654-23660.
- Crow, A., Le Brun, N.E. and Oubrie, A. (2005) The role of ResA in type II cytochrome *c* maturation. *Biochem Soc Trans*, 33, 149-151.
- Csukai, M., Murray, M. and Orr, E. (1994) Isolation and complete sequence of CBR, a gene encoding a putative cytochrome *b* reductase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 219, 441-448.

-D-

- D'Silva, P., Liu, Q., Walter, W. and Craig, E.A. (2004) Regulated interactions of mtHsp70 with Tim44 at the translocon in the mitochondrial inner membrane. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 1084-1091.
- Dailey, H.A. (2002) Terminal steps of haem biosynthesis. *Biochem Soc Trans*, 30, 590-595.
- Daltrop, O., Allen, J.W., Willis, A.C. and Ferguson, S.J. (2002) In vitro formation of a *c*-type cytochrome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 99, 7872-7876.
- Daltrop, O. and Ferguson, S.J. (2003) Cytochrome *c* maturation. The in vitro reactions of horse heart apocytochrome *c* and *Paracoccus denitrificans* apocytochrome *c*₅₅₀ with heme. *J Biol Chem*, 278, 4404-4409.
- de Vitry, C., Desbois, A., Redeker, V., Zito, F. and Wollman, F.A. (2004) Biochemical and spectroscopic characterization of the covalent binding of heme to cytochrome *b*₆. *Biochemistry*, 43, 3956-3968.
- Deshmukh, M., Brasseur, G. and Daldal, F. (2000) Novel *Rhodobacter capsulatus* genes required for the biogenesis of various *c*-type cytochromes. *Mol Microbiol*, 35, 123-138.
- Deshmukh, M., Turkarlan, S., Astor, D., Valkova-Valchanova, M. and Daldal, F. (2003) The dithiol:disulfide oxidoreductases DsbA and DsbB of *Rhodobacter capsulatus* are not directly involved in cytochrome *c* biogenesis, but their inactivation restores the cytochrome *c* biogenesis defect of CcdA-null mutants. *J Bacteriol*, 185, 3361-3372.
- Diekert, K., de Kroon, A.I., Ahting, U., Niggemeyer, B., Neupert, W., de Kruijff, B. and Lill, R. (2001) Apocytochrome *c* requires the TOM complex for translocation across the mitochondrial outer membrane. *EMBO J.*, 20, 5626-5635.
- Diekert, K., Kispal, G., Guiard, B. and Lill, R. (1999) An internal targeting signal directing proteins into the mitochondrial intermembrane space. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 11752-11757.
- Dreyfuss, B.W., Hamel, P.P., Nakamoto, S.S. and Merchant, S. (2003) Functional analysis of a divergent system II protein, Ccs1, involved in *c*-type cytochrome biogenesis. *J Biol Chem*, 278, 2604-2613.
- Drygas, M.E., Lambowitz, A.M. and Nargang, F.E. (1989) Cloning and analysis of the *Neurospora crassa* gene for cytochrome *c* heme lyase. *J. Biol. Chem.*, 264, 17897-17906.
- Dubaquie, Y., Looser, R. and Rospert, S. (1997) Significance of chaperonin 10-mediated inhibition of ATP hydrolysis by chaperonin 60. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 94, 9011-9016.
- Dudkina, N.V., Eubel, H., Keegstra, W., Boekema, E.J. and Braun, H.P. (2005) Structure of a mitochondrial supercomplex formed by respiratory-chain complexes I and III. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 3225-3229.

- Dumont, M.E., Cardillo, T.S., Hayes, M.K. and Sherman, F. (1991) Role of cytochrome *c* heme lyase in mitochondrial import and accumulation of cytochrome *c* in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol. Cell Biol.*, 11, 5487-5496.
- Dumont, M.E., Ernst, J.F., Hampsey, D.M. and Sherman, F. (1987) Identification and sequence of the gene encoding cytochrome *c* heme lyase in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.*, 6, 235-241.
- Dumont, M.E., Ernst, J.F. and Sherman, F. (1988) Coupling of heme attachment to import of cytochrome *c* into yeast mitochondria. Studies with heme lyase-deficient mitochondria and altered apocytochromes *c*. *J. Biol. Chem.*, 263, 15928-15937.
- Dumont, M.E., Schlichter, J.B., Cardillo, T.S., Hayes, M.K., Bethlenny, G. and Sherman, F. (1993) *CYC2* encodes a factor involved in mitochondrial import of yeast cytochrome *c*. *Mol. Cell Biol.*, 13, 6442-6451.

-E-

- Eaves, D.J., Grove, J., Staudenmann, W., James, P., Poole, R.K., White, S.A., Griffiths, I. and Cole, J.A. (1998) Involvement of products of the *nrfEFG* genes in the covalent attachment of haem *c* to a novel cysteine-lysine motif in the cytochrome *c*₅₅₂ nitrite reductase from *Escherichia coli*. *Mol Microbiol*, 28, 205-216.
- Edeling, M.A., Guddat, L.W., Fabianek, R.A., Halliday, J.A., Jones, A., Thony-Meyer, L. and Martin, J.L. (2001) Crystallization and preliminary diffraction studies of native and selenomethionine CcmG (CycY, DsbE). *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr*, 57, 1293-1295.
- Emtage, J.L. and Jensen, R.E. (1993) MAS6 encodes an essential inner membrane component of the yeast mitochondrial protein import pathway. *J Cell Biol*, 122, 1003-1012.
- Enggist, E., Thony-Meyer, L., Guntert, P. and Pervushin, K. (2002) NMR structure of the heme chaperone CcmE reveals a novel functional motif. *Structure (Camb)*, 10, 1551-1557.
- Enosawa, S. and Ohashi, A. (1986) Localization of enzyme for heme attachment to apocytochrome *c* in yeast mitochondria. *Biochem Biophys Res Commun*, 141, 1145-1150.
- Enosawa, S. and Ohashi, A. (1987) A simple and rapid assay for heme attachment to apocytochrome *c*. *Anal. Biochem.*, 160, 211-216.
- Ephrussi, B. and Slonimski, P.P. (1955) Subcellular units involved in the synthesis of respiratory enzymes in yeast. *Nature*, 176, 1207-1208.
- Erlendsson, L.S., Acheson, R.M., Hederstedt, L. and Le Brun, N.E. (2003) *Bacillus subtilis* ResA is a thiol-disulfide oxidoreductase involved in cytochrome *c* synthesis. *J Biol Chem*, 278, 17852-17858.
- Erlendsson, L.S. and Hederstedt, L. (2002) Mutations in the thiol-disulfide oxidoreductases BdbC and BdbD can suppress cytochrome *c* deficiency of CcdA-defective *Bacillus subtilis* cells. *J Bacteriol*, 184, 1423-1429.

-F-

- Fabianek, R.A., Hennecke, H. and Thony-Meyer, L. (2000) Periplasmic protein thiol:disulfide oxidoreductases of *Escherichia coli*. *FEMS Microbiol Rev*, 24, 303-316.
- Fabianek, R.A., Hofer, T. and Thony-Meyer, L. (1999) Characterization of the *Escherichia coli* CcmH protein reveals new insights into the redox pathway required for cytochrome *c* maturation. *Arch Microbiol*, 171, 92-100.
- Fabianek, R.A., Huber-Wunderlich, M., Glockshuber, R., Kunzler, P., Hennecke, H. and Thony-Meyer, L. (1997) Characterization of the *Bradyrhizobium japonicum* CycY protein, a

membrane-anchored periplasmic thioredoxin that may play a role as a reductant in the biogenesis of *c*-type cytochromes. *J Biol Chem*, 272, 4467-4473.

- Faivre-Nitschke, S.E., Nazoa, P., Gualberto, J.M., Grienenberger, J.M. and Bonnard, G. (2001) Wheat mitochondria *ccmB* encodes the membrane domain of a putative ABC transporter involved in cytochrome *c* biogenesis. *Biochim Biophys Acta*, 1519, 199-208.
- Feissner, R.E., Beckett, C.S., Loughman, J.A. and Kranz, R.G. (2005) Mutations in cytochrome assembly and periplasmic redox pathways in *Bordetella pertussis*. *J Bacteriol*, 187, 3941-3949.
- Ferguson, S.J. (2001) Keilin's cytochromes: how bacteria use them, vary them and make them. *Biochem Soc Trans*, 29, 629-640.
- Frazier, A.E., Dudek, J., Guiard, B., Voos, W., Li, Y., Lind, M., Meisinger, C., Geissler, A., Sickmann, A., Meyer, H.E., Bilanchone, V., Cumsy, M.G., Truscott, K.N., Pfanner, N. and Rehling, P. (2004) Pam16 has an essential role in the mitochondrial protein import motor. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 226-233.
- Fytlovich, S., Gervais, M., Agrimonti, C. and Guiard, B. (1993) Evidence for an interaction between the CYP1(HAP1) activator and a cellular factor during heme-dependent transcriptional regulation in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Embo J*, 12, 1209-1218.

-G-

- Gaballa, A., Baysse, C., Koedam, N., Muyldermans, S. and Cornelis, P. (1998) Different residues in periplasmic domains of the CcmC inner membrane protein of *Pseudomonas fluorescens* ATCC 17400 are critical for cytochrome *c* biogenesis and pyoverdine-mediated iron uptake. *Mol Microbiol*, 30, 547-555.
- Gan, X., Kitakawa, M., Yoshino, K., Oshiro, N., Yonezawa, K. and Isono, K. (2002) Tag-mediated isolation of yeast mitochondrial ribosome and mass spectrometric identification of its new components. *Eur J Biochem*, 269, 5203-5214.
- Giege, P. and Brennicke, A. (1999) RNA editing in Arabidopsis mitochondria effects 441 *c* to U changes in ORFs. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 15324-15329.
- Giege, P., Rayapuram, N., Meyer, E.H., Grienenberger, J.M. and Bonnard, G. (2004) CcmF(C) involved in cytochrome *c* maturation is present in a large sized complex in wheat mitochondria. *FEBS Lett*, 563, 165-169.
- Goldman, B.S., Beck, D.L., Monika, E.M. and Kranz, R.G. (1998) Transmembrane heme delivery systems. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 95, 5003-5008.
- Goldman, B.S., Beckman, D.L., Bali, A., Monika, E.M., Gabbert, K.K. and Kranz, R.G. (1997) Molecular and immunological analysis of an ABC transporter complex required for cytochrome *c* biogenesis. *J Mol Biol*, 268, 724-738.
- Goldman, B.S. and Kranz, R.G. (1998) Evolution and horizontal transfer of an entire biosynthetic pathway for cytochrome *c* biogenesis: *Helicobacter*, *Deinococcus*, Archae and more. *Mol Microbiol*, 27, 871-873.
- Gonzalez, D.H., Bonnard, G. and Grienenberger, J.M. (1993) A gene involved in the biogenesis of *c*-type cytochromes is co-transcribed with a ribosomal protein gene in wheat mitochondria [corrected]. *Curr Genet*, 24, 248-255.
- Graack, H.R. and Wittmann-Liebold, B. (1998) Mitochondrial ribosomal proteins (MRPs) of yeast. *Biochem J*, 329 (Pt 3), 433-448.
- Gray, M.W., Burger, G. and Lang, B.F. (2001) The origin and early evolution of mitochondria. *Genome Biol*, 2, REVIEWS1018.
- Gray, M.W., Lang, B.F. and Burger, G. (2004) Mitochondria of protists. *Annu Rev Genet*, 38, 477-524.

Gumpel, N.J., Ralley, L., Girard-Bascou, J., Wollman, F.A., Nugent, J.H. and Purton, S. (1995) Nuclear mutants of *Chlamydomonas reinhardtii* defective in the biogenesis of the cytochrome *b₆f* complex. *Plant Mol Biol*, 29, 921-932.

-H-

Hakvoort, T.B., Sprinkle, J.R. and Margoliash, E. (1990) Reversible import of apocytochrome *c* into mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 87, 4996-5000.

Hamel, P.P., Dreyfuss, B.W., Xie, Z., Gabilly, S.T. and Merchant, S. (2003) Essential histidine and tryptophan residues in CcsA, a system II polytopic cytochrome *c* biogenesis protein. *J Biol Chem*, 278, 2593-2603.

Harvat, E.M., Stevens, J.M., Redfield, C. and Ferguson, S.J. (2005) Functional characterisation of the *c*-terminal domain of the cytochrome *c* maturation protein CCME. *J Biol Chem*. 280, 36747-53.

Haucke, V., Ocana, C.S., Honlinger, A., Tokatlidis, K., Pfanner, N. and Schatz, G. (1997) Analysis of the sorting signals directing NADH-cytochrome *b₅* reductase to two locations within yeast mitochondria. *Mol Cell Biol*, 17, 4024-4032.

Heazlewood, J.L., Tonti-Filippini, J.S., Gout, A.M., Day, D.A., Whelan, J. and Millar, A.H. (2004) Experimental analysis of the Arabidopsis mitochondrial proteome highlights signaling and regulatory components, provides assessment of targeting prediction programs, and indicates plant-specific mitochondrial proteins. *Plant Cell*, 16, 241-256.

Howe, C.J., Schlarb-Ridley, B.G., Wastl, J., Purton, S. and Bendall, D.S. (2006) The novel cytochrome *c₆* of chloroplasts: a case of evolutionary bricolage? *J Exp Bot*, 57, 13-22.

Howe, G. and Merchant, S. (1994) Role of heme in the biosynthesis of cytochrome *c₆*. *J Biol Chem*, 269, 5824-5832.

-I, J-

Inoue, K., Dreyfuss, B.W., Kindle, K.L., Stern, D.B., Merchant, S. and Sodeinde, O.A. (1997) Ccs1, a nuclear gene required for the post-translational assembly of chloroplast *c*-type cytochromes. *J Biol Chem*, 272, 31747-31754.

Jarosch, E., Tuller, G., Daum, G., Waldherr, M., Voskova, A. and Schweyen, R.J. (1996) Mrs5p, an essential protein of the mitochondrial intermembrane space, affects protein import into yeast mitochondria. *J Biol Chem*, 271, 17219-17225.

John, G.B., Shang, Y., Li, L., Renken, C., Mannella, C.A., Selker, J.M., Rangell, L., Bennett, M.J. and Zha, J. (2005) The mitochondrial inner membrane protein mitofilin controls cristae morphology. *Mol Biol Cell*, 16, 1543-1554.

Jordi, W., Hergersberg, C. and de Kruijff, B. (1992) Bilayer-penetrating properties enable apocytochrome *c* to follow a special import pathway into mitochondria. *Eur J Biochem*, 204, 841-846.

-K-

Kadokura, H., Katzen, F. and Beckwith, J. (2003) Protein disulfide bond formation in prokaryotes. *Annu Rev Biochem*, 72, 111-135.

Katzen, F. and Beckwith, J. (2000) Transmembrane electron transfer by the membrane protein DsbD occurs via a disulfide bond cascade. *Cell*, 103, 769-779.

Katzen, F., Deshmukh, M., Daldal, F. and Beckwith, J. (2002) Evolutionary domain fusion expanded the substrate specificity of the transmembrane electron transporter DsbD. *Embo J*, 21, 3960-3969.

- Kerfeld, C.A. and Krogmann, D.W. (1998) PHOTOSYNTHETIC CYTOCHROMES *c* IN CYANOBACTERIA, ALGAE, AND PLANTS. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol*, 49, 397-425.
- Kitajima-Ihara, T. and Yagi, T. (1998) Rotenone-insensitive internal NADH-quinone oxidoreductase of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria: the enzyme expressed in *Escherichia coli* acts as a member of the respiratory chain in the host cells. *FEBS Lett*, 421, 37-40.
- Knop, M., Siegers, K., Pereira, G., Zachariae, W., Winsor, B., Nasmyth, K. and Schiebel, E. (1999) Epitope tagging of yeast genes using a PCR-based strategy: more tags and improved practical routines. *Yeast*, 15, 963-972.
- Kobayashi, T. and Ito, K. (1999) Respiratory chain strongly oxidizes the CXXC motif of DsbB in the *Escherichia coli* disulfide bond formation pathway. *Embo J*, 18, 1192-1198.
- Koch, M., Breithaupt, C., Kiefersauer, R., Freigang, J., Huber, R. and Messerschmidt, A. (2004) Crystal structure of protoporphyrinogen IX oxidase: a key enzyme in haem and chlorophyll biosynthesis. *Embo J*, 23, 1720-1728.
- Kozjak, V., Wiedemann, N., Milenkovic, D., Lohaus, C., Meyer, H.E., Guiard, B., Meisinger, C. and Pfanner, N. (2003) An essential role of Sam50 in the protein sorting and assembly machinery of the mitochondrial outer membrane. *J Biol Chem*, 278, 48520-48523.
- Kranz, R., Lill, R., Goldman, B., Bonnard, G. and Merchant, S. (1998) Molecular mechanisms of cytochrome *c* biogenesis: three distinct systems. *Mol Microbiol*, 29, 383-396.
- Kranz, R.G., Beckett, C.S. and Goldman, B.S. (2002) Genomic analyses of bacterial respiratory and cytochrome *c* assembly systems: *Bordetella* as a model for the system II cytochrome *c* biogenesis pathway. *Res Microbiol*, 153, 1-6.
- Kumar, S. and Bandyopadhyay, U. (2005) Free heme toxicity and its detoxification systems in human. *Toxicol Lett*, 157, 175-188.
- Kuras, R., de Vitry, C., Choquet, Y., Girard-Bascou, J., Culler, D., Buschlen, S., Merchant, S. and Wollman, F.A. (1997) Molecular genetic identification of a pathway for heme binding to cytochrome *b₆*. *J Biol Chem*, 272, 32427-32435.
- Kurusu, G., Zhang, H., Smith, J.L. and Cramer, W.A. (2003) Structure of the cytochrome *b₆f* complex of oxygenic photosynthesis: tuning the cavity. *Science*, 302, 1009-1014.

-L-

- Labbe-Bois, R. (1990) The ferrochelatase from *Saccharomyces cerevisiae*. Sequence, disruption, and expression of its structural gene HEM15. *J Biol Chem*, 265, 7278-7283.
- Laloi, C., Rayapuram, N., Chartier, Y., Grienenberger, J.M., Bonnard, G. and Meyer, Y. (2001) Identification and characterization of a mitochondrial thioredoxin system in plants. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 14144-14149.
- Lang, B.F., O'Kelly, C., Nerad, T., Gray, M.W. and Burger, G. (2002) The closest unicellular relatives of animals. *Curr Biol*, 12, 1773-1778.
- Lange, H., Kaut, A., Kispal, G. and Lill, R. (2000) A mitochondrial ferredoxin is essential for biogenesis of cellular iron-sulfur proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 1050-1055.
- Lathrop, J.T. and Timko, M.P. (1993) Regulation by heme of mitochondrial protein transport through a conserved amino acid motif. *Science*, 259, 522-525.
- Le Brun, N.E., Bengtsson, J. and Hederstedt, L. (2000) Genes required for cytochrome *c* synthesis in *Bacillus subtilis*. *Mol Microbiol*, 36, 638-650.
- Lee, D., Pervushin, K., Bischof, D., Braun, M. and Thony-Meyer, L. (2005) Unusual heme-histidine bond in the active site of a chaperone. *J Am Chem Soc*, 127, 3716-3717.

- Lee, H.C., Hon, T., Lan, C. and Zhang, L. (2003) Structural environment dictates the biological significance of heme-responsive motifs and the role of Hsp90 in the activation of the heme activator protein Hap1. *Mol Cell Biol*, 23, 5857-5866.
- Lennartz, K., Plucken, H., Seidler, A., Westhoff, P., Bechtold, N. and Meierhoff, K. (2001) HCF164 encodes a thioredoxin-like protein involved in the biogenesis of the cytochrome *b(6)f* complex in *Arabidopsis*. *Plant Cell*, 13, 2539-2551.
- Li, J., Saxena, S., Pain, D. and Dancis, A. (2001) Adrenodoxin reductase homolog (Arh1p) of yeast mitochondria required for iron homeostasis. *J Biol Chem*, 276, 1503-1509.
- Lill, R. and Muhlenhoff, U. (2005) Iron-sulfur-protein biogenesis in eukaryotes. *Trends Biochem Sci*, 30, 133-141.
- Lill, R., Stuart, R.A., Drygas, M.E., Nargang, F.E. and Neupert, W. (1992) Import of cytochrome *c* heme lyase into mitochondria: a novel pathway into the intermembrane space. *EMBO J.*, 11, 449-456.
- Liu, Q., Krzewska, J., Liberek, K. and Craig, E.A. (2001) Mitochondrial Hsp70 Ssc1: role in protein folding. *J Biol Chem*, 276, 6112-6118.
- Longtine, M.S., McKenzie, A., 3rd, Demarini, D.J., Shah, N.G., Wach, A., Brachat, A., Philippsen, P. and Pringle, J.R. (1998) Additional modules for versatile and economical PCR-based gene deletion and modification in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast*, 14, 953-961.
- Louie, G.V. and Brayer, G.D. (1990) High-resolution refinement of yeast iso-1-cytochrome *c* and comparisons with other eukaryotic cytochromes *c*. *J Mol Biol*, 214, 527-555.
- Ludovico, P., Rodrigues, F., Almeida, A., Silva, M.T., Barrientos, A. and Corte-Real, M. (2002) Cytochrome *c* release and mitochondria involvement in programmed cell death induced by acetic acid in *Saccharomyces cerevisiae*. *Mol Biol Cell*, 13, 2598-2606.

-M-

- Madeo, F., Engelhardt, S., Herker, E., Lehmann, N., Maldener, C., Proksch, A., Wissing, S. and Frohlich, K.U. (2002a) Apoptosis in yeast: a new model system with applications in cell biology and medicine. *Curr Genet*, 41, 208-216.
- Madeo, F., Herker, E., Maldener, C., Wissing, S., Lachelt, S., Herlan, M., Fehr, M., Lauber, K., Sigrist, S.J., Wesselborg, S. and Frohlich, K.U. (2002b) A caspase-related protease regulates apoptosis in yeast. *Mol Cell*, 9, 911-917.
- Madeo, F., Herker, E., Wissing, S., Jungwirth, H., Eisenberg, T. and Frohlich, K.U. (2004) Apoptosis in yeast. *Curr Opin Microbiol*, 7, 655-660.
- Mannella, C.A. (2006) The relevance of mitochondrial membrane topology to mitochondrial function. *Biochim Biophys Acta*, 1762(2):140-7.
- Margeot, A., Garcia, M., Wang, W., Tetaud, E., di Rago, J.P. and Jacq, C. (2005) Why are many mRNAs translated to the vicinity of mitochondria: a role in protein complex assembly? *Gene*, 354, 64-71.
- Marohnic, C.C., Bewley, M.C. and Barber, M.J. (2003) Engineering and characterization of a NADPH-utilizing cytochrome *b₅* reductase. *Biochemistry*, 42, 11170-11182.
- Martin, W. (2005) The missing link between hydrogenosomes and mitochondria. *Trends Microbiol.*
- Matner, R.R. and Sherman, F. (1982) Differential accumulation of two apo-iso-cytochromes *c* in processing mutants of yeast. *J. Biol. Chem.*, 257, 9811-9821.
- Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B. and Eisenhaber, F. (2002a) N-terminal N-myristoylation of proteins: prediction of substrate proteins from amino acid sequence. *J Mol Biol*, 317, 541-557.
- Maurer-Stroh, S., Eisenhaber, B. and Eisenhaber, F. (2002b) N-terminal N-myristoylation of proteins: refinement of the sequence motif and its taxon-specific differences. *J Mol Biol*, 317, 523-540.

- Mayer, A., Neupert, W. and Lill, R. (1995) Translocation of apocytochrome *c* across the outer membrane of mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 270, 12390-12397.
- Meisinger, C., Rissler, M., Chacinska, A., Szklarz, L.K., Milenkovic, D., Kozjak, V., Schonfisch, B., Lohaus, C., Meyer, H.E., Yaffe, M.P., Guiard, B., Wiedemann, N. and Pfanner, N. (2004) The mitochondrial morphology protein Mdm10 functions in assembly of the preprotein translocase of the outer membrane. *Dev Cell*, 7, 61-71.
- Mesecke, N., Terziyska, N., Kozany, C., Baumann, F., Neupert, W., Hell, K. and Herrmann, J.M. (2005) A disulfide relay system in the intermembrane space of mitochondria that mediates protein import. *Cell*, 121, 1059-1069.
- Metheringham, R., Griffiths, L., Crooke, H., Forsythe, S. and Cole, J. (1995) An essential role for DsbA in cytochrome *c* synthesis and formate-dependent nitrite reduction by *Escherichia coli* K-12. *Arch Microbiol*, 164, 301-307.
- Meyer, E.H., Giege, P., Gelhaye, E., Rayapuram, N., Ahuja, U., Thony-Meyer, L., Grienenberger, J.M. and Bonnard, G. (2005) AtCCMH, an essential component of the *c*-type cytochrome maturation pathway in Arabidopsis mitochondria, interacts with apocytochrome *c*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102:16113-8.
- Miao, B., Davis, J.E. and Craig, E.A. (1997) Mge1 functions as a nucleotide release factor for Ssc1, a mitochondrial Hsp70 of *Saccharomyces cerevisiae*. *J Mol Biol*, 265, 541-552.
- Milenkovic, D., Kozjak, V., Wiedemann, N., Lohaus, C., Meyer, H.E., Guiard, B., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2004) Sam35 of the mitochondrial protein sorting and assembly machinery is a peripheral outer membrane protein essential for cell viability. *J Biol Chem*, 279, 22781-22785.
- Miranda-Vizuete, A., Damdimopoulos, A.E. and Spyrou, G. (2000) The mitochondrial thioredoxin system. *Antioxid Redox Signal*, 2, 801-810.
- Mokranjac, D., Sichting, M., Neupert, W. and Hell, K. (2003) Tim14, a novel key component of the import motor of the TIM23 protein translocase of mitochondria. *Embo J*, 22, 4945-4956.
- Moraes, C.T., Diaz, F. and Barrientos, A. (2004) Defects in the biosynthesis of mitochondrial heme *c* and heme *a* in yeast and mammals. *Biochim Biophys Acta*, 1659, 153-159.
- Muhlenhoff, U., Balk, J., Richhardt, N., Kaiser, J.T., Sipos, K., Kispal, G. and Lill, R. (2004) Functional characterization of the eukaryotic cysteine desulfurase Nfs1p from *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 279, 36906-36915.
- Muhlenhoff, U., Gerber, J., Richhardt, N. and Lill, R. (2003) Components involved in assembly and dislocation of iron-sulfur clusters on the scaffold protein Isu1p. *Embo J*, 22, 4815-4825.
- Murphy, M.P., Leuenberger, D., Curran, S.P., Oppliger, W. and Koehler, C.M. (2001) The essential function of the small Tim proteins in the TIM22 import pathway does not depend on formation of the soluble 70-kilodalton complex. *Mol Cell Biol*, 21, 6132-6138.
- Myers, C.R. and Myers, J.M. (2004) The outer membrane cytochromes of *Shewanella oneidensis* MR-1 are lipoproteins. *Lett Appl Microbiol*, 39, 466-470.

-N-

- Nakai, Y., Umeda, N., Suzuki, T., Nakai, M., Hayashi, H., Watanabe, K. and Kagamiyama, H. (2004) Yeast Nfs1p is involved in thio-modification of both mitochondrial and cytoplasmic tRNAs. *J Biol Chem*, 279, 12363-12368.
- Nargang, F.E., Drygas, M.E., Kwong, P.L., Nicholson, D.W. and Neupert, W. (1988) A mutant of *Neurospora crassa* deficient in cytochrome *c* heme lyase activity cannot import cytochrome *c* into mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 263, 9388-9394.
- Nicholson, D.W., Hergersberg, C. and Neupert, W. (1988) Role of cytochrome *c* heme lyase in the import of cytochrome *c* into mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 263, 19034-19042.

- Nicholson, D.W., Kohler, H. and Neupert, W. (1987) Import of cytochrome *c* into mitochondria. Cytochrome *c* heme lyase. *Eur. J. Biochem.*, 164, 147-157.
- Nicholson, D.W. and Neupert, W. (1989) Import of cytochrome *c* into mitochondria: reduction of heme, mediated by NADH and flavin nucleotides, is obligatory for its covalent linkage to apocytochrome *c*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 86, 4340-4344.
- Nicholson, D.W., Stuart, R.A. and Neupert, W. (1989) Biogenesis of cytochrome *c*₁. Role of cytochrome *c*₁ heme lyase and of the two proteolytic processing steps during import into mitochondria. *J. Biol. Chem.*, 264, 10156-10168.
- Nishida, H., Inaka, K., Yamanaka, M., Kaida, S., Kobayashi, K. and Miki, K. (1995) Crystal structure of NADH-cytochrome *b*₅ reductase from pig liver at 2.4 Å resolution. *Biochemistry*, 34, 2763-2767.

-O-

- Ogawa, K., Sun, J., Taketani, S., Nakajima, O., Nishitani, C., Sassa, S., Hayashi, N., Yamamoto, M., Shibahara, S., Fujita, H. and Igarashi, K. (2001) Heme mediates derepression of Maf recognition element through direct binding to transcription repressor Bach1. *Embo J*, 20, 2835-2843.
- Okamoto, K. and Shaw, J.M. (2005) Mitochondrial Morphology and Dynamics in Yeast and Multicellular Eukaryotes. *Annu Rev Genet*, 39:503-36.
- Ortenberg, R. and Beckwith, J. (2003) Functions of thiol-disulfide oxidoreductases in *E. coli*: redox myths, realities, and practicalities. *Antioxid Redox Signal*, 5, 403-411.

-P-

- Page, M.D. and Ferguson, S.J. (1999) Mutational analysis of the *Paracoccus denitrificans* *c*-type cytochrome biosynthetic genes *ccmABCDG*: disruption of *ccmC* has distinct effects suggesting a role for *CcmC* independent of *CcmAB*. *Microbiology*, 145 (Pt 11), 3047-3057.
- Page, M.D., Pearce, D.A., Norris, H.A. and Ferguson, S.J. (1997) The *Paracoccus denitrificans* *ccmA*, *B* and *c* genes: cloning and sequencing, and analysis of the potential of their products to form a haem or apo- *c*-type cytochrome transporter. *Microbiology*, 143 (Pt 2), 563-576.
- Page, M.L., Hamel, P.P., Gabilly, S.T., Zegzouti, H., Perea, J.V., Alonso, J.M., Ecker, J.R., Theg, S.M., Christensen, S.K. and Merchant, S. (2004) A homolog of prokaryotic thiol disulfide transporter *CcdA* is required for the assembly of the cytochrome *b₆f* complex in *Arabidopsis* chloroplasts. *J Biol Chem*, 279, 32474-32482.
- Panek, H. and O'Brian, M.R. (2002) A whole genome view of prokaryotic haem biosynthesis. *Microbiology*, 148, 2273-2282.
- Paumard, P., Vaillier, J., Couлары, B., Schaeffer, J., Soubannier, V., Mueller, D.M., Brethes, D., di Rago, J.P. and Velours, J. (2002) The ATP synthase is involved in generating mitochondrial cristae morphology. *Embo J*, 21, 221-230.
- Pearce, D.A., Cardillo, T.S. and Sherman, F. (1998) *Cyc2p* is required for maintaining ionic stability and efficient cytochrome *c* import and mitochondrial function in *Saccharomyces cerevisiae*. *FEBS Lett*, 439, 307-311.
- Pearce, D.A. and Sherman, F. (1995) Degradation of cytochrome oxidase subunits in mutants of yeast lacking cytochrome *c* and suppression of the degradation by mutation of *yme1*. *J Biol Chem*, 270, 20879-20882.
- Pearce, D.A. and Sherman, F. (1997) Differential ubiquitin-dependent degradation of the yeast apocytochrome *c* isozymes. *J Biol Chem*, 272, 31829-31836.
- Pedrajas, J.R., Kosmidou, E., Miranda-Vizuete, A., Gustafsson, J.A., Wright, A.P. and Spyrou, G. (1999) Identification and functional characterization of a novel mitochondrial thioredoxin system in *Saccharomyces cerevisiae*. *J Biol Chem*, 274, 6366-6373.

- Pfanner, N. (2000) Protein sorting: recognizing mitochondrial presequences. *Curr Biol*, 10, R412-415.
- Pfanner, N., Wiedemann, N., Meisinger, C. and Lithgow, T. (2004) Assembling the mitochondrial outer membrane. *Nat Struct Mol Biol*, 11, 1044-1048.
- Pfeifer, K., Kim, K.S., Kogan, S. and Guarente, L. (1989) Functional dissection and sequence of yeast HAP1 activator. *Cell*, 56, 291-301.
- Pollock, W.B., Rosell, F.I., Twitchett, M.B., Dumont, M.E. and Mauk, A.G. (1998) Bacterial expression of a mitochondrial cytochrome *c*. Trimethylation of lys72 in yeast iso-1-cytochrome *c* and the alkaline conformational transition. *Biochemistry*, 37, 6124-6131.
- Prakash, S.K., Cormier, T.A., McCall, A.E., Garcia, J.J., Sierra, R., Haupt, B., Zoghbi, H.Y. and Van Den Veyver, I.B. (2002) Loss of holocytochrome *c*-type synthetase causes the male lethality of X-linked dominant micro-phthalmia with linear skin defects (MLS) syndrome. *Hum. Mol. Genet.*, 11, 3237-3348.
- Priest, J.W. and Hajduk, S.L. (2003) Trypanosoma brucei cytochrome *c*₁ is imported into mitochondria along an unusual pathway. *J Biol Chem*, 278, 15084-15094.
- Prokisch, H., Scharfe, C., Camp, D.G., 2nd, Xiao, W., David, L., Andreoli, C., Monroe, M.E., Moore, R.J., Gritsenko, M.A., Kozany, C., Hixson, K.K., Mottaz, H.M., Zischka, H., Ueffing, M., Herman, Z.S., Davis, R.W., Meitinger, T., Oefner, P.J., Smith, R.D. and Steinmetz, L.M. (2004) Integrative analysis of the mitochondrial proteome in yeast. *PLoS Biol*, 2, e160.

-R-

- Rao, A.U., Carta, L.K., Lesuisse, E. and Hamza, I. (2005) Lack of heme synthesis in a free-living eukaryote. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 102, 4270-4275.
- Rapaport, D. and Neupert, W. (1999) Biogenesis of Tom40, core component of the TOM complex of mitochondria. *J Cell Biol*, 146, 321-331.
- Rehling, P., Brandner, K. and Pfanner, N. (2004) Mitochondrial import and the twin-pore translocase. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 519-530.
- Ren, Q., Ahuja, U. and Thony-Meyer, L. (2002) A bacterial cytochrome *c* heme lyase. CcmF forms a complex with the heme chaperone CcmE and CcmH but not with apocytochrome *c*. *J Biol Chem*, 277, 7657-7663.
- Ren, Q. and Thony-Meyer, L. (2001) Physical interaction of CcmC with heme and the heme chaperone CcmE during cytochrome *c* maturation. *J Biol Chem*, 276, 32591-32596.
- Rissler, M., Wiedemann, N., Pfannschmidt, S., Gabriel, K., Guiard, B., Pfanner, N. and Chacinska, A. (2005) The Essential Mitochondrial Protein Erv1 Cooperates with Mia40 in Biogenesis of Intermembrane Space Proteins. *J Mol Biol*, 353, 485-492.
- Rodgers, K.R. (1999) Heme-based sensors in biological systems. *Curr Opin Chem Biol*, 3, 158-167.
- Rostovtseva, T.K., Tan, W. and Colombini, M. (2005) On the role of VDAC in apoptosis: fact and fiction. *J Bioenerg Biomembr*, 37, 129-142.
- Rothstein, R.J. and Sherman, F. (1980) Genes affecting the expression of cytochrome *c* in yeast: genetic mapping and genetic interactions. *Genetics*, 94, 871-889.
- Rouault, T.A. and Tong, W.H. (2005) Iron-sulphur cluster biogenesis and mitochondrial iron homeostasis. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 6, 345-351.

-S-

- Saint-Georges, Y., Hamel, P., Lemaire, C. and Dujardin, G. (2001) Role of positively charged transmembrane segments in the insertion and assembly of mitochondrial inner-membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 13814-13819.
- Sambongi, Y. and Ferguson, S.J. (1994) Specific thiol compounds complement deficiency in *c*-type cytochrome biogenesis in *Escherichia coli* carrying a mutation in a membrane-bound disulphide isomerase-like protein. *FEBS Lett*, 353, 235-238.
- Sambongi, Y. and Ferguson, S.J. (1996) Mutants of *Escherichia coli* lacking disulphide oxidoreductases DsbA and DsbB cannot synthesise an exogenous monohaem *c*-type cytochrome except in the presence of disulphide compounds. *FEBS Lett*, 398, 265-268.
- Sanchez, N.S., Pearce, D.A., Cardillo, T.S., Uribe, S. and Sherman, F. (2001) Requirements of Cyc2p and the porin, Por1p, for ionic stability and mitochondrial integrity in *Saccharomyces cerevisiae*. *Arch Biochem Biophys*, 392, 326-332.
- Sato, H. and Miyakawa, I. (2004) A 22 kDa protein specific for yeast mitochondrial nucleoids is an unidentified putative ribosomal protein encoded in open reading frame YGL068W. *Protoplasma*, 223, 175-182.
- Saveanu, C., Fromont-Racine, M., Harington, A., Ricard, F., Namane, A. and Jacquier, A. (2001) Identification of 12 new yeast mitochondrial ribosomal proteins including 6 that have no prokaryotic homologues. *J Biol Chem*, 276, 15861-15867.
- Schaefer, L., Ballabio, A. and Zoghbi, H.Y. (1996) Cloning and characterization of a putative human holocytochrome *c*-type synthetase gene (HCCS) isolated from the critical region for microphthalmia with linear skin defect (MLS). *Genomics*, 34, 166-172.
- Schagger, H. and Pfeiffer, K. (2000) Supercomplexes in the respiratory chains of yeast and mammalian mitochondria. *Embo J*, 19, 1777-1783.
- Schiott, T., Throne-Holst, M. and Hederstedt, L. (1997a) *Bacillus subtilis* CcdA-defective mutants are blocked in a late step of cytochrome *c* biogenesis. *J Bacteriol*, 179, 4523-4529.
- Schiott, T., von Wachenfeldt, C. and Hederstedt, L. (1997b) Identification and characterization of the *ccdA* gene, required for cytochrome *c* synthesis in *Bacillus subtilis*. *J Bacteriol*, 179, 1962-1973.
- Schulz, H., Fabianek, R.A., Pelliccioli, E.C., Hennecke, H. and Thony-Meyer, L. (1999) Heme transfer to the heme chaperone CcmE during cytochrome *c* maturation requires the CcmC protein, which may function independently of the ABC-transporter CcmAB. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 96, 6462-6467.
- Schulz, H., Hennecke, H. and Thony-Meyer, L. (1998) Prototype of a heme chaperone essential for cytochrome *c* maturation. *Science*, 281, 1197-1200.
- Schulz, H., Pelliccioli, E.C. and Thony-Meyer, L. (2000) New insights into the role of CcmC, CcmD and CcmE in the haem delivery pathway during cytochrome *c* maturation by a complete mutational analysis of the conserved tryptophan-rich motif of CcmC. *Mol Microbiol*, 37, 1379-1388.
- Schwarz, Q.P. and Cox, T.C. (2002) Complementation of a yeast CYC3 deficiency identifies an X-linked mammalian activator of apocytochrome *c*. *Genomics*, 79, 51-57.
- Shayeghi, M., Latunde-Dada, G.O., Oakhill, J.S., Laftah, A.H., Takeuchi, K., Halliday, N., Khan, Y., Warley, A., McCann, F.E., Hider, R.C., Frazer, D.M., Anderson, G.J., Vulpe, C.D., Simpson, R.J. and McKie, A.T. (2005) Identification of an intestinal heme transporter. *Cell*, 122, 789-801.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schonfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N. and Meisinger, C. (2003) The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 100, 13207-13212.
- Soll, J. and Schleiff, E. (2004) Protein import into chloroplasts. *Nat Rev Mol Cell Biol*, 5, 198-208.

- Spielewoy, N., Schulz, H., Grienberger, J.M., Thony-Meyer, L. and Bonnard, G. (2001) CCME, a nuclear-encoded heme-binding protein involved in cytochrome *c* maturation in plant mitochondria. *J Biol Chem*, 276, 5491-5497.
- Steiner, H., Kispal, G., Zollner, A., Haid, A., Neupert, W. and Lill, R. (1996) Heme binding to a conserved Cys-Pro-Val motif is crucial for the catalytic function of mitochondrial heme lyases. *J Biol Chem*, 271, 32605-32611.
- Steiner, H., Zollner, A., Haid, A., Neupert, W. and Lill, R. (1995) Biogenesis of mitochondrial heme lyases in yeast. Import and folding in the intermembrane space. *J Biol Chem*, 270, 22842-22849.
- Stevens, J.M., Daltrop, O., Allen, J.W. and Ferguson, S.J. (2004) *c*-type cytochrome formation: chemical and biological enigmas. *Acc Chem Res*, 37, 999-1007.
- Stevens, J.M., Uchida, T., Daltrop, O. and Ferguson, S.J. (2005) Covalent cofactor attachment to proteins: cytochrome *c* biogenesis. *Biochem Soc Trans*, 33, 792-795.
- Stroebel, D., Choquet, Y., Popot, J.L. and Picot, D. (2003) An atypical haem in the cytochrome *b(6)f* complex. *Nature*, 426, 413-418.
- Stuart, R.A. and Neupert, W. (1990) Apocytochrome *c*: an exceptional mitochondrial precursor protein using an exceptional import pathway. *Biochimie*, 72, 115-121.
- Sylvestre, J., Margeot, A., Jacq, C., Dujardin, G. and Corral-Debrinski, M. (2003a) The role of the 3' untranslated region in mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is conserved from yeast to human cells. *Mol Biol Cell*, 14, 3848-3856.
- Sylvestre, J., Vialette, S., Corral Debrinski, M. and Jacq, C. (2003b) Long mRNAs coding for yeast mitochondrial proteins of prokaryotic origin preferentially localize to the vicinity of mitochondria. *Genome Biol*, 4, R44.

-T-

- Taylor, S.W., Fahy, E., Zhang, B., Glenn, G.M., Warnock, D.E., Wiley, S., Murphy, A.N., Gaucher, S.P., Capaldi, R.A., Gibson, B.W. and Ghosh, S.S. (2003) Characterization of the human heart mitochondrial proteome. *Nat Biotechnol*, 21, 281-286.
- Thony-Meyer, L. (2002) Cytochrome *c* maturation: a complex pathway for a simple task? *Biochem Soc Trans*, 30, 633-638.
- Thony-Meyer, L., Fischer, F., Kunzler, P., Ritz, D. and Hennecke, H. (1995) *Escherichia coli* genes required for cytochrome *c* maturation. *J Bacteriol*, 177, 4321-4326.
- Thony-Meyer, L. and Kunzler, P. (1997) Translocation to the periplasm and signal sequence cleavage of preapocytochrome *c* depend on *sec* and *lep*, but not on the *ccm* gene products. *Eur J Biochem*, 246, 794-799.
- Throne-Holst, M., Thony-Meyer, L. and Hederstedt, L. (1997) *Escherichia coli* *ccm* in-frame deletion mutants can produce periplasmic cytochrome *b* but not cytochrome *c*. *FEBS Lett*, 410, 351-355.
- Tichy, M. and Vermaas, W. (1999) Accumulation of pre-apocytochrome *f* in a *Synechocystis* sp. PCC 6803 mutant impaired in cytochrome *c* maturation. *J Biol Chem*, 274, 32396-32401.
- Tokatlidis, K. (2005) A disulfide relay system in mitochondria. *Cell*, 121, 965-967.
- Tomlinson, E.J. and Ferguson, S.J. (2000a) Conversion of a *c* type cytochrome to a *b* type that spontaneously forms in vitro from apo protein and heme: implications for *c* type cytochrome biogenesis and folding. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 97, 5156-5160.
- Tomlinson, E.J. and Ferguson, S.J. (2000b) Loss of either of the two heme-binding cysteines from a class I *c*-type cytochrome has a surprisingly small effect on physicochemical properties. *J Biol Chem*, 275, 32530-32534.
- Tong, J. and Margoliash, E. (1998) Cytochrome *c* heme lyase activity of yeast mitochondria. *J Biol Chem*, 273, 25695-25702.

- Towler, D.A., Gordon, J.I., Adams, S.P. and Glaser, L. (1988) The biology and enzymology of eukaryotic protein acylation. *Annu Rev Biochem*, 57, 69-99.
- Trotter, E.W. and Grant, C.M. (2005) Overlapping roles of the cytoplasmic and mitochondrial redox regulatory systems in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *Eukaryot Cell*, 4, 392-400.
- Tyagarajan, K., Pretzer, E. and Wiktorowicz, J.E. (2003) Thiol-reactive dyes for fluorescence labeling of proteomic samples. *Electrophoresis*, 24, 2348-2358.

-U, V-

- Uchida, T., Stevens, J.M., Daltrop, O., Harvat, E.M., Hong, L., Ferguson, S.J. and Kitagawa, T. (2004) The interaction of covalently bound heme with the cytochrome *c* maturation protein CcmE. *J Biol Chem*, 279, 51981-51988.
- Unsel, M., Marienfeld, J.R., Brandt, P. and Brennicke, A. (1997) The mitochondrial genome of *Arabidopsis thaliana* contains 57 genes in 366,924 nucleotides. *Nat Genet*, 15, 57-61.
- Urban-Grimal, D., Volland, C., Garnier, T., Dehoux, P. and Labbe-Bois, R. (1986) The nucleotide sequence of the HEM1 gene and evidence for a precursor form of the mitochondrial 5-aminolevulinic synthase in *Saccharomyces cerevisiae*. *Eur J Biochem*, 156, 511-519.
- Veloso, D., Juillerat, M. and Taniuch, i.H. (1984) Synthesis of a heme fragment of horse cytochrome *c* which forms a productive complex with a native apofragment. *J. Biol. Chem.*, 258, 10963-10966.
- Voisine, C., Cheng, Y.C., Ohlson, M., Schilke, B., Hoff, K., Beinert, H., Marszalek, J. and Craig, E.A. (2001) Jac1, a mitochondrial J-type chaperone, is involved in the biogenesis of Fe/S clusters in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, 1483-1488.

-W-

- Wachter, C., Schatz, G. and Glick, B.S. (1992) Role of ATP in the intramitochondrial sorting of cytochrome *c*₁ and the adenine nucleotide translocator. *EMBO J.*, 11, 4787-4794.
- Wain, R., Redfield, C., Ferguson, S.J. and Smith, L.J. (2004) NMR analysis shows that a b-type variant of *Hydrogenobacter thermophilus* cytochrome *c*₅₅₂ retains its native structure. *J Biol Chem*, 279, 15177-15182.
- Wandersman, C. and Delepelaire, P. (2004) Bacterial iron sources: from siderophores to hemophores. *Annu Rev Microbiol*, 58, 611-647.
- Wang, X., Dumont, M.E. and Sherman, F. (1996) Sequence requirements for mitochondrial import of yeast cytochrome *c*. *J. Biol. Chem.*, 271, 6594-6604.
- Wastl, J., Purton, S., Bendall, D.S. and Howe, C.J. (2004) Two forms of cytochrome *c*₆ in a single eukaryote. *Trends Plant Sci*, 9, 474-476.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Prinz, T., Ryan, M.T., Meisinger, C., Pfanner, N. and Truscott, K.N. (2003a) Biogenesis of yeast mitochondrial cytochrome *c*: a unique relationship to the TOM machinery. *J. Mol. Biol.*, 327, 465-474.
- Wiedemann, N., Kozjak, V., Prinz, T., Ryan, M.T., Meisinger, C., Pfanner, N. and Truscott, K.N. (2003b) Biogenesis of yeast mitochondrial cytochrome *c*: a unique relationship to the TOM machinery. *J Mol Biol*, 327, 465-474.
- Wijayanti, N., Katz, N. and Immenschuh, S. (2004) Biology of heme in health and disease. *Curr Med Chem*, 11, 981-986.
- Wissing, S., Ludovico, P., Herker, E., Buttner, S., Engelhardt, S.M., Decker, T., Link, A., Proksch, A., Rodrigues, F., Corte-Real, M., Frohlich, K.U., Manns, J., Cande, C., Sigrist, S.J., Kroemer, G. and Madeo, F. (2004) An AIF orthologue regulates apoptosis in yeast. *J Cell Biol*, 166, 969-974.

Wu, C.K., Dailey, H.A., Rose, J.P., Burden, A., Sellers, V.M. and Wang, B.C. (2001) The 2.0 Å structure of human ferrochelatase, the terminal enzyme of heme biosynthesis. *Nat Struct Biol*, 8, 156-160.

-X,Y-

Xie, Z., Culler, D., Dreyfuss, B.W., Kuras, R., Wollman, F.A., Girard-Bascou, J. and Merchant, S. (1998) Genetic analysis of chloroplast *c*-type cytochrome assembly in *Chlamydomonas reinhardtii*: One chloroplast locus and at least four nuclear loci are required for heme attachment. *Genetics*, 148, 681-692.

Xie, Z. and Merchant, S. (1996) The plastid-encoded *ccsA* gene is required for heme attachment to chloroplast *c*-type cytochromes. *J Biol Chem*, 271, 4632-4639.

Xie, Z. and Merchant, S. (1998) A novel pathway for cytochromes *c* biogenesis in chloroplasts. *Biochim Biophys Acta*, 1365, 309-318.

Yang, M., Jensen, R.E., Yaffe, M.P., Oppliger, W. and Schatz, G. (1988) Import of proteins into yeast mitochondria: the purified matrix processing protease contains two subunits which are encoded by the nuclear *MAS1* and *MAS2* genes. *Embo J*, 7, 3857-3862.

-Z-

Zhang, L. and Guarente, L. (1994) HAP1 is nuclear but is bound to a cellular factor in the absence of heme. *J Biol Chem*, 269, 14643-14647.

Zhang, L. and Guarente, L. (1995) Heme binds to a short sequence that serves a regulatory function in diverse proteins. *Embo J*, 14, 313-320.

Zollner, A., Rodel, G. and Haid, A. (1992) Molecular cloning and characterization of the *Saccharomyces cerevisiae* *CYT2* gene encoding cytochrome *c*₁ heme lyase. *Eur. J. Biochem.*, 207, 1093-1100.

- ANNEXES -

ANNEXE 1

- ALIGNEMENTS DE SEQUENCES PROTEIQUES -

Figure 1 Supplemental data: Conservation of mitochondrial cytochrome *c* and *c*₁ heme lyases

Sequences of cytochrome *c* heme lyases (CCHL) and cytochrome *c*₁ heme lyases (CC₁HL) from *Saccharomyces cerevisiae* (CCHL:P06182, CC₁HL:X67017), *Schizosaccharomyces pombe* (CCHL:NP_596655, CC₁HL:NP_594026), *Candida albicans* (CCHL:P53700, ¹CC₁HL: CA5141), *Neurospora crassa* (CCHL:P14187, ²CC₁HL:NCU08138.1), *Plasmodium falciparum* (CCHL:AAN36323, CC₁HL:NP_701401), ³*Chlamydomonas reinhardtii* (CCHL:genewise.1400.13.1, CC₁HL:genewise.1076.18.1) and holocytochrome *c* synthetase (HCCS) from *Caenorhabditis elegans* (NP_496403), ⁴*Ciona intestinalis* (ci0100146451), *Anopheles gambiae* (EAA06088), *Drosophila melanogaster* (NP_651003), *Danio rerio* (AAH44486), *Xenopus laevis* (AAH45005), *Mus musculus* (NP_032248), *Homo sapiens* (NP_005324), were aligned using the CLUSTALW algorithm (Blosum62 scoring matrix) in Bioedit. The alignment was edited using the GeneDoc multiple alignment editor. The tilde character (~) indicates manual editing of the alignment. Amino-acids strictly conserved in all sequences are shaded red and those conserved in the majority of the sequences (10 of 20) are shaded blue. The heme-regulatory motifs (HRMs), defined by the sequence CPX (X= V, M, I, L, S) are highlighted in yellow. The position of the residues mutated in the suppressor allele *CYC3-9* is indicated in green.

¹ See *Candida albicans* database at <http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/index.html>

² See *Neurospora crassa* database at <http://www-genome.wi.mit.edu/annotation/fungi/neurospora/index.html>

³ See *Chlamydomonas reinhardtii* draft genome at <http://genome.jgi-psf.org/chlre1/chlre1.home.html>

⁴ See *Ciona intestinalis* draft genome sequence at <http://fugu.jgi-psf.org/ciona4/ciona4.home.html>

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	100			
<i>S.cerevisiae_CCHL</i>	:MGWFW	AD.....	32	
<i>S.pombe_CCHL</i>	:	MTSSETTDHPRTGK	CPI~	DHSKFARSNEANP	DAYINGIKK	DQOSSSWNSLWSRNTD	VASEPDVAMLHKKP	STVDTHDHP	LANPPPG	CPMHKAS	NENST	99	
<i>C.albicans_CCHL</i>	:MGWFW	AD~	30	
<i>N.crassa_CCHL</i>	:MGWFW	ADGNASAAAPVV	PPSHKDLAASGAV	PPPS	CPMHNK	TMDALSAHKP	VTPAPEPT	PAAAAPSK	CPVNHGAKD	75	
<i>P.falciparum_CCHL</i>	:	24	
<i>C.reinhardtii_CCHL</i>	:MGN	QO	SASAPP	PATSA	39	
<i>S.cerevisiae_CC1HL</i>	:MMS	SDOQ	30	
<i>S.pombe_CC1HL</i>	:MQPEQL	QEEES	29	
<i>C.albicans_CC1HL</i>	:MS	DSE	QP	31	
<i>N.crassa_CC1HL</i>	:MKEMAG	OAGAG	SED	38	
<i>P.falciparum_CC1HL</i>	:	-	
<i>C.reinhardtii_CC1HL</i>	:MPN	SLA	ATP	11	
<i>C.elegans_HCCS</i>	:MGS	SQ	ST	PKV	Q	32	
<i>C.intestinalis_HCCS</i>	:MGN	S	A	S	T	24	
<i>A.gambiae_HCCS</i>	:	2	
<i>D.melanogaster_HCCS</i>	:MGN	T	A	I	T	26	
<i>D.rerio_HCCS</i>	:MGA	S	V	S	L	A	P	T	I	R	37
<i>X.laewis_HCCS</i>	:MGA	S	A	S	S	A	P	L	Q	S	42
<i>M.musculus_HCCS</i>	:MGA	S	A	S	S	A	P	A	T	A	34
<i>H.sapiens_HCCS</i>	:MGL	S	P	S	A	S	A	P	A	V	30

	*	120	*	140	*	160	*	180	*	200			
<i>S.cerevisiae_CCHL</i>	:SSSSPP	SSE	CPV	52	
<i>S.pombe_CCHL</i>	:	GFFSNL	FGRE	Q	182	
<i>C.albicans_CCHL</i>	:SKL	ASS	P	T	CPV	52	
<i>N.crassa_CCHL</i>	:TLA	AAAA	A	V	APK	108	
<i>P.falciparum_CCHL</i>	:LGC	SDG	T	K	I	Q	38	
<i>C.reinhardtii_CCHL</i>	:YKN	P	A	V	N	V	Y	G	R	I	74
<i>S.cerevisiae_CC1HL</i>	:G	A	T	A	P	45	
<i>S.pombe_CC1HL</i>	:G	K	K	34	
<i>C.albicans_CC1HL</i>	:K	A	A	P	P	V	S	E	E	P	S	72
<i>N.crassa_CC1HL</i>	:A	A	A	A	G	S	T	A	P	S	P	89
<i>P.falciparum_CC1HL</i>	:	1	
<i>C.reinhardtii_CC1HL</i>	:V	P	G	L	R	G	E	R	V	26
<i>C.elegans_HCCS</i>	:G	S	Q	C	P	L	T	P	E	Q	R	66
<i>C.intestinalis_HCCS</i>	:E	C	P	M	S	Q	S	E	T	G	44
<i>A.gambiae_HCCS</i>	:G	N	36	
<i>D.melanogaster_HCCS</i>	:G	S	G	A	P	71	
<i>D.rerio_HCCS</i>	:P	P	K	S	S	80	
<i>X.laewis_HCCS</i>	:A	S	P	V	S	S	A	P	S	T	E	112
<i>M.musculus_HCCS</i>	:Q	R	K	G	CPV	83	
<i>H.sapiens_HCCS</i>	:K	M	K	G	CPV	79	

		*	220	*	240	*	260	*	280	*	300			
<i>S.cerevisiae_CCHL</i>	:	NPLN	NMP	ELAASKQ	PGQKMDLPVDRTI	...SIPKSPDSN	EFWEYPS	POOMYNAMVRK	GKIGGSG : 114		
<i>S.pombe_CCHL</i>	:	DKSN	MMYK	NIPQTAV	DDQVVGLETTRT	SSIPKVDGK	NWEYPS	POOMYNAMWRK	GYRD... : 240		
<i>C.albicans_CCHL</i>	:	NPLN	NMPM	AISSERA	PGQRIKISTERT	ISTIPRGESEDQ	GLWEYPS	POOMLNAMLSK	GKGD... : 113		
<i>N.crassa_CCHL</i>	:	NPLN	YMFS	SISQEPA	PNQAIALPTE	DPSSIPKGTGD	GNWEYPS	POOMYNALLRK	GYTD... : 167		
<i>P.falciparum_CCHL</i>	:	NERN	MMP	EIPNVSLT	DENDFTFNKKRH	VSSIPKNNNE	YWVYPS	SOQFYNSLR	RKND... : 95		
<i>C.reinhardtii_CCHL</i>	:	DPKN	NMPL	EPNQLPC	PGQRKPLSTER	VASNIPKGGTE	STWLFPS	POMVFNALKR	RKG...KGD : 133		
<i>S.cerevisiae_CC,HL</i>	:	.QD	NDKTP	EYHT	TVDLSQSEVST	IPRTN	SDRNWIYPS	EKQFYEAMK	KNWD... : 96		
<i>S.pombe_CC,HL</i>	:	..EV	HDTPT	HPT	MLPTEREIST	IPKVVTE	SDSG...KEE	KWIYPSQOMF	DAMKRKNWN... : 87		
<i>C.albicans_CC,HL</i>	:	TCDS	SKIPN	TLEDTTTT	NIDLPGEREL	SSIPRTS	SNTNWIYPS	OKQFYEAMK	KNWD... : 129		
<i>N.crassa_CC,HL</i>	:	QQQQ	SSSSSS	SWL	PFMSSSS	SGSTTTG	AAAAAGATP	QLNLGEHRE	ISSIPRA	ATTGPSAC	PSNAEQET	GADTSTGNWYPS	EKQFYEAMKR	RKGHDG... : 186
<i>P.falciparum_CC,HL</i>	:	NEQ	KKENINIK	NISNHNSD	GEKSSIP	SKNG	SWYPS	OKQFYNTT	KKKGY... : 53		
<i>C.reinhardtii_CC,HL</i>	:	APPD	KLP	PHQAP	GQQN	WVYPS	EOMFYNAMK	RK...GW : 60		
<i>C.elegans_HCCS</i>	:	NPLN	NELE	HPNQKA	PDQPFALPTK	REKSTIPK	AGTET	ETWYPS	POMFVNAML	KKGWRWQDD : 129	
<i>C.intestinalis_HCCS</i>	:	DPTN	MMP	PPNQPS	PDQPFLLD	TRVSSIPK	GNAPDG	ETWYPS	POMFVNAML	RKGWRWKED : 107	
<i>A.gambiae_HCCS</i>	:	NPLN	MMP	PANQPA	PGQPFLLP	TERQVSSIP	KATTGKQ	EFWYPS	POMFVNAML	RKGWRWEKD : 100	
<i>D.melanogaster_HCCS</i>	:	NPLN	MMP	PANQPA	ADQPFLLP	TDRTSTIPK	VTEGDSV	QFWYPS	POMFVNAML	RKGWRWKTE : 135	
<i>D.erio_HCCS</i>	:	DPTN	MMP	PPNQVA	PDQPFLLS	VKREESKIP	RSSTE	QNWYPS	EOMFVNAML	RKGWRWKDD : 141	
<i>X.laewis_HCCS</i>	:	DPSN	MMP	PPNQTPA	PDQPFLLS	LDREESTIP	RSSTE	KNWYPS	EOMFVNAML	RKGWRWKED : 173	
<i>M.musculus_HCCS</i>	:	DPSN	LMP	PPNQTPS	PDQPFLLS	TSTREESSIP	RADSE	KKWYPS	EOMFVNAML	RKGWKWDD : 144	
<i>H.sapiens_HCCS</i>	:	DPSN	LMP	PPNQTPA	PDQPFLLS	TSTREESSIP	RADSE	KKWYPS	EOMFVNAML	KGWKWDE : 140	

targeting sequence

targeting sequence

		*	320	*	340	*	360	*	380	*	400				
<i>S.cerevisiae_CCHL</i>	:	EVAE	DAVESMVQVHN	FLNE	GCWQE	VL	EWKPH	TDESHVQ	PK	LLKFMGKPGVL	SPRARWMHLCGLLFP... : 181			
<i>S.pombe_CCHL</i>	:	..SGE	NVPI	QVHN	FLNE	GAWSE	IKAWEREAG	ENTE	PK	LLRFEGNANKRT	PRALWYMLGRINP... : 303			
<i>C.albicans_CCHL</i>	:	VVPED	AVESMVQVHN	FLNE	GAWQO	LL	TWEDQY	TQQTKE	PR	LKFTGRPHDLS	SPARMYLWLGLFP... : 180			
<i>N.crassa_CCHL</i>	:	TD	ITAVESMVAVHN	FLNE	GAWNE	IV	EWERRFGKGLMRGWEIMKRG	ENAPMLRRLEAQENDPE	POPT	LIRFOGRPKDM	TPKAA	LLOVLGRIN... : 260			
<i>P.falciparum_CCHL</i>	:	.IDKNY	IDAVSVHNE	EVNE	ESWKQ	LL	KYEHMH	KRSC	TD	VT	LHRFLGKFDDL	SIKARFRSIFSRGKKKN : 163		
<i>C.reinhardtii_CCHL</i>	:	DVTE	DDMGFLAAHNSM	NE	ATWQR	VAQ	WEMLH	RGE	CDT	PT	LLRFQKPHDLS	PLAWVR... : 191		
<i>S.cerevisiae_CC,HL</i>	:	.PNSD	DMKVVP	LHNS	INER	VWNY	IKSWED	KQGE	ACG	..GIK	LTNFKGDSK	KLTPRAWFRSR... : 156		
<i>S.pombe_CC,HL</i>	:	.PHPE	DMKTI	VPI	HNAV	NERAWQD	LLQWE	QO	WGSE	CKG	..GPK	LERFDGNVKK	LTPKARILN... : 146	
<i>C.albicans_CC,HL</i>	:	.PQOE	DMKVI	VPI	HNLV	NERAWKH	ILMWEKPYA	EDTQ	CKG	..GIT	LTSFKGDSK	KLTPRAWLKS... : 191		
<i>N.crassa_CC,HL</i>	:	.ASA	ADMKT	VPI	HNAV	NERAWAE	LLRWEK	FTGE	ACG	EA	PK	LQSFMGESK	RMPKARLNT... : 248	
<i>P.falciparum_CC,HL</i>	:	.FSQ	EDLN	MALK	I	HNAV	NETW	NKIMKKEQKY	FDI	CKE	..OK	LKIFVGYPT	KLSTIKAFMLTLIG... : 114	
<i>C.reinhardtii_CC,HL</i>	:	DPQAE	DMRSV	VG	LHNT	VNEQAW	HQVLA	WERLH	CDE	CAT	..PR	LKRFQGR	PSDLSPKARLL... : 118	
<i>C.elegans_HCCS</i>	:	SLSK	SDMENI	IS	THAN	NEEAW	REVL	KWENLL	HPE	CAE	PK	LKSF	KGDAKNLSPRARFRN... : 188	
<i>C.intestinalis_HCCS</i>	:	EPQO	TDMAHI	IS	THAN	NEQAW	QEL	KWEAFH	AKE	CPCG	PK	LKRF	GKATDFSPRARLR... : 166	
<i>A.gambiae_HCCS</i>	:	DIAQ	DMDDI	IK	THAN	NEQAW	QEL	KWEALH	ARE	CGN	..PR	LKSF	GKATDYSPRAKIR... : 158	
<i>D.melanogaster_HCCS</i>	:	DVSQ	KDMGDI	IR	THAN	NEQAW	QEL	KWEALH	AKE	CGN	..PR	LKSF	GKAKDFSPRARFR... : 193	
<i>D.erio_HCCS</i>	:	TLAP	EDMSNI	IT	HN	RNDQAW	QEL	KWEALH	ASE	CPCG	PS	LKRF	GKAKEFSPRARIR... : 200	
<i>X.laewis_HCCS</i>	:	DLKP	EDMTNI	IK	HN	KNEQAW	SE	ILKWEALH	AKE	CPCG	PS	LVR	F	GKAKEFSPRARMR... : 232
<i>M.musculus_HCCS</i>	:	DISQ	KDMYNI	IR	HN	QNEQAW	KE	ILKWEALH	AHE	CPCG	PS	LVR	F	GKAREYSPRARIR... : 203
<i>H.sapiens_HCCS</i>	:	DISQ	KDMYNI	IR	HN	QNEQAW	KE	ILKWEALH	AAE	CPCG	PS	LIR	F	GKAKEYSPRARIR... : 199

Figure 2 Supplemental data: Alignments of mitochondrial cytochrome *c*₁

Sequences of cytochrome *c*₁ (Cyt1p) from *Saccharomyces cerevisiae* (NP_014708), *Schizosaccharomyces pombe* (CAA18395), ⁵*Candida albicans* (CA0864), *Neurospora crassa* (P07142), *Plasmodium falciparum* (AAN37210), *Chlamydomonas reinhardtii* (AJ417788), *Caenorhabditis elegans* (CAA99820), ⁶*Ciona intestinalis* (ci0100131245), *Anopheles gambiae* (EAA04119), *Drosophila melanogaster* (AAM11126), *Danio rerio* (CA470874), *Xenopus laevis* (AAH45127), *Mus musculus* (NP_079843), *Homo sapiens* (NP_001907), *Euglena gracilis* (P20114) and *Trypanosoma brucei* (AAD19902) were aligned using CLUSTALW algorithm (Blosom62 scoring matrix) in Bioedit software. The alignment was edited in the GeneDoc multiple alignment editor software. Amino-acids strictly conserved in all sequences are shaded red and those conserved in the majority of the sequences (8 of 16) are shaded blue. The cysteine and histidine residues of the heme binding motif (CXXCH or CH) are highlighted in yellow. The position of the residues mutated in the suppressor alleles *CYT1-14*, *CYT1-16* and *CYT1-34* is highlighted in green and indicated with an arrow.

	*	20	*	40	*	60	*	80	*	100		
Cyt1p_ <i>S.cerevisiae</i>	:MFSNLSKRWAQRTLSKSFYSTAT.....									:	23
Cyt1p_ <i>S.pombe</i>	:MFQFVKKKNEFLKFARLGSRAFT.....									:	23
Cyt1p_ <i>C.albicans</i>	:MF.....RTAYKTMNQ.....									:	12
Cyt1p_ <i>N.crassa</i>	:MLARTCLRSTRTFASAKNGAFKFAKRSASTQS.....									:	32
Cyt1p_ <i>P.falciparum</i>	:	MAGGGAMNNLFPGYKDKIWLKLPYHFRLYLIKSWNKNFEKNMFKAKIKNNRIKNLNYIILDKFKPNEFNKNTHTDYKRQICRGTLLEGCDFYLPDKKSQD									:	100
Cyt1p_ <i>C.reinhardtii</i>	:MRTSLLRSLGKGLGLCAEATSSR.....VAQ									:	26
Cyt1p_ <i>C.elegans</i>	:MQRVVQGS.....									:	9
Cyt1p_ <i>C.intestinalis</i>	:MSLNLYKQATP....KLLSMR.....H.LQT									:	21
Cyt1p_ <i>A.gambiae</i>	:	MSAGTKKLDRLSKSALNDDDERCRTEVEETVQKRDGRSRHETTVPNRVCEKSFTLPRCSPIMAAFVGRICGSGLLSPKGGATLQKVGKYVTSFTGOVHP									:	100
Cyt1p_ <i>D.melanogaster</i>	:MAATLRRFHGLRLLKSAPALSLQQA.....									:	25
Cyt1p_ <i>D.rerio</i>	:									:	-
Cyt1p_ <i>X.laevis</i>	:MAAACLVLRRLSLRG...AVLQGGRVA.....WPVAP									:	28
Cyt1p_ <i>M.Musculus</i>	:MAAAAASLRRTVLGPRGVGLPGASAPGLLGGARSRQLPLRT									:	41
Cyt1p_ <i>H.sapiens</i>	:MAAAAASLRGVVLGPRGAGLPGARARGLLCSARPGQLPLRT									:	41
Cyt1p_ <i>E.gracilis</i>	:									:	-
Cyt1p_ <i>T.brucei</i>	:									:	-

⁵ See *Candida albicans* database at <http://genolist.pasteur.fr/CandidaDB/index.html>

⁶ See *Ciona intestinalis* draft genome sequence at <http://fugu.jgi-psf.org/ciona4/ciona4.home.html>


```

*           320           *           340           *           360           *           380           *           400
Cyt1p_S.cerevisiae : ..DEPAGVALPPGCSNYNPFYFPGGSIAMARVLFDDMVEYEDGTPAITSQMAKDVVTFILNCA.EPEHDERKRLGLKTVIILSSLYLLSIWVKKFKWAGIK : 296
Cyt1p_S.pombe      : ...EPAGVEVPDCMNFNPFYFPGTQIAMARPLFDDAVEFEDGTPAITSQAAKDVVNFHLWAS.EPELDIRKKMGFOVITVLTILTALSMWYKRFKWTPIK : 296
Cyt1p_C.albicans  : ..DEPPAGVVLPECSNYNPFYFPGGAIAMGRVLFDDLVEYEDGTPAITSQMAKDVSTFLNWAAS.EPEHDIRKKWGLKALVVLSSLYLLSIWVKKRFKWTPIK : 277
Cyt1p_N.crassa    : ..DEPPAGASVGAELNFNPFYFPGTGIAMARVLYDGLVDYEDGTPASTSQMAKDVVEFLNWAAS.EPEMDIRKRMGMKVLVVTSVLFALSIVYVKRYKAWLW : 305
Cyt1p_P.falci-parum : ..RDPPREGVELRNCLYINPFYFEGGSISMPPPLQDDMIEYEDGTPCNVSOAKDVVNFICWAA.EPAHDERKLTGLKLSIGAFVAMVMTVWQRFWTIYA : 382
Cyt1p_C.reinhardtii : ...DPPAGISIRECLYINPFYFPGGAIAMPKMLVGGVEYEDGTPASASQQAADITFLAWAS.YPYQDEMRVMGKKAACLMISILIGFAAYSKRLRWAPIK : 304
Cyt1p_C.elegans   : ...EAPAGVKVDDCKAYNPFYFPGGIISMPOOLFDEGIEYKDGTPAITSQQAADVSAFMHWAA.EPFHDIRKKWALKIAALIPFVAVVLIYGRHHSFTK : 267
Cyt1p_C.intestinalis : ...DPPAGVTIGEDQHYNAYFPGQAISMAQALYNEAIEYEDGTPAVQSOLAKDVSTFLRWAA.EPHHDIRKLSGFRVACFGLLFLPLFWFQKRIEFLSVK : 293
Cyt1p_A.gambiae  : ...DAPAGVVLRECOYFNPFYFPGGAIISMAQALYNEAAEYSDGTPPTASQOLAKDVSTFLRWAA.EPHYDERKRMGKISVGIIMLGAISYYIKRHKWAAAL : 373
Cyt1p_D.melanogaster : ...DAPAGVVLRECOYFNPFYFPGGAIISMAQVLYNEVIEYEDGTPPTQSOLAKDVATFLKWTSEPEHDIRKQLLKVIGILGFLTVISYYIKRHKWSSLK : 296
Cyt1p_D.rerio    : ...DPPAGVSLRECLYINPFYFPGQAISMAPPIYNEVLEYDDGTP.....CHHEPGWLRCLY.FPEVGSRART..... : 235
Cyt1p_X.laevis   : ...DPPAGVTLRECLYINPFYFPGQAVGMAPPYNEVLEYEDGTPAITSQVAKDVSTFLRWAS.EPEHDIRKRMGLKVLMISSILIPLIYYMKRHRMSVLK : 299
Cyt1p_M.Musculus : ...EPPAGVSLRECLYFNPFYFPGQAISMAPPIYTEVLEYDDGTPAITSQVAKDVATFLRWAS.EPEHDIRKRMGLKMLLMGLLLPLTYAMKRHKWMSVLK : 315
Cyt1p_H.sapiens  : ...EPPAGVSLRECLYFNPFYFPGQAISMAPPIYTDVLEFDGTPAITSQIAKDVCTFLRWAS.EPEHDIRKRMGLKMLMMALLVPLVYTIKRHKWMSVLK : 315
Cyt1p_E.gracilis : ..RPVPCGVQLSTQWYNPFYFHGGIISMPPLTDDMIEYEDGTPASVQMAKDVCTFLEWCS.NPWWDERKLLGYKTIATLAVIAVSSGYNRFSLGLWR : 230
Cyt1p_T.brucei  : LMEIPFPAELKPCQFVWNPYFKDCVLSMPPPLSDGMVDYEDGTPAITSQMAKDVVNFILRWAS.ESEYDERRVMFWKCFITTLGLVNCILLHYCQKNTNWRI : 245

```

```

*           420           *
Cyt1p_S.cerevisiae : TRKFFVFN.....PPKPRK..... : 309
Cyt1p_S.pombe      : NRKIFVQO.....RPIK..... : 307
Cyt1p_C.albicans  : NRKFRFD.....PPKK..... : 288
Cyt1p_N.crassa    : SRKIVVD.....PPKSPPPATNLALPQORAKS : 332
Cyt1p_P.falci-parum : TRRIDFG.....KIKYL..... : 394
Cyt1p_C.reinhardtii : SQRIVMD.....VVN..... : 314
Cyt1p_C.elegans   : SQKFLFKTVKGREPPKAQ..... : 285
Cyt1p_C.intestinalis : SKKIAFK.....G..... : 301
Cyt1p_A.gambiae  : TRKISFH.....PKSK..... : 384
Cyt1p_D.melanogaster : SRKIVFV.....PKEK..... : 307
Cyt1p_D.rerio    : ..... : -
Cyt1p_X.laevis   : SRKIAVR.....PPK..... : 309
Cyt1p_M.Musculus : SRKLAVR.....PPK..... : 325
Cyt1p_H.sapiens  : SRKLAVR.....PPK..... : 325
Cyt1p_E.gracilis : SRRLAVR.....PFNYSK..... : 243
Cyt1p_T.brucei  : YGRTTFR.....YWKKTW..... : 258

```

FIGURE 3 SUPPLEMENTAL DATA: Alignment of fungal Cyc2p homologs

Fungal Cyc2p homologs from the genomes of *S. cerevisiae* (CAA60756), *Schizosaccharomyces pombe* (CAB11221), *Neurospora crassa* (XP_330548), *Magnaporthe grisea* (EAA52113), *Gibberella zeae* (EAA67703), *Aspergillus nidulans* (EAA57860), *Kluyveromyces lactis* (CAH00025), *Candida albicans* (EAL01900), *Candida glabrata* (CAG60234), *Debaryomyces hansenii* (CAG90366), *Yarrowia lipolytica* (CAG80882), *Ustilago maydis* (EAK84810), were aligned using the CLUSTALW algorithm (Blosum62 scoring matrix) in Bioedit software. The GeneDoc multiple alignment editor software was used for manual editing of the aligned sequences. Conserved amino-acids in all sequences are shaded red and those conserved in 10 of 12 sequences are shaded blue. The purple residues correspond to the predicted transmembrane segment. The motifs RXYS(T), GXXS(T)XXL(X)₅G(X)₇PXG of the FAD binding fold and MXxXGT(S)G(A)IXP of the NAD(P)H binding site are highlighted in pink and orange, respectively and correspond to the consensus sequences present in members of the ferredoxin reductase FAD-fold family (62).

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100
S.cerevisiae : ..... : -
S.pombe : ..... : -
N.crassa : .....MSARLLRPLTRRLPPTSPACLRLVRPGTYNVSHFNPVVHSNTASLQIRSIARPYSSKLSPEGMGHNTPONQKQE : 75
M.grisea : .....MFARPAIR.....ACQSLKQP...VRR : 19
G.zeae : .....MFARSAFR.....AAQPLRS...VRR : 18
A.nidulans : ..... : -
K.lactis : ..... : -
C.albicans : MLRFRQIRLSPIYKSRLINFRFNSTNSKKPKAAEEDNNNNNDKSLQQHNVPARQDDKTQVGSFKIKPATSRSPAPME.NTGIEQLMHKDNKPYIPKLQ : 99
C.galbrata : ..... : -
D.hansenii : MIGIRSIGCR.VLANRSFGVRLANQTFYR.CKSNTDKSNKTKDKELTSN...DANNDKVGNFVKVSTSSPASPAPMDPNSGVSHYLKKNKPYIPKLK : 93
Y.lipolytica : .....MFRIGLIGLRASRPVLLKPIQRPQLLFRPVPFTTGRHLFQKDAHNDHPKKDAENKPENDKEQSNEMVKKDITFDQLPHIPDPKAEALA : 89
U.maydis : .....MFIRPVLSSSLGHAARSSLRSQAPAVRQ : 28

```

```

*      120      *      140      *      160      *      180      *      200
S.cerevisiae : ...MLWKNYVLSS...SRITR..RLHKSPRKSSF.SKNFFITGCLLVGAVSSYLTYRYTSHKRDISSSHFLLEVTPLF. : 89
S.pombe : .....MSSSTYR.....KLPKILAAGLAIGCAGGYAYKNSNKPPGLNPEIYAPTVNKITELTSDASLFSLVPQSP : 67
N.crassa : QQSNQNDNRKSDGPSSSSSSKNSKSKLLIAAA.VFSGYLFHSIILRPNDLSLGDVPVLLGIVSPPSLNPTSFVPTIVEREQVSSTAFIITVEPFDP : 174
M.grisea : YTNTPPPQSGNANNSRVGILIASAVGMAGFGTYFM.FGQGTTP..AAG...VKALGAEPKKALEM...EKGFVSLQDDVEVVNHNTKRLRFKLPED : 107
G.zeae : YAT...EAGGAGGSNALLYAAGAAALGGAG.YWY.FGKSGAP..VAAAQDVKQAVGVEPKAAFTGG...DQGWVSLKSDVEIVNHNTKRLRFELPEA : 107
A.nidulans : ...MRFQGRR.....FTSQVSREPVSSTGSLFTIKP... : 31
K.lactis : MKLLLSIKRLSS...SKTT..LPQPSAGKSS...SLLKTVLLLSGVAIGALSWNYKESLYQRELSRDYFSKYTSSKYSTDQDHYLIELTPLK. : 89
C.albicans : HKRVSEYEPNLPNQDEYTNLVE..PKPSITRWTRY.IPKILTVIVLVWSGYTYHVWMTDTEEGEDSSDLLNPNEFHKIVTHKEIDDDHYIIELTPKFS : 196
C.galbrata : ...MLKGYQALCGRRTISSVSP..IKRSFSKRSII.GYSIILSASAFVTWYTKDLIKQYVETFTTKELSPNDFTEKTTRRHDIDNCHYLIELTPLK. : 93
D.hansenii : HERLSYEYPGLPNQDDFTKHTNEKPKVNRWSRY.FPKIITAVVVLWGAYAIKVWVYLPEPGSDSQELLDPKEFHRITAHKEIDDQHFLIELIPKFN : 192
Y.lipolytica : KKNGYVPAKEWVRESFEMPKTDVRRPHMLKWKALDGHGPKLFALAVILWIIWCAYMVTGRGGNEGETTLANNAFVKKTVKKMKISDDVELIEFKGPER : 189
U.maydis : YAT...EAGKSSGGSNLPVLVLALGGVAGIGAWYG.LGGFDDPKKVSNKIQEKGKEAVDQAKGAVEGGALNKDQFVETEKEIKPYNHDSATLIFELPEG : 123

```

```

*      220      *      240      *      260      *      280      *      300
S.cerevisiae : .....KQKVNIWSLMTAENLWSVEIKQPEVMVRRNYTPLPLKFNP.....ASKEIEILKGDGNADGKLSFYIKKYENGEV : 159
S.pombe : S.....EHLTLEPIAKVTIRDPSMQVQRPYTPLY.....LDANELKFFIRKYEEGPV : 115
N.crassa : LHRLMGGSEKKKKNARKNANKLRNELQEAWHHGLWCVEIKQPQLQVARDYTPLPPPVGQ.....EREEMQRGRRFLIRKMEGGEV : 255
M.grisea : D.....MVSGLHVASALLTKFKPEGAE...KPVLRPYTPIS.....DEDQKGYLDLIVKKYEGGPM : 160
G.zeae : D.....QVSGLHVASALLTKYKGPND...KATLRPYTPIS.....DETDKGFDLLKKYPNGPM : 160
A.nidulans : .....PKSDGNSNLK.VYEDAWNTGVWSVMFKQPQLQIGRDYTPLPPTSAN.....EDDEC...LRFFIRKDPFEGEV : 93
K.lactis : .....AQKVNLWKEMNSSKLSWSVEVKQPEIMVVRSYTPLPLTIE.....ENGAVEVLRDEENASGALTFYIKQYKQGEV : 158
C.albicans : YW.....EYSHGTDPEGKSLWNGDKFWSVEIKQPDINVVRSYTPLPLYLKSEYTRSGEREPLLKVINPEIDEYDKHGTVCLYIKRYNDGEV : 283
C.galbrata : .....RQNVNLWKELEARNILWSIEVKQPEIMVVRNYTPLPLQLKS.....NGNIVPLDLNDPVESKLFLYIKSYNNGEV : 163
D.hansenii : HW.....QYSFYSNYESKSIWNGDKIWSVDVKQPDIMVVRAYTPLPLFMKSEYTRSGDRKPLLKVIDNDADDYDKQGSMCLYVKKYDDGEV : 279
Y.lipolytica : S.....MLQPKYAEYWDGHRMFSVHIRQPDVQVVRSYTPLPVYMMQDVD.....GKDPLVKIISWDTDYNGFCMIIKKYENGEV : 263
U.maydis : .....KKPGMGVASAVVVKAVGDGLKDDQGDVIRPYTPIIT.....SPDTVGHDFLKKYPGGKM : 179

```


* 620 *

S.cerevisiae : KYDLN...**Q**GPV**G**LL**S**KEG.....WNSDN**V**YKLS : 366
S.pombe : KADYGAR..**Q**GEV**K**LL**S**NNP.....FGK**V**WKL : 266
N.crassa : KAWSEGLER**Q**GHV**A**GV**A**GELM**K**KG**V**N**K**EE**W**VL**K**L : 543
M.grisea : KVSPKD...**Q**GEV**S**G**I**L**K**ELG.....Y**K**Q**D**Q**I**Y**K**F : 331
G.zeae : KVSPKN...**Q**GE**L**T**G**AL**K**ELG.....Y**K**ED**Q**V**Y**K**F** : 331
A.nidulans : KLWA**Q**G**M**EL**Q**GP**L**OG**I**IK**E**LD.....L**Q**D**W**A**V**W**K**L : 311
K.lactis : KYDLV...**Q**GP**I**K**G**IL**A**ARG.....W**D**NS**N**V**Y**K**L**S : 357
C.albicans : KDLVRNK..**Q**GPV**N**G**L**L**G**DKK.....W**D**NS**N**V**Y**K**L** : 555
C.galbrata : KYDTS...**Q**GP**I**E**G**LL**G**EKG.....W**D**NS**N**V**Y**K**M**D : 343
D.hansenii : KHAEVNE..**Q**GP**I**K**G**LL**G**EKD.....W**D**NS**N**T**Y**K**L** : 539
Y.lipolytica : RTYDG...**Q**GPV**K**LL**G**Q**K**G.....W**T**ND**N**V**R**K**M** : 474
U.maydis : KGPKGS...**Q**GE**L**K**G**LL**A**K**L**G.....Y**Q**AD**Q**V**Y**K**F** : 350

FIGURE 4 SUPPLEMENTAL DATA: Alignment of *S. cerevisiae* Cyc2p and cytochrome *b*₅ reductase-like proteins from *S. cerevisiae* and plants

S. cerevisiae Cyc2p (CAA60756), cytochrome *b*₅ reductases Mcr1p (CAA81991) and Cbr1p (NP_012221) and cytochrome *b*₅ reductases like proteins (CBR) from plants, *Oryza sativa* (XP_550297), *Curcubita maxima* (AAK69398) and *Arabidopsis thaliana* (AAM64833) were aligned using the CLUSTALW algorithm (Blosom62 scoring matrix) in Bioedit software. The tilde character (~) indicates manual editing of the alignment. The aligned sequences were edited using the GeneDoc multiple alignment editor software. Conserved amino-acids in all sequences are shaded red and those conserved in 5 of 6 sequences are shaded blue.

```

*      20      *      40      *      60      *      80      *      100
Cyc2p   : .....MLWKNYVLSSSR.....ITRRLHKSPRKSFSKNFFITG.....CLLTV
Cbr1p   : .....MYKYSYYIRKNE.....REKKVLKVCIQALQOETQSIKQSK.....MAI
Mcr1p   : .....MFSLSR.....SHSKALPIALGTVAIAATA...FYFAN.....RNQ
A.thaliana CBR : .....MATSFFRRLARSAPITFPVAFGSQ.....SKSGSGAFRFSTGAIALS GGFSYYLTS.....GNN
O.sativa CBR   : .....MAALLRLLAG.....THRG...RVPLAAAAVTGGAALFCASS.....PPT
C.maxima CBR   : .....MAAFLRLATAAPALRYNALCGQ.....SRIESSKFRFPIGTITAVTAGFSYMFYAS.....TSN

```

```

*      120     *      140     *      160     *      180     *      200
Cyc2p   : G.....AVSSYLTYRYSERENKHELSPSY..FVKYKISHKRDIDSSHFLLEVTPLFKQKVNISLMTAENLWSVEIKQ.....PEVMVV
Cbr1p   : DAQKLVVVIV....IVVPLLFKFIIGPKTKPVLDPKRNDQSFPLVEKTIILTHNTSMYKFG..LPHADDVGLPIGQHTVIKANIN.....GKDIIT
Mcr1p   : .....HSFVFNESNKVFKGDDK..WIDLPI SKIEEESHDTRRFTFK..LPTEDSEMGLVLASALFAKFVTP.KGSN.....VV
A.thaliana CBR : .....LVYLDQAKEETGKTAIINPDK..WLEFKIQDTARVSHNTQLFRFS..FDP.SAELGLHVASCILTRAPLG.YNAEGKTKYVI
O.sativa CBR   : .....IALMEEKGEDAAAKVALINPDK..WLEFKIQEKATVSHNSQLFRFS..FDP.STKLGLDVASCILTRAPIG.EEVEGGRKFI
C.maxima CBR   : .....LVHLAPNCEEDGQKVALKPKD..WLEFELQDVARVSHNTNLYRFS..FDP.SENWGMWLLHASLQELQLI.KTNRGEVKYVA

```

```

*      220     *      240     *      260     *      280     *      300
Cyc2p   : RNYTPIPLKFNPAKSEIEILKGDGNADGKLSFYIKKYENGEVARWLHHLPKCHIIEIRGPFIDYEFPHLPNELKRSRDCLYMDNRNERGNNVRENSQFIY
Cbr1p   : RSYTPIISLDGDTK.....GNFELLVKSYPTENVSKMIGELKIGDSIQIKGPRGNHYH.....ER
Mcr1p   : RPYTPVSDLSQK.....GNFQLVVRKHVEGKMTSHLFLGPKPNDIVSFKGPIMKWKW.....QPN
A.thaliana CBR : RPYTPIS.DPEAK.....GYFDLLIKVYPDGKMSQHFASLKP GDVLEVKGPVEKFKY.....SPN
O.sativa CBR   : RPYTPIS.DPDSK.....GYFDLLIKVYPDGKMSQYFASLKP GDVVEVKGPVEKLRV.....SPN
C.maxima CBR   : RSYTPIIS.DPEAK.....GYFDLLIKIYPOGKMTQHFASLKP GDKLEVKGPIRKLKY.....SPN

```

```

*      320     *      340     *      360     *      380     *      400
Cyc2p   : QPYDMMFTA GTGIVTALQLLTESPFRTIKLFHTDKNIKQLGPLYPILLRLQASNRVQLKIFETDRQTKQDVLKSIQKSIKPYPYKGLLPFSNVNKK
Cbr1p   : CRSHLGMIAAGGTGIAPMYQIMKATAMDPHDTKRVSLVFGNVHEEDILLKK.....ELEALVAMKFSQFKIVVYLDSD.....PDRED
Mcr1p   : QFKSTILLGAGTGINPLYQLAHIVENPNDKTKVNLLYGNKTPQDILLRK.....ELDALKEKYEDKFNVTVFVDDK.....QDDQD
A.thaliana CBR : MKKHGMIAAGSGGTPMLQVIDATAVKNPEDNTOISLLYANVSPDDILLKQ.....KLDVLQANHPN.LKIFVTVDNP.....TKN
O.sativa CBR   : MKKQIGMIAAGGTGTPMLQVVRALKNPDDNTOVSLIYANVSPDDILLKR.....ELDRLASSYFN.FKVFVTVDKP.....SND
C.maxima CBR   : MKKHGMIAAGGTGTPMLQVIDATAKNQDDITOVSLIFANVSADDILLKE.....KLDKLAACHFN.IKVFVTVSNP.....PRG

```

```

*      420     *      440     *      460     *      480
Cyc2p   : NIMPVLALVCGPESYISSISG.....RKYDLNQGPVG.....GLLSKEGNNSDNVYKLS
Cbr1p   : WTCGVGYITKDVKEH.....LPAATMDNVQILICGPEAMVASVR..RSTVDLG..FRRSKPLSKMEDQVVFV.
Mcr1p   : FDCBISFISKDFIQEH.....VPGP.KESTHLFVCGPPEPFMNAYSGEKKS PKDQEGELIGILNNGVSKDQVFKF.
A.thaliana CBR : WKGCVGYISKDMALKG.....LPLP.TDDTILVCGPPEGMMEHISGGKAPDWSQGEVKGILKELGYTEEMVFKF.
O.sativa CBR   : WRCGVGYISKDIALKG.....LPRP.GEDSLILVCGPPEGMNHISGDKAKDRSQEELTGILKELGYTAEMVYKF.
C.maxima CBR   : WKGKGVHVSKDMIIC.....LPSP.GNDALILVCGPPEGMKHICGPKNKDFTQELGGLKDLGVSKDMVFKF.

```

ANNEXE 2

-BLUE NATIVE GELS-

(from Carla Koehler, UCLA)

1- SOLUTIONS :

10X Sample Buffer :5% Coomassie Brilliant Blue G-250 (Serva), 0.5 M 6-aminocaproic acid, 100 mM Bistris/HCl pH 7.0, 1 mM PMSF

Detergent solution : 1 % water-soluble digitonin or 0.16% dodecylmaltoside

Cathode Buffer :50 mM Tricine, 15 mM BisTris/HCl pH 7.0, 0.02% Coomassie Blue G-250

Colourless Cathode Buffer : as above without Coomassie

Anode Buffer : 50 mM BisTris/HCl pH 7.0

Gel Buffer : 100 mM BisTris/HCl pH 7.0, 1 M 6-aminocaproic acid

Acrylamide solution : 48% acrylamide, 1.5% bisacrylamide

Molecular Weight Markers:

HMW Electrophoresis calibration Kit Pharmacia. Resuspend content of one vial in 250 μ l of buffer: 0.16% dodecylmaltoside or 1% digitonin (detergent chosen depends on application) 10% glycerin, 20 mM Hepes ph 7.4, 50 mM NaCl, + 25 μ l sample buffer

Stock solutions : 1M Tricine pH 7.0 (adjusted with NaOH) kept at 4C 1M BisTris/HCl pH 7.0 kept at 4C 2% Serva G Blue in H₂O

2- GELS 6-16% GRADIENT :

	6%	16%	Stacking
H ₂ O	26.25 ml	----	15.5 ml
Gel Buffer	35 ml	30 ml	18.75 ml
Acrylamide solution	8.75 ml	20 ml	3.0 ml
87% glycerin stock	-----	10 ml	-----
<hr/>			
	70 ml	60 ml	37.25 ml
For 1 gel:	12.5 ml	12.5 ml	
TEMED	5 μ l	5 μ l	
10% APS	50 μ l	50 μ l	
Stacker: For 7.5 mls :	6 μ l TEMED		
	60 μ l 10% APS		

3- SOLUBILIZATION OF MITOCHONDRIA

We use 1% digitonin or 1.6 mg/ml n-dodecylmaltoside and solubilize at 2.5 mg/ml mito concentration. Buffer contains 50 mM NaCl, 10% glycerol, 20 mM Hepes KOH, pH 7.4, 2.5 mM Mg₂Cl, PMSF.

Solubilize on ice with gentle pipetting and inversion occasionally for 30 min, spin in Ultra at 100,000g for 10 min to remove insoluble material

For one dimension BN gels, you need clean antibodies. If not clean, make a 2D gel. For second dimension run 16% or 10% Tris-Tricine gel (see below)

4- SAMPLE PRAPARATION/MIGRATION OF GEL

*For mitos, we run up to 400 μ g total solubilized protein in 160 μ l per lane (with 16 μ l SB). Adjust protocol for different membrane complexes.

*Migration is ON/4C, 100 Volts constant (that gives about 15 mA current). Next day, change the cathode buffer to colourless buffer, increase to 400 Volts let migrate until Blue is out. (Changing decreases amount of Blue in transfer and helps for immunoblot analysis. Alternatively, if proteins precipitate, then do not change blue or just decrease concentration to 0.002%)

Alternative: run fast at 400 V (takes about 4-5 hours), some complexes may fall apart though. Change of cathode to colourless buffer helps transfer to PVDF membrane for Western blotting. However, if you run the gel from the beginning using colourless cathode buffer, resolution is decreased.

5. DENATURATING SECOND DIMENSION :

1. Cut out pieces or lane from the first (BN) gel, extra lanes can be stored at -20C. Soak gel piece in 1% SDS with 10 mM BME for 15 min -30 min, change to 1% SDS for another 15-30 min. Place strip on top of glass plate at the usual position for the wells. Cut off blue blob of stain at bottom, it is a pain in e second dimension. You may want to make a well on each side using the bottom of a spacer or a cut comb. Std and solubilized mitos can be loaded in these lanes.

2. Remove excess SDS as completely as possible

3. Position spacers (now use 0.7 mm thick, when pieces from 1.6 mm native gels are used) and put the second glass plate on top. The 1.6 mm native gels are thereby squeezed and do not slide down when the gel is brought to a vertical position.

4. Pour separating gel using Tris-Tricine or your favorite gel system, leave a 2 cm gap below gel slide and Overlay with your favorite solution to promote polymerization.

5. Cover separating gel with stacking gel after polymerization of separating gel. Overlay with your favorite solution to promote polymerization.

6. Finally fill the space between the plates, to fully embed the pieces of first dimension gel with the following solution:

For 12 mls :

3.0 ml	50% glycerol
240 μ l	10% SDS
1.0 ml	48% acrylamide (same as used for BN gels)
6.0 ml	BN Gel Buffer (2X)
1.76 ml	H ₂ O

For polymerization : TEMED 10 μ l, 10% APS 100 μ l

Allow polymerization to complete for 30 min

7. Run second gel as usual.

7. REFERENCES :

Dekker, P. J., Falk, M., Maarse, A.C., Bomer, U., Muller, H., Guiard, B., Meijer, M., Rassow, J., and Pfanner, N. 1997. The Tim core complex defines the number of mitochondrial translocation contact sites and can hold arrested preproteins in the absence of matrix Hsp70-Tim44, *EMBO J.*, **16**, 5408-5419

Dekker, P.J., Müller, H., Rassow, J. and Pfanner, N. (1996) Characterization of the preprotein translocase of the outer mitochondrial membrane by blue native electrophoresis. *Biol. Chem.*, **377**, 535-8.

Schägger, H., Cramer, W.A. and von Jagow, G. (1994) Analysis of molecular masses and oligomeric states of protein complexes by blue native electrophoresis and isolation of membrane protein complexes by two-dimensional native electrophoresis. *Anal. Biochem.*, **217**, 220-30.

Schägger, H. and von Jagow, G. (1987) Tricine-sodium dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis for the separation of proteins in the range from 1 to 100 kDa. *Anal. Biochem.*, **166**, 368-79.

Schägger, H. and von Jagow, G. (1991) Blue native electrophoresis for isolation of membrane protein complexes in enzymatically active form. *Anal. Biochem.*, **199**, 223-31.

ANNEXE 3

- Large Scale Purification of complexes from CCHL-proteinA -

(adapted from Martin van der Laan, N. Pfanner, Freiburg, Germany)

Starting material: 14 mg of CCHL-protein A

Spin down, 10 min. 14,000 rpm, 2°C

Carefully resuspend in 6 mL *Solubilization Buffer*

20 mM Hepes-KOH pH 7.4	2x Stock:	40 mM
50 mM NaCl		100 mM
10 % glycerol		20 %
2,5 mM MgCl ₂		5 mM MgCl ₂

Add freshly before use:

- 1 % digitonin
- 2 mM PMSF
- 2 mM Pefablock
- 2 µg/ml Leupeptin

Shake head-over-head for 30 min at 4°C,

Spin 15 min, 14,000 rpm, 2°C

Go on with the supernatant

Take off 50 µl of each supernatant (TOTAL sample for the gels)

Column preparation:

Put filters into columns

Put columns into collection tubes

Use 200-250 µl of 50% IgG sepharose slurry (125 µl column volume)

Pipet on column, add 1 ml acetate buffer pH 3.5

Spin, 1 min, 700 rpm

Wash with 1 ml acetate buffer pH 3.5 again

Spin, 1 min, 700 rpm

Wash with 2x Solubilization buffer stock

Spin, 1 min, 700 rpm

Wash with 2x Solubilization buffer stock

Spin, 1 min, 700 rpm

Resuspend washed sepharose beads in solubilizate (close column before with the tiny „foot“!), pipet beads back into the tube.

Incubate solubilizate with beads for at least 2-3 h at 4°C, shaking head-over-head

(Remark: Optimal binding is achieved after appr. 1.5 - 2 hrs, longer incubations, up to 6 h have been tested, do neither harm nor improve!)

Prepare 10 ml *Wash Buffer* (same 2x Stock as Solubilization Buffer):

20 mM Tris-HCl pH 7.4	2x Stock:	40 mM
50 mM NaCl		100 mM
1 mM EDTA		2 mM
10 % glycerol		20 %

Add freshly before use:

0.3 % digitonin

2 mM PMSF

Spin samples 1 min, 1200 rpm at 4°C, Remove supernatant, leave about 400 µl in the tubes for resuspension of beads !

Take off 50 µl of each supernatant (UNBOUND sample for gels)

Resuspend beads and pipet back on the column.

Spin 1 min. 700 rpm, 4°C

Discard flow-through

Take 5 ml wash buffer, rinse the incubation tube and pipet on the column

Spin 1 min. 700 rpm, 4°C

Discard flow-through

Take another 5 ml wash buffer, rinse the incubation tube and pipet on the column

Spin 1 min. 700 rpm, 4°C

Discard flow-through

(This rinsing of the tubes does improve the yield!)

Wash column with 6 x 0,5 ml wash buffer

After the last washing step: Spin beads dry, 1 min. 1500 rpm

Close tubes with „foot“

Elute with 200 µl wash buffer, 8 µL TEV protease, incubate over night, 4°C, shaking

Next morning, take 20 µl Ni-NTA slurry per sample, pellet with a short spin, and remove supernatant.

Wash Ni-NTA beads with 50 µl wash buffer, pellet, remove supernatant, resuspend beads in 20 µl wash buffer and add to the sample.

Incubate 30 min. 4°C, shaking

Remove foot and elute into an Eppendorf cup by spinning 2 min. 1500 rpm at 4°C

Add 100 µl 2x SDS sample buffer to the elution fraction.

ANNEXE 4

- Génotypes des souches de levure construites ou utilisées au cours de ce travail -

Souche	Génotype	Source
W303-1A	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	R. Rothstein ^a
W303-1B	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1</i>	R. Rothstein ^a
SMY1	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyt2::his5+</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2003
SMY4	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyc3::kan</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2003
YPH1	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2003
YCT1-11A	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2003
UV9	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 CYC3-9 cyt2::his5+</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2003
UV14	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 CYT1-14 cyt2::his5+</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2003
UV17,48	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 CYT1-48 cyt2::his5+</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2003
UV16,18,34, 43,50	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 CYT1-34 cyt2::his5+</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2003
R2	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyt2::his5+su2</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2003
R19	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyt2::his5+su19</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2003
CC1-2D	<i>α ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc3::kan cyt2::his5+</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2003
CC1-5A	<i>α ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc3::kan cyt2::his5+</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2003
PHT3	<i>α ade2-1 can1-100 his3-11,15 1 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyt1::LEU2</i>	Hamel <i>et al.</i> , 1998
YPH9-2A	<i>a leu2-3,112 his3-11,15 ura3-1 cycl::kan</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2003
W303ΔCYC7	<i>α ade2-1 his3-1,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyc7Δ::TRP1</i>	A.Tzagoloff
JNY33	<i>α ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 imp2::LEU2</i>	Nunnari <i>et al.</i> , 1993
YCT1-7D	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyt2::his5+cyc2::hph</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2005
YCT1-11C	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyt2::his5+</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2003
YPH10-8A	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 CYT1-48</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2005
YPH6-9C	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyt1-34 cyc2::hph</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2005
YPH71-14B	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 CYT1-34</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2005
CYC2-TAP	<i>α his3-Δ1, leu2-Δ0, ura3-Δ0, met15-Δ0, CYC2-TAP-his5+(ATCC 201388)</i>	J. Weissman
YBG4	<i>α ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 hap1::URA3</i>	B. Guiard
YDB1	<i>ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 CYC3-his₆</i>	thèse ^s
YDB2	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 CYC2-(HA)₃-HIS3</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2005
YDB3	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 CYC2-myc₁₃-HIS3</i>	thèse ^u
YDB4	<i>α ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc3::URA3</i>	thèse ^j
YDB5	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 mcr1::HIS3</i>	thèse ^k
YDB6	<i>ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 CYC3-TEV-protA-his₇-HIS3</i>	thèse ^t
YDB8	<i>a ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 CYT1-48 cyc2::hph</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2005
YDB14	<i>α ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 ycp4::HIS3</i>	thèse ^e

YDB15	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 pst2::kan</i>	thèse ^f
YDB16	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cbr1::kan</i>	thèse ^g
YDB9 (SU1)	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc3-F₁₃₀L:LI (CYC3-9)</i>	Bernard <i>et al.</i> , 2003 ^b
YDC1	<i>α ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc3-E₁₄₃:K</i>	thèse ^o
YDC2-1	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyc3-ΔCPV+Q137R</i>	thèse
YDC2-2	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyc3-ΔCPV+Q137R+D419N</i>	thèse
YDC3	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyc3-ΔCPV</i>	thèse ^m
YDC30	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyc3-ΔCPV+L188P+FA11S</i>	thèse ^m
YDC4	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyc3-F₁₃₀L:QN</i>	thèse ⁿ
YDC40	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyc3-F₁₃₀L:QN+S150N</i>	thèse ⁿ
YDC41	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyc3-F₁₃₀L:QN+S36P</i>	thèse ⁿ
YDC42	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyc3-F₁₃₀L:QN+Q8K</i>	thèse ⁿ
YDC5 (YDB17)	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyc3-G₂:A</i>	thèse ^q
YDC6 (YDB18)	<i>α ade2-1 his3-11,15 leu2-3,112 trp1-1 ura3-1 cyc3-W₃FW:AAA</i>	thèse ^r
DB2-14A	<i>α ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyt2::his5⁺ hap1::URA3</i>	thèse ^c
DB2-2D	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyt2::his5⁺ hap1::URA3</i>	thèse ^c
DB10-2B	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph cbr1::kan</i>	thèse ^h
DB10-3D	<i>α ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph cbr1::kan</i>	thèse ^h
DB10-3C	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph cbr1::kan</i>	thèse ^h
DB10-7B	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph cbr1::kan</i>	thèse ^h
DB11-5B	<i>α ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 ycp4::HIS3 pst2::kan</i>	thèse
DB11-3C	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 ycp4::HIS3 pst2::kan</i>	thèse
DB11-5C	<i>α ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 ycp4::HIS3 pst2::kan</i>	thèse
DB12-6C	<i>α ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 ycp4::HIS3 pst2::kan</i>	thèse ⁱ
DB12-6D	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 ycp4::HIS3 pst2::kan</i>	thèse ⁱ
DB13-6A	<i>α ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph cyc3-ΔCPV</i>	thèse ^d
DB13-8C	<i>α ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph cyc3-ΔCPV</i>	thèse ^d
DB13-9A	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph cyc3-ΔCPV</i>	thèse ^d
DB13-6C	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph</i>	thèse ^d
DB13-8D	<i>α ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph</i>	thèse ^d
DB13-9B	<i>α ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph</i>	thèse ^d
DB14-1A	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph mcr1::HIS3</i>	thèse ^y
DB14-1D	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph mcr1::HIS3</i>	thèse ^y
DB14-5D	<i>α ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph mcr1::HIS3</i>	thèse ^y
DB15-4C	<i>α ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph cbr1::kan mcr1::HIS3</i>	thèse ^l
DB15-4D	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph cbr1::kan mcr1::HIS3</i>	thèse ^l
YPH6-13D	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph cyt1-34</i>	P. Hamel ^x
YPH11-10A	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph cyt1-34</i>	P. Hamel ^y
série SSP	<i>a ade2-1 his3-1, 15 leu2-3, 112 trp1-1 ura3-1 cyc2::hph cyt1-x</i>	P. Hamel ^w

- ^a Department of Human Genetics, Columbia University.
- ^b souche issue de la réintégration de la mutation *cyc3-9* par PCR et recombinaison homologue.
- ^c spores issues du croisement SMY1 x YBG4.
- ^d spores issues du croisement YDC3 x YCT1-11A.
- ^e remplacement du gène *YCP4* par PCR et recombinaison homologue dans W303-1B.
- ^f remplacement du gène *PST2* par PCR et recombinaison homologue dans W303-1A.
- ^g remplacement du gène *CBRI* par PCR et recombinaison homologue dans W303-1A.
- ^h spores issues du croisement YPH1 x YDB16
- ⁱ spores issues du croisement YDB14 x YDB15
- ^j remplacement du gène *CYC3* par PCR et recombinaison homologue dans W303-1B.
- ^k remplacement du gène *MCRI* par PCR et recombinaison homologue dans W303-1A.
- ^l spores issues du croisement YDB5 x DB10-3D
- ^m souche issue de la réintégration de la mutation *cyc3-ΔCPV* par recombinaison homologue dans YDB4.
- ⁿ souche issue de la réintégration de la mutation *cyc3-FL:QN* par recombinaison homologue dans YDB4.
- ^o souche issue de la réintégration de la mutation *cyc3-E₁₄₃:K* par recombinaison homologue dans YDB4.
- ^q souche issue de la réintégration de la mutation *cyc3-G:A* par recombinaison homologue dans YDB4.
- ^r souche issue de la réintégration de la mutation *cyc3-WFW:AAA* par recombinaison homologue dans YDB4.
- ^s addition de l'étiquette *his₆* par PCR à partir d'oligonucléotides spécifiques et intégration dans SMY4.
- ^t amplification de l'étiquette TEV-protA-*his₇* par PCR à partir du plasmide pYM10 et intégration dans W303-1B
- ^u amplification de l'étiquette *myc₁₃* par PCR à partir du plasmide pFA6a-13myc-HIS3MX6 et intégration dans W303-1B
- ^x spores issues du croisement YPH1 x UV34
- ^y spores issues du croisement YPH1 x UV18
- ^w révertants obtenus sur milieu lactate à partir de la souche YPH11-10A
- ^y spores issues du croisement YDB5 x YPH1

ANNEXE 5

- Liste des oligonucléotides utilisés pour des expériences de mutagenèse ou d'addition d'étiquettes -

nom de l'oligonucléotide	séquence	gène concerné
HCCSmutG-1	GCGCGGCCGCATGGCTTTGTCTCCATCTGCTCCTGCTG	<i>HCCS</i>
HCCSmutG-2	CAGCAGGAGCAGATGGAGACAAAAGCCATGCGGCCGCGC	<i>HCCS</i>
HCCS-1	CACTCCACGTACTCATAGGCGC	<i>HCCS</i>
CCHL-mutG1	CAACAGAAACTACAAAAAATGGCTTGGTTTTGGGCAGATC	<i>CCHL</i>
CCHL-mutG2	GATCTGCCCAAACCAAGCCATTTTTGTAGTTTCTGTTG	<i>CCHL</i>
CCHL-mutWFW-1	CAGAAACTACAAAAAATGGGTGCGGCTGCGGCAGATCAAAAAAC TACGGGC	<i>CCHL</i>
CCHL-mutWFW-2	GCCCCGTAGTTTTTTGATCTGCCGCAGCCGCACCCATTTTTGTAGT TTCTG	<i>CCHL</i>
<i>cyc3-1</i>	ACTAAGAGAAATGAAATAGGCAGC	<i>CCHL</i>
<i>cyc3-C-his6</i>	CTTACTTGGCTATTTACACGTACTIONTACGCTGGCTGTATATCATTTA TTAATGGTGATGGTGATGGTGAGGGGCGGAGGACGAAGAGGAC	<i>CCHL</i>
<i>cyc3-S2</i>	GGACATCATTATTTCTTACTTGGCTATTTACACGTACTIONTACGCTGG CTGATCGATGAATTCGAGCTCGTTTAAAC	<i>CCHL</i>
<i>cyc3-S3</i>	CTTGGACCGGATGATCTCGGGTCCGTCCTCTTCGTCCTCCGCCCC GTACGCTGCAGGTCGACGGATCC	<i>CCHL</i>

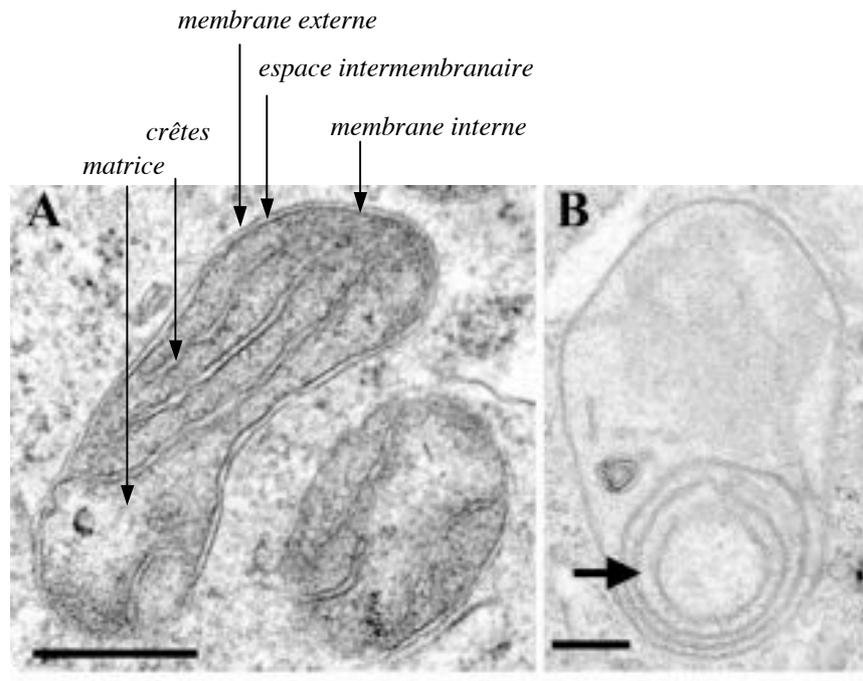


Figure 1. Coupe de mitochondries visualisée par microscopie électronique (d'après John *et al.*, 2005). (A) Mitochondrie sauvage issue de cellules HeLa. (B) Mitochondrie altérée suite à l'inhibition de la mitofiline par interférence à l'ARN. Notez la structure en pelure d'oignons. Les barres correspondent à 250 nm.

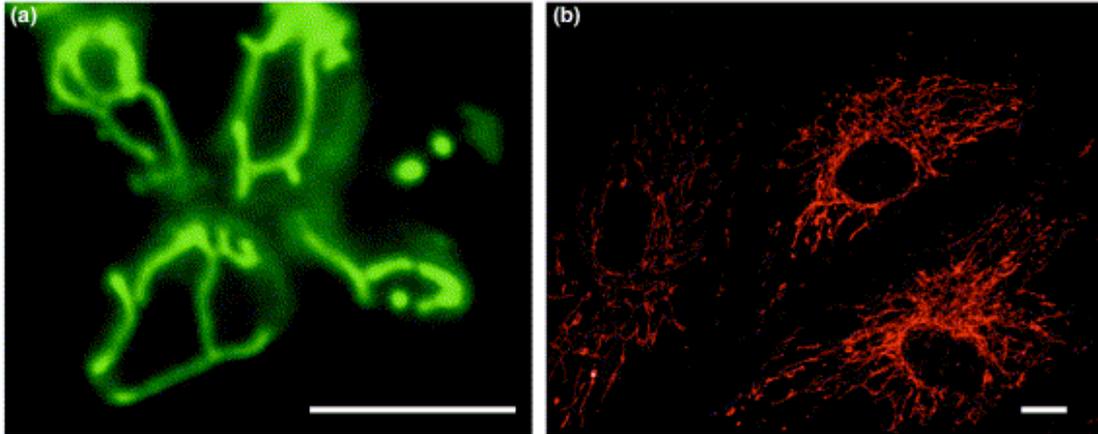


Figure 2. Images du réseau mitochondrial (d'après Jensen *et al.*, 2004).

(a) Cellules de levures *S. cerevisiae* exprimant une protéine matricielle étiquetée par la GFP (Green Fluorescent Protein). (b) Cellules endothéliales d'artère pulmonaire bovine colorées par le marqueur mitochondrial Mito Tracker. Les barres correspondent à 10 μm .

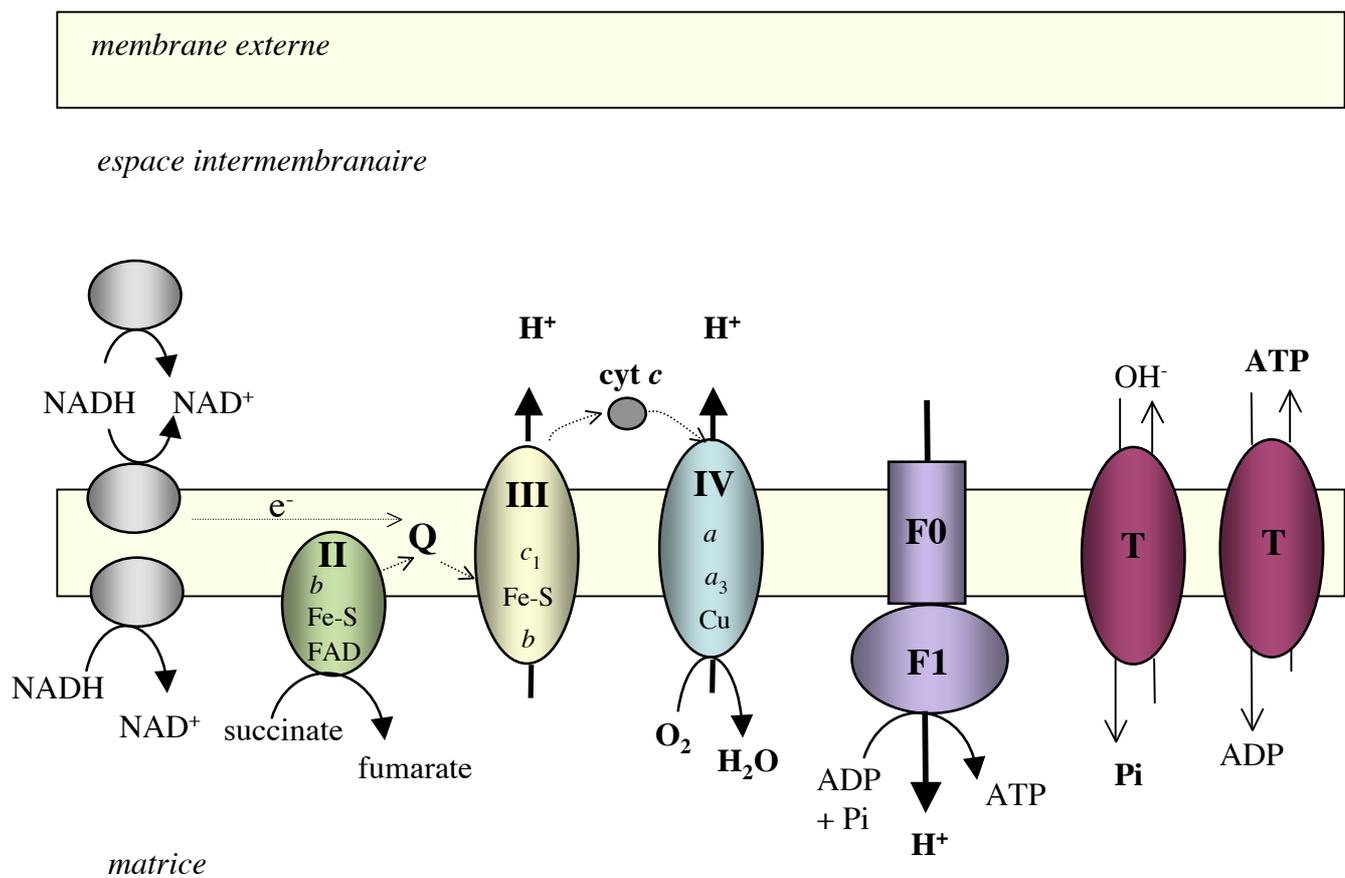


Figure 3. Représentation schématique de la chaîne respiratoire chez *S. cerevisiae* (d'après G. Dujardin). Le complexe I se réduit à trois NADH deshydrogénases, deux dans l'espace intermembranaire et une matricielle (en gris). Sont également représentés les transporteurs (T) de phosphate Pi et d'ATP/ADP.

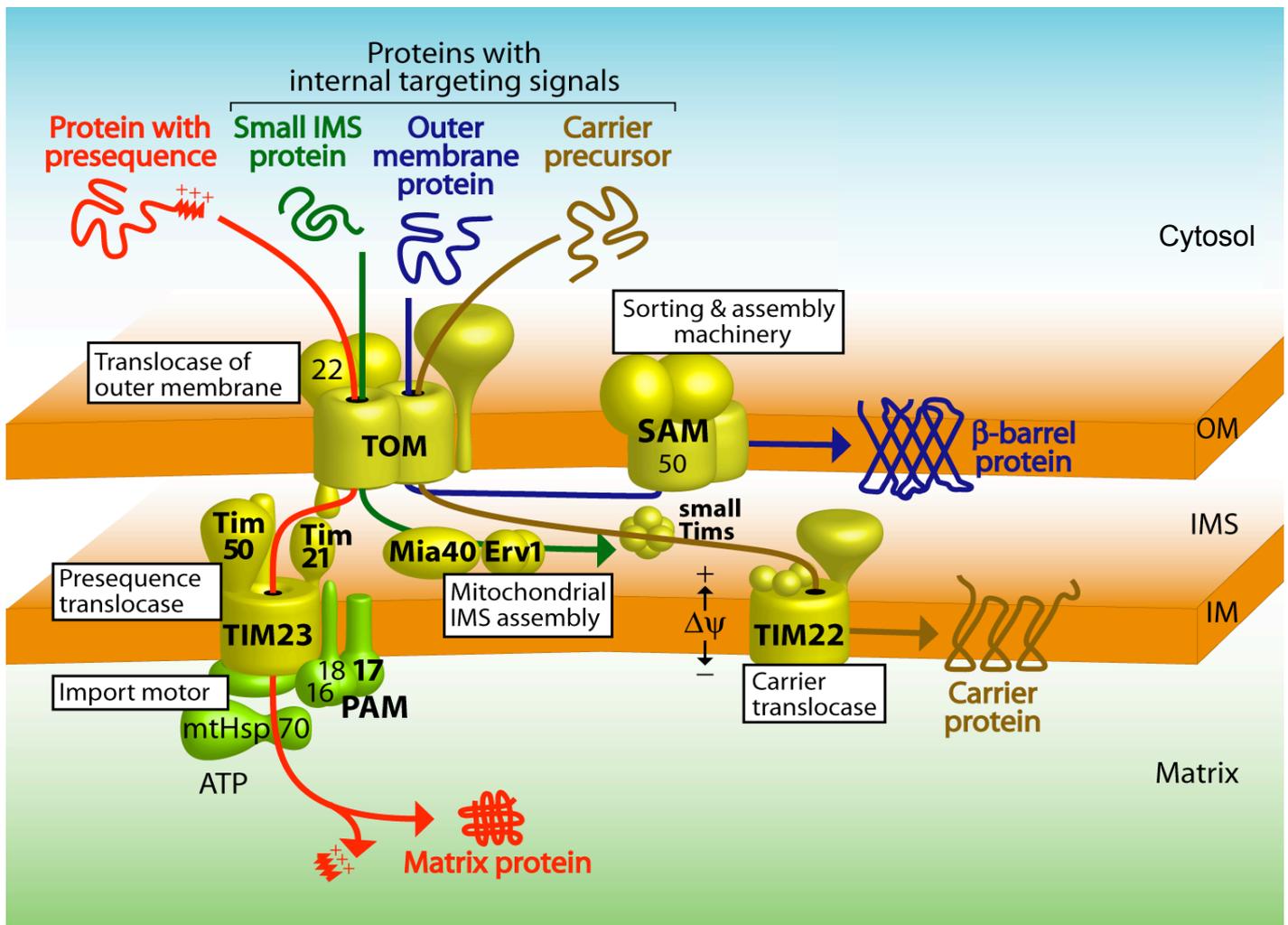


Figure 4. Import et assemblage des protéines mitochondriales (d'après Nils Wiedemann et Nikolaus Pfanner). Toutes les protéines à destinée mitochondriale traversent la membrane externe par la translocase de la membrane externe (TOM) puis sont dirigées vers l'une des quatre voies suivantes: (1) le complexe TIM23 pour les protéines présentant une préséquence en N-terminal (2) le complexe TIM22 pour les protéines de type transporteur, à plusieurs segments transmembranaires (3) le complexe SAM pour les protéines de la membrane externe (4) une voie particulière pour les petites protéines de l'espace intermembranaire, impliquant Mia40 et Erv1p. $\Delta\psi$: différence de potentiel membranaire; PAM: Presequence translocase associate motor; TIM: Translocase of the inner membrane.

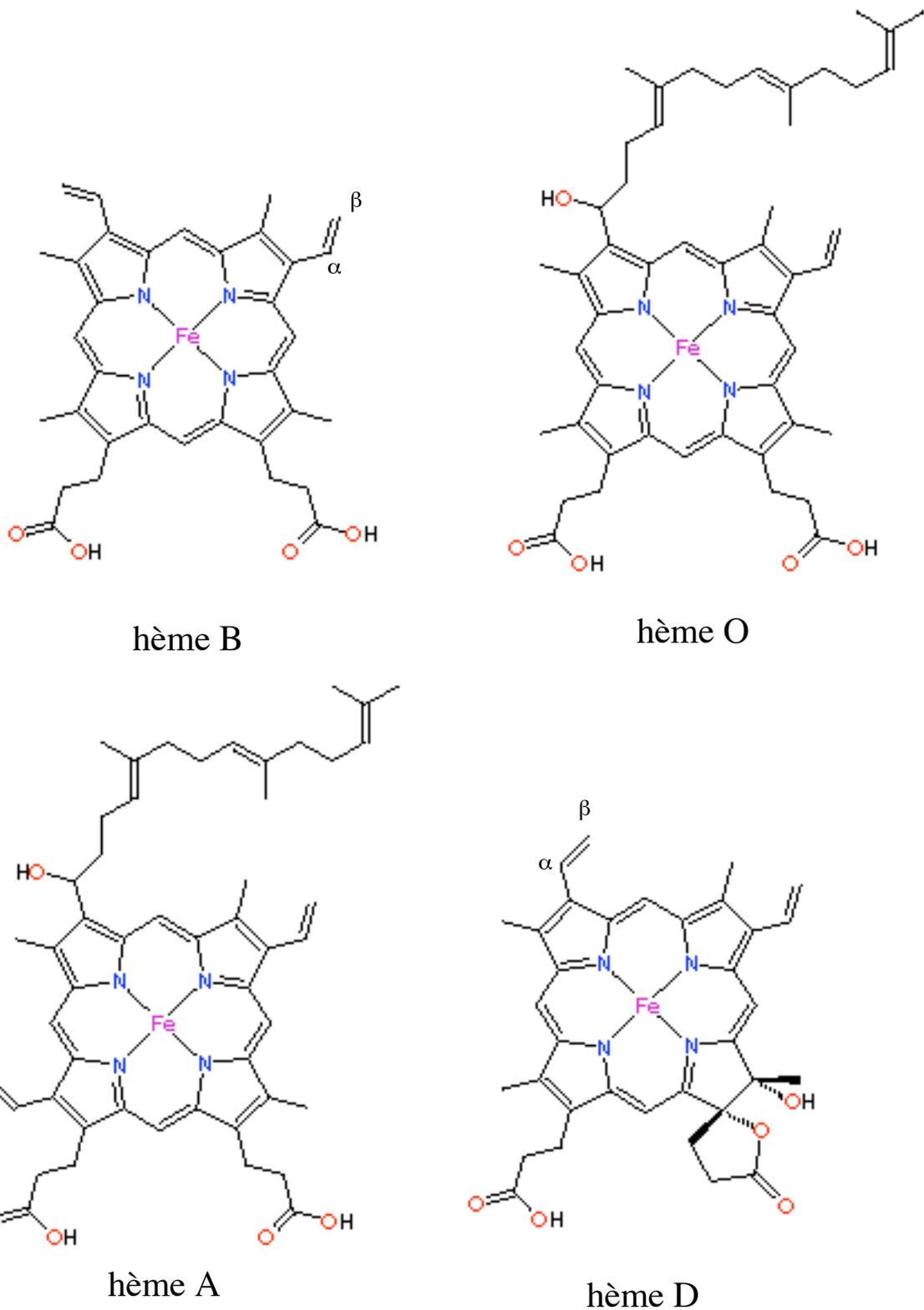
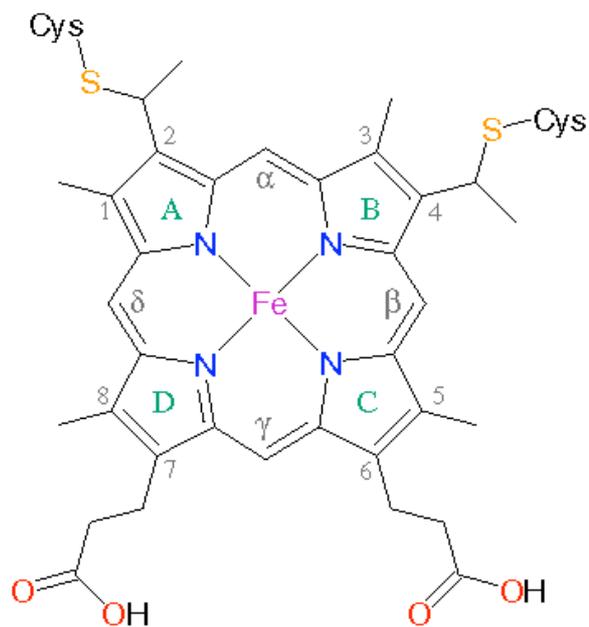


Figure 5. Exemples de différents types d'hèmes (excepté l'hème C, présenté en figure 6) (issus du site <http://metallo.scripps.edu/PROMISE/CYTOCHROMES.html>). Ces hèmes diffèrent par la nature des chaînes périphériques associées à la protoporphyrine. L'hème D ne se trouve que chez les procaryotes.

A.



B.

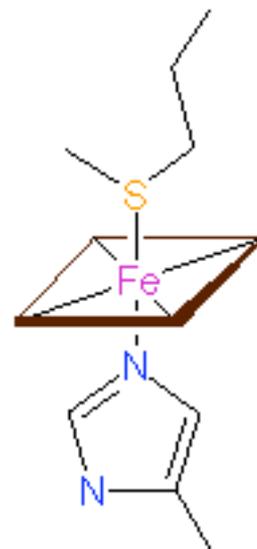
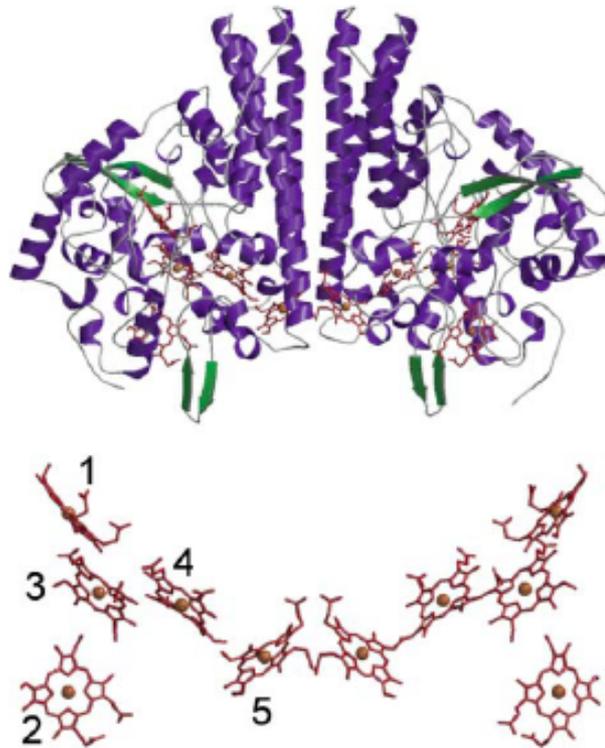


Figure 6. Attachement covalent de l'hème aux cytochromes de type *c*.

A. Représentation de l'hème C. Notez la liaison covalente de type thioéther établie entre les cystéines (du motif C-X-X-C-H) et le carbone α des groupes vinyles de la protoporphyrine IX. B. L'atome de fer est hexacoordonné. Les ligands axiaux représentés ici sont l'histidine (atome d'azote en bleu) et la méthionine (atome de soufre en jaune), correspondant aux cytochromes de type *c* de classe I.

A.



B.

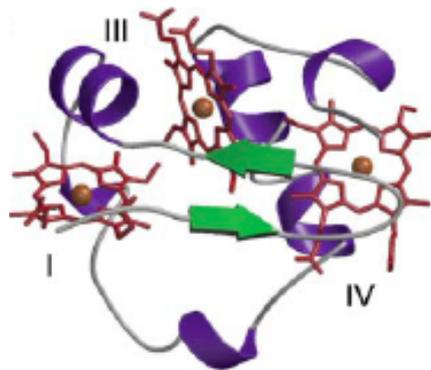


Figure 7. Structure cristallographique de cytochromes de type *c* multihèmes bactériens (d'après Mowat and Chapman, 2005). A. Structure de la cytochrome *c* nitrite reductase (NrfA) issue de *Wolinella succinogenes* et arrangement spatial des groupements hèmes au sein du dimère. B. Structure du cytochrome *c*₇ de *Geobacter sulfurreducens*.

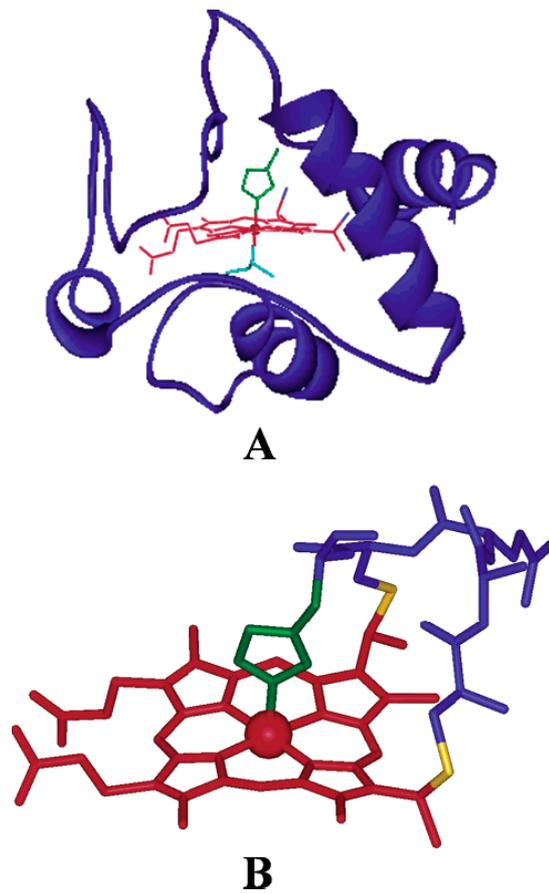
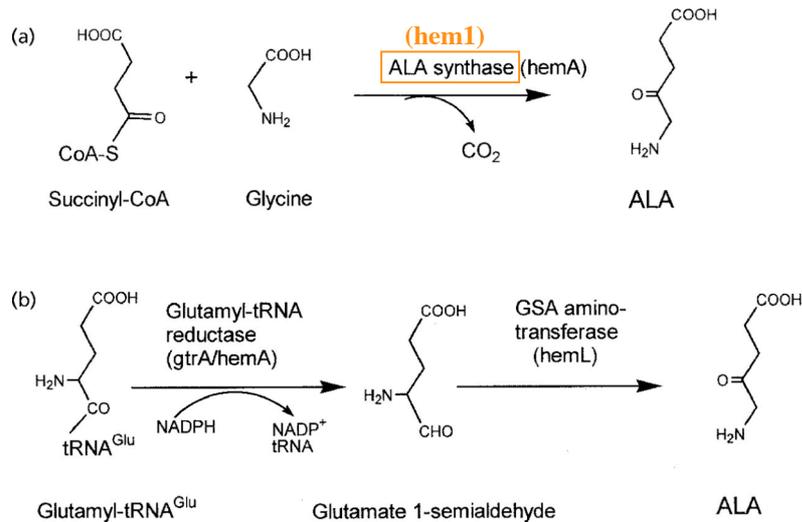


Figure 8. Structure cristallographique du cytochrome *c* de cœur de cheval. (d'après la revue Stevens *et al.*, 2004) A. L'hème est représenté en rouge. Les ligands axiaux de l'atome de fer sont l'histidine (vert) et la méthionine (turquoise). B. Visualisation de l'hème, du ligand histidine et des cystéines (jaune) impliquées dans la liaison covalente de l'hème à l'apocytochrome *c*.

A.



B.

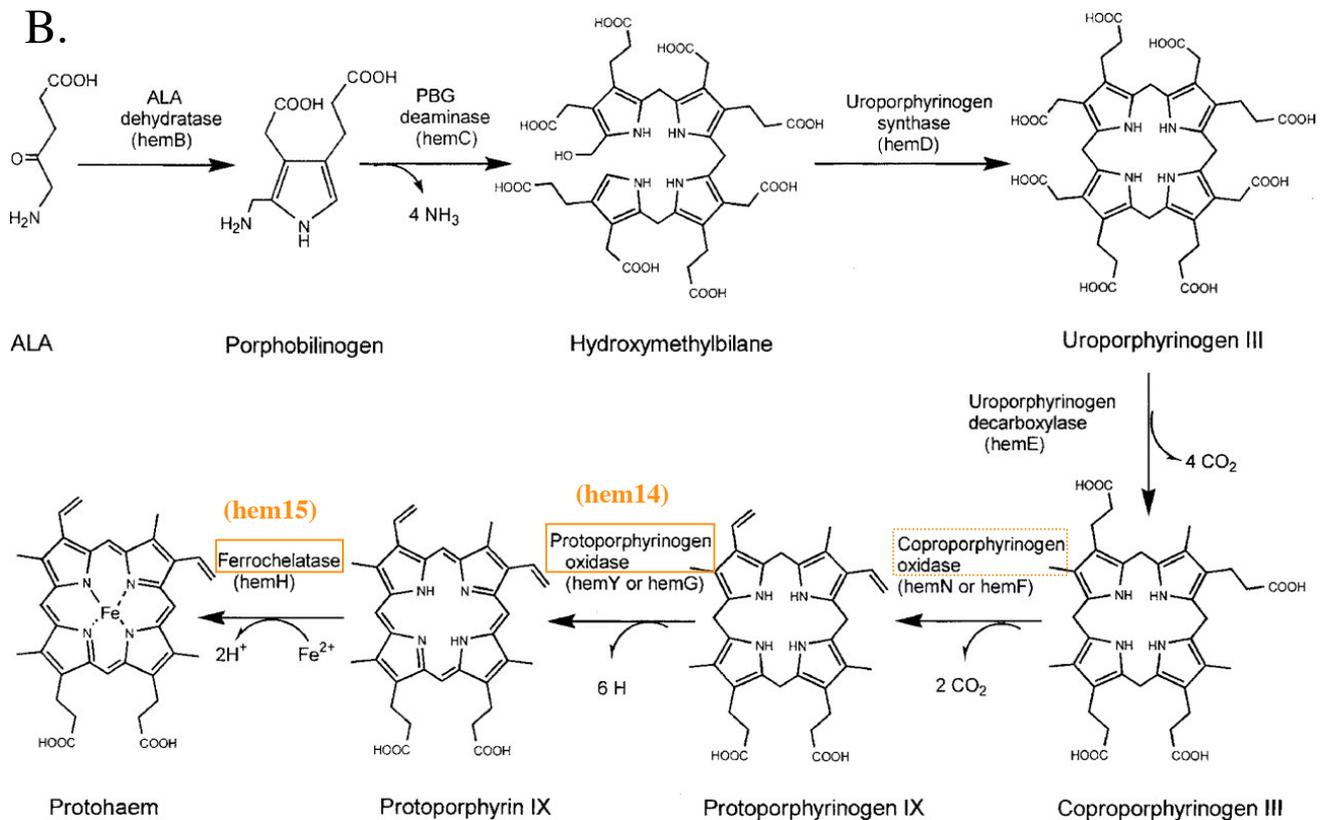


Figure 9. La chaîne de biosynthèse de l'hème (adapté de Panek *et al.*, 2005)

La biosynthèse de l'hème, universelle et conservée parmi les procaryotes et les eucaryotes, s'effectue en huit étapes. Les gènes bactériens codant chacune de ces enzymes sont mentionnés entre parenthèses. Les gènes orthologues de levure codant les enzymes à localisation mitochondriale sont indiqués en orange. Le nom des enzymes localisées dans la mitochondrie est encadré en orange. La coproporphyrinogène oxydase est mitochondriale chez les mammifères mais cytoplasmique chez la levure. A. La première étape consiste en la formation de l'acide δ -aminolévulinique (ALA). Chez les eucaryotes et les α -protéobactéries, l'ALA est formé à partir de la glycine et du succinyl-CoA. Les autres bactéries synthétisent l'ALA suivant une autre voie, présentée en b). B. Les sept étapes suivantes de la biosynthèse de l'hème.

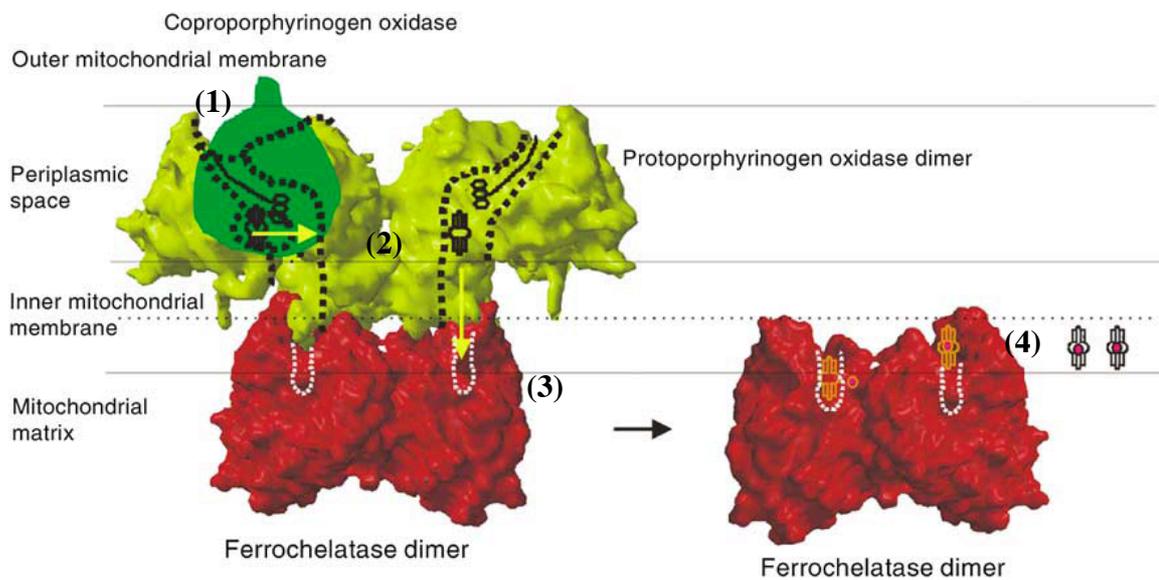


Figure 10. Modèle d'interaction physique des trois dernières enzymes de biosynthèse de l'hème, chez l'humain (d'après Hoch *et al.*, 2004).

Localisation de la coproporphyrinogène III oxydase CPO (Santana *et al.*, 2002) en vert, de la protoporphyrinogène oxydase PPO de tabac en vert clair et de la ferrochelatase humaine (Wu *et al.*, 2001) en rouge. Les lignes en pointillés symbolisent le canal entre la PPO et la ferrochelatase dans lequel pourrait se situer le substrat. (1) La protoporphyrinogène IX passe de la CPO jusqu'à la PPO, (2) formation de la protoporphyrine IX et accompagnement jusqu'à la ferrochelatase, (3) insertion du fer dans la protoporphyrine IX, (4) libération de l'hème dans la membrane. Une alternative du modèle, proposée également par les auteurs serait le désassemblage du complexe après l'étape (2), justifiée par l'instabilité du complexe.

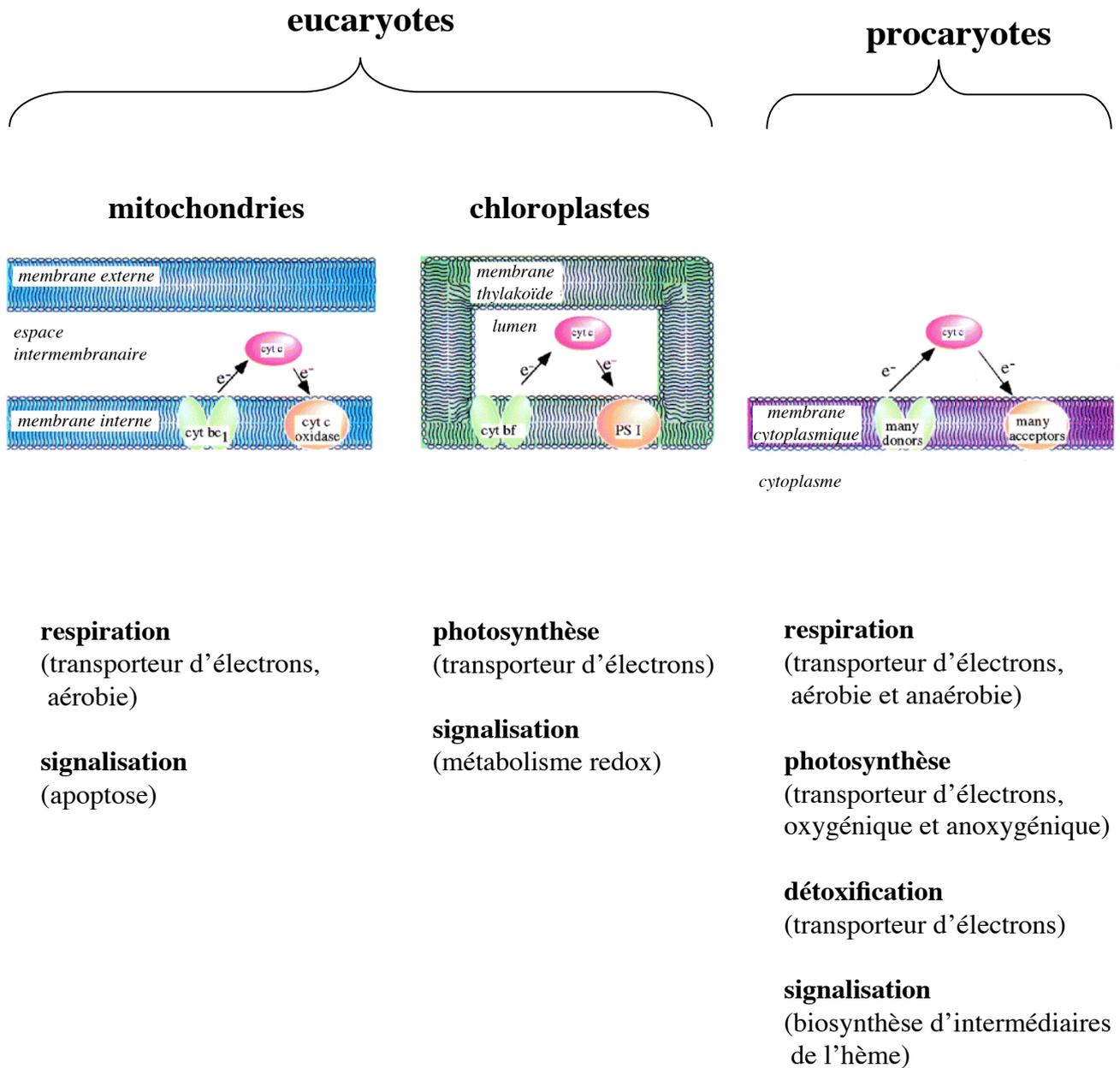
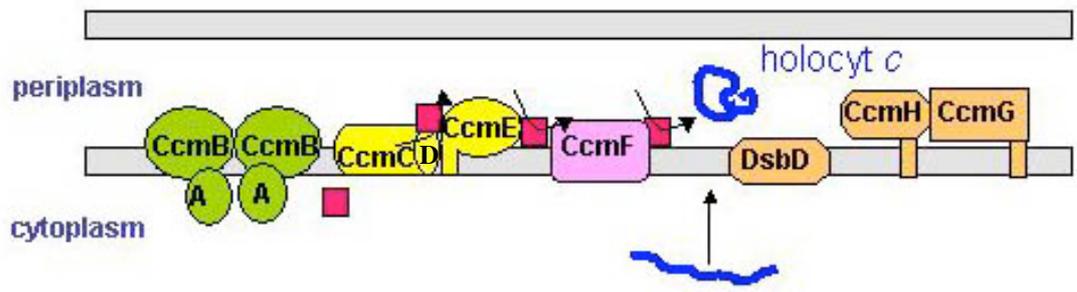
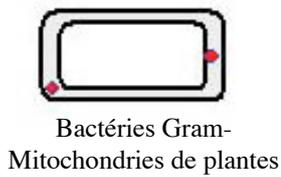
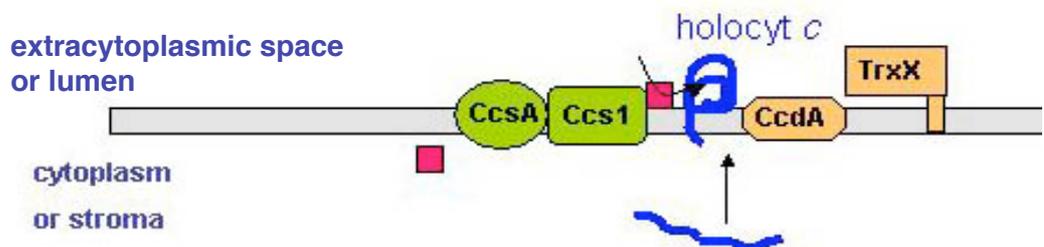
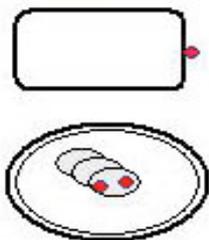


Figure 11. Localisation et fonctions des cytochromes de type *c* (d'après Kranz *et al.*, 1998).

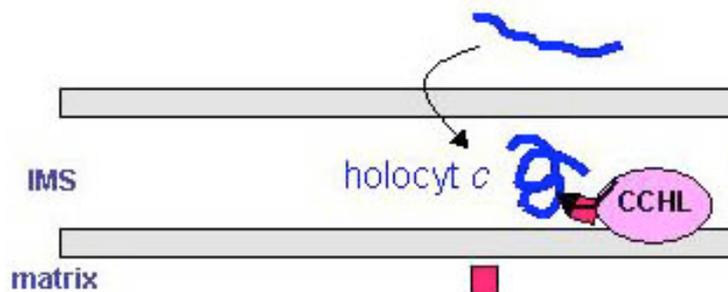
System I



System II

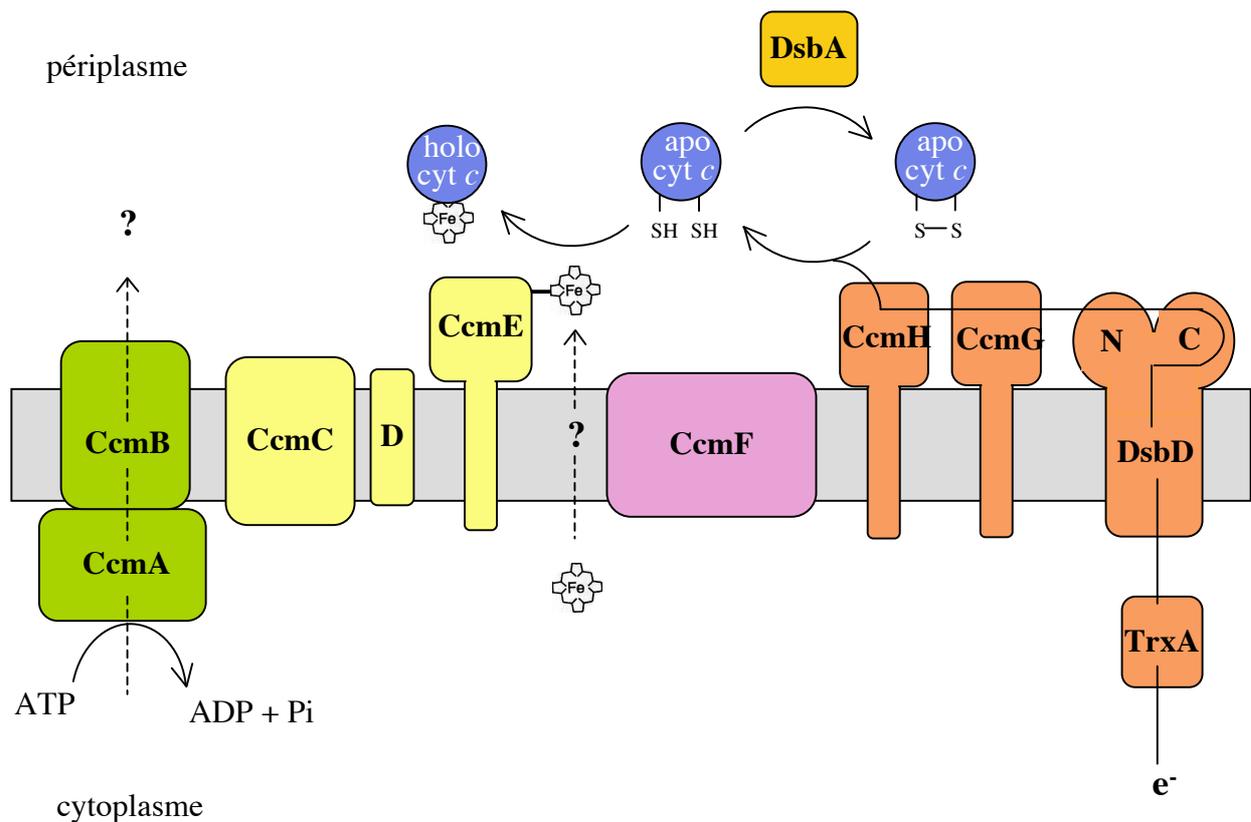


System III



- | | |
|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| <i>transporteur?</i> | <i>hème lyase putative</i> |
| <i>livraison de l'hème</i> | <i>métabolisme redox</i> |

Figure 12. Comparaison des trois principaux systèmes de maturation des cytochromes de type c. Cette figure résume l'état des lieux des connaissances obtenues jusqu'à présent sur les trois différents systèmes de maturation des cytochromes de type c, sachant que l'étude des systèmes II et III a été moins développée que celle du système I.



- transporteur?*
- livraison de l'hème*
- hème lyase putative*
- métabolisme redox*

Figure 13. Modèle de maturation des cytochromes de type *c* chez *E. coli* (système I) (adapté de la revue Stevens *et al.*, 2004). Les apocytochromes *c* sont exportés dans le périplasm *via* la machinerie de translocation Sec (non représentée). Certaines bactéries ont un facteur supplémentaire, CcmI, qui ressemble au domaine C-terminal de CcmH de *E. coli*. DsbA est réoxydée par une protéine membranaire DsbB, elle même réoxydée par les quinones de la chaîne respiratoire (voir figure 14). Le substrat transporté par CcmAB demeure inconnu, ainsi que la voie de transport de l'hème à travers la membrane cytoplasmique. CcmE, qui a la propriété de lier l'hème de façon covalente, interagirait avec plusieurs facteurs Ccm. Les mitochondries de plante utilisent un système similaire mais ne semblent comporter ni CcmG ni DsbA ni DsbD. Légendes: les flèches en trait continu indiquent le flux d'électrons. DsbD=DipZ et CcmG=DsbE

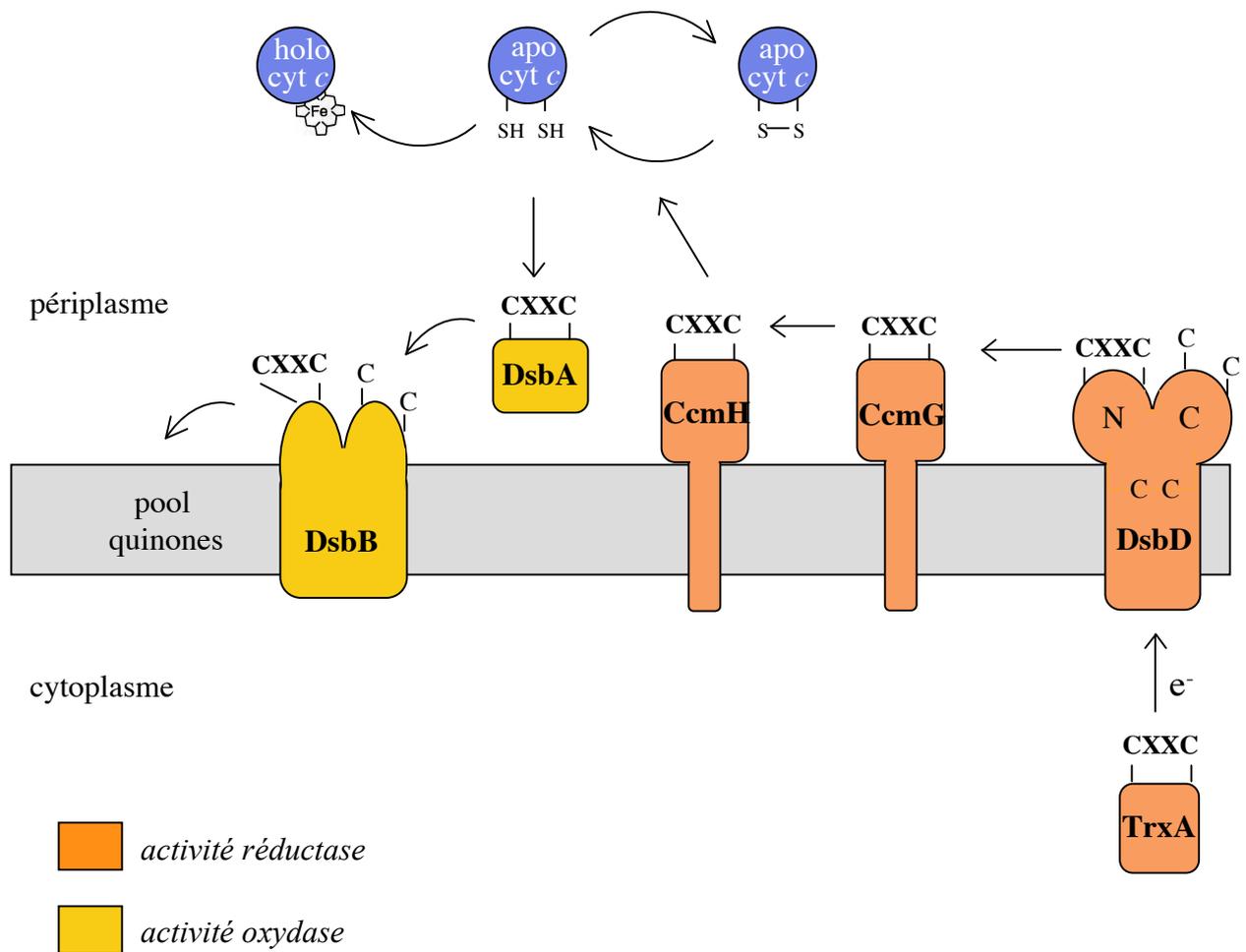


Figure 14. Modèle du contrôle redox de la maturation des cytochromes de type c chez *E. coli* (adapté de Fabianek *et al.*, 2000). Les flèches indiquent le flux d'électrons.

```

DsbA: GAPQVLEFFSFFCPHCYQFEEVLHISDN
DsbB: ALWFQHVMLLKPCVLCIYERCALFGVLG
DsbC: EKHVITVFTDITCGYCHKLHEQMADYNA
DsbD: GKPVMLDLYADWCVACKEFEKYTFSDPQ
DsbG: APVIVYVFADPFCPYCKQFWQQARPWVD
CcmG: GKPVLLNVWATWCPTCRAEHQYLNQLSA
CcmH: EQQFRQLTEELRCPKCQNNSIADSNSMI
TrxA: DGAILVDFWAEWCGPCKMIAPILDEIAD

```

Figure 15. Alignement de séquences de différentes oxydoréductases de la famille des thiorédoxines au niveau du motif conservé C-X-X-C chez *E. coli* (d'après Fabianek *et al.*, 2000). Hormis TrxA, localisée dans le cytoplasme, les autres oxydoréductases sont localisées du côté périplasmique. DsbC et DsbG sont des disulfides isomérases localisées dans le périplasm.

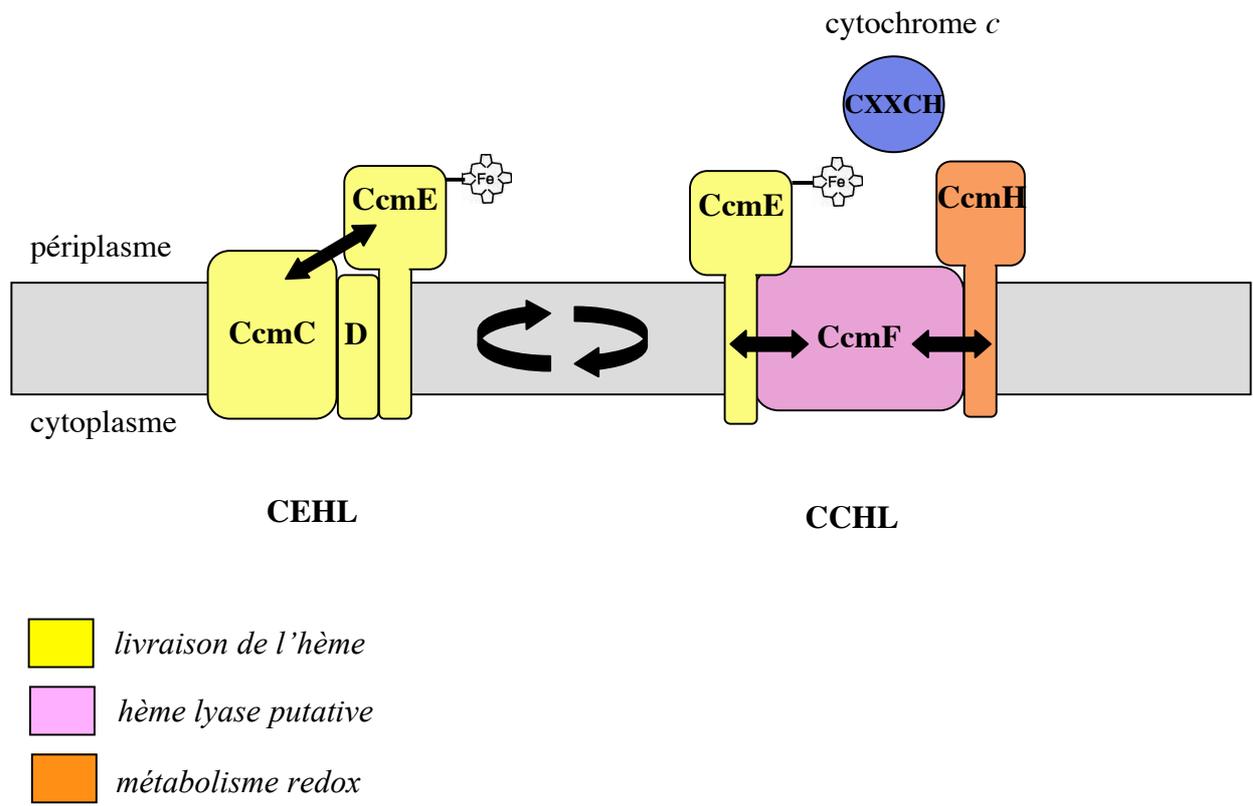


Figure 16. Modèle d'interaction physique des sous-unités de l'appareil de maturation des cytochromes de type *c* dans le système I (adapté de Ahuja and Thöny-Meyer, 2003). Les flèches noires indiquent les interactions physiques. Les fonctions putatives de CcmC et CCHL sont indiquées comme suit: CEHL, CcmE hème lyase; CCHL, cytochrome *c* hème lyase.

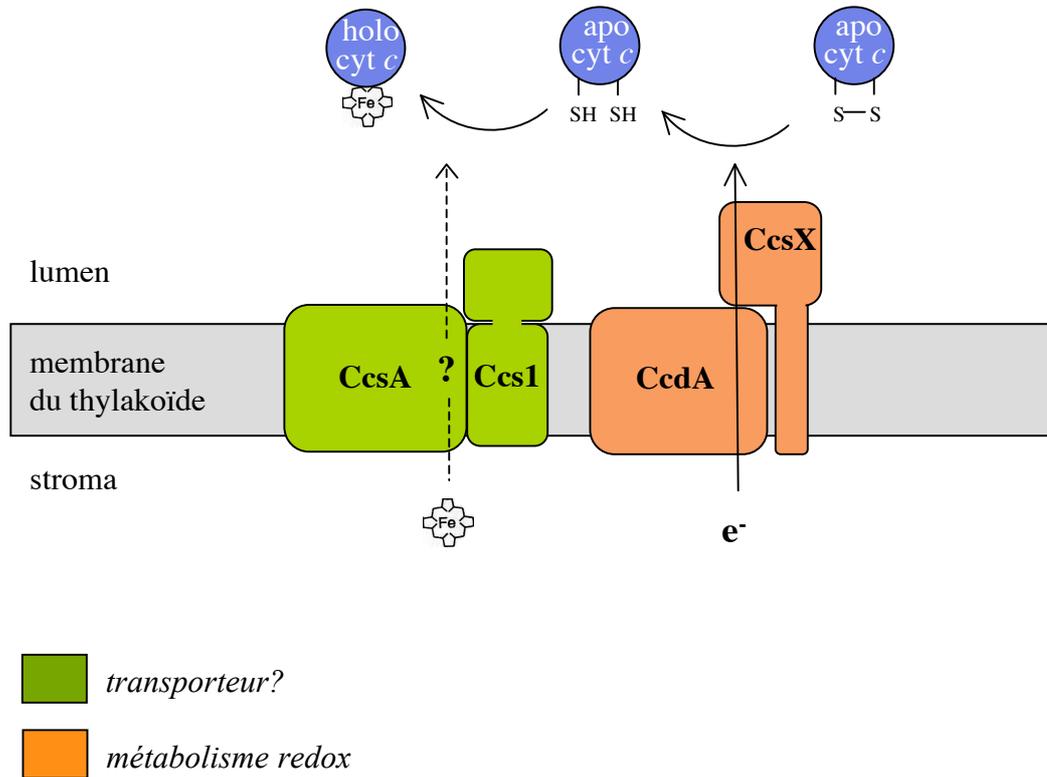


Figure 17. Modèle de maturation des cytochromes de type *c* dans le chloroplaste de *Chlamydomonas reinhardtii* (système II). Ce système est également opérationnel chez les bactéries Gram-positives (*Bacillus subtilis*), certaines bactéries Gram-négatives (*Helicobacter pylori*), les chloroplastes de plantes et d'algue ainsi que chez les cyanobactéries. Les flèches en trait continu indiquent le flux d'électrons. Une nomenclature alternative est utilisée chez *B. subtilis* et *Bordetella pertussis*: Ccs1=ResB=CcsB; CcsA=ResC; CcsX=ResA.

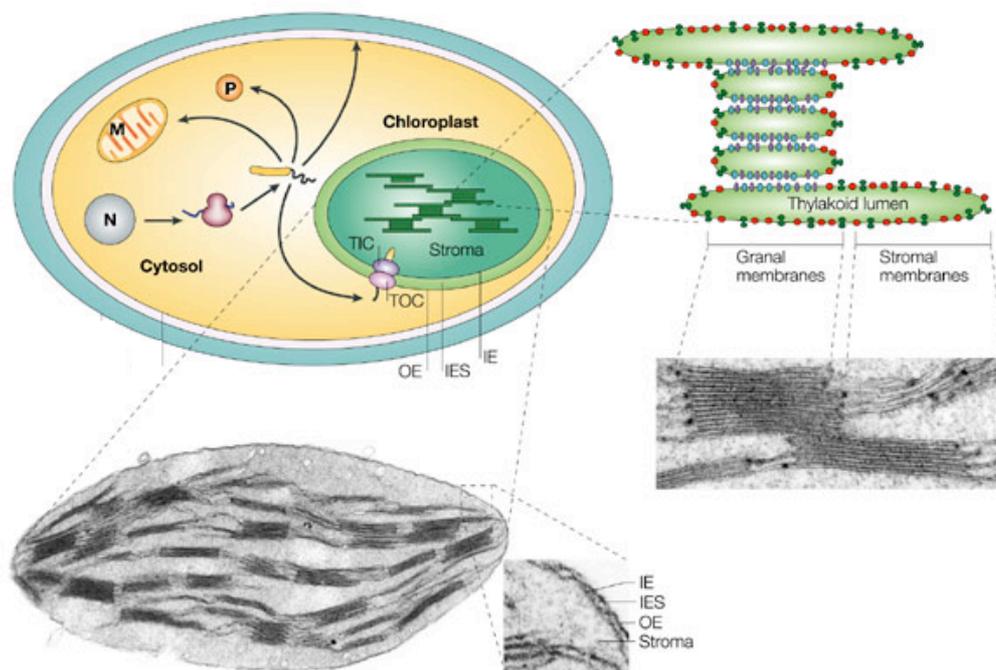


Figure 18. Organisation générale du chloroplaste (d'après Soll and Schleiff, 2004).

Légendes concernant la cellule: N: noyau; M: mitochondries, P: peroxysomes. Légendes concernant le chloroplaste: OE: enveloppe externe; IES: espace inter-enveloppe; IE: enveloppe interne. Le chloroplaste, ultrastructuré, est composé de trois systèmes membranaires: l'enveloppe externe, l'enveloppe interne et les membranes thylakoïdiennes contenant les complexes photosynthétiques. Trois compartiments solubles sont distinguables: l'espace inter-enveloppe, le stroma et le lumen du thylakoïde. Les protéines codées par le génome nucléaire et dirigées vers les thylakoïdes doivent traverser les deux enveloppes par les systèmes TOC/TIC. Des images obtenues par microscopie électronique sont également présentées.

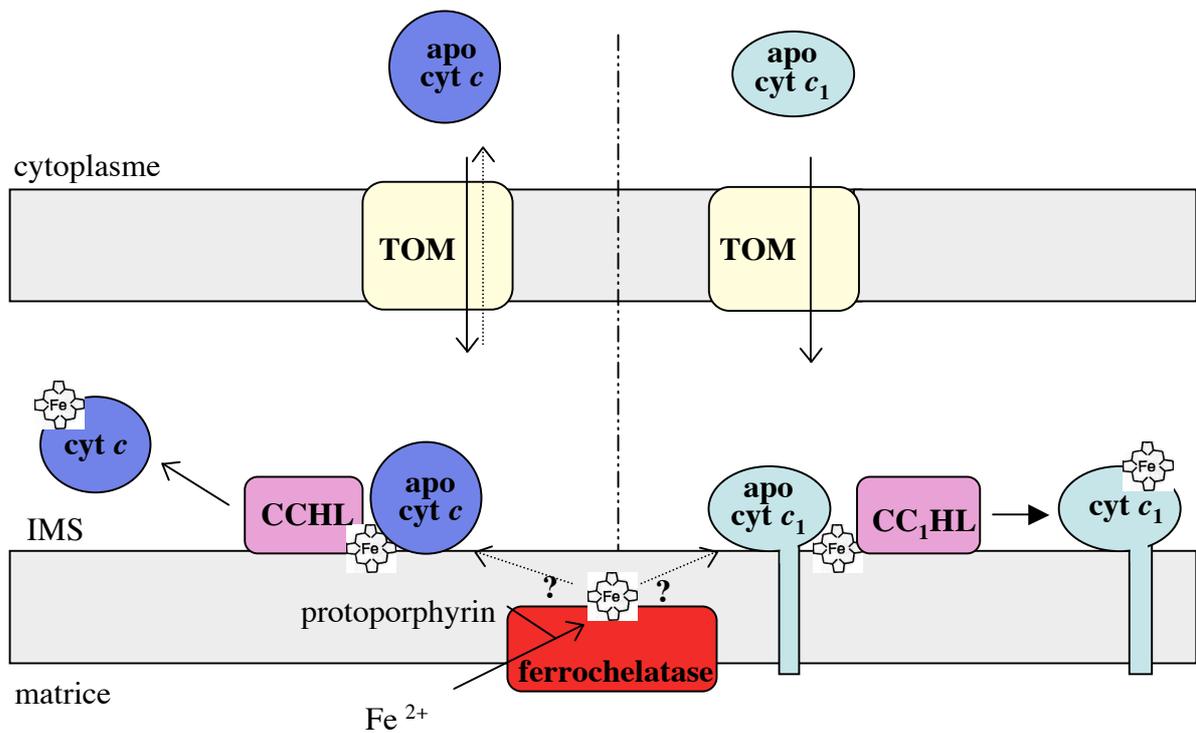


Figure 19. Modèle de maturation des cytochromes de type *c* dans la mitochondrie chez *Saccharomyces cerevisiae* (système III). Ce système est également opérationnel dans les mitochondries de champignons (*Neurospora crassa*), de vertébrés (*Homo sapiens*, *Mus musculus*), d'invertébrés (*Caenorhabditis elegans*) et d'algue verte. Dans ces derniers cas, une seule hème lyase a été mise en évidence par comparaison de séquences génomiques. Les apocytochromes *c* et *c*₁ sont importés dans l'espace intermembranaire *via* la translocase de la membrane externe (TOM) puis lient l'hème dans ce compartiment. L'hème lyase du cytochrome *c* (CCHL) et l'hème lyase du cytochrome *c*₁ (CC₁HL), associées à la face externe de la membrane interne, sont requises pour l'attachement covalent de l'hème à l'apocytochrome *c* et *c*₁, respectivement. La maturation du cytochrome *c*₁, plus complexe, requiert deux étapes protéolytiques présentées dans la figure 20. La dernière étape de la biosynthèse de l'hème est catalysée par la ferrochelatase, localisée du côté matriciel de la membrane interne. On ignore la façon dont l'hème est transporté à travers la membrane interne (?).

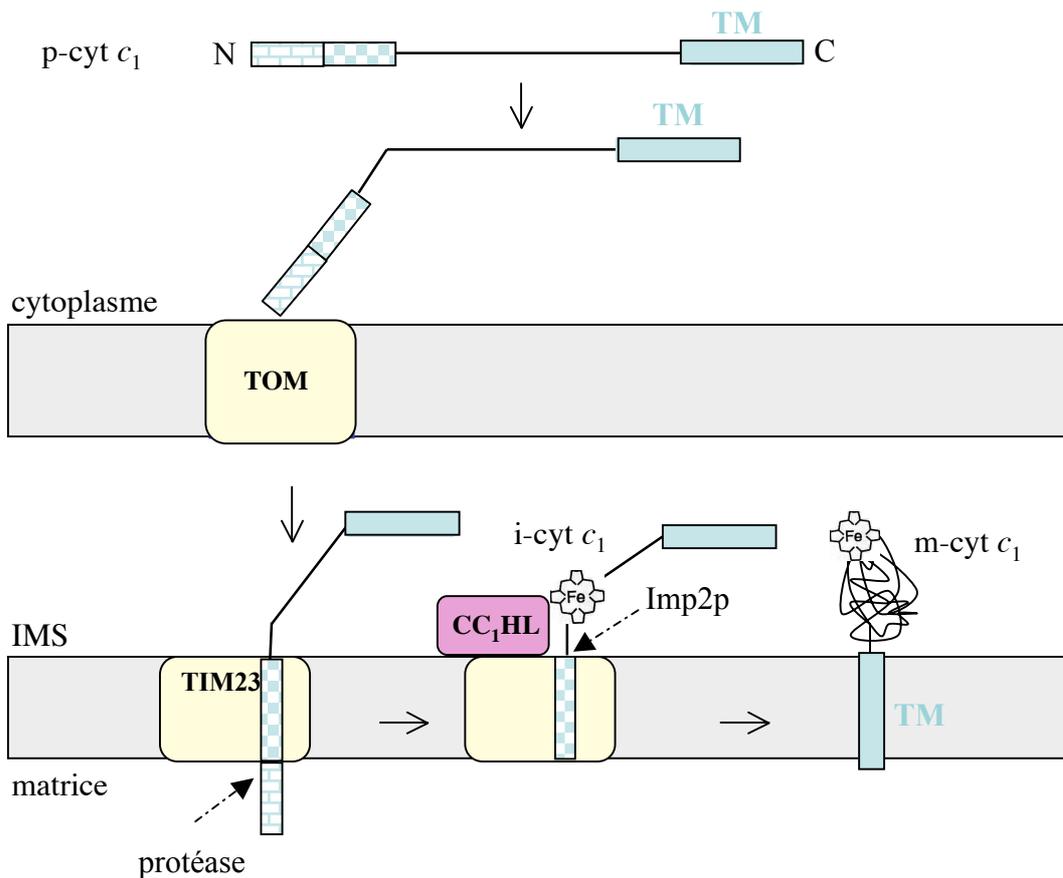


Figure 20. Modèle de maturation du cytochrome c_1 dans la mitochondrie chez *Saccharomyces cerevisiae*. Le précurseur du cytochrome c_1 (p-cyt c_1), codé par le génome nucléaire, contient une longue séquence signal bipartite en N-terminal (signalée par les motifs en damiers et briques) est clivée en deux étapes distinctes au cours de l'import. Le précurseur du cytochrome c_1 est importé dans la mitochondrie via la translocase de la membrane externe (TOM) et le complexe Tim23, puis la séquence d'adressage à la matrice est clivée par une peptidase matricielle, conduisant à la forme intermédiaire du cytochrome c_1 (i-cyt c_1). L'attachement covalent de l'hème à l'apocytochrome c_1 , médié par l'hème lyase du cytochrome c_1 (CC₁HL), est un prérequis pour l'étape successive de coupure protéolytique catalysée par Imp2p et qui conduit à la forme mature du cytochrome c_1 (m-cyt c_1).

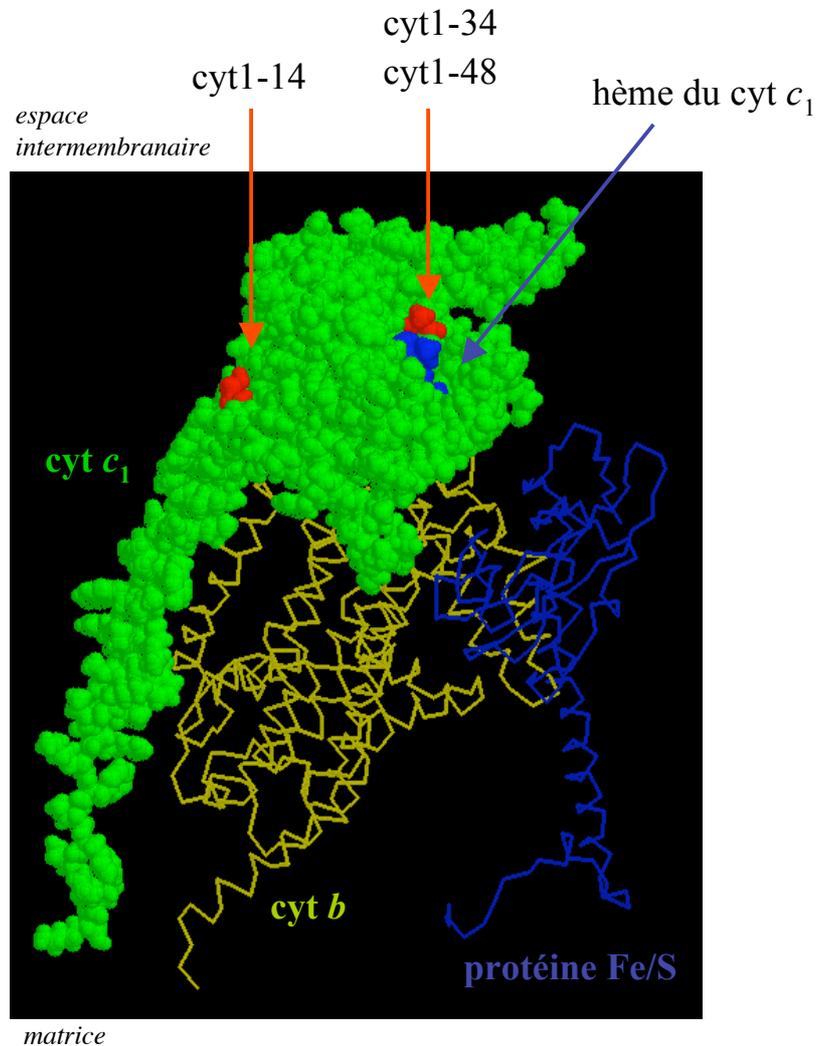


Figure 21. Localisation spatiale des sites du cytochrome c_1 modifiés chez certains révertants capables de supprimer le défaut respiratoire d'un mutant Δcc_1hl . Seules les structures du cytochrome c_1 , du cytochrome b et de la protéine Fe/S de *S. cerevisiae* sont représentées (Rasmol). Les acides aminés modifiés sont localisés du côté de l'espace intermembranaire. Légendes relatives aux acides aminés modifiés chez trois révertants:

cyt1-14 : $WS_{16}F \rightarrow WY_{16}H$
 cyt1-34 : $CAA_{42}CH \rightarrow CAP_{42}CH$
 cyt1-48 : $CAA_{42}CH \rightarrow CAD_{42}CH$

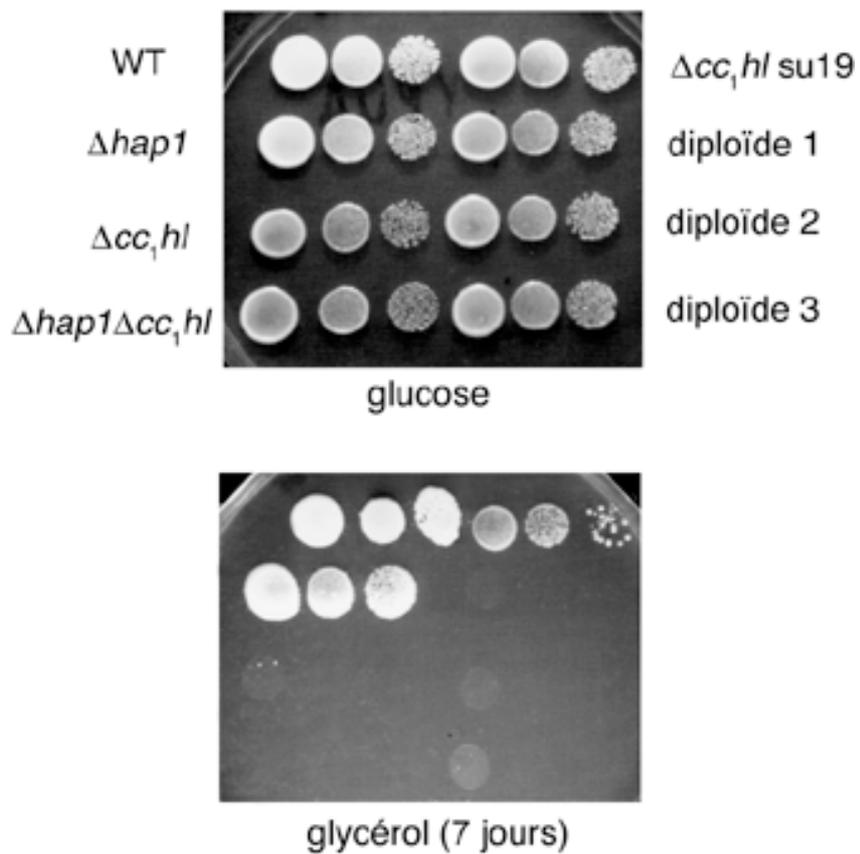
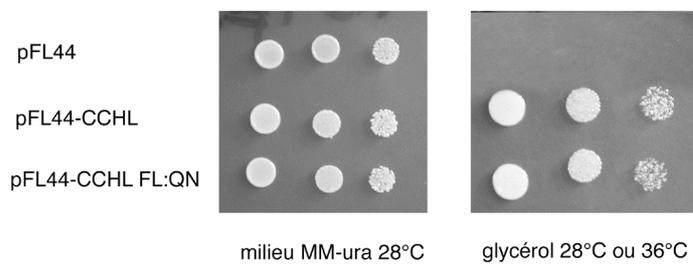


Figure 22. Comparaison des croissances respiratoires de différents mutants. Les souches utilis es sont WT (W303-1B), $\Delta hap1$ (YBG4), Δcc_1hl (SMY1), $\Delta hap1 \Delta cc_1hl$ (DB2-14A), $\Delta cc_1hl su19$ (R19) et trois diploïdes issus du croisement DB2-14A x SMY1.

A. Transformation d'un mutant $\Delta cchl$



B. Transformation d'un mutant Δcc_1hl

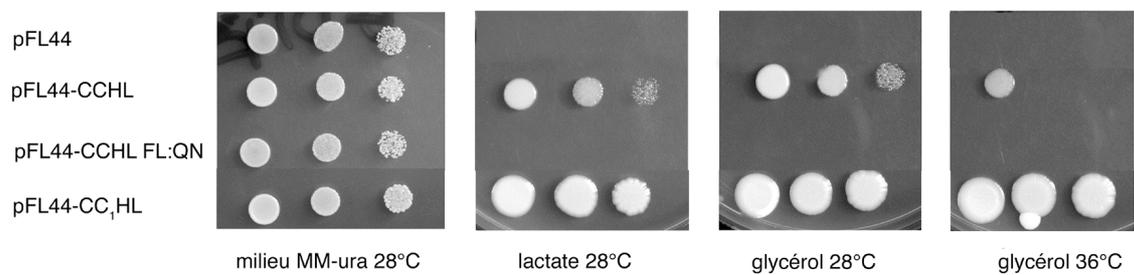
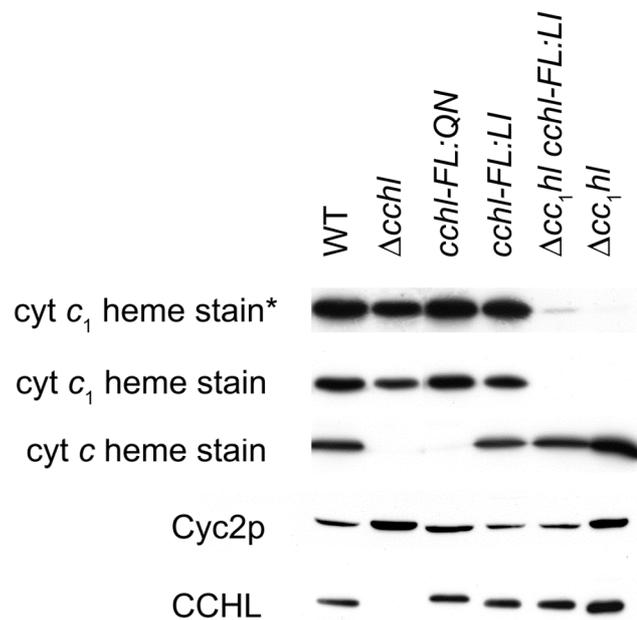


Figure 23. Transformation des mutants $\Delta cchl$ et Δcc_1hl par un plasmide multicopie exprimant la CC₁HL ou différentes versions de la CCHL. La croissance respiratoire des transformants a été observée après 6 jours de croissance à 28°C et 36°C.



**exposition prolongée*

Figure 24. Effet de certaines mutations du gène codant la CCHL sur l'accumulation d'holocytochrome *c* et sur la stabilité de la CCHL. Les souches utilisées sont les suivantes: WT (W303-1B), $\Delta cchl$ (SMY4), *cchl-FL:QN* (YDC4), *cchl-FL:LI* (YDB9), Δcc_1hl *cchl-FL:LI* (UV9) et Δcc_1hl (SMY1). 65 μ g de protéines mitochondriales purifiées à partir de cellules cultivées en galactose à 28°C ont été séparées sur un gel SDS 12,5% (ou LiDS 12.5% à 4°C en présence de DTT pour l'hème staining) puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. L'immunodétection a été réalisée en présence d'antisérums produits au laboratoire et dirigés contre les protéines Cyc2p et CCHL.

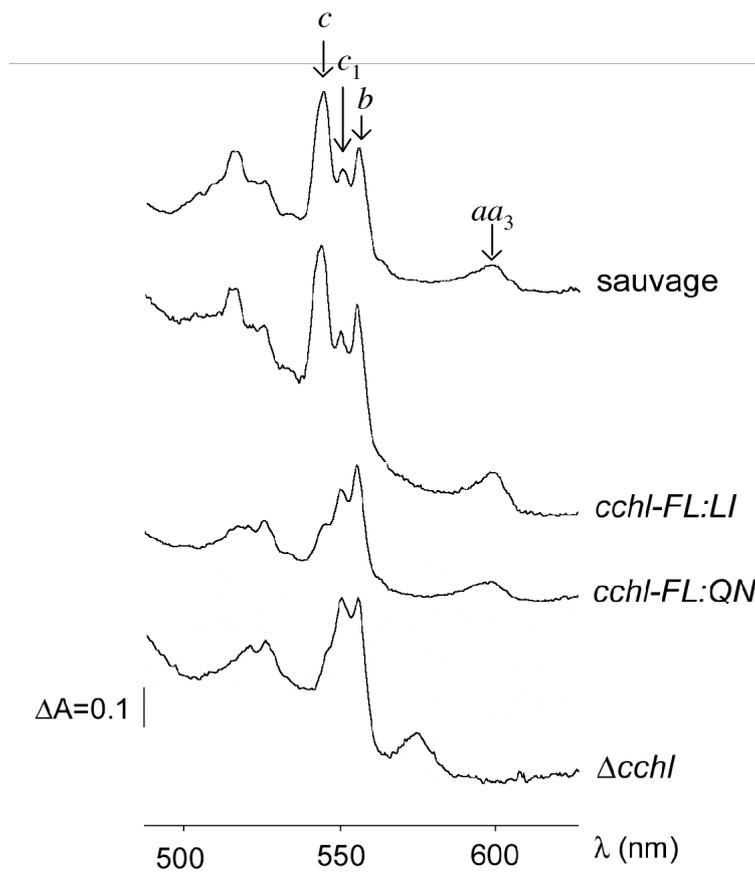


Figure 25. La substitution FL:QN de la CCHL affecte l'assemblage du cytochrome *c*. Les souches ont été cultivées 48h à 28°C sur un milieu galactose solide puis récoltées pour effectuer un spectre d'absorption (réalisé selon Claisse *et al.*, 1970). Les souches utilisées sont les suivantes: sauvage (W303-1B), $\Delta cchl$ (SMY4), $cchl_{FL:QN}$ (YDC4), $cchl_{FL:LI}$ (SU9).

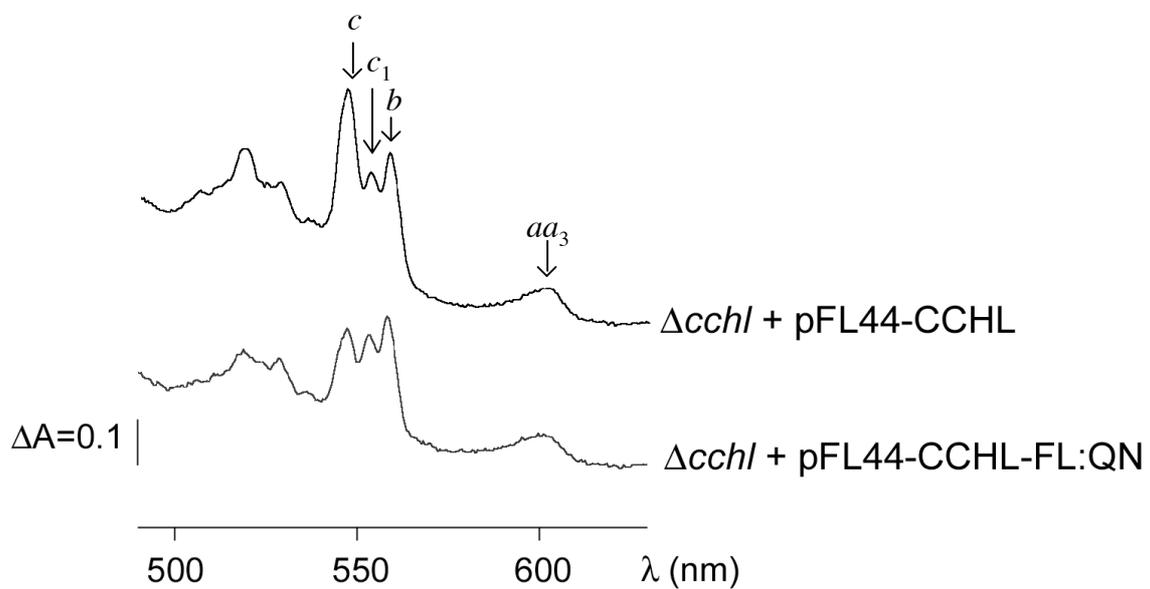


Figure 26. La substitution FL:QN de la CCHL affecte la capacité de la protéine à compléter le mutant $\Delta cchl$. Les transformants ont été cultivés 48h à 28°C sur un milieu glycérol solide puis récoltés pour effectuer un spectre d'absorption (réalisé selon Claisse *et al.*, 1970).

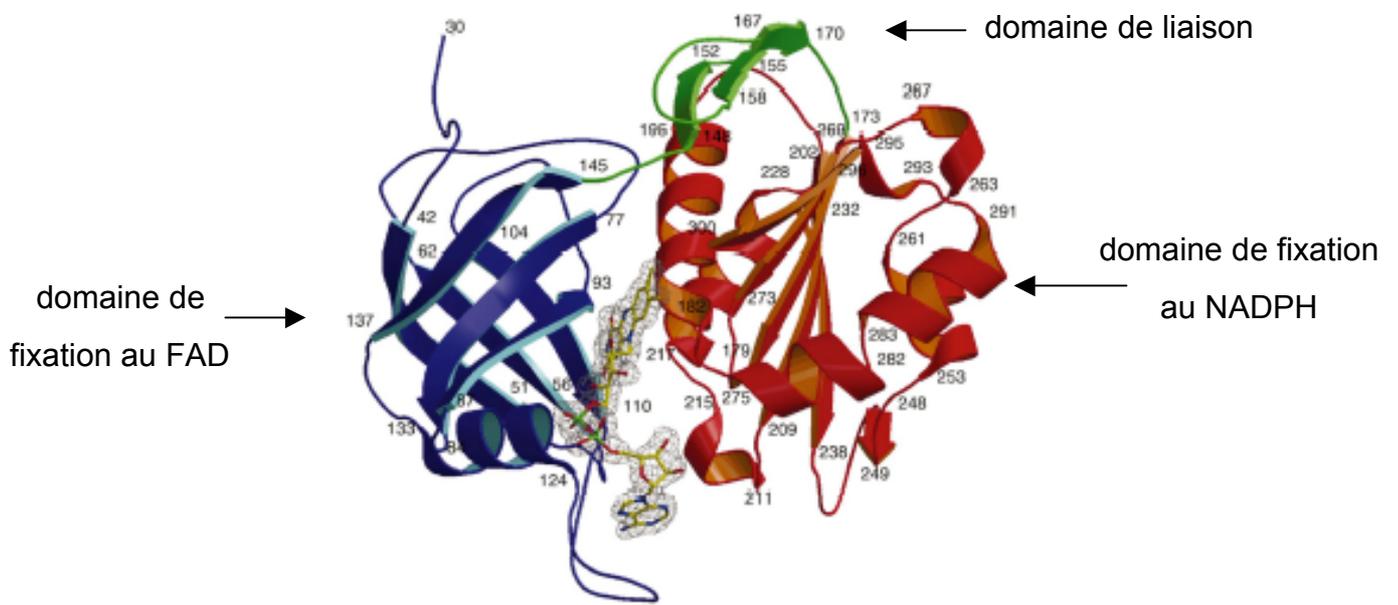


Figure 28. Structure cristallographique de la cytochrome b_5 réductase érythrocytaire humaine (Bando *et al.*, 2004). Cette structure révèle l'existence d'un domaine de fixation au FAD et d'un domaine de fixation au NADH, séparé par un domaine de liaison (*linker domain*). La structure du FAD (en blanc) a été superposée à celle de l'enzyme.

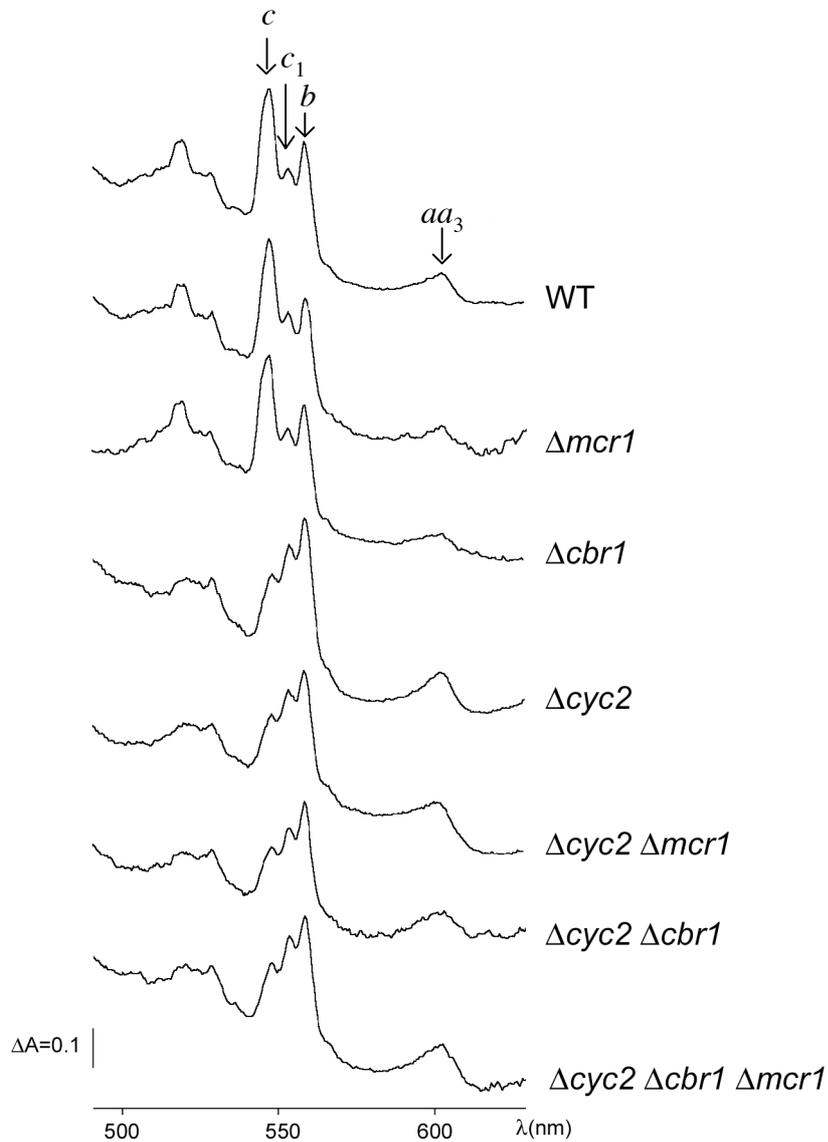
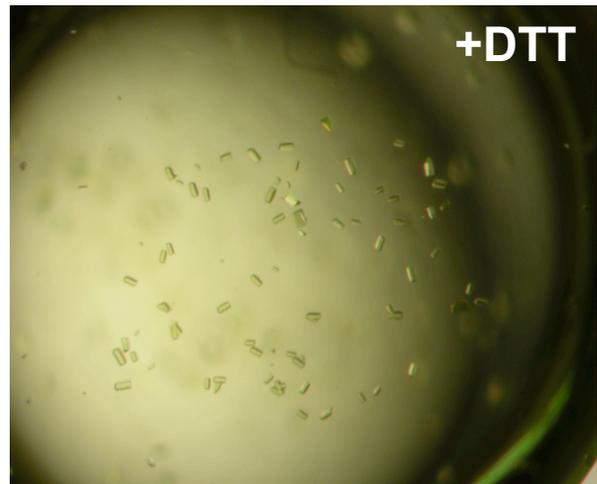


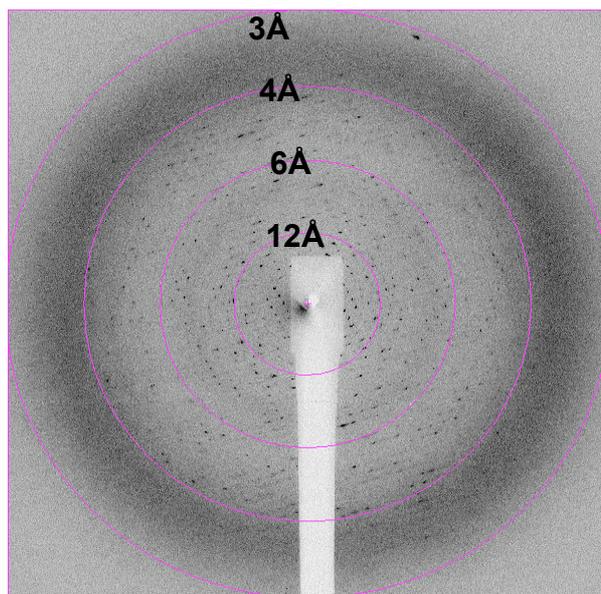
Figure 29. La délétion des gènes *CBR1* et *MCR1* n'aggrave pas le phénotype du mutant nul Δ *cyc2*. Les souches ont été cultivées 48h à 28°C sur un milieu galactose solide puis récoltées pour effectuer un spectre d'absorption (réalisé selon Claisse *et al.*, 1970). Les souches utilisées sont les suivantes: sauvage (W303-1B), Δ *mcr1* (YDB5), Δ *cbr1* (YDB16), Δ *cyc2* (YPH1), Δ *cyc2* Δ *mcr1* (DB14-1A), Δ *cyc2* Δ *cbr1* (DB10-3D), Δ *cyc2* Δ *mcr1* Δ *cbr1* (DB15-5A).



Photographie de cristaux.



Photographie de cristaux.



Cliché de diffraction.

Figure 30. Essais de cristallisation du domaine soluble de la protéine Cyc2p (réalisée par le groupe de Herman van Tilbeurgh, à Orsay). La protéine Cyc2p-His₆ a été purifiée par passages successifs sur colonne de nickel puis sur une colonne Superdex75 (tampon : 20mM Tris-HCl pH7,5, 200 mM NaCl). Des cristaux petits et difficiles à faire grossir ont pu être obtenus dans les conditions suivantes 25% PEG550MME, 10mM ZnSO₄, NaCaco pH6.5, 0,5mM FAD et +/- 10mM DTT. Peu de cristaux diffractaient, et la diffraction s'est avérée très faible (environ 4Å).

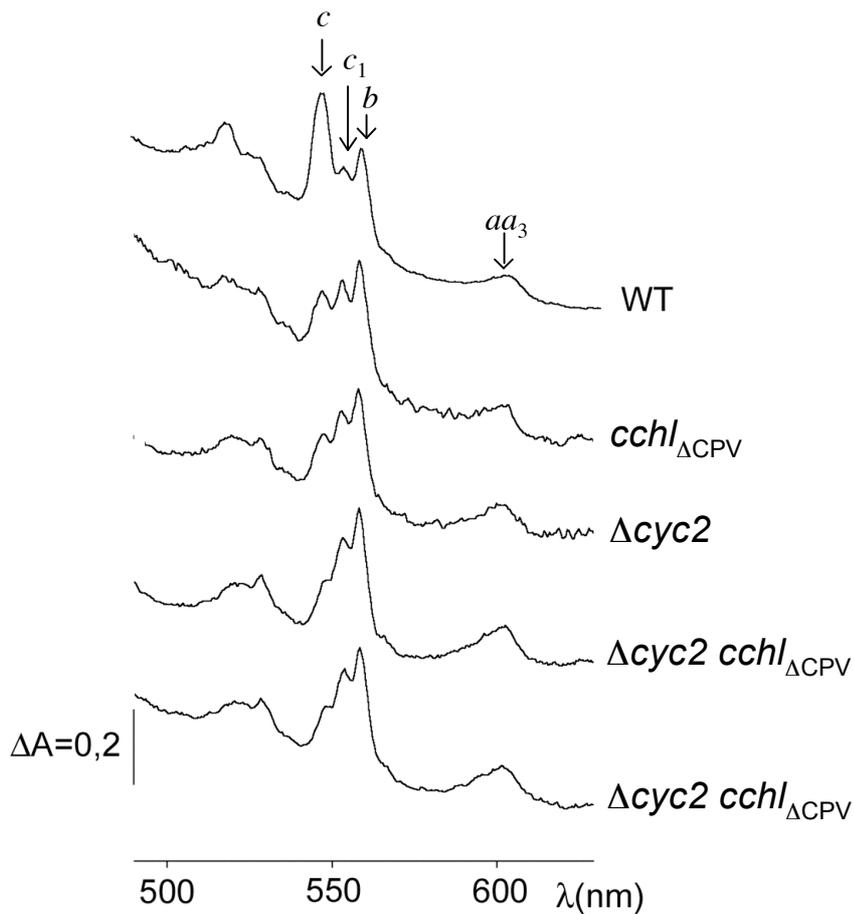


Figure 31. Spectre d'absorption des cytochromes à basse température (réalisés selon Claisse *et al.*, 1970). Les souches ont été cultivées 48h à 28°C sur un milieu galactose solide puis récoltées pour effectuer un spectre d'absorption. Les souches suivantes ont été utilisées: WT (W303-1B); *cchl*_{ΔCPV} (YDC3); Δ *cyc2* (DB13-7B); Δ *cyc2 cchl*_{ΔCPV} (DB13-6A et DB13-8C).

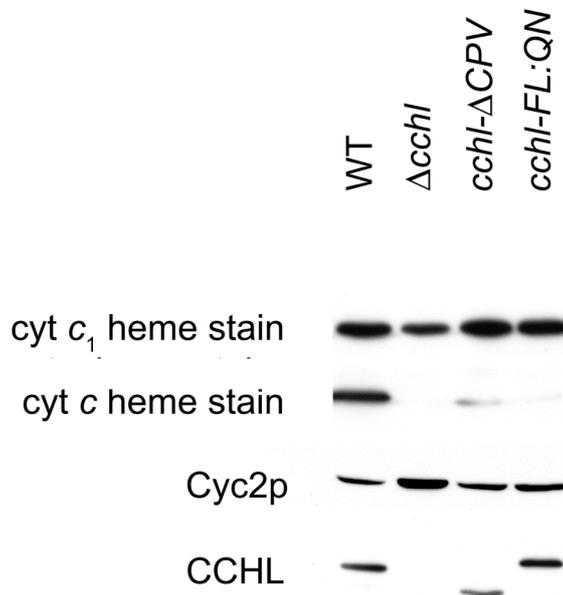
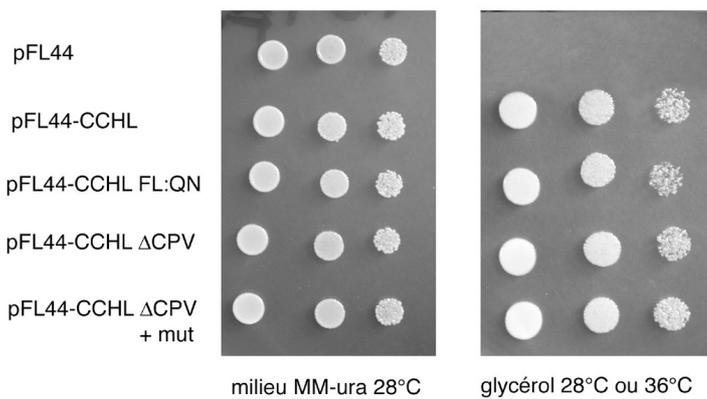


Figure 32. Effet de certaines mutations du gène codant la CCHL sur l'accumulation d'holocytochrome *c* et sur la stabilité de la CCHL. Les souches utilisées sont les suivantes: WT (W303-1B), $\Delta cchl$ (SMY4), *cchl* _{Δ CPV} (YDC3), *cchl*_{FL:QN} (YDC4). 65 μ g de protéines mitochondriales purifiées à partir de cellules cultivées en galactose à 28°C ont été séparées sur un gel SDS 12,5% (ou LiDS 12.5% à 4°C en présence de DTT pour l'heme staining) puis transférées sur une membrane de nitrocellulose. L'immunodétection a été réalisée en présence d'antisérums produits au laboratoire et dirigés contre les protéines Cyc2p et CCHL.

A. Transformation d'un mutant $\Delta cchl$



B. Transformation d'un mutant Δcc_1hl

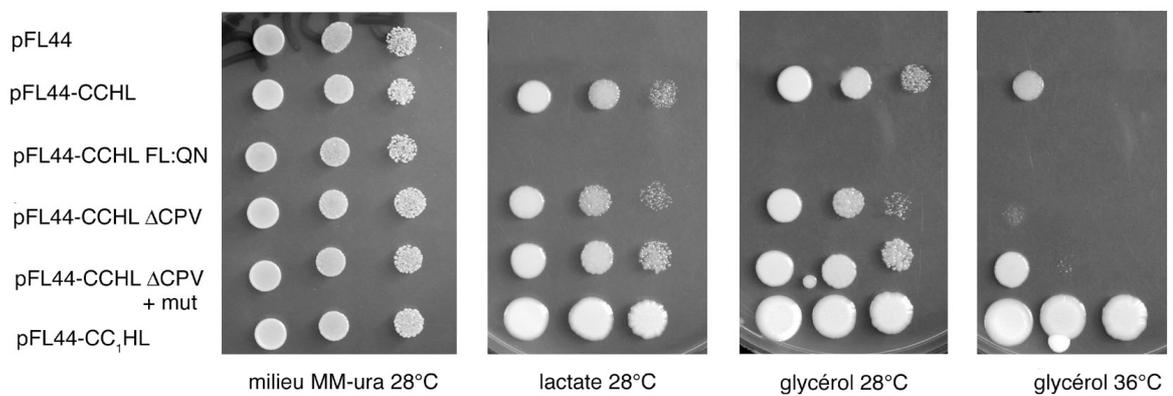


Figure 33. Transformation des mutants $\Delta cchl$ et Δcc_1hl par un plasmide multicopie exprimant différentes versions de la CCHL. La croissance respiratoire des transformants a été observée après 6 jours de croissance à 28°C et 36°C.

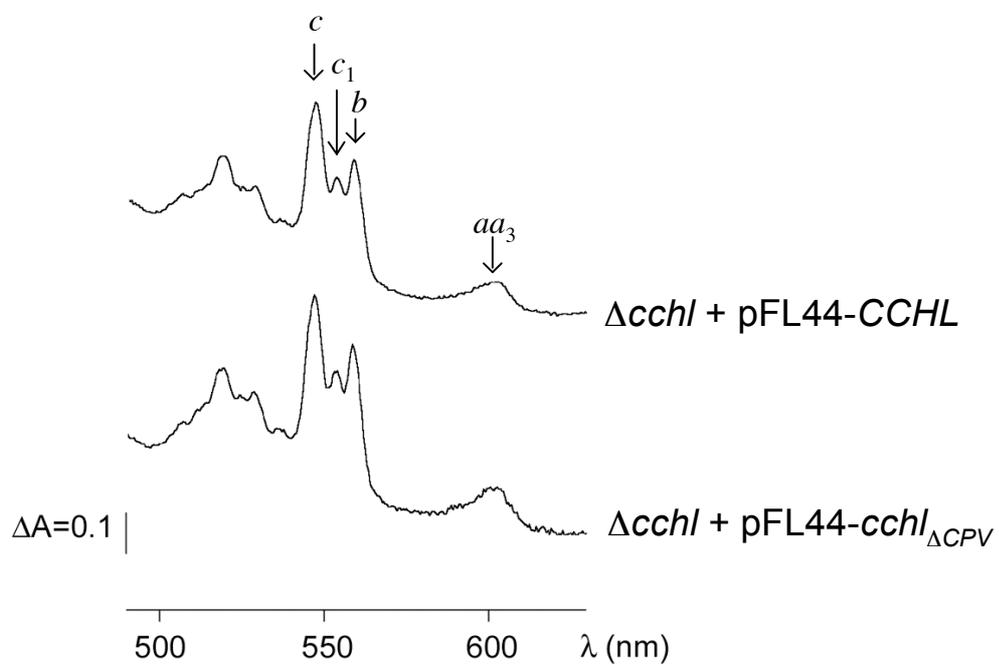


Figure 34. La délétion des motifs CPV de la CCHL n'affecte pas la capacité de la protéine à compléter le mutant $\Delta cchl$. Les transformants ont été cultivés 48h à 28°C sur un milieu glycérol puis récoltés pour effectuer un spectre d'absorption (réalisés selon Claisse *et al.*, 1970).

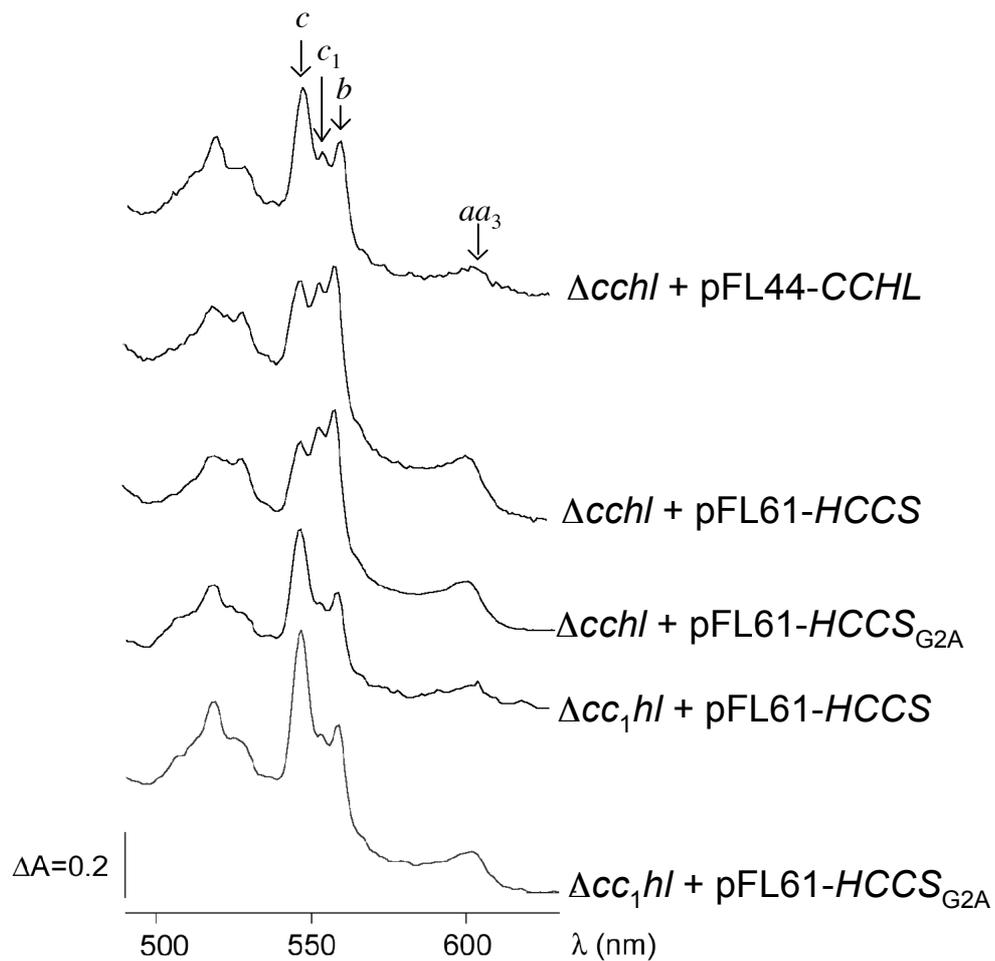


Figure 35. La substitution G2A de l'hème lyase humaine n'affecte pas la capacité de la protéine à compléter les mutants $\Delta cchl$ et Δcc_1hl de levure. Les mutants $\Delta cchl$ et Δcc_1hl ont été transformés par un plasmide multicopie exprimant l'hème lyase humaine (HCCS) ou une version mutée (HCCS G2A). Les transformants ont été cultivés 48h à 28°C sur un milieu glycérol solide puis récoltés pour effectuer un spectre d'absorption des cytochromes (réalisés selon Claisse *et al.*, 1970).

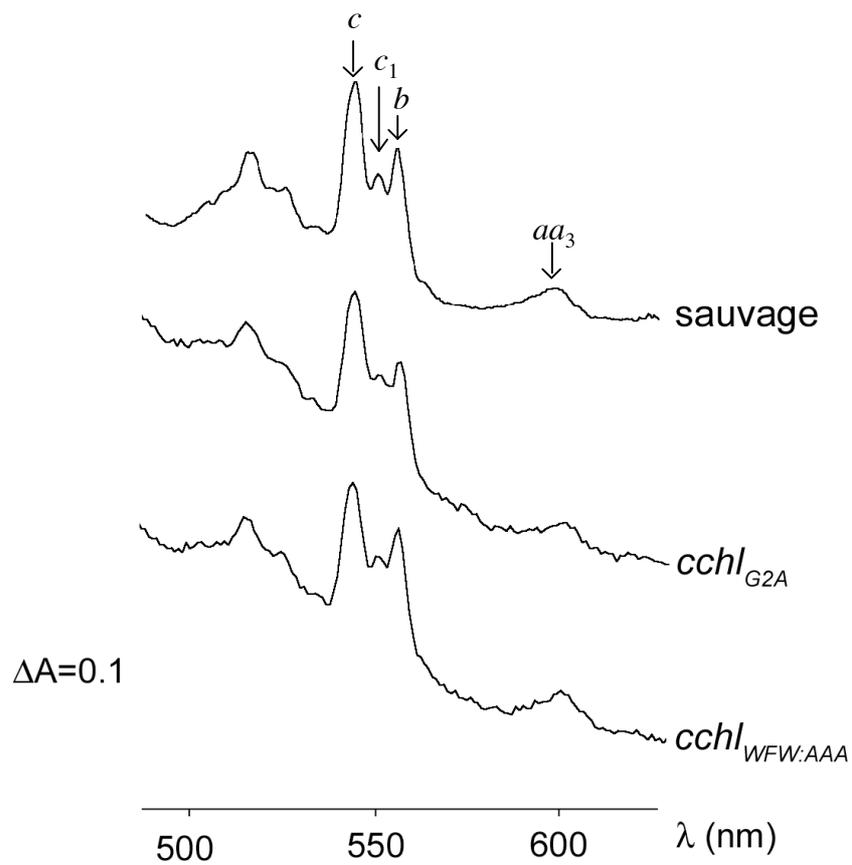


Figure 36. Les substitutions G2A et WFW_{2.5}:AAA_{2.5} de la CCHL n'affectent pas l'assemblage des cytochromes de type *c*. Les souches ont été cultivées 48h à 28°C (et 36°C) sur un milieu galactose solide puis récoltées pour effectuer un spectre d'absorption (réalisés selon Claisse *et al.*, 1970). Les spectres des souches cultivées à 36°C sont identiques à celui d'une souche sauvage. Les souches utilisées sont les suivantes: sauvage (W303-1B), *cchl*_{G2A} (YDC5), *cchl*_{WFW:AAA} (YDC6).

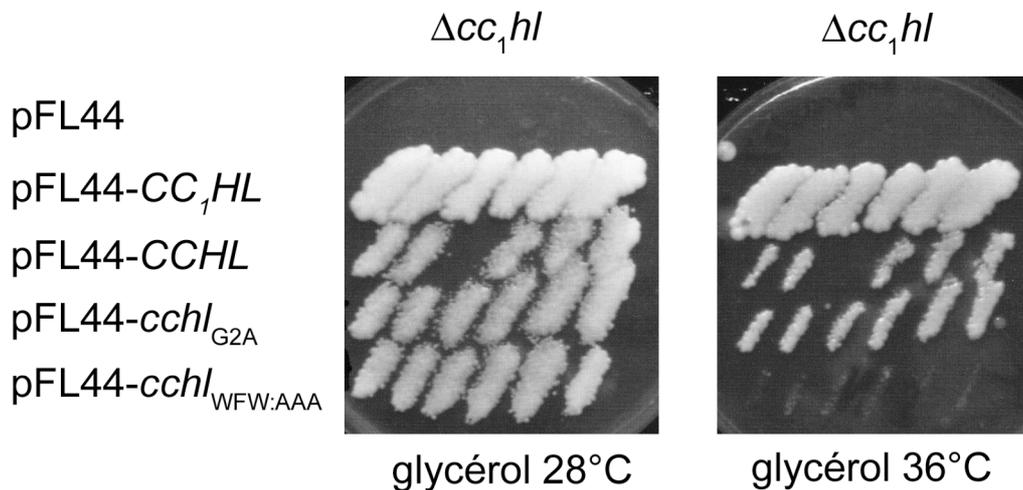


Figure 37. La surexpression de l'allèle $cchl_{WFW:AAA}$ ne supprime pas le mutant Δcc_1hl à 36°C. La souche Δcc_1hl a été transformée par des dérivés du plasmide multicopie pFL44. Une matrice de transformants a ensuite été réalisée sur un milieu sans uracile puis a été répliquée sur ce même milieu et sur différents milieux respiratoires. Il a été vérifié que les mêmes quantités de cellules étaient déposées. La croissance respiratoire des transformants a été observée après 7 jours de croissance à 28°C et 36°C, sur des milieux contenant du glycérol comme unique source de carbone.

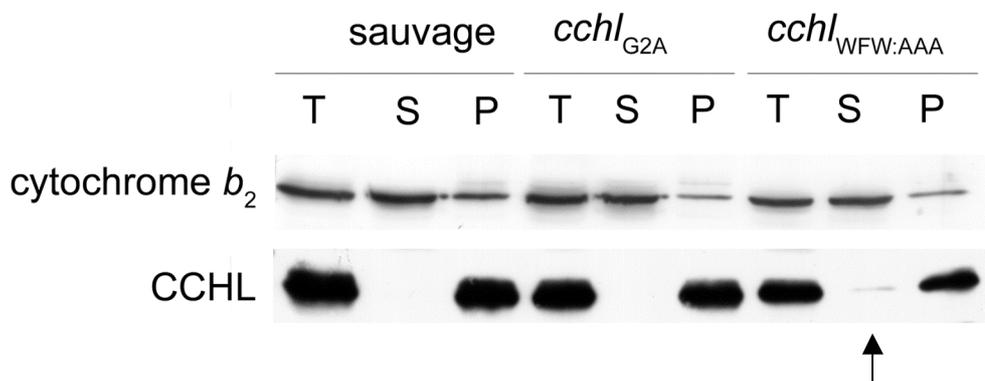


Figure 38. Effet de la substitution WFW₂₋₅:AAA₂₋₅ sur l'interaction de la CCHL à la membrane. Les mitochondries des souches W303-1B (sauvage), YDC5 (*cchl*_{G2A}) et YDC6 (*cchl*_{WFW:AAA}) cultivées en milieu galactose ont été purifiées puis analysées comme suit: les mitochondries ont été mises en suspension dans un tampon hypotonique (contenant des inhibiteurs de protéases) pendant 30 min, à deux températures (28°C et 37°C) puis cassées par sonication (Bioblock Scientific, 3x30s, duty cycle 40% , output 5) et soumises à une centrifugation à haute vitesse (1h, 100000g, 4°C) pour séparer la fraction membranaire de la fraction soluble (T=total, S=surnageant, P=culot). Ces fractions ont ensuite été analysées par SDS-PAGE et immunodétection, en utilisant l'anticorps α -CCHL produit au laboratoire au cours de ce travail.

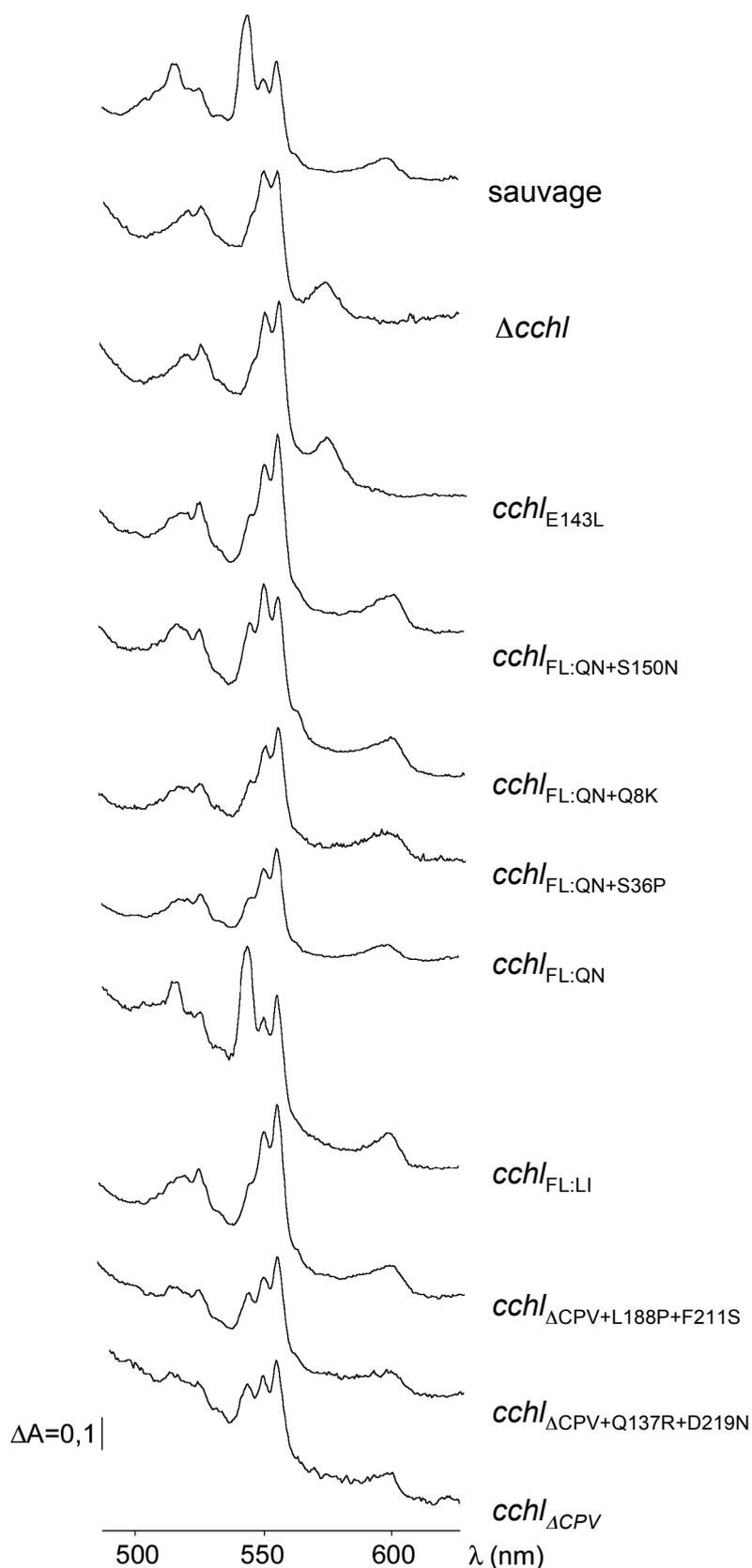


Figure 39. Spectre d'absorption des cytochromes à basse température de différents mutants *cchl* (réalisés selon Claisse *et al.*, 1970). Les souches utilisées sont les suivantes: sauvage (W303-1B), $\Delta cchl$ (SMY4), $cchl_{E143L}$ (YDC1), $cchl_{FL:QN+S150N}$ (YDC40), $cchl_{FL:QN+Q8K}$ (YDC42), $cchl_{FL:QN+S36P}$ (YDC41), $cchl_{FL:QN}$ (YDC4), $cchl_{FL:LI}$ (YDB9), $cchl_{\Delta CPV+L188P+F211S}$ (YDC30), $cchl_{\Delta CPV+Q137R+D219N}$ (YDC2-2), $cchl_{\Delta CPV}$ (YDC3). FL:QN équivaut à FL₁₃₀₋₁₃₁:QN.

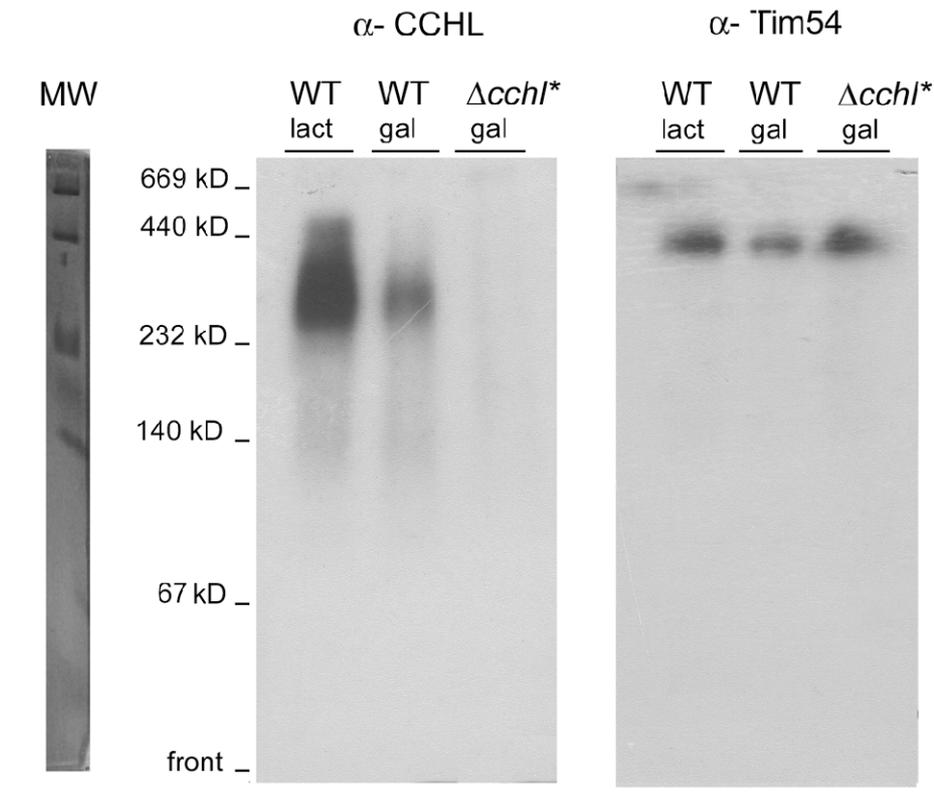


Figure 40. La CCHL migre au niveau d'un complexe de 300 kDa.

70 μ g de protéines mitochondriales purifiées à partir de cellules cultivées en milieu galactose ou lactate à 28°C ont été solubilisées dans un tampon contenant 1% de digitonine pendant 30 minutes à froid (à raison de 2,5 μ g de protéines par μ L). Le matériel insoluble a été éliminé par ultracentrifugation à 100.000g environ (Airfuge) pendant 15 minutes. Les échantillons ont ensuite été analysés par Blue Native PAGE sur un minigel gradient 8%-18% de polyacrylamide. Le gel a ensuite été transféré sur une membrane PVDF et l'immunodétection a été réalisée avec un anticorps dirigé contre la CCHL (fourni par Cardillo) ou contre Tim54 (fourni par C. Koehler), en utilisant la protéine A iodée (I^{125}) comme mode de révélation. La différence d'accumulation du complexe de 300 kDa détectée en milieu lactate (*versus* milieu galactose) est probablement liée au fait que ce milieu induit probablement une forte activité respiratoire.

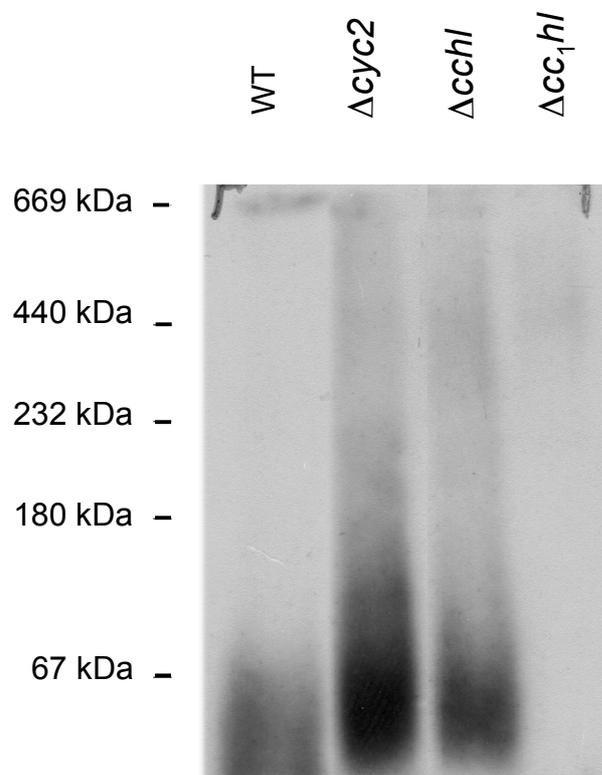


Figure 41. La CC₁HL ne semble pas former de complexe (dans les conditions où la CCHL se trouve associée à un complexe de 300 kDa).

70 µg de protéines mitochondriales purifiées à partir de cellules cultivées en milieu galactose à 28°C ont été solubilisées dans un tampon contenant 0,16% de dodecylmaltoside pendant 30 minutes à froid (à raison de 2,5 µg de protéines par µL). Le même type de résultat a été obtenu en utilisant la digitonine (1%) comme détergent. Le matériel insoluble a été éliminé par ultracentrifugation à 100.000g environ (Airfuge) pendant 15 minutes. Les échantillons ont ensuite été analysés par Blue Native PAGE sur un minigel gradient 8%-18% de polyacrylamide. Le gel a ensuite été transféré sur une membrane PVDF et l'immunodétection a été réalisée avec un anticorps dirigé contre la CC₁HL (fourni par Rolland Lill), en utilisant la protéine A iodée (I¹²⁵) comme mode de révélation.

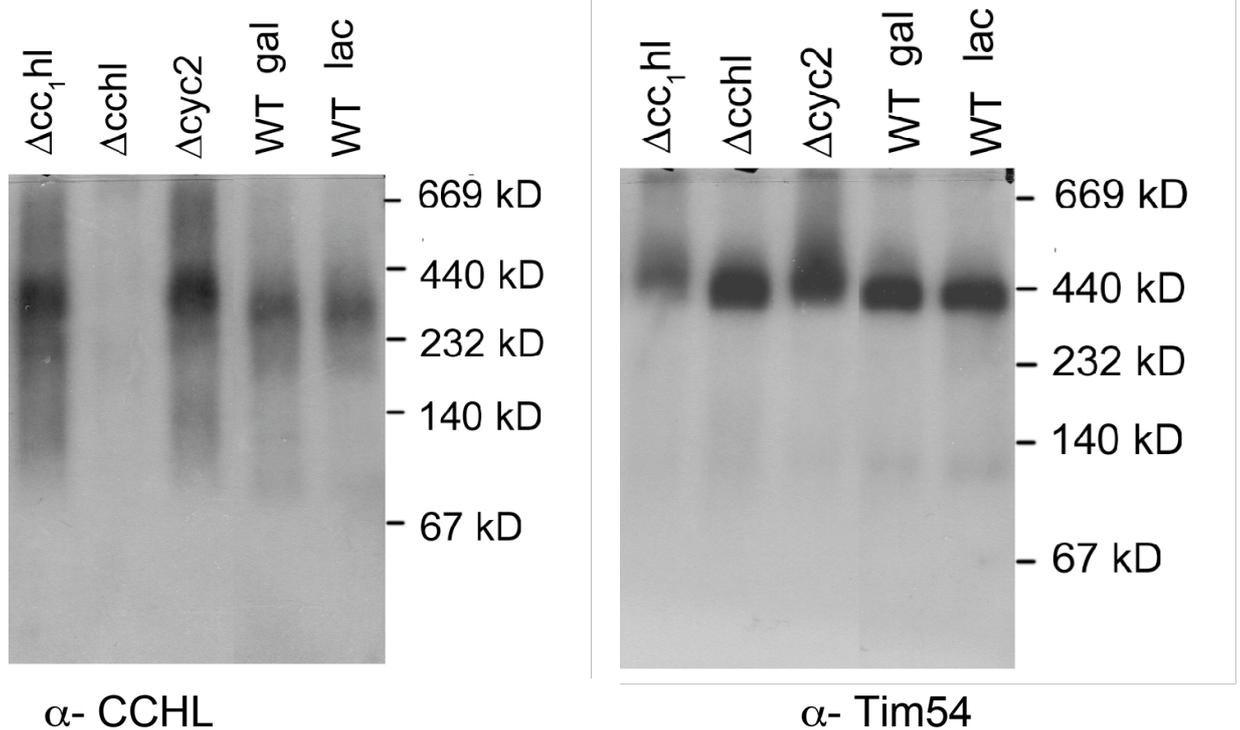


Figure 42. La migration du complexe de 300kDa ne semble pas modifiée dans un contexte $\Delta cyc2$ et Δcc_1hl .

70 μ g de protéines mitochondriales purifiées à partir de cellules cultivées en milieu galactose ou lactate à 28°C ont été solubilisées dans un tampon contenant 1% de digitonine pendant 30 minutes à froid (à raison de 2,5 μ g de protéines par μ L). Le matériel insoluble a été éliminé par ultracentrifugation à 100.000g environ (Airfuge) pendant 15 minutes. Les échantillons ont ensuite été analysés par Blue Native PAGE sur un minigel gradient 8%-18% de polyacrylamide. Le gel a ensuite été transféré sur une membrane PVDF et l'immunodétection a été réalisée avec un anticorps dirigé contre la CCHL (fourni par Cardillo) ou contre Tim54 (fourni par C. Koehler), en utilisant la protéine A iodée (I^{125}) comme mode de révélation.

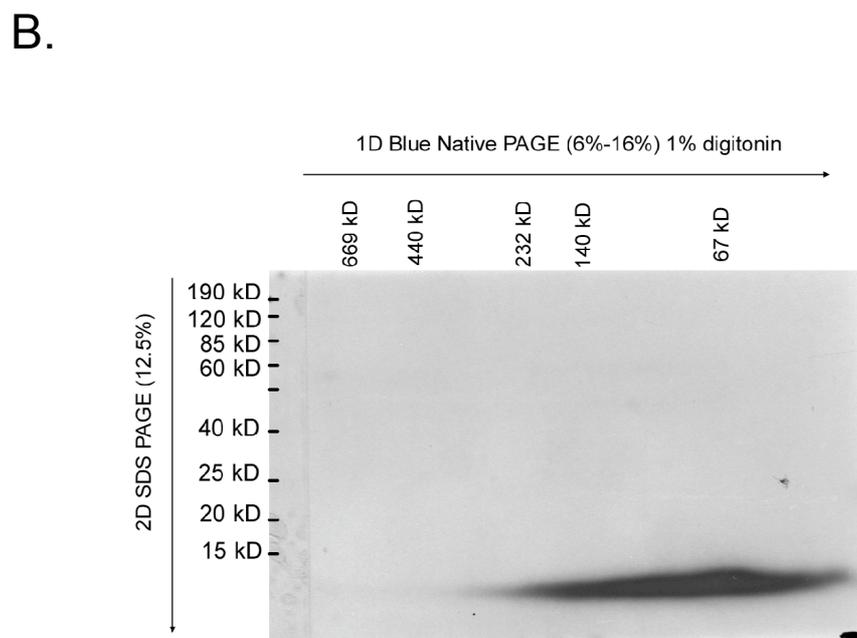
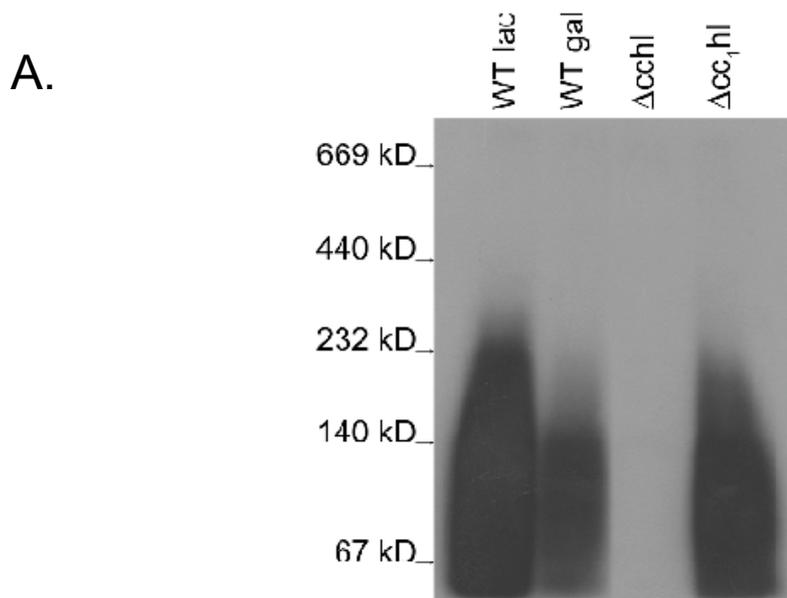


Figure 43. Migration du cytochrome *c* dans des conditions natives.

A. 70 μ g de protéines mitochondriales purifiées à partir de cellules cultivées en milieu galactose ou lactate à 28°C ont été solubilisées dans un tampon contenant 1% de digitonine pendant 30 minutes à froid (à raison de 2,5 μ g de protéines par μ L). Le matériel insoluble a été éliminé par ultracentrifugation à 100.000g environ (Airfuge) pendant 15 minutes. Les échantillons ont ensuite été analysés par Blue Native PAGE sur un minigel gradient 6%-16% de polyacrylamide. Le gel a ensuite été transféré sur une membrane PVDF et l'immunodétection a été réalisée avec un anticorps dirigé contre le cytochrome *c* (fourni par C. Koehler), en utilisant la protéine A iodée (I^{125}) comme mode de détection. B. Une deuxième dimension a été effectuée sur un gel SDS 12,5% acrylamide. Le gel a ensuite été transféré sur une membrane PVDF et le cytochrome *c* a été immunodéfecté (révélation ECL).

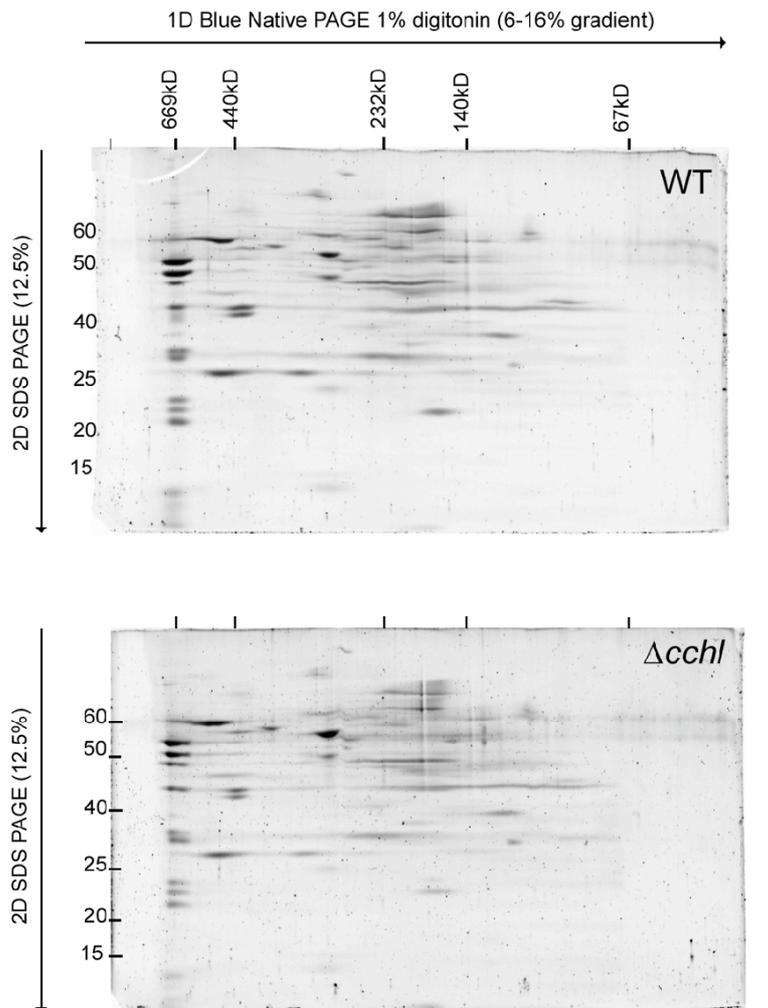


Figure 44. Les gels en deux dimensions ne permettent pas de détecter les différents composants éventuels du complexe de 300 kDa.

70 μ g de protéines mitochondriales purifiées à partir de cellules cultivées en milieu galactose à 28°C ont été traitées comme indiqué dans la légende de la figure 40 puis séparées par Blue Native PAGE sur un gel gradient 6%-16% de polyacrylamide. Une seconde dimension a ensuite été effectuée dans des conditions dénaturantes (gel SDS PAGE). Le gel a ensuite été transféré sur une membrane PVDF puis le marqueur fluorescent Sypro Ruby a été utilisé pour détecter la totalité des protéines. Les profils 2D obtenus à partir de la souche sauvage (WT) et de la souche contrôle $\Delta cchl$ ont été comparés en utilisant le logiciel PDQuest, en se focalisant plus particulièrement sur la zone correspondant à 300kDa. Malheureusement, aucune différence de profil n'a été détectée. Les différentes bandes visualisées au niveau du marqueur 669 kDa correspondent aux différentes sous-unités de l'ATP synthétase.

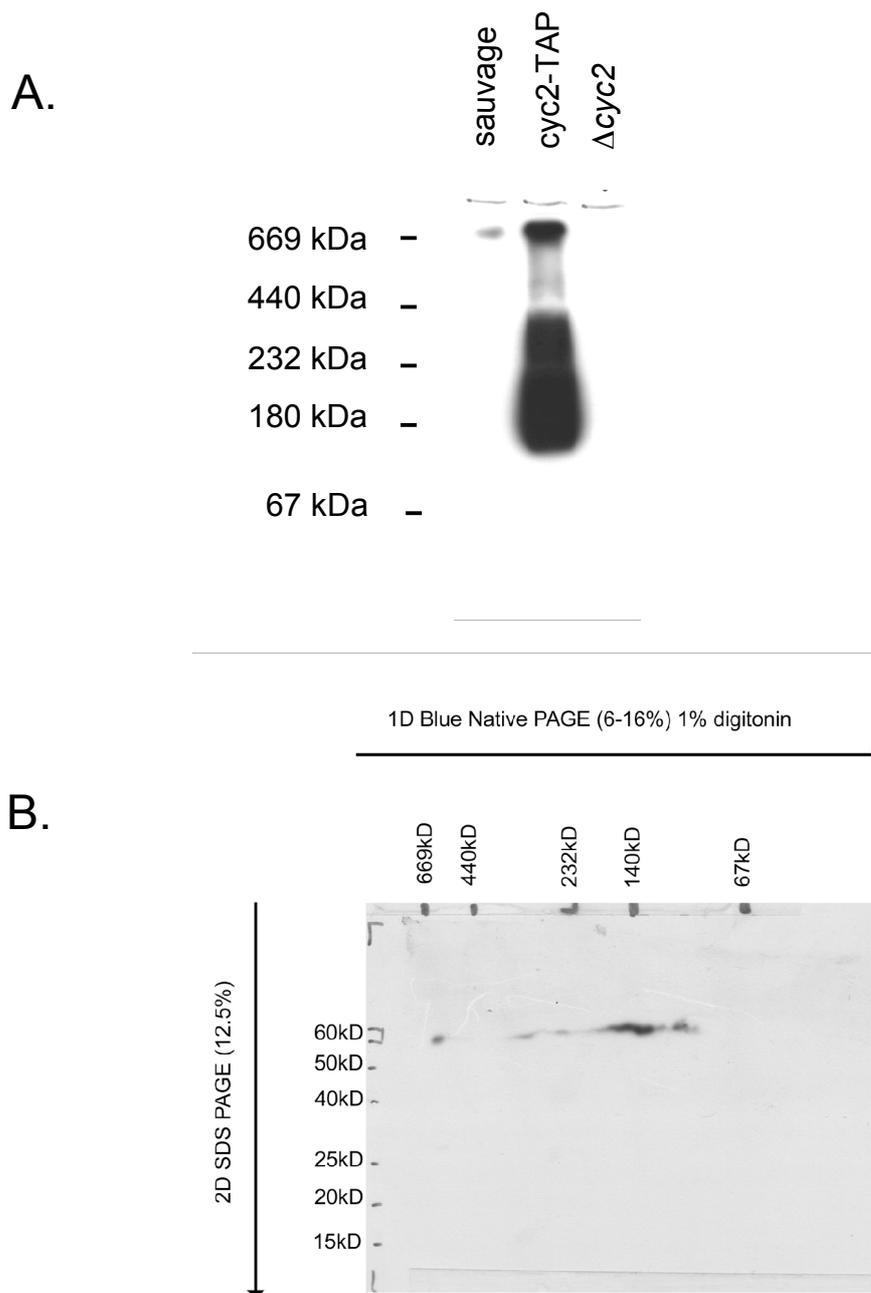


Figure 45. La protéine Cyc2p-TAP migre au niveau de deux sous-complexes.

A. 70 μ g de protéines mitochondriales purifiées à partir de cellules (Cyc2p-TAP) cultivées en milieu galactose à 28°C ont été solubilisées dans un tampon contenant 1% de digitonine pendant 30 minutes à froid (à raison de 2,5 μ g de protéines par μ L). Le matériel insoluble a été éliminé par ultracentrifugation à 100.000g environ (Airfuge) pendant 15 minutes. Les échantillons ont ensuite été analysés par Blue Native PAGE sur un minigel gradient 6%-16% de polyacrylamide. Le gel a ensuite été transféré sur une membrane PVDF. La partie protéine A de l'étiquette TAP a été détectée en utilisant l'anticorps commercial PAP. B. Une deuxième dimension a été effectuée sur un gel SDS 12,5% acrylamide. Le gel a ensuite été transféré sur une membrane PVDF et la protéine Cyc2p-TAP a été détectée grâce à l'anticorps PAP.

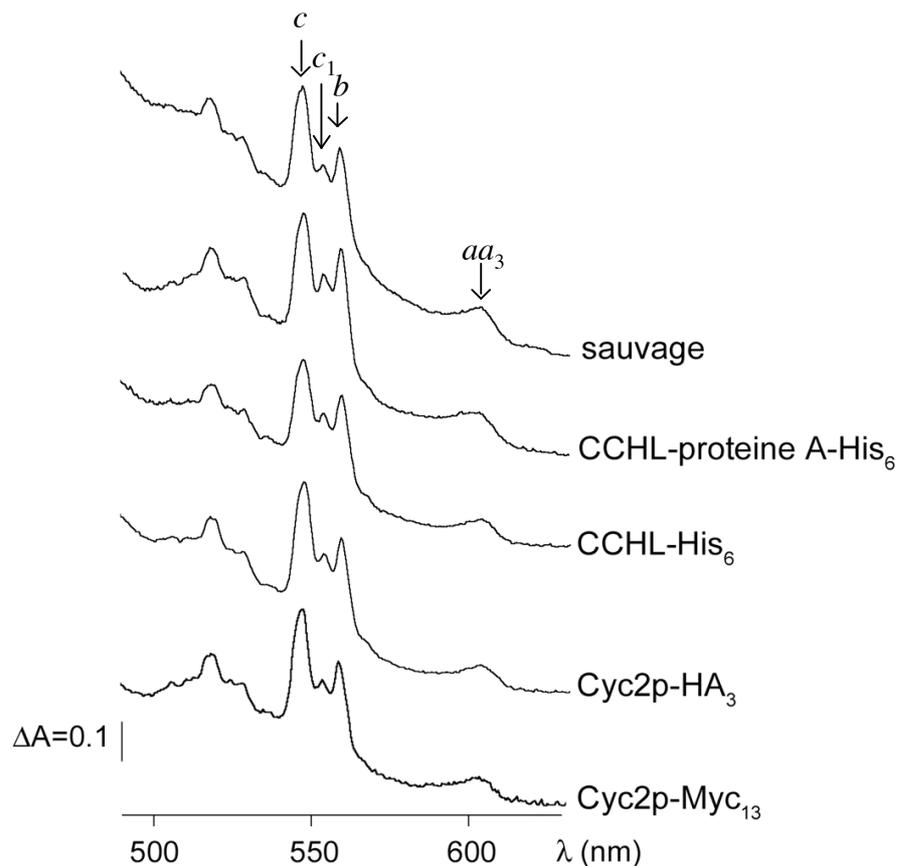


Figure 46. L'addition d'étiquettes en C-terminal de la CCHL et de Cyc2p n'altère pas la fonction de ces protéines.

Cette figure présente les spectres d'absorption des cytochromes de toutes les souches exprimant une protéine étiquetée (en C-terminal) et construites au cours de ce travail de thèse. Les souches ont été cultivées 48h sur un milieu galactose solide puis les cellules ont été récoltées pour réaliser un spectre d'absorption. Les souches analysées ici sont les suivantes: sauvage (W303-1B), CCHL-protéineA-His6 (YDB6), CCHL-His₆ (YDB1), Cyc2p-HA₃ (YDB2), Cyc2p-Myc₁₃ (YDB3).

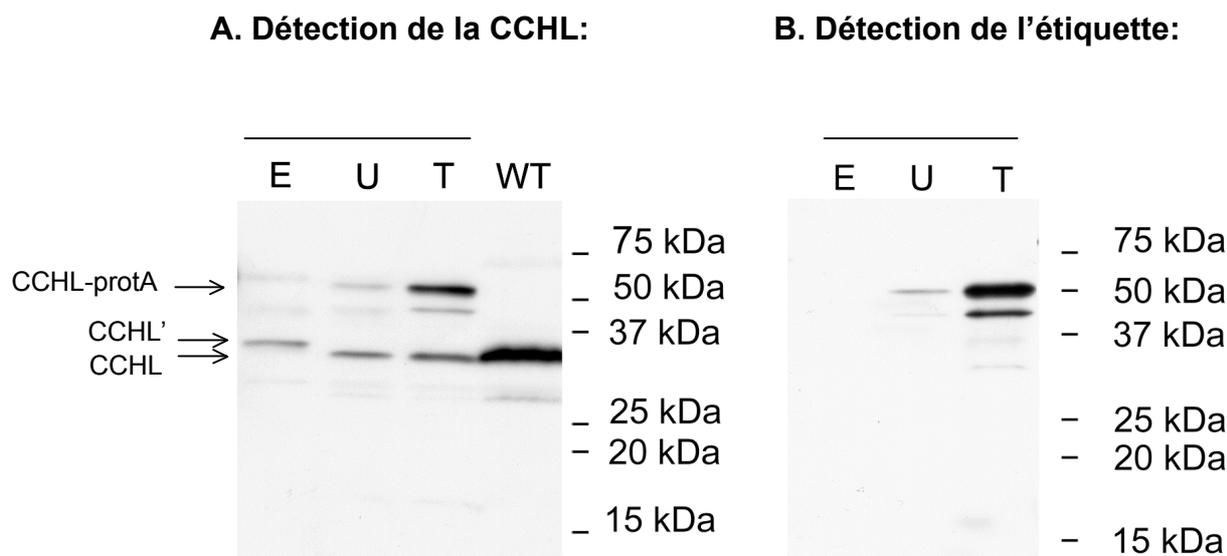


Figure 47. Contrôle des différentes étapes de la purification du complexe contenant la CCHL-protéine A.

La purification du complexe à partir de la souche YDB6 (CCHL-TEV-ProtéineA-His₆) a été effectuée selon le protocole présenté en Annexe 3. 5 μ L de la fraction totale T (soit environ 1/1200 de la fraction, équivalent à 12 μ g de protéines), 5 μ L de la fraction non liée, U=Unbound (soit environ 12 μ g de protéines) et 5 μ L de l'éluat (1/40 de l'éluat total) ont été analysés par SDS-PAGE. Le gel a ensuite été transféré sur une membrane de nitocellulose puis l'immunodétection a été réalisée avec: (A) l'anticorps anti-CCHL produit au laboratoire, ou avec (B) l'anticorps PAP qui reconnaît spécifiquement l'étiquette protéine A. L'espèce CCHL' correspond probablement à la forme éluee par la TEV de la CCHL, qui possède en supplément les acides aminés du domaine linker.

Cyc2 53 ERENKHELSPSYFVKY--KISHKRDIDSSHF~~LLEV~~TPLFKQKVNIWSL-MTAENLWSVEIKQPE
 SP +KY ++ +++ I SH + +I+ L + + ++S++I+

Cytb5 1FQRSTPAITLES PD--IKVPLRLIDREI I--SHDTRRRFRFALPSPQHILGLPVGQHIYLSARI D--G
 $\beta 1$ $\beta 2$ $\beta 3$

Cyc2 VMVVRNYTPL--PLKFN~~PASKEIE~~-ILKGDGN---ADGKLSFYIKKYENGEVARWLHHL~~PKGH~~
 +VVR YTP+ + + I+ ++KD + A GK+S Y++ ++ G+

Cytb5 NLVVRPYTPISSDDDKG~~FVDLVI~~KVYFKDTHPKFPAGGKMSOYLESMQIGD-----
 $\beta 4$ $\beta 5$ $\alpha 1$

Cyc2 IIEIRGP--FIDYE~~FPHLPNELKRSRD~~CLYMDNR~~NERGNNVRENSQFIYQPYD~~DIMMFTA
 IE RGP ++ Y+ + +++++ +I + M+

Cytb5 TIEFRG~~PSGLLVYQ~~GK-----GKFAIRP-----DKKSNPIIRTVK~~SVGM~~IAG
 $\beta 6$ $\beta 7$ $\beta 8$ $\beta 9$ $\beta 10$

Cyc2 GTGI~~V~~TALQ~~LL~~TE--SP----FRGTIKL~~F~~H~~T~~DKNIKQLGPLY~~PILLRLO~~ASNRVQ
 GTGI LQ++ P T+ L ++T+K+I L P L +L +

Cytb5 GTGI~~TPMLQVIRA~~IMKDPDDHTV~~CHLLFA~~NQTEKDI----LLR~~PELEELR~~NKHSAR
 $\alpha 2$ $\beta 11$ $\alpha 3$

Cyc2 LKIFETDRQTKQDVLKSIQKSITKPY~~PKGLLP~~FSNVNKNIMPV~~LALVCGPE~~SYISS
 +K++ T +++++ Q + + + LP L L+CGP +I

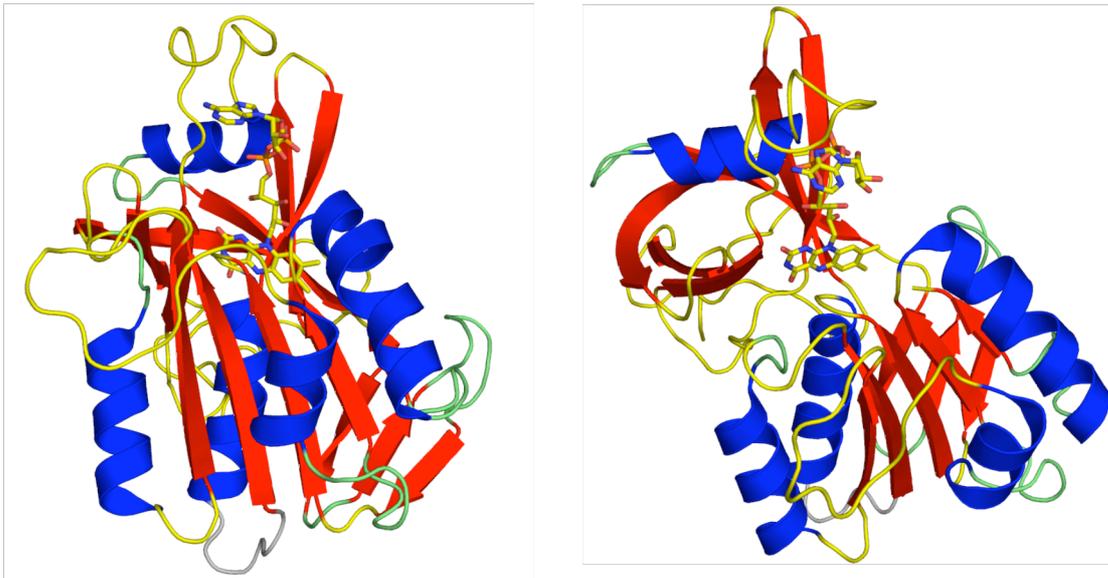
Cytb5 FKLWY~~TL~~D-RAPEAWDYGGFVNE~~EMIR~~-DHLP-----PPEEE~~PLVLM~~CGP~~PE~~MIQY
 $\beta 12$ $\alpha 4$ $\beta 13$ $\alpha 5$

Cyc2 GRKYDLN~~QGPV~~G~~LLS~~KEGWNSDNVYKLS
 N VG + V+

Cytb5 YAC-LPNLDHVG-----HPTER~~CFVF~~
 $\alpha 6$ $\beta 14$

Figure 48. Alignement des séquences protéiques entre Cyc2p et la NAD(P)H cytochrome b_5 réductase humaine (réalisé par Marc Graille). Cet alignement n'est pas celui issu de Psi-Blast, il a été corrigé en utilisant des programmes d'analyse de séquences. Il en résulte une identité de séquence de 21% et une homologie de séquence de 41%. La séquence Cyt b_5 est celle de la NAD(P)H cytochrome b_5 réductase (PDB code 1UMK). Les insertions sont matérialisées en vert et les délétions en gris.

A.



B.

face externe du domaine en tonneau β

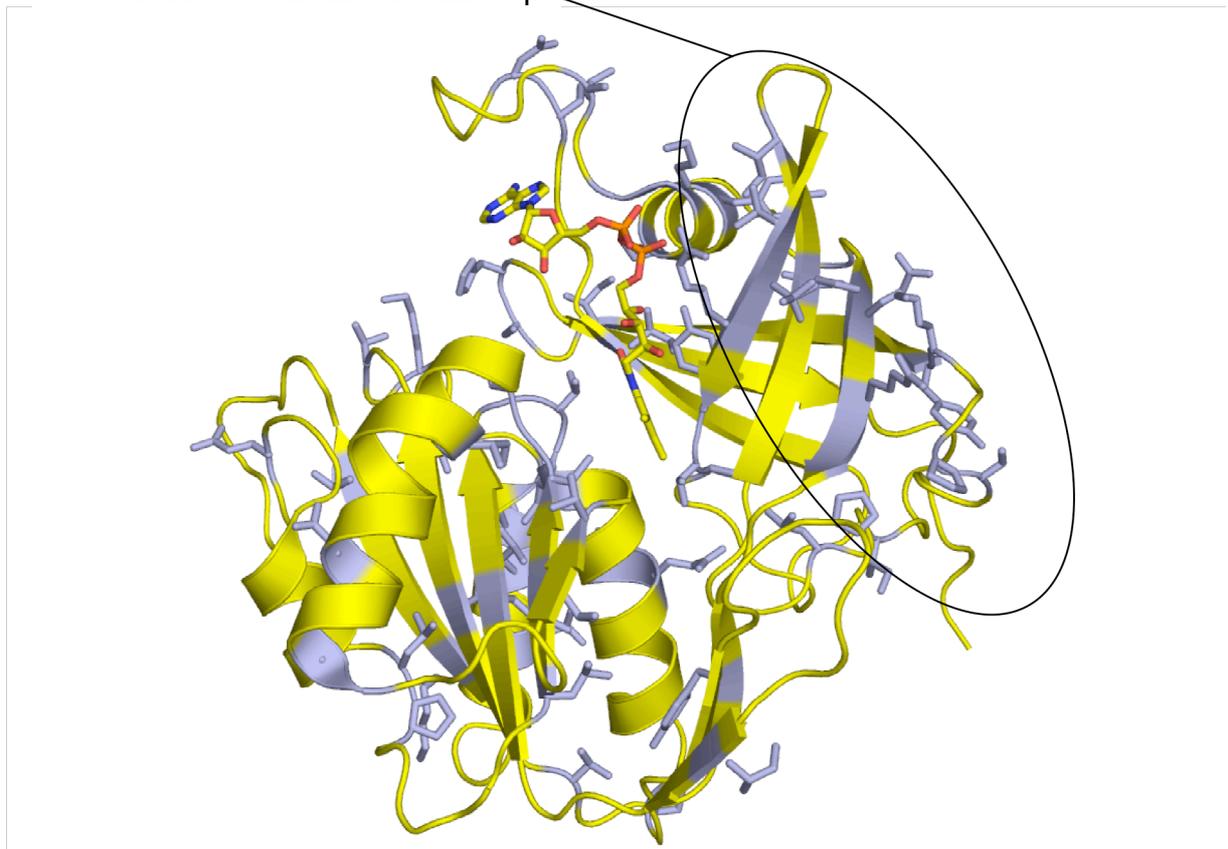


Figure 49. Modélisation de la structure de Cyc2p à partir de la structure de la NAD(P)H cytochrome *b*₅ réductase (PDB code 1UMK). A. Localisation des boucles contenant les insertions et les délétions sur la structure de la NAD(P)H cytochrome *b*₅ réductase (PDB code 1UMK). Les insertions sont matérialisées en vert et les délétions en gris. Deux vues différentes sont représentées. B. Localisation des résidus conservés (matérialisés en gris).

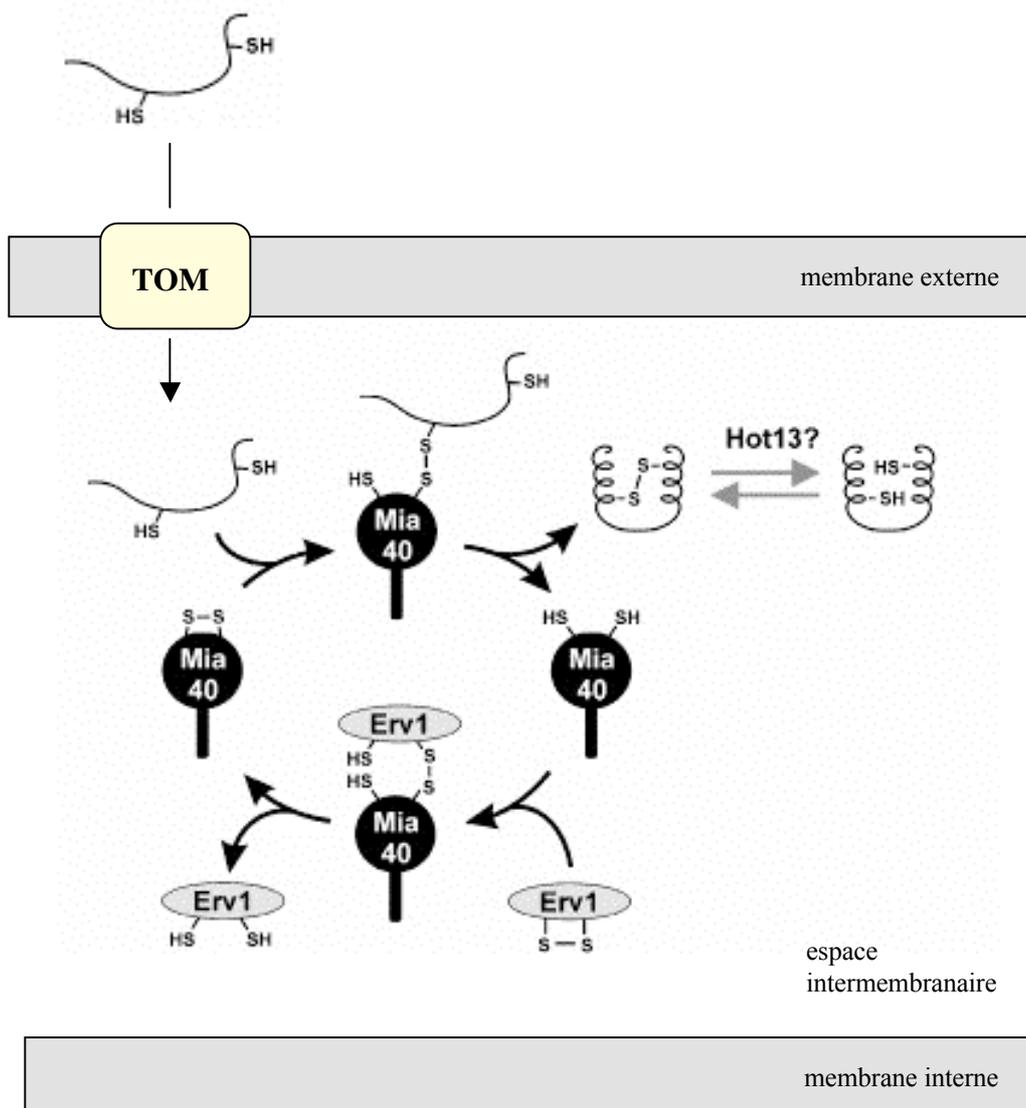


Figure 50. Import et repliement des petites protéines riches en cystéines dans l'espace intermembranaire mitochondrial (adapté de Mesecke *et al.*, 2005 et Tokatlidis, 2005). La protéine précurseur est importée, sous sa forme réduite, dans l'espace intermembranaire, à travers le complexe TOM. Celle-ci formerait un pont disulfure intermoléculaire transitoire avec la forme oxydée de Mia40p. Cette étape conduirait à l'oxydation du précurseur, qui contient alors un pont disulfure intramoléculaire, et à son repliement. La forme réduite de Mia40p serait oxydée par Erv1p. On ignore la façon dont Erv1p serait à son tour oxydée.

protéine	autres noms	fonction générale	activité	localisation	références
Tom 40	Isp42, Mom38	import (complexe TOM)	élément central du pore	membrane externe	Rapaport and Neupert, 1999
Sam50	Omp85, Tob55	import (complexe SAM)	facilitent l'insertion des précurseurs à tonneaux β		Kozjak <i>et al.</i> , 2003
Sam35	Fmp20, Tob38, Tom38				Milenkovic <i>et al.</i> , 2004
Tim23	Nim23, Mas6, Mpl3	import (complexe Tim23)	translocase de la membrane interne concernant les précurseurs comportant une préséquence N-terminale	membrane interne	Emtage and Jensen, 1993
Tim50	-		pourrait aider la liaison des protéines précurseurs à Tom22 pendant la translocation?		Chacinska <i>et al.</i> , 2005
Tim17	Mim17, Sms1, Mpl2		interagit avec Pam18p pour recruter le complexe PAM		Chacinska <i>et al.</i> , 2005
Tim22	-	import (complexe Tim22)	constituant principal du pore, import des ADP/ATP transporteurs		Rehling <i>et al.</i> , 2004
Tim12	Mrs5		composant du complexe Tim22, interaction possible avec Tim9-tim10		Jarosch <i>et al.</i> , 1996
mt Hsp70	Ens1, Ssc1	import (complexe PAM)	chaperonne de la famille <i>heat shock</i> , se lie à la préprotéine		Liu <i>et al.</i> , 2001
Pam16	Tim16, Mia1		contrôle l'activité de Pam18		Frazier <i>et al.</i> , 2004
Mge1/Mge1	Yge1		échangeur de nucléotides		Miao <i>et al.</i> , 1997
Tim44	Isp45, Mim44, Mpl1		transfert mtHsp70 vers l'apoprotéine		D'Silva <i>et al.</i> , 2004
Pam18	Tim14		protéine intégrale, stimule l'activité ATPase de la Hsp70	Mokranjac <i>et al.</i> , 2003	
Zim17	Tim15, Hep1		import/repliement	faciliterait le repliement des chaperonnes	matrice
Mia40	-	import	import et assemblage des petites protéines de l'IMS	IMS	Chacinska <i>et al.</i> , 2004
Erv1/Erv1	-	maturation des petites protéines de l'IMS et des clusters Fe/S	flavoprotéine à activité sulfhydryl oxydase	IMS	Lill and Muhlenhoff, 2005 Rissler <i>et al.</i> , 2005
Arh1	-	homéostasie du fer et maturation des clusters Fe/S	oxydoréductase	membrane interne	Li <i>et al.</i> , 2001
Jac1	-		chaperonne	matrice	Voisine <i>et al.</i> , 2001
Nfs1	-		cystéine desulfurase	matrice	Muhlenhoff <i>et al.</i> , 2004 Nakai <i>et al.</i> , 2004
Yah1	-		ferredoxine avec groupement [2Fe-2S], impliquée également dans la biosynthèse de l'hème A	matrice	Lange <i>et al.</i> , 2000

Mas1	Mif1	maturation et repliement des protéines mitochondriales	clivage de la séquence d'adressage à la matrice mitochondriale	matrice	Yang <i>et al.</i> , 1988
Mas2	Mif2				Yang <i>et al.</i> , 1988
Hsp60	Cpn60, Mif4		chaperonne de la famille <i>heat shock</i>		Cheng <i>et al.</i> , 1989
Hsp10	Cpn10		Régulation de Hsp60		Dubaquie <i>et al.</i> , 1997
Hem1	-	synthèse de l'hème	5-aminolevulinate synthase, expression régulée par Hap2p-Hap3p	matrice	Urban-Grimal <i>et al.</i> , 1986
Hem14	-		protoporphyrinogen III oxydase	membrane interne	
Hem15	-		ferrochelatase, insertion du Fe ²⁺ dans la protoporphyrine IX	membrane interne	Labbe-Bois, 1990
Rsm10	-	machinerie de traduction mitochondriale	protéine ribosomale de la petite sous-unité	matrice	Saveanu <i>et al.</i> , 2001
Mnp1	-		protéine ribosomale putative	matrice ?	Sato and Miyakawa, 2004
Yml6	-		protéine ribosomale de la grande sous-unité	matrice	Gan <i>et al.</i> , 2002
Mrps18	-		protéine ribosomale de la petite sous-unité	matrice	Graack and Wittmann-Liebold, 1998
ACP1	-	porteur	protéine acyl porteur impliquée dans la biosynthèse de l'octanoate	matrice	Brody <i>et al.</i> , 1997
Fol1	-	biosynthèse de l'acide folique	enzyme multifonctionnelle ?	?	Bayly <i>et al.</i> , 2001

Tableau 1. Protéines mitochondriales essentielles à la viabilité cellulaire chez *S. cerevisiae*.

Les protéines ont été classées par catégorie fonctionnelle : machineries d'import (**bleu**); homéostasie du fer et maturation des clusters fer/soufre (**vert**); repliement des protéines mitochondriales (**turquoise**); biosynthèse de l'hème (**rouge**); machinerie de traduction mitochondriale (**gris**); autres (noir). IMS : espace intermembranaire. Les mutants des gènes impliqués dans la biosynthèse de l'hème peuvent être sauvés sur un milieu contenant du tween-ergostérol.

<i>Escherichia coli</i>	<i>Bradyrhizobium japonicum</i>	<i>Rhodobacter. capsulatus</i>	A. thaliana
CcmA	CycV	HelA	CcmA
CcmB	CycW	HelB	CcmB
CcmC	CycZ	HelC	CcmC
CcmD	CycX	HelD	
CcmE	CycJ	CycJ	CcmE
CcmF	CycK	Ccl1	CcmF _{N1} , CcmF _{N2} , CcmF _C
CcmG	CycY	HelX	
CcmH	CycL	Ccl2	CcmH
(CcmI ^o)	CycH	CycH	

Tableau 2. Nomenclature des gènes impliqués dans la maturation des cytochromes de type c dans le système I. *Ccm* : cytochrome *c* maturation; *Hel* : heme export for ligation. °CcmI n'est pas présent chez *E. coli*. DipZ=DsbD.

Organisme	Site de liaison à l'hème :	
	cytochrome <i>c</i>	cytochrome <i>c</i> ₁
<i>Trypanosoma brucei</i>	AAQCH	FAPCH
<i>Trypanosoma vivax</i>	AAQCH	FAPCH
<i>Trypanosoma cruzi</i>	AAQCH	FAPCH
<i>Crithidia oncopelti</i>	AAQCH	FAPCH
<i>Crithidia fasciculata</i>	AAQCH	FAPCH
<i>Leishmania major</i>	AAQCH	FAPCH
<i>Leishmania infantum</i>	AAQCH	FAPCH
<i>Euglena gracilis</i>	AAQCH	FAPCH
<i>Euglena viridis</i>	AGQCH	N.D.
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	CLQCH (iso1) CQQCH (iso2)	CAACH
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	CAQCH	CSACH
<i>Candida albicans</i>	CLQCH	CAACH
<i>Neurospora crassa</i>	CAQCH	CASCH
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	CAQCH	CAACH
<i>Plasmodium falciparum</i>	CAQCH	CATCH
<i>Caenorhabditis elegans</i>	CLQCH	CAACH
<i>Drosophila melanogaster</i>	CAQCH	CSACH
<i>Homo sapiens</i>	CSQCH	CASCH
<i>Mus musculus</i>	CAQCH	CSSCH
<i>Arabidopsis thaliana</i>	CAQCH	CASCH

Tableau 3. Alignement de séquences des sites de liaison à l'hème de cytochromes de type *c* mitochondriaux issus de différentes espèces (adapté de Allen *et al.*, 2004).

		site de liaison à l'hème	
nom des souches	caractéristique	séquence nucléotidique	séquence protéique
W303-1B	sauvage	TGT GCC GCC TGC CAT	CAACH
YDB8	Δ cyc2 cyt1-48	TGT GCC GAC TGC CAT	CADCH
YPH6-9C	Δ cyc2 cyt1-34	TGT GCC CCC TGC CAT	CAPCH
SSP2, RYPH11-10A#2	révertant	TGT GCC ACC TGC CAT	CATCH
SSP5, RYPH6-13D-L, RYPH6-13D-Y, SSP10	révertant	TGT GCC CAC TGC CAT	CAHCH
SSP6	révertant	TGT GCC CTC TGC CAT	CALCH
SSP3, SSP7, SSP11, SSP12, RYPH11-10A#1	révertant	TGT GCC TCC TGC CAT	CASCH
SSP4, SSP8	révertant	TGT GCC GCC TGC CAT	CAACH

Tableau 4. Séquence du site de liaison à l'hème du cytochrome c_1 des révertants obtenus (de façon indépendante) à partir du mutant Δ cyc2 cyt1-34, sur différents milieux respiratoires.

	nombre d'hème lyases	présence de <i>CYC2</i> dans le génome	génomme entièrement séquencé ?
<i>Saccharomyces cerevisiae</i>	2	+	+
<i>Schizosaccharomyces pombe</i>	2	+	+
<i>Candida albicans</i>	2	+	+
<i>Neurospora crassa</i>	2	+	+
<i>Plasmodium falciparum</i>	2	-	+
<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>	2	-	+
<i>Xenopus laevis</i>	1	-	+
<i>Caenorhabditis elegans</i>	1	-	+
<i>Drosophila melanogaster</i>	1	-	+
<i>Mus musculus</i>	1	-	+
<i>Homo sapiens</i>	1	-	+

Tableau 5. Corrélation entre le nombre d'hème lyases et la présence du gène *CYC2*.

systeme utilise	organismes
systeme I	<p>α-protéobactéries (<i>Bradyrhizobium japonicum</i>, <i>Paracoccus denitrificans</i>, <i>Rickettsia prowazekii</i>)</p> <p>β-protéobactéries (<i>Nitrosomonas europaea</i>, <i>Burkholderia xenovorans</i>)</p> <p>γ-protéobactéries (<i>Escherichia coli</i>, <i>Pseudomonas aeruginosa</i>, <i>Legionella pneumophila</i>)</p> <p>δ-protéobactéries (<i>Desulfovibrio vulgaris</i>)¹</p> <p>bactéries pourpres photosynthétiques (<i>Rhodobacter capsulatus</i>)</p> <p><i>Deinococci</i>²</p> <p><i>Archaeoglobus fulgidus</i>³ ?</p>
	<p>Mitochondries de :</p> <p>-plantes (<i>Arabidopsis thaliana</i>, <i>Oryza sativa</i>)</p> <p>-algues rouges (<i>Cyanidioschyzon merolae</i>)</p> <p>-protistes (<i>Paramecium</i>, <i>Tetrahymena</i>, <i>Reclinomonas americana</i>)</p>
systeme II	<p>δ-protéobactéries (<i>Geobacter sulfurreducens</i>)</p> <p>ε-protéobactéries (<i>Helicobacter pylori</i>, <i>Wolinella succinogenes</i>)</p> <p>β-protéobactéries (<i>Bordetella pertussis</i>, <i>Neisseria meningitidis</i>)</p> <p>γ-protéobactéries (<i>Acidithiobacillus ferrooxidans</i>)</p> <p>cytophagales</p> <p>aquificales (<i>Aquifex</i>)</p> <p>high G+C Gram⁺ (<i>Mycobacterium tuberculosis</i>)</p> <p>low G+C Gram⁺ (<i>Bacillus subtilis</i>)</p> <p>cyanobactéries (<i>Synechocystis</i>)</p>
	<p>Chloroplastes de :</p> <p>-plantes (<i>Arabidopsis thaliana</i>)</p> <p>-algues vertes (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)</p>
systeme III	<p>Mitochondries de :</p> <p>-algues vertes (<i>Chlamydomonas reinhardtii</i>)</p> <p>-champignons (<i>Saccharomyces cerevisiae</i>, <i>Neurospora crassa</i>)</p> <p>-métazoaires (<i>Drosophila melanogaster</i>, <i>Homo sapiens</i>)</p> <p>-parasites apicomplexes (<i>Plasmodium falciparum</i>)</p>
systeme IV ⁴ ?	<p>Euglenides (<i>Euglena gracilis</i>)</p> <p>Trypanosomatides (<i>Trypanosoma brucei</i>, <i>Leishmania major</i>)</p>

Tableau 6. Répartition des différents systèmes d'assemblage des cytochromes de type c.

¹ D'après Cianciotto *et al.*, 2005.

² Les *deinococci* présentent une coloration Gram⁺ mais leur membrane externe est de type Gram⁻

³ Seuls les gènes *ccmC* et *ccmF* du système I ont été retrouvés dans ce génome (Goldman and Kranz, 1998)

⁴ les cytochromes de type c de ces organismes contiennent une seule cystéine au niveau du site de liaison à l'hème.