

2m11.2714.9

Université de Montréal

Analyse Structure-Fonction du Transporteur ABC Mitochondrial
Atm1 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

par
Laurence Pelletier

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Mémoire présenté à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maître ès sciences (M.Sc.)
en biologie moléculaire

Octobre, 1998

©Laurence Pelletier, 1998



9 41 58 1165

QH

506

U34

1999

V.013

Universität de Montréal

Faculté de Génie

Programme de biologie moléculaire

Faculté des études supérieures

Rapport remis à la Faculté des études supérieures
en vue de l'obtention du grade de
Maîtrise en génie (M.Sc.)
en biologie moléculaire



27 février 1999

Université de Montréal

Page d'identification du jury

Université de Montréal
Faculté des études supérieures

Ce mémoire intitulé:

Analyse Structure-Fonction du Transporteur ABC Mitochondrial
Atm1 chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*.

présenté par:

Laurence Pelletier

a été évalué par un jury composé des personnes suivantes:

Pierre Belhumeur
Martine Raymond
James W. Coulton

Mémoire accepté le: 99.04.16

SOMMAIRE

Le transport des molécules à travers les membranes est un processus cellulaire fondamental. Les transporteurs ABC (pour *ATP-binding cassette*) sont des protéines transmembranaires médiant le transport actif de substrats variés (peptides, ions, acides aminés, antibiotiques, etc). Le gène *ATM1* de *Saccharomyces cerevisiae* code pour un transporteur ABC de 690 acides aminés localisé dans la membrane interne de la mitochondrie. La protéine Atm1 est une proche homologue de la P-glycoprotéine impliquée dans la résistance aux agents anticancéreux. Il a été démontré qu'Atm1 est essentielle pour la croissance des cellules, procurant ainsi un phénotype idéal pour l'analyse fonctionnelle de ce transporteur. Nous utilisons une technique, appelée 'plasmid shuffling', basée sur l'échange de plasmides par contre-sélection d'un plasmide portant le marqueur de sélection *URA3* en présence d'acide 5-fluoroorotique (5-FOA) pour étudier Atm1. Nous avons construit une souche haploïde de *S. cerevisiae* dans laquelle la copie chromosomique du gène *ATM1* est excisée mais qui est viable grâce à la présence d'un plasmide *URA3* portant une copie fonctionnelle du gène *ATM1*. Cette souche a été transformée avec une banque d'allèles mutés d'*ATM1* portés par un plasmide *LEU2* et criblée pour des mutants thermosensibles (ts) d'Atm1 après contre-sélection du plasmide *URA3* sur 5-FOA. Trois mutants ts d'Atm1 ont été isolés et les mutations causant le phénotype ts ont été identifiées par séquençage de l'ADN. Des courbes de croissance de ces mutants ont été tracées, démontrant une croissance normale à température permissive mais un arrêt de croissance après quelques divisions à température restrictive. Nous avons produit des anticorps polyclonaux anti-Atm1 qui nous ont permis d'étudier la protéine de type sauvage et celle des trois mutants ts. Ces études ont révélé l'absence d'Atm1 seulement dans les mitochondries des mutants ts à température restrictive. D'autre part, des expériences de co-immunoprécipitation ont démontré qu'Atm1 forme des homodimères et que cette interaction est médiée par la partie C-terminale d'Atm1, qui contient le domaine de liaison à l'ATP. Nos expériences ont donc permis d'identifier des acides aminés importants pour la fonction d'Atm1 ainsi qu'un domaine impliqué dans la structure quaternaire de ce transporteur.

TABLE DES MATIÈRES

TABLE DES MATIÈRES.....	I
LISTE DES TABLEAUX.....	V
LISTE DES FIGURES.....	VI
LISTE DES ABRÉVIATIONS.....	VII
DÉDICACE.....	IX
REMERCIEMENTS.....	X
CHAPITRE 1. INTRODUCTION.....	1
1.1 Les transporteurs ABC.....	1
1.1.1 Généralités.....	1
1.1.2 Fonctions biologiques connues des transporteurs ABC.....	2
1.1.2.1 Import d'éléments nutritifs.....	2
1.1.2.2 Transport extracellulaire de protéines et de peptides.....	2
1.1.2.3 Transport dans les membranes intracellulaires.....	3
1.1.2.4 Transport d'ions.....	4
1.1.2.5 Translocation de phospholipides.....	4
1.1.2.6 Résistance aux médicaments.....	5
1.1.3 Structure des transporteurs ABC.....	6
1.1.3.1 Transporteur ABC typique.....	6
1.1.3.2 Les sites de liaison à l'ATP.....	9
1.1.3.3 Les domaines transmembranaires.....	10
1.1.3.4 Interactions intermoléculaires et intramoléculaires.....	10
1.1.3.4.1 Interactions intermoléculaires.....	10
1.1.3.4.2 Interactions intramoléculaires.....	12
1.1.4 Analyses mutationnelles des transporteurs ABC.....	13
1.1.4.1 Mutations qui affectent la liaison ou l'hydrolyse de l'ATP.....	13

1.1.4.2	Mutations qui affectent la liaison et la translocation des substrats.....	14
1.1.4.3	Autres types de mutations.....	14
1.2	Les mitochondries.....	15
1.2.1	Généralités.....	15
1.2.2	Mutations affectant les mitochondries.....	16
1.2.3	Communication entre le noyau et les mitochondries.....	16
1.2.4	Import mitochondrial.....	17
1.2.4.1	Le complexe TOM.....	18
1.2.4.2	Le complexe TIM.....	18
1.2.5	Chaîne de respiration mitochondriale.....	19
1.3	Informations sur <i>Atm1</i>	20
1.3.1	Description d' <i>ATM1</i>	20
1.3.2	Phénotype des cellules $\Delta atm1$	21
1.4	But du projet de recherche.....	21
CHAPITRE 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES.....		23
2.1	Souches et conditions de croissance utilisées.....	23
2.2	Transformation de <i>S. cerevisiae</i>	23
2.3	Construction d'une cassette d'excision $\Delta atm1::HIS3$	24
2.4	Préparation d'ADN génomique et analyse de type Southern.....	25
2.5	Criblage d'une banque d'ADN génomique de <i>S. cerevisiae</i> chez <i>E. coli</i>	26
2.6	Isolement d'une souche haploïde viable $\Delta atm1$	27
2.7	Mutagenèse d' <i>ATM1</i> , criblage et sous-clonage des mutants thermosensibles.....	28
2.8	Séquençage des mutants thermosensibles d' <i>Atm1</i>	30
2.9	Production d'anticorps polyclonaux anti- <i>Atm1</i>	30

2.10	Purification des anticorps polyclonaux anti-Atm1	33
2.11	Préparation d'extraits protéiques totaux	34
2.12	Préparation des mitochondries.....	35
2.13	Constructions plasmidiques pour les expériences de co-immunoprécipitation	36
2.14	Co-immunoprécipitations	38
2.15	Analyses de type Western.....	39
CHAPITRE 3. RÉSULTATS.....		41
3.1	Construction d'une souche $\Delta atm1$ viable	41
3.1.1	Utilisation de la technique du 'plasmid shuffling' pour étudier <i>ATM1</i>	41
3.1.2	Génération d'une souche hétérozygote <i>ATM1/$\Delta atm1$</i>	44
3.1.3	Isolement d'un fragment génomique contenant une copie sauvage d' <i>ATM1</i> ..	47
3.1.4	Isolement et caractérisation d'une souche haploïde viable $\Delta atm1$	47
3.1.5	Utilisation de la souche LPY1-12B dans le système du 'plasmid shuffling' ...	50
3.2	Production d'anticorps polyclonaux anti-Atm1	55
3.3	Identification et caractérisation de mutants thermosensibles d'Atm1	58
3.3.1	Isolement de mutants thermosensibles.....	58
3.3.2	Identification des mutations dans <i>ATM1</i> responsables pour le phénotype thermosensible.....	64
3.3.3	Caractérisation des mutants thermosensibles.....	67
3.3.3.1	Courbes de croissance des mutants thermosensibles.....	67
3.3.3.2	Analyse des mutants thermosensibles au niveau protéique	70
3.4	Atm1 forme des homodimères.....	73
3.4.1	Constructions plasmidiques pour les expériences de co-immunoprécipitation	73
3.4.1.1	Stratégie utilisée pour les expériences de co-immunoprécipitation.....	73
3.4.1.2	Les formes étiquetées d'Atm1 sont fonctionnelles.....	78
3.4.1.3	Construction d'un contrôle pour démontrer la spécificité de l'interaction...	79

3.4.1.4	Les protéines étiquetées sont correctement exprimées	81
3.4.2	Co-immunoprécipitations	84
3.4.2.1	Co-immunoprécipitations des formes étiquetées d'Atm1	84
3.4.2.2	Co-immunoprécipitations de la partie C-terminales d'Atm1	88
CHAPITRE 4. DISCUSSION		94
4.1	Structure et fonction d'Atm1: mise à jour.....	95
4.1.1	Analyse de la séquence peptidique d'Atm1	95
4.1.2	Fonctions biologiques possibles pour Atm1.....	99
4.2	Mutants thermosensibles.....	102
4.2.1	Mutations thermosensibles identifiées dans Atm1	102
4.2.2	Caractérisation éventuelle de suppresseurs intragéniques et extragéniques...	105
4.3	Homodimérisation.....	107
CONCLUSION		111
RÉFÉRENCES.....		112

LISTE DES TABLEAUX

Tableau 1. Liste des oligonucléotides utilisés au cours des expérimentations.....	31
Tableau 2. Pourcentages d'homologie et de similitude entre Atm1 et ses plus proches homologues	97

LISTE DES FIGURES

Figure 1. Représentation schématique des différentes sous-classes de transporteurs ABC.	7
Figure 2. Représentation schématique de la technique du ‘plasmid shuffling’.	42
Figure 3. Délétion du gène <i>ATM1</i> dans la souche diploïde W303 de <i>S. cerevisiae</i> .	45
Figure 4. Clonage d’un fragment génomique de <i>S. cerevisiae</i> contenant le gène <i>ATM1</i> .	48
Figure 5. Caractérisation de la tétrade 12.	51
Figure 6. Contre-sélection sur l’acide 5-fluoroorotique (5-FOA) de plasmides <i>URA3</i> .	53
Figure 7. Production d’anticorps polyclonaux anti-Atm1.	56
Figure 8. Stratégie utilisée lors du criblage pour des mutations ts dans <i>Atm1</i> .	59
Figure 9. Identification de mutants thermosensibles d’ <i>Atm1</i> .	62
Figure 10. Séquence peptidique et positions des mutations thermosensibles dans <i>Atm1</i> .	65
Figure 11. Courbes de croissance des mutants ts36-2, ts111-1 et ts247-1.	68
Figure 12. Analyse d’ <i>Atm1</i> dans les mitochondries.	71
Figure 13. Dendrogramme représentant la similarité entre <i>Atm1</i> et les autres membres de la superfamille des protéines ABC chez <i>S. cerevisiae</i> .	74
Figure 14. Étiquetage d’ <i>Atm1</i> .	76
Figure 15. Les formes étiquetées d’ <i>Atm1</i> pleine longueur sont fonctionnelles.	79
Figure 16. Les formes étiquetées d’ <i>Atm1</i> et de <i>Mas6</i> sont exprimées.	82
Figure 17. Co-immunoprécipitation des formes complètes d’ <i>Atm1</i> .	86
Figure 18. Les domaines de liaison à l’ATP d’ <i>Atm1</i> étiquetés sont exprimés.	89
Figure 19. Co-immunoprécipitation du DLA d’ <i>Atm1</i> .	92
Figure 20. Alignement de séquences multiples de quelques membres du sous-groupe de transporteurs ABC dont <i>Atm1</i> fait partie.	100

LISTE DES ABRÉVIATIONS

μ l	Microlitre
μ M	Micromolaire
5-FOA	Acide 5-fluoroorotique
ABC	<i>ATP-binding cassette</i>
ADN	Acide désoxyribonucléique
Amp	Ampiciline
ARN	Acide ribonucléique
ARNase	Ribonucléase A
ATP	Adénosine tri-phosphate
BSA	<i>Bovine serum albumin</i>
CPM	<i>Counts per minute</i>
DLA	Domaine de liaison à l'ATP
dNTP	Désoxyribonucléotides tri-phosphate
DO	Densité optique
DTM	Domaine transmembranaire
DTT	Dithiothréitol
EDTA	Acide éthylène diamine tétra-acétique
EtOH	Éthanol
g	Gramme
GST	Glutathione-S-transférase
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactoside
kb	Kilobase
kDa	Kilodalton
L	Litre
M	Molaire
ml	Millilitre
mM	Millimolaire
ng	Nanogramme
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
pb	Paire de base

PCR	<i>Polymerase chain reaction</i>
PEG	Polyéthylène glycol
PNK	<i>Polynucleotide kinase</i>
rpm	Révolution par minute
SC	<i>Synthetic complete</i>
SDS	<i>Sodium dodecyl sulphate</i>
ts	Thermosensible
YNB	<i>Yeast nitrogen base</i>
YPD	<i>Yeast extract peptone dextrose</i>

*À mes parents,
ma soeur Geneviève,
Lamon,
Bastien,
Lapointe
et Marie-Claude*

REMERCIEMENTS

J'aimerais tout d'abord remercier le Dr Martine Raymond et tous les membres de son laboratoire pour leur support à la fois scientifique et moral qui sans lui ce projet n'aurait été réalisable. Je tiens aussi à remercier chaleureusement les Drs Pierre Belhumeur et Bernard Turcotte pour leurs conseils judicieux sur plusieurs aspects tant techniques que fondamentaux. Je voudrais également exprimer ma reconnaissance envers les Drs Kevin McBride et Daniel Durocher, à la fois amis et collègues, pour leur encouragement ainsi que leur contribution scientifique tout au long de ma maîtrise. Finalement, j'aimerais remercier l'Institut de recherches cliniques de Montréal pour le support financier d'un an qu'il m'a octroyé.

CHAPITRE 1. INTRODUCTION

1.1 Les transporteurs ABC

1.1.1 Généralités

Le transport membranaire est un processus cellulaire fondamental. Toutes les cellules, ainsi que leurs organelles, sont séparées du milieu externe par des membranes lipidiques. La survie des cellules dépend donc du passage sélectif et régulé, aux travers de ces membranes, d'une grande diversité de molécules. L'essentialité de ce processus ne se situe pas uniquement au niveau de l'approvisionnement en éléments nutritifs mais également au niveau de la détoxification et de la régulation d'un grand nombre de fonctions biologiques. Le transport transmembranaire est médié par des protéines spécifiquement associées aux membranes. Ces protéines peuvent être regroupées en familles distinctes en fonction des homologies retrouvées au niveau des séquences protéiques et des mécanismes de translocation utilisés (André, 1995; Decottignies et Goffeau, 1997). Les transporteurs de la super-famille ABC (pour *ATP-binding cassette*) sont caractérisés principalement par la présence d'un domaine de liaison à l'ATP (DLA) fortement conservé au cours de l'évolution (Hyde *et al.*, 1990) et se retrouvent chez toutes les espèces, allant des bactéries jusqu'aux mammifères (Higgins, 1992). Les transporteurs ABC utilisent l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP pour transporter leur substrat contrairement à d'autres transporteurs, comme par exemple les facilitateurs, qui utilisent plutôt un gradient électro-chimique comme source d'énergie (Sadée *et al.*, 1995; André, 1995). Plusieurs transporteurs ABC sont d'une grande importance médicale. Par exemple, le gène CFTR (pour *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein*) code pour un canal d'ions chlorure défectueux chez les patients atteints de fibrose kystique (Riordan *et al.*, 1989); la P-glycoprotéine (Pgp) et la *multidrug resistance-associated protein* (MRP) causent la résistance aux agents anticancéreux lorsque surexprimées dans des cellules cancéreuses (Endicott et Ling, 1989; Cole *et al.*, 1992); les gènes *PMP70* et *ALDP*, codant pour des transporteurs ABC localisés aux peroxysomes, sont impliqués respectivement dans le syndrome de Zellweger et l'adrénoleukodystrophie (Kamijo *et al.*, 1990; Mosser *et al.*, 1993); la protéine encodée par le gène *MDR3* est impliquée dans des problèmes hépatiques familiaux (Devree *et al.*, 1998) et la protéine SUR (pour *sulfonylurea receptor*) est impliquée dans des cas d'hyperinsulinémie et d'hypoglycémie infantile.

1.1.2 Fonctions biologiques connues des transporteurs ABC

1.1.2.1 Import d'éléments nutritifs

La capacité de croître des bactéries dépend grandement de l'efficacité avec laquelle elles peuvent incorporer les nutriments dont elles ont besoin, et cela même chez des espèces comme *Escherichia coli* qui sont capables de croître dans un milieu défini mais où la vitesse de croissance est beaucoup plus rapide lorsque des acides aminés ou autres nutriments sont ajoutés au milieu de croissance. Au niveau énergétique, il est beaucoup plus avantageux pour une cellule d'incorporer des acides aminés que de les synthétiser *de novo*. Par exemple, la biosynthèse d'une molécule d'histidine requiert l'équivalent de 41 molécules d'ATP tandis que l'import via la perméase d'histidine n'en requiert qu'une ou deux (Ames, 1986). Plusieurs perméases bactériennes appartenant à la super-famille des transporteurs ABC, également connues sous le nom de *Traffic ATPase*, ont été identifiées jusqu'à maintenant et sont généralement impliquées dans l'import, plutôt que l'export, de leur substrat (Ames *et al.*, 1992). Par exemple, nous retrouvons chez *E. coli* les perméases de maltose MalEFGK (sous-unités MalE, MalF, MalG et MalK), d'histidine HisJQMP, d'arabinose AraFGH et de glutamine GlnHPQ (Ames *et al.*, 1992). Ces différents systèmes d'import bactériens nécessitent habituellement la présence d'une protéine périplasmique qui se doit de lier le substrat du transporteur afin de le présenter à ce dernier pour qu'il le transloque à l'intérieur de la cellule (Ames *et al.*, 1992).

1.1.2.2 Transport extracellulaire de protéines et de peptides

La grande majorité des protéines sont exportées à l'extérieur des cellules grâce à un signal peptidique qui les dirige vers l'extérieur et cela chez les cellules prokaryotes et eukaryotes. Chez les bactéries, la sécrétion de protéines via le complexe Sec s'avère être la voie principale de sécrétion de protéines qui possèdent un signal peptidique (Blight *et al.*, 1994a). Chez les cellules eukaryotes, la voie de sécrétion classique est composée de plusieurs compartiments membranaires comme le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi qui sont interconnectés entre eux par un système de transport vésiculaire bien caractérisé et qui permettent à la fois la maturation et la sécrétion de peptides (Harter et Wieland, 1996; Pelham, 1996). Cependant, certaines protéines qui ne possèdent pas de signal peptidique se retrouvent à l'extérieur des cellules et sont exportées, indépendamment du transport vésiculaire, par l'entremise de transporteurs ABC (Binet *et al.*, 1997). Par

exemple, l'hémolysine A chez *E. coli* est sécrétée dans l'espace périplasmique par le transporteur ABC HlyB (Felmlee *et al.*, 1985), la cyclolysine de *Bordetella pertussis* est sécrétée par CyaB (Glaser *et al.*, 1988) et la colicine V d'*E. coli* par CvaB (Gilson *et al.*, 1990). Chez la levure *Saccharomyces cerevisiae*, le facteur **a**, une phéromone de nature polypeptidique, est transporté à l'extérieur des cellules par le transporteur ABC Ste6 chez les cellules de type sexuel **a** (Kuchler *et al.*, 1989). L'absence de sécrétion du facteur **a**, dans un mutant *Aste6*, rend les cellules stériles, c'est-à-dire qu'elles ont perdu la capacité de se conjuguer avec des cellules du type sexuel opposé. La sécrétion du facteur **a** demeure actuellement le seul exemple d'export de protéine qui est indépendant d'un signal peptidique chez les eukaryotes (Higgins, 1992). Cependant, plusieurs autres protéines comme les facteurs de croissance IL-1 (interleukine-1) et FGF (*fibroblast growth factor*), n'ont pas de signal peptidique et sont quand même sécrétées à l'extérieur des cellules, potentiellement par l'entremise de transporteurs ABC (Rubartelli et Sitia, 1991; Florkiewicz *et al.*, 1995).

1.1.2.3 Transport dans les membranes intracellulaires

Des transporteurs ABC ont été identifiés dans les membranes de presque tous les différents types d'organelles. Les protéines humaines Tap1 et Tap2 sont impliquées dans le transport de peptides antigéniques vers le réticulum endoplasmique et sont ainsi requises pour la présentation de molécules associées au complexe majeur d'histocompatibilité de type 1 (Townsend et Trowsdale, 1993; Colonna *et al.*, 1992). Les protéines Pxa1 et Pxa2 (Pat1 et Pat2) de *S. cerevisiae* sont probablement les orthologues d'ALDP et de PMP70 impliquées respectivement dans l'adrénoleukodystrophie et le syndrome de Zellweger (Shani *et al.*, 1995). Elles médient le transport à l'intérieur des peroxysomes des acides gras à très longues chaînes (Hetteema *et al.*, 1996). Les protéines pfmdr1 de *Plasmodium falciparum* et Hmt1 de *Schizosaccharomyces pombe*, impliquées respectivement dans la résistance aux agents antimalariques et au cadmium, sont toutes deux localisées à la vacuole (Wilson *et al.*, 1989; Ortiz *et al.*, 1992). Un transporteur ABC localisé dans les mitochondries, nommé Atm1, a été identifié chez *S. cerevisiae* (Leighton, 1995a). La fonction cellulaire de cette protéine est encore incertaine. Aucun transporteur ABC spécifiquement localisé à l'appareil de Golgi et au noyau n'a été identifié jusqu'à maintenant. Une fonction biologique encore inconnue pour des transporteurs ABC dans ces deux organelles est cependant possible (Cleves et Kelly, 1996).

1.1.2.4 Transport d'ions

Les anions sont des substrats pour les transporteurs ABC. Le gène *CFTR* (pour *cystic fibrosis transmembrane conductance regulator protein*) est muté chez les patients atteints de fibrose kystique (Riordan *et al.*, 1989; Kere *et al.*, 1989; McIntosh *et al.*, 1989). Il a été démontré que la surexpression du gène *CFTR* dans les cellules de mammifères HeLa, CHO et NIH 3T3 ou dans les cellules d'insecte Sf9 cause une augmentation de la perméabilité envers les anions chlorures, suggérant que CFTR agit à titre de canal d'ions chlorure (Anderson *et al.*, 1991b; Kartner *et al.*, 1991). Il est maintenant admis que CFTR agit à titre de canal ionique de faible conductance sélectif pour les anions ($\text{Br}^- > \text{Cl}^- > \text{I}^-$) (Anderson *et al.*, 1991a).

Les cations divalents sont également des substrats pour les transporteurs ABC. Par exemple, l'homologue du gène *CFTR* chez la levure *S. cerevisiae*, le gène *YCF1*, confère la résistance à de fortes concentrations de Cd^{2+} (Szczypka *et al.*, 1994). Des expériences ont prouvé que la résistance envers le cadmium médié par Ycf1 était due à la séquestration vacuolaire de complexes Cd^{2+} -glutathione (Li *et al.*, 1997). Des gènes codant pour des transporteurs ABC impliqués dans la résistance au Cd^{2+} chez *Schizosaccharomyces pombe* et *Caenorhabditis elegans* ont également été identifiés (Ortiz *et al.*, 1992; Broeks *et al.*, 1996). Chez *S. pombe*, la protéine Hmt1 est localisée à la membrane vacuolaire et elle confère la résistance au cadmium en transportant à l'intérieur des vacuoles des complexes phytochélatines- Cd^{2+} (Ortiz *et al.*, 1992; Ortiz *et al.*, 1995). Chez *C. elegans*, le gène *mrp-1*, codant pour un homologue de la protéine humaine MRP impliquée dans la résistance à plusieurs agents anticancéreux via leur expulsion à l'extérieur de la cellule sous forme de complexes avec la glutathione (Zaman *et al.*, 1995), confère également la résistance au Cd^{2+} (Broeks *et al.*, 1996). Ainsi, il semble que les cations divalents soient des substrats pour les transporteurs ABC uniquement lorsqu'ils sont complexés avec des petits peptides comme la glutathione et les phytochélatines.

1.1.2.5 Translocation de phospholipides

Des souris où le gène *mdr2* est excisé développent des problèmes hépatiques qui sont dus à une déficience au niveau de la sécrétion, dans la bile, de la phosphatidylcholine (PC), suggérant que le produit du gène *mdr2* pourrait être impliqué dans la translocation de la PC dans les membranes des hépatocytes des canalicules biliaires (Smit *et al.*, 1993). Des expériences ultérieures utilisant un analogue fluorescent de la PC, le NBD-PC, ont

démontré que la protéine *mdr2* a la capacité de transloquer *in vitro* la PC du feuillet interne au feuillet externe d'une bi-couche lipidique (Ruetz et Gros, 1994). Une distribution asymétrique de PC de part et d'autre de la bi-couche lipidique pourrait induire le bourgeonnement de vésicules riches en PC, résultant en une sécrétion nette de PC dans la bile (Ruetz et Gros, 1994; van Helvoort *et al.*, 1996; Higgins, 1994). Plus récemment, il a été démontré que la protéine humaine MDR1 ainsi que la protéine murine *mdr3* ont la capacité de transloquer à la fois la PC et la PE (van Helvoort *et al.*, 1996). De son côté, la protéine MDR3 humaine semble être uniquement impliquée dans la translocation de la PC, démontrant ainsi une plus grande spécificité envers son substrat que MDR1 (van Helvoort *et al.*, 1996; Bosch *et al.*, 1997). Ainsi, il semble que les phospholipides soient des substrats naturels pour les P-glycoprotéines et il serait donc envisageable que d'autres transporteurs ABC puissent être impliqués dans la translocation de phospholipides (Higgins, 1994).

1.1.2.6 Résistance aux médicaments

La résistance multiple aux drogues (MDR) chez les cellules de mammifères est habituellement causée par la surexpression du gène *MDR1* codant pour la P-glycoprotéine (Chen *et al.*, 1986) ou par la protéine MRP (Cole *et al.*, 1992). Le phénotype MDR chez les cellules de mammifères est un important problème clinique puisqu'il rend inefficaces les traitements chimiothérapeutiques actuels car la P-glycoprotéine (Ueda *et al.*, 1987) et MRP (Zaman *et al.*, 1994) expulsent à l'extérieur des cellules cancéreuses un grand nombre de composés structurellement différents n'ayant en commun que leur grande hydrophobicité (Germann, 1996; Gottesman *et al.*, 1995). Un phénotype de résistance pléiotropique aux drogues (PDR) est également présent chez la levure *S. cerevisiae* et il est fréquemment causé par la surexpression de transporteurs ABC comme Pdr5 (Balzi *et al.*, 1994b; Bissinger et Kuchler, 1994), Snq2 (Servos *et al.*, 1993) et Yor1p (Katzmann *et al.*, 1995; Cui *et al.*, 1996). Ces protéines sont également impliquées dans la résistance à plusieurs composés structurellement différents (Balzi et Goffeau, 1994a). Le phénotype MDR/PDR est également présent chez la levure *Candida albicans*, un pathogène humain opportuniste, et est causé par la surexpression des transporteurs ABC Cdr1 et Cdr2 (Prasad *et al.*, 1995; Sanglard *et al.*, 1997; Balzi et Goffeau, 1991).

1.1.3 Structure des transporteurs ABC

1.1.3.1 Transporteur ABC typique

Un transporteur ABC typique est composé de quatre domaines associés aux membranes, deux domaines transmembranaires (DTM) et deux domaines de liaison à l'ATP (DLA) (Higgins, 1992). Les DTM sont extrêmement hydrophobes et contiennent un nombre variable de segments transmembranaire, le plus souvent six, tandis que les DLA sont hydrophiles et possèdent des séquences consensus de liaison à l'ATP (Higgins, 1992). L'hypothèse actuelle est que les DTM forment un canal au travers duquel le substrat est transporté et que les sites de liaison à l'ATP servent à coupler l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP à la translocation du substrat (Higgins, 1992). Chez les perméases bactériennes (figure 1), les polypeptides contenant les DTM et les DLA sont synthétisés séparément et s'associent subséquemment dans la membrane pour former un transporteur fonctionnel (Prossnitz *et al.*, 1989; Davidson et Nikaido, 1991; Kerppola *et al.*, 1991). Il est important de noter qu'une composante périplasmique spécifique à chaque perméase est requise pour que le système d'import avec lequel elle est associée soit fonctionnel (Ames *et al.*, 1992). Au cours de l'évolution, les DTM et les DLA se seraient fusionnés pour générer deux différents groupes de 'demi-transporteurs', dépendant de l'orientation de la fusion (figure 1). Un de ces groupes possède l'orientation N-(TM₆-ABC)-C et inclut le transporteur d'hémolysine HlyB chez *E. coli* (Felmlee *et al.*, 1985), le transporteur mitochondrial Atm1 chez *S. cerevisiae* (Leighton et Schatz, 1995b) et Mdl1p et Mdl2p, les homologues chez *S. cerevisiae* des transporteurs de peptides antigéniques humains Tap1 et Tap2 (Townsend et Trowsdale, 1993). L'autre groupe possède une orientation de type N-(ABC-TM₆)-C et comprend les transporteurs *white*, *brown* et *scarlet*, impliqués dans l'import de précurseurs pour la pigmentation des yeux chez *Drosophila melanogaster* (Ewart *et al.*, 1994) et la protéine Adp1p de *S. cerevisiae* dont la fonction est encore inconnue (Skala *et al.*, 1992). Ces 'demi-transporteurs' doivent homodimériser ou hétérodimériser afin de générer un complexe protéique possédant les quatre domaines (deux DTM et deux DLA) requis pour la fonction des transporteurs ABC (Higgins, 1992). Ces 'demi-transporteurs' se seraient ensuite dupliqués pour générer deux autres groupes de transporteurs possédant dans le

Figure 1. Représentation schématique des différentes sous-classes de transporteurs ABC. Les DTM (hachurés), DLA (barrés) et la région 'linker' (noir) sont indiqués.



Perméases bactériennes
Opp, His, Mal, Ara, etc.



HlyB, LktB
Tap1, Tap2
Mdl1, Mdl2
Aldp, Pmp70
Pat1, Pat2
Atm1



white, brown, scarlet
Adp1



P-Glycoprotéines (MDR)
pfmdr1
Stc6
CFTR
MRP



Pdr5
Cdr1, Cdr2, Cdr3
Sng2

même polypeptide les quatre domaines fonctionnels. L'un de ces deux groupes comprend les transporteurs ABC de type N-(TM₆-ABC)₂-C comme Ste6, le transporteur du facteur **a** chez *S. cerevisiae* (Kuchler *et al.*, 1989), CFTR (Riordan *et al.*, 1989) ainsi que la P-glycoprotéine et ses homologues (Chen *et al.*, 1986; Cole *et al.*, 1992; Wilson *et al.*, 1989). CFTR contient un domaine additionnel nommé R situé entre le premier DLA et le deuxième DTM et qui s'avère être un site de phosphorylation impliqué dans la régulation de l'activité de CFTR (Cheng *et al.*, 1991). Le second groupe, de type N-(ABC-TM₆)₂-C, comprend des protéines comme Pdr5 (Balzi *et al.*, 1994b; Bissinger et Kuchler, 1994) et Snq2 (Servos *et al.*, 1993), identifiées chez la levure *S. cerevisiae*, et les protéines Cdr1 (Prasad *et al.*, 1995) et Cdr2 (Sanglard *et al.*, 1997) qui sont impliquées dans la résistance pléiotropique aux antifongiques chez *C. albicans*. Ce type de transporteur a également été identifié chez les plantes mais jamais chez les mammifères (Smart et Fleming, 1996; Michaelis et Berkower, 1995).

1.1.3.2 Les sites de liaison à l'ATP

Les DLA constituent la principale caractéristique des transporteurs ABC. Ils sont composés approximativement de 200 acides aminés et possèdent deux motifs habituellement conservés dans la majorité des protéines et qui lient les nucléotides, soient les motifs Walker A et Walker B, qui sont toujours séparés l'un de l'autre par 90-120 résidus d'acides aminés (Walker *et al.*, 1982; Hyde *et al.*, 1990). Le motif Walker A a comme consensus la séquence GxxGxGKS/T où x représente n'importe quel acide aminé. Cette séquence est également connue sous le nom de 'P(phosphate)-loop' puisqu'elle forme, probablement via la lysine, des contacts directs entre les phosphates α , β et γ de l'ATP (Saraste *et al.*, 1990). De son côté, le motif Walker B possède un consensus légèrement moins rigoureux, de séquence Rx₍₆₋₈₎ΘΘΘΘD, où Θ représente un acide aminé hydrophobe. Des évidences suggèrent que l'acide aspartique interagit avec le cation Mg⁺⁺ lié à l'ATP (Mimura *et al.*, 1991). En plus des motifs Walker A et Walker B, les transporteurs ABC possèdent une séquence protéique conservée appelée 'Signature ABC'. Cette séquence, située entre les sites Walker A et Walker B, a comme consensus LSGGQ et pourrait être impliquée dans la signalisation entre les DTM et les DLA (Ames *et al.*, 1992; Cutting *et al.*, 1990). Des mutations dans les résidus conservés des motifs Walker A, Walker B et 'Signature ABC' affectent de façon drastique la fonction d'un transporteur ABC (section 1.1.4.1). Des expériences biochimiques ont également démontré que les

DLA des transporteurs ABC ont la capacité de lier et d'hydrolyser l'ATP (Doige et Ames, 1993; Ambudkar *et al.*, 1992).

1.1.3.3 Les domaines transmembranaires

Les DTM des transporteurs ABC sont hautement hydrophobes et le plus souvent composés de six hélices α ayant la capacité de traverser la membrane (Higgins, 1992). Un transporteur ABC typique comprend deux DTM ayant chacun six segments transmembranaires avec ses extrémités N-terminale et C-terminale du côté cytoplasmique, trois boucles extracellulaires et deux boucles intracellulaires (Higgins, 1992). Des expériences biochimiques soutiennent ce modèle pour la perméase d'oligopeptides OppBC chez *S. typhimurium* (Pearce *et al.*, 1992), le transporteur d'hémolysine HlyB chez *E. coli* (Wang *et al.*, 1991), le transporteur de protéases PrtD chez *Erwinia chrysanthemi* (Delepelaire et Wandersman, 1991) et la P-glycoprotéine (Loo et Clarke, 1995a; Kast *et al.*, 1995). Cependant, quelques exceptions ont été observées. La sous-unité MalF de la perméase du maltose semble posséder huit segments transmembranaires (Froshauer *et al.*, 1988). De leur côté, HisQ et HisM n'ont que cinq segments transmembranaires chacun et s'associent dans la membrane plasmique pour former un transporteur fonctionnel (Higgins *et al.*, 1982; Kerppola *et al.*, 1991). D'autre part, le sous-groupe de transporteur ABC qui inclut la protéine MRP chez les mammifères et la protéine Ycf1 chez *S. cerevisiae* possède une topologie membranaire différente, où il y a présence d'un DTM N-terminal additionnel ayant de quatre à six segments transmembranaires (Tusnady *et al.*, 1997).

Il existe très peu d'homologie entre les DTM des différents transporteurs. Cependant, un motif nommé EEA se retrouve dans les boucles intracellulaires situées entre les quatrièmes et cinquièmes segments transmembranaires chez plusieurs perméases bactériennes (Saurin *et al.*, 1994), Pxa1 et Pxa2 (Pat1 et Pat2) chez *S. cerevisiae* et MDR1 chez l'humain (Michaelis et Berkower, 1995) (section 1.1.3.4.1). Des études *in silico* démontrent également que la longueur des boucles intracellulaires et extracellulaires est conservée entre différents membres d'une même sous-classe de transporteurs ABC. Ces boucles pourraient donc avoir un rôle fonctionnel important (Michaelis et Berkower, 1995).

1.1.3.4 Interactions intermoléculaires et intramoléculaires

1.1.3.4.1 Interactions intermoléculaires

Les perméases bactériennes comme celle de l'histidine chez *S. typhimurium* et celle du maltose chez *E. coli* sont dépendantes d'une composante périplasmique, MBP (pour *maltose binding protein*) dans le cas de la perméase du maltose et HisJ pour la perméase d'histidine (Ames *et al.*, 1992). Des expériences *in vitro* confirment la présence d'une interaction physique entre la composante périplasmique soluble et le complexe membranaire qui serait requise pour le transport du substrat respectif (Treptow et Shuman, 1985; Prossnitz *et al.*, 1989). Il existe un motif conservé chez les perméases bactériennes, nommé motif EAA, qui pourrait favoriser une interaction entre la protéine périplasmique et son complexe membranaire (Mourez *et al.*, 1997). Des interactions entre les différentes sous-unités des perméases de l'histidine chez *S. typhimurium* et du maltose chez *E. coli* ont également été démontrées (Panagiotidis *et al.*, 1993; Kerppola *et al.*, 1991).

Les 'demi-transporteurs' ABC de type N-(TM₆-ABC)-C ou N-(ABC-TM₆)-C doivent homodimériser ou hétérodimériser dans les membranes afin de former un transporteur ABC fonctionnel (Higgins, 1992). Des évidences génétiques avec les transporteurs de guanine/tryptophane chez *D. melanogaster* suggèrent que différentes combinaisons des 'demi-transporteurs' ABC *white*, *brown* et *scarlet* permettent de changer la spécificité envers le substrat (Ewart *et al.*, 1994). Ainsi, une association entre les 'demi-transporteurs' ABC *white* et *brown* génère un transporteur de guanine tandis qu'une association entre *white* et *scarlet* permet de transporter le tryptophane (Ewart *et al.*, 1994). La présence d'hétérodimères Tap1/Tap2 et Pxa1/Pxa2 (Pat1/Pat2) a été démontrée biochimiquement (Spies *et al.*, 1992; Kelly *et al.*, 1992; Shani et Valle, 1996). Les domaines spécifiques de ces 'demi-transporteurs' médiant la dimérisation n'ont pas encore été identifiés. Des évidences génétiques suggèrent également que le transporteur d'hémolysine HlyB d'*E. coli* fonctionne sous forme d'homodimères (Koronakis et Hughes, 1993). Aucune preuve biochimique démontrant la capacité d'un 'demi-transporteur' ABC à homodimériser n'a cependant été apportée.

Des formes multimériques de la P-glycoprotéine ont été observées dans des lignées cellulaires humaines ou CHO ayant un phénotype MDR (Boscoboinik *et al.*, 1990; Naito et Tsuruo, 1992). Des expériences ont montré que les formes multimériques sont moins phosphorylées que les formes monomériques (Poruchynsky et Ling, 1994). Des études récentes ont démontré que la partie 'linker' de la P-glycoprotéine a la capacité de dimériser *in vitro* et que sa phosphorylation pourrait être impliquée dans la formation de complexes oligomériques de la P-glycoprotéine (Juvvadi *et al.*, 1997). D'autre part, il semble que la

forme minimale active de la P-glycoprotéine soit un monomère mais la présence de formes oligomériques n'a pas encore été complètement écartée (Loo et Clarke, 1996).

Finalement, les transporteurs ABC peuvent interagir avec des protéines qui ne font pas partie du complexe transporteur. Les chaperonnes lient de façon transitoire plusieurs protéines nouvellement synthétisées et sont impliquées dans la rétention de protéines ayant une structure tertiaire ou quaternaire erronée (Bergeron *et al.*, 1994; Gething et Sambrook, 1992). La calnexine, une chaperonne localisée au réticulum endoplasmique, est impliquée dans la rétention et la dégradation subséquente de formes mutantes de la P-glycoprotéine et de CFTR (Pind *et al.*, 1994; Loo et Clarke, 1994a). La calnexine est également impliquée dans la rétention au réticulum endoplasmique de la forme mutante Δ Phe508 de CFTR causant la fibrose kystique (Pind *et al.*, 1994).

1.1.3.4.2 Interactions intramoléculaires

Des interactions entre différents domaines du même polypeptide sont également possibles. En effet, il a été démontré que la co-expression des moitiés N-terminale et C-terminale du transporteur Ste6, contenant chacune un DTM et un DLA, restaurait la capacité des cellules Δ ste6 à se conjuguer (Berkower et Michaelis, 1991). Ces expériences suggéraient la présence d'interactions intramoléculaires dans Ste6, ce qui fut confirmé par des expériences de co-immunoprécipitation (Berkower *et al.*, 1996). De plus, il a été démontré que des mutants de Ste6, possédant une mutation dans l'un ou l'autre de ses deux DLA rendant la protéine inactive, étaient en mesure d'interagir physiquement et fonctionnellement avec une partie N-terminale ou C-terminale ne possédant pas la mutation (Berkower *et al.*, 1996). Des expériences similaires ont démontré que le DTM N-terminal de Ste6 (DTM1) a la capacité d'interagir avec une forme tronquée de Ste6 ne possédant que les trois domaines C-terminaux (DLA1-DTM2-DLA2), suggérant que les interactions intramoléculaires observées sont du moins partiellement médiées par les DTM (Berkower *et al.*, 1996). Des expériences similaires ont été effectuées avec la P-glycoprotéine démontrant, suite à la co-expression dans des cellules Sf9 des moitiés N-terminale et C-terminale de cette dernière, une activité ATPasique stimulable par la présence de différentes drogues (Loo et Clarke, 1994b). Des interactions spécifiques entre les DTM1 et DTM2, DLA1 et DLA2, DTM1 et DLA1 et DTM2 et DLA2 de la P-glycoprotéine ont également été observées suite à des expériences de co-immunoprécipitation (Loo et Clarke, 1995b). D'un autre côté, il a été démontré que la co-expression du DTM N-terminal

additionnel de la protéine MRP et d'une partie C-terminale ne contenant pas ce domaine était en mesure de rétablir la capacité de MRP à transporter le leukotriène C₄, suggérant l'existence d'interactions intramoléculaires entre ces deux parties de la protéine (Gao *et al.*, 1998).

1.1.4 Analyses mutationnelles des transporteurs ABC

Des études mutationnelles ont été effectuées sur plusieurs transporteurs ABC mais principalement sur les P-glycoprotéines humaines et murines. Considérant l'abondance d'information disponible, nous utiliserons majoritairement les informations obtenues sur les P-glycoprotéines et sur Ste6 afin d'expliquer les différents concepts importants.

1.1.4.1 Mutations qui affectent la liaison ou l'hydrolyse de l'ATP

Puisque les domaines de liaison à l'ATP sont très conservés à l'intérieur de la famille des transporteurs ABC et que la liaison et l'hydrolyse de l'ATP est requise pour la translocation du substrat, un grand nombre d'études mutationnelles de cette région ont été entreprises. Les substitutions Gly431Ala, Gly1073Ala, Lys432Arg et Lys1074Arg dans le motif Walker A de la protéine mdr1 murine et les substitutions Lys422Met et Lys1076Met chez la protéine MDR1 humaine rendent ces protéines non fonctionnelles (Azzaria *et al.*, 1989; Muller *et al.*, 1996). Le fait que seulement une de ces mutations soit requise afin d'inactiver la protéine suggère que la présence de deux DLA fonctionnels est nécessaire pour la fonction des P-glycoprotéines (Azzaria *et al.*, 1989; Muller *et al.*, 1996). De plus, ces mutants conservent la capacité de lier un analogue non hydrolysable de l'ATP, le 8-azido-ATP, suggérant qu'une étape suivant la liaison de l'ATP est affectée (Azzaria *et al.*, 1989; Muller *et al.*, 1996). D'un autre côté, une molécule chimérique dans laquelle le DLA C-terminal de MDR1 est remplacé par son DLA N-terminal conserve partiellement la capacité de conférer un phénotype MDR, l'inverse donnant lieu à une molécule non fonctionnelle (Gottesman *et al.*, 1995). Ceci suggère que les DLA ne sont pas interchangeables mais qu'ils n'occupent pas non plus un rôle unique (Gottesman *et al.*, 1995). Les substitutions Gly392Val, Gly1087Val, Lys393Arg ou Lys393Ala, Lys1093Arg ou Lys1093Arg dans le motif Walker A de la protéine Ste6 de *S. cerevisiae* affectent toutes la capacité des cellules à transporter le facteur a (Berkower et Michaelis, 1991). Des mutations dans la 'signature ABC' causant les substitutions Gly509Asp et Gly1193Asp affectent également l'activité du transporteur (Berkower et Michaelis, 1991). Globalement,

ces résultats démontrent à quel point les DLA des transporteurs ABC, et principalement les motifs Walker A, Walker B et 'signature ABC', sont importants pour leur fonction.

1.1.4.2 Mutations qui affectent la liaison et la translocation des substrats

Des analyses biochimiques de la P-glycoprotéine suggèrent que ses DTM sont impliqués dans la reconnaissance et dans l'interaction initiale avec les différentes drogues dans le contexte de la bi-couche lipidique (Bruggemann *et al.*, 1992; Greenberger, 1993; Germann, 1996). D'un autre côté, des analyses génétiques de différents mutants de la P-glycoprotéine chez l'humain, le hamster et la souris ayant un profil de résistance différent de la protéine sauvage ont démontré que les mutations responsables de ce changement de spécificité se trouvaient majoritairement dans les DTM (Germann, 1996). Par exemple, la mutation Gly185Val dans la protéine MDR1 humaine cause une diminution de la résistance à la vinblastine et l'actinomycine mais une résistance accrue à la colchicine (Choi *et al.*, 1988). Des études de photomarquage avec des analogues de la vinblastine, de la colchicine et de l'azidopine ont démontré que la diminution de la résistance de ce mutant était associée à une augmentation de la liaison des ligands photoactivables, suggérant que la mutation Gly185Val n'affectait pas la liaison du substrat (*on-rate*) mais plutôt sa dissociation subséquente (*off-rate*) (Safa *et al.*, 1990). Les résidus Ser939 et Ser941 des protéines murines *mdr1* et *mdr3* respectivement sont impliqués dans des interactions avec la colchicine et l'adriamycine (Dhir *et al.*, 1993). Les substitutions Pro223Ala et Pro886Ala situées dans les segments transmembranaires TM4 et TM10 de la P-glycoprotéine humaine altèrent également sa spécificité (Loo et Clarke, 1993). Globalement, ces expériences suggèrent que les DTM des transporteurs ABC sont probablement impliqués dans la liaison des substrats et que leur translocation a lieu en deux étapes distinctes, soit la reconnaissance et la liaison du substrat et puis le relâchement et la translocation de ce dernier.

1.1.4.3 Autres types de mutations

Des mutations n'affectant pas la liaison et l'hydrolyse de l'ATP (section 1.1.4.1), ou la liaison et la translocation des substrats (section 1.1.4.2) ont également été identifiées chez certains transporteurs ABC. Par exemple, il a été démontré que les mutations Δ Phe508 et Δ Ile507 et les substitutions Lys464Met, Phe508Arg et Ser549Ile dans CFTR donnaient lieu à des protéines mutantes non glycosylées, ces dernières n'atteignant pas l'appareil de Golgi puisque retenues et subséquemment dégradées dans le réticulum

endoplasmique (Cheng *et al.*, 1990). D'un autre côté, CFTR et son homologue chez *S. cerevisiae* Ycf1 se distinguent des autres transporteurs ABC par la présence d'un domaine additionnel, nommé domaine R, qui contient des sites consensus de phosphorylation des sérines (Szczycka *et al.*, 1994; Cheng *et al.*, 1991). La mutation d'une sérine dans le domaine R de Ycf1 rend les cellules sensibles à de fortes concentrations de Cd^{2+} , suggérant que la phosphorylation du domaine R est essentielle pour la fonction de ce transporteur (Szczycka *et al.*, 1994). Ycf1 contient une phénylalanine à la position 713 qui est requise pour la détoxification du Cd^{2+} et qui est analogue à la Phe508 de CFTR qui est mutée chez les patients atteints de fibrose kystique (Szczycka *et al.*, 1994). D'autre part, les mutations Ser945Leu, Gly970Arg et His949Tyr dans la troisième boucle cytoplasmique de CFTR ont une influence sur la probabilité d'ouverture du canal (P_0), suggérant que cette boucle se trouve à proximité de la partie interne du canal (Seibert *et al.*, 1996). De plus des mutations ts se trouvant soit dans le DTM ou le DLA du transporteur HlyB d'*E. coli* affectant sa capacité à transporter l'hémolysine à température restrictive ont été identifiées (Blight *et al.*, 1994b).

1.2 Les mitochondries

1.2.1 Généralités

Outre la respiration oxydative, plusieurs processus cellulaires fondamentaux et essentiels comme la biosynthèse de l'hème, des pyrimidines, de certains acides aminés et de plusieurs autres métabolites clefs nécessitent la participation des mitochondries. Les mitochondries contiennent leur propre système génétique et synthétisent certains de leurs polypeptides, quoique la majorité des polypeptides mitochondriaux soient d'origine nucléaire, traduits dans le cytoplasme et importés subséquentement dans les mitochondries par un système d'import de polypeptides hautement caractérisé. La régulation de l'expression des gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales s'avère donc un problème unique à cette organelle et commence à peine à être compris. La levure *S. cerevisiae* a été l'organisme de choix pour étudier les mitochondries grâce aux possibilités expérimentales offertes par ce système modèle. Il est maintenant clair que les mécanismes de fonctionnement des mitochondries varient très peu d'un organisme à l'autre et que les différences observées ne sont pas fondamentales (Pon et Schatz, 1991). Ainsi, seulement les informations obtenues chez *S. cerevisiae* sont discutées dans ce mémoire.

1.2.2 Mutations affectant les mitochondries

Des mutants de *S. cerevisiae* incapables de croître sur des sources de carbone non-fermentables, comme le lactate et le glycérol, ont été identifiés. Ces derniers étaient déficients au niveau d'une seule activité enzymatique, dû à des mutations se trouvant dans l'ADN mitochondrial. Des analyses génétiques et biochimiques de ces mutants *mit⁻* ont mené à l'identification de plusieurs gènes impliqués dans la respiration oxydative et d'autres codant pour des composantes de la chaîne de respiration mitochondriale ou du complexe ATPase (Costanzo et Fox, 1990). Une deuxième classe de mutants, formant des colonies plus petites que les cellules sauvages en présence de glucose comme source unique de carbone mais incapable de croître en présence d'une source de carbone non-fermentable, a également été identifiée (Tzagoloff et Dieckmann, 1990; Pon et Schatz, 1991). Des analyses génétiques ont démontré que ces mutations ne ségrégaient pas de façon mendélienne et ont par conséquent été nommées *pet* (pour *cytoplasmic petite*) ou ρ^- (Ebner *et al.*, 1973). Ces mutants démontrent des délétions importantes au niveau de l'ADN mitochondrial et sont incapables de répliquer leur ADN. Ceci est dû à l'absence de certains gènes d'origine mitochondriale codant, par exemple, pour les sous-unités ribosomales ou les ARNt mitochondriaux (Tzagoloff et Myers, 1986; Costanzo et Fox, 1990). La classe de mutants *pet* la plus sévère est celle des mutants ρ^0 , chez qui la totalité de l'ADN mitochondrial est absente mais qui conservent quand même la majorité des activités enzymatiques mitochondriales autres que la respiration oxydative (Tzagoloff et Myers, 1986).

1.2.3 Communication entre le noyau et les mitochondries

Un grand nombre de protéines nucléaires sont requises pour l'expression de certains gènes mitochondriaux. Des gènes nucléaires impliqués dans la ségrégation des mitochondries (McConnell *et al.*, 1990; Stewart et Yaffe, 1991), la réplication et la ségrégation de l'ADN mitochondrial (Lundin *et al.*, 1991; Jones et Fangman, 1992), le contrôle post-transcriptionnel mitochondrial (Seraphin *et al.*, 1989; Stepien *et al.*, 1992) et la traduction de gènes mitochondriaux (Costanzo et Fox, 1986; Costanzo et Fox, 1988) ont été identifiés.

D'un autre côté, très peu d'information est disponible en ce qui concerne les signaux transmis par les mitochondries qui peuvent influencer la transcription de gènes nucléaires. Ce type de communication, c'est-à-dire de la mitochondrie vers le noyau, se

nomme régulation rétrograde (Butow *et al.*, 1988). L'hème, qui est synthétisée à partir de la protoporphyrine à l'intérieur des mitochondries, est capable d'exercer cette fonction (Guarente et Mason, 1983). En effet, il a été démontré que l'expression du gène *CYC1*, codant pour l'iso-1-cytochrome c de *S. cerevisiae*, est régulée de façon transcriptionnelle par les niveaux intracellulaires d'hème (Guarente et Mason, 1983). Le facteur de transcription Hap1 semble être l'activateur majeur des gènes codant pour des protéines mitochondriales qui sont influencés par les niveaux d'hème (Forsburg et Guarente, 1989). Ainsi, une molécule comme l'hème pourrait agir à titre de signal provenant des mitochondries pour contrôler l'expression de gènes nucléaires codant pour des protéines mitochondriales (Guarente et Mason, 1983). Il reste encore cependant à déterminer comment l'hème est exportée à l'extérieur des mitochondries de *S. cerevisiae*. Chez les bactéries, l'hème est transportée à travers la membrane plasmique par des transporteurs ABC (Beckman *et al.*, 1992). Un rôle similaire joué par un transporteur ABC mitochondrial chez *S. cerevisiae* serait donc possible. D'un autre côté, des études plus récentes ont démontré que l'état fonctionnel des mitochondries et des chloroplastes avaient également la capacité d'influencer la transcription de gènes nucléaires (Susek *et al.*, 1993; Mayfield, 1990; Parikh *et al.*, 1987).

1.2.4 Import mitochondrial

Les mitochondries doivent importer la majorité de leurs protéines du cytoplasme. Le processus d'import fait face à deux problèmes majeurs. Premièrement, les protéines doivent être acheminées au compartiment sub-mitochondrial approprié et deuxièmement, les protéines destinées à la matrice doivent être transloquées à travers deux membranes distinctes. Les mitochondries possèdent donc deux systèmes d'import distincts, l'un se trouvant à la membrane externe (le complexe TOM) et l'autre à la membrane interne des mitochondries (le complexe TIM) (Pfanner *et al.*, 1996). Les protéines destinées aux mitochondries sont habituellement synthétisées avec un signal de localisation en N-terminal (Hurt *et al.*, 1984a; Hurt *et al.*, 1984b). Pour les protéines destinées à la matrice mitochondriale, le signal peptidique est composé d'une séquence dégénérée de 20-30 acides aminés capables de se replier sous la forme d'une hélice amphipathique chargée positivement (von Heijne, 1986). Les protéines mitochondriales destinées à des compartiments sub-mitochondriaux différents possèdent habituellement des séquences additionnelles empêchant la translocation au travers de la membrane interne ou externe

(Hurt *et al.*, 1984b). Ceci résulte en une localisation au niveau de la membrane externe, de l'espace intermembranaire ou de la membrane interne (Hurt *et al.*, 1984b). Les signaux de localisation sont habituellement clivés une fois la protéine acheminée au compartiment sub-mitochondrial approprié (Hurt *et al.*, 1984a). Actuellement, il n'est pas clair si l'import mitochondrial *in vivo* a lieu de façon post-traductionnelle ou co-traductionnelle (Kellems *et al.*, 1975; Verner, 1993). Cependant, contrairement au réticulum endoplasmique où l'on retrouve de nombreux ribosomes attachés à sa surface cytosolique, très peu de ribosomes sont liés aux mitochondries *in vivo*. Ceci suggère donc un mécanisme d'import plutôt post-traductionnel, contrairement au réticulum endoplasmique, mais cela reste à être confirmé.

1.2.4.1 Le complexe TOM

Les précurseurs de protéines mitochondriales doivent s'associer avec des chaperonines cytosoliques avant d'être importés dans les mitochondries. Par exemple, certains membres de la famille des hsp70 lient des protéines devant être localisées à différents compartiments sub-cellulaires tandis que le complexe hétérodimérique MSF (pour *mitochondrial import stimulating factor*) semble être spécifique aux protéines devant être localisées aux mitochondries (Hachiya *et al.*, 1994; Deshaies *et al.*, 1988). Cette interaction avec les chaperonines permet de prévenir l'agrégation ou le repliement incorrect des protéines mitochondriales. Ces précurseurs sont ensuite reconnus par un récepteur spécifique à la surface des mitochondries qui est composé des polypeptides Tom70, Tom37, Tom22 et Tom20 (pour *transport across the outer membrane*). Le complexe récepteur-précurseur est par la suite acheminé vers un canal composé de Tom40, Tom38, Tom7, Tom6 et Tom5, qui traverse la membrane externe des mitochondries, permettant ainsi le passage des polypeptides à travers la membrane (Neupert, 1997).

1.2.4.2 Le complexe TIM

Une fois le polypeptide passé à travers la membrane externe des mitochondries, son hélice amphipatique chargée positivement lui permet de passer, du moins partiellement, à travers la membrane interne de la mitochondrie et cela grâce à la présence d'un gradient électrochimique entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale (Martin *et al.*, 1991). Le complexe Tim (pour *transport across the inner membrane*) est composé de deux sous-complexes. Le premier, composé de Tim33, Tim23 (Mas6), Tim17, Tim14 et Tim11, semble former un canal à travers la membrane interne (Berthold *et al.*, 1995). Le

second complexe est composé de Tim44 et des chaperonines mhsp70 et mGrpE et semble agir comme un moteur qui couple l'énergie issue de l'hydrolyse de l'ATP à la translocation des précurseurs vers la matrice mitochondriale (Schneider *et al.*, 1994; Kronidou *et al.*, 1994; Rassow *et al.*, 1994). Le complexe Tim joue également un rôle important dans l'acheminement des précurseurs vers leur localisation sub-mitochondriale appropriée (Neupert, 1997).

1.2.5 Chaîne de respiration mitochondriale

En absence d'une source de carbone fermentable, la levure *S. cerevisiae* se doit d'utiliser la phosphorylation oxydative afin de générer l'ATP requise pour la croissance cellulaire. Ce processus a lieu au niveau de la membrane interne des mitochondries qui contient les différents complexes de la chaîne de respiration mitochondriale (de Vries et Marres, 1987). Le premier complexe, celui de la NADH déshydrogénase, est composé seulement d'une sous-unité qui contient une molécule de flavine et une molécule de fer comme accepteurs d'électrons (de Vries et Marres, 1987). Il catalyse le transfert d'électrons entre le NADH et la coenzyme Q, un accepteur d'électrons soluble dans les membranes qui permet de transférer les électrons au complexe de la coenzyme Q réductase (Ashby *et al.*, 1992). Le complexe coenzyme Q:cytochrome c réductase, de son côté, est composé de neuf sous-unités et permet le transfert d'électrons de la coenzyme Q au cytochrome c (de Vries et Marres, 1987). Les gènes *CYC1* et *CYC7* de *S. cerevisiae* codent pour deux isoformes du cytochrome c, soient l'iso-1-cytochrome c et l'iso-2-cytochrome c, mais il reste à déterminer si ces deux isoformes sont fonctionnellement identiques (Poyton et Burke, 1992). Le dernier membre de la chaîne respiratoire est le complexe cytochrome c oxydase, composé de dix sous-unités, qui catalyse le transfert d'électrons entre le cytochrome c et l'oxygène, l'accepteur final d'électrons. La réaction d'oxydation est couplée à la translocation de protons au travers de la membrane interne des mitochondries et contribue ainsi l'énergie nécessaire à la synthèse de l'ATP (de Vries et Marres, 1987).

1.3 Informations sur Atm1

1.3.1 Description d'ATM1

Le gène *ATM1* de *S. cerevisiae* a été identifié en prenant avantage de l'homologie qui existe entre les DLA des transporteurs ABC au niveau de la séquence nucléotidique. Des oligonucléotides dégénérés correspondant aux motifs Walker A et Walker B ont été utilisés lors d'une réaction de polymérisation en chaîne (PCR) sur de l'ADN génomique de *S. cerevisiae* et dix fragments homologues à des transporteurs ABC ont été isolés (Leighton et Schatz, 1995). La délétion des gènes correspondants a révélé que l'un d'entre-eux était essentiel pour la croissance normale de *S. cerevisiae*. En effet, seulement deux spores sur quatre étaient viables suite à la dissection de tétrades provenant d'une souche diploïde hétérozygote pour la délétion de ce gène (Leighton et Schatz, 1995). Le cadre de lecture complet a été obtenu en criblant une banque d'ADN génomique en utilisant le produit de PCR comme sonde. L'analyse de la séquence de ce gène a révélé qu'il codait pour un 'demi-transporteur' ABC de type N-(TM₆-ABC)-C de 690 acides aminés (figure 1) (Leighton et Schatz, 1995). Cette protéine possède une partie N-terminale extrêmement hydrophobe contenant six segments transmembranaires prédits et une partie C-terminale hydrophile contenant les motifs Walker A, Walker B et la 'Signature ABC' (Leighton et Schatz, 1995). Une comparaison de la séquence protéique d'Atm1 avec une base de données a révélé une forte homologie avec les transporteurs ABC humain MDR1 et Htm1 de la levure *S. pombe* (Leighton et Schatz, 1995). Atm1 démontre une homologie de plus de 50% avec la partie N-terminale de MDR1 au niveau du DLA et 27% globalement (Leighton et Schatz, 1995). Une étude plus poussée de la séquence protéique d'Atm1 est présentée dans la discussion (section 4.1.1).

Dans le but de localiser ce transporteur au niveau sub-cellulaire, un épitope *c-myc* a été inséré en C-terminal de la protéine. La version étiquetée de cette protéine complémentait fonctionnellement la délétion du gène parental et était spécifiquement localisée aux mitochondries. La protéine fut par conséquent nommée Atm1 (pour *ABC transporter of mitochondria 1*) (Leighton et Schatz, 1995). Des tests de sensibilité à la protéinase K ont démontré qu'Atm1 est localisée à la membrane interne des mitochondries avec son DLA exposé à la matrice, suggérant qu'Atm1 transporte son substrat de la matrice mitochondriale vers l'espace intermembranaire (Leighton et Schatz, 1995). Il a également été démontré qu'Atm1 possède un signal de localisation à la mitochondrie fonctionnel en

N-terminal qui est présent dans les 53 premiers résidus de la protéine. Cette séquence, lorsque fusionnée aux protéines CoxIV et Ura3, qui requièrent un signal N-terminal afin d'être acheminées aux mitochondries, permet leur localisation à la mitochondrie (Leighton et Schatz, 1995).

1.3.2 Phénotypes des cellules *Δatm1*

Le culot mitochondrial provenant d'une souche *Δatm1* est blanc, suggérant une absence totale de tous les différents types de cytochromes (Leighton et Schatz, 1995). L'absence de cytochromes dans les mitochondries d'une souche *Δatm1* pourrait suggérer qu'Atm1 est impliquée dans la biosynthèse de l'hème, un cofacteur requis pour la fonction des cytochromes (de Vries et Marres, 1987). Cependant, l'addition d'hémine exogène, de Tween 80 ou d'ergostérol, qui habituellement comble les exigences de mutants déficients au niveau de la biosynthèse de l'hème, n'arrive pas à compenser pour la perte de l'allèle sauvage d'*ATM1* (Leighton et Schatz, 1995). Une étude récente a démontré que des cellules *Δatm1* ne possèdent pas d'holoformes de protéines contenant un groupement hème comme les cytochromes et la catalase, c'est-à-dire une forme enzyme-cofacteur catalytiquement active mais, uniquement des apoformes, un complexe sans cofacteur ne possédant aucune activité enzymatique (Kispal *et al.*, 1997). Le transport et la synthèse de l'hème ne sont cependant pas affectés (Kispal *et al.*, 1997). De plus, les cellules *Δatm1* sont hypersensibles aux agents oxydants comme le peroxyde et contiennent des niveaux plus élevés de glutathion, principalement sous sa forme oxydée (Kispal *et al.*, 1997). Finalement, des mitochondries provenant de cellules *Δatm1* contiennent trente fois plus de fer que des mitochondries provenant de cellules sauvages (Kispal *et al.*, 1997). Les résultats récents de Kispal *et al.* attribuent ainsi à Atm1 un rôle important dans l'homéostasie du fer dans les mitochondries (Kispal *et al.*, 1997).

1.4 But du projet de recherche

Le but de ce projet est d'obtenir des informations structurales et fonctionnelles sur la protéine Atm1 de *S. cerevisiae* en prenant avantage du caractère essentiel de cette dernière. Puisqu'Atm1 fait partie d'un sous-groupe de transporteurs ABC dont les membres sont fortement homologues entre eux et qui inclut la P-glycoprotéine, Tap1 et Tap2, nous espérons que les informations obtenues sur Atm1 permettront de faire des prédictions pouvant être analysées expérimentalement sur d'autres membres de ce sous-

groupe de transporteurs qui sont d'une grande importance médicale comme les P-glycoprotéines. Pour ce faire, nous avons premièrement construit une souche dans laquelle il est possible d'étudier Atm1 à l'aide de la technique du 'plasmid shuffling'. Cette souche a été utilisée pour cribler une banque d'allèles mutés d'*ATMI* dans le but d'identifier des mutations ts dans Atm1. Ces mutants ont par la suite été caractérisés au niveau de leur croissance et au niveau protéique en utilisant des anticorps polyclonaux anti-Atm1 que nous avons produits. De tels mutants pourraient être utilisés ultérieurement dans le but d'identifier différents supresseurs intragéniques et extragéniques pouvant mener respectivement à l'identification d'interactions entre différents domaines d'Atm1 et à une meilleure compréhension du rôle joué par Atm1 dans les mitochondries. D'autre part, nous avons utilisé la technique de co-immunoprécipitation afin de démontrer la présence d'homodimères d'Atm1 et cela dans le but de mieux comprendre son mode de fonctionnement dans les mitochondries.

CHAPITRE 2. MATÉRIELS ET MÉTHODES

2.1 Souches et conditions de croissance utilisées

Les souches W303 (*MATa/α ade2/ade2 his3/his3 leu2/leu2 trp1/trp1 ura3/ura3 can1/can1*), DC14 (*MATa his1*) et DC17 (*MATα his1*) ont été obtenues du Dr M. Whiteway, Institut de recherche en biotechnologie, Montréal. La souche JPY201 (*MATa gal2 his3 leu2 lys2 trp1 ura3-52 Δste6::HIS3*) a été obtenue du Dr A. Varshavsky (McGrath et Varshavsky, 1989). Les différentes souches ont été cultivées dans du milieu YPD (1% extrait de levure, 2% bacto-peptone et 2% glucose) ou dans du milieu synthétique complet (SC) (0.67% YNB, 2% glucose et 0.2% d'un mélange d'acides aminés approprié) et incubées à 25°C, 30°C ou 35.5°C (Kaiser *et al.*, 1994). La contre-sélection des plasmides *URA3* a eu lieu sur des milieux SC appropriés contenant 0.1% d'acide 5-fluoroorotique (5-FOA) (Toronto Research Chemical, Toronto, Canada) et 50 µg/ml d'uracile soit à 25°C ou 30°C durant 3 à 4 jours (Kaiser *et al.*, 1994). Pour la préparation de mitochondries, un milieu de culture où la source principale de carbone est l'acide lactique, a été utilisé (0.1% glucose, 0.1% KH₂PO₄, 0.1% NH₄Cl₂H₂O, 0.05% NaCl, 0.06% MgSO₄H₂O, 0.0003% FeCl₃, 2% acide lactique, 20 µg/ml adénine, 20 µg/ml uracile et 20 µg/ml tryptophane) et la croissance a eu lieu à 25°C ou 35.5°C à 250 rpm (Daum *et al.*, 1982). La sporulation de *S. cerevisiae* a été induite suite à une incubation de 4 jours à 25°C sur un milieu de sporulation (1% acétate de potassium, 0.1% extrait de levure, 0.05% glucose, 2% agar, 5 µg/L adénine, 5 µg/L tryptophane et 25 µg/L leucine). Les souches bactériennes utilisées sont DH5α (F'*endA1 hsdR17 (r_k⁻m_k⁻) supE44 thi-1 recA1 gyrA (Nal^r) relA1 Δ(lacZYA-argF) U169 deoR (φ80dlacΔ(lacZ)M15)*), MC1061 (F'*araD Δ(ara-leu)7696 galE15 galK16 Δ(lac)X74 rpsL (Str^r) hsdR2 (r_k⁻m_k⁻) mcrA mcrB1*), JM83 (F'*araΔ(lac-proAB) rpsL (Str^r) [φ80 dlacΔ(lacZ)M15] thi*) et XL1-Red (Stratagene) (*endA1 gyrA96 thi-1 hsdR17 supE44 relA1 lac mutD5 mutS mutT Tn10 (Tet^r)*).

2.2 Transformation de *S. cerevisiae*

L'introduction d'ADN plasmidique dans différentes souches de *S. cerevisiae* a été effectuée selon la méthode décrite par Gietz *et al.* (Gietz *et al.*, 1995). Des cellules provenant d'une culture en phase stationnaire dans du milieu SC ont été diluées dans 50 ml de milieu SC frais à une DO₆₀₀ initiale de 0.5 et incubées à 30°C, 250 rpm, jusqu'à une

DO₆₀₀ finale de 2.0. Les cellules ont ensuite été récoltées, lavées une fois avec 25 ml d'eau stérile et une fois avec 1 ml de d'acétate de lithium (LiAc) 100 mM et resuspendues dans un volume final de 500 µl de LiAc 100 mM. Une réaction typique de transformation comprenait 50 µl de cellules compétentes, 240 µl de PEG 50%, 36 µl de LiAc 1 M, 5µl d'ADN de sperme de saumon (10 mg/ml) dénaturé 10 minutes à 100°C et 50 µl d'eau stérile contenant l'ADN à introduire. Les cellules ont été resuspendues en vortexant à forte intensité durant 1 minute suivi d'une première incubation de 30 minutes à 30°C et d'une seconde de 20 minutes à 42°C. Les cellules ont ensuite été récoltées par une centrifugation de 15 secondes à 6000 x g, resuspendues dans 200 µl d'eau stérile, étalées sur un milieu sélectif SC approprié et incubées 2-3 jours à 30°C.

2.3 Construction d'une cassette d'excision *Δatm1::HIS3*

Une cassette *Δatm1::HIS3* a été construite afin d'exciser le gène *ATM1* par la méthode d'excision génique en une étape décrite par Kaiser *et al.* (Kaiser *et al.*, 1994). L'amplification de la partie codante d'*ATM1* (+1 à +2085) a été effectuée par la technique de PCR avec les oligonucléotides MR48 (5'-GGAATTCATGCTGCTTCTTCCAAGA-3') et MR49 (5'-GGAATTCTCATAGTTCTTGCTGGTC-3') incorporant des sites de restriction *EcoRI* à leur extrémité 5' (soulignés). La réaction de PCR a eu lieu dans un volume final de 50 µl comprenant 5 µl de tampon 10X (100 mM Tris-HCl pH 9.0, 15 mM MgCl₂ et 500 mM KCl), 50 µM de dNTPs, 100 pmole de chaque oligonucléotide, 200 ng d'ADN génomique provenant de la souche JPY201 et 1 unité d'ADN polymérase *Taq* (Pharmacia). Le programme consistait en un cycle de 4 minutes à 94°C, 1 minute à 50°C et 3 minutes à 72°C suivi de 29 cycles de 1 minute à 94°C, 1 minute à 50°C et 3 minutes à 72°C avec une élongation finale de 11 minutes à 72°C. Un produit abondant d'environ 2.1 kb correspondant à la taille du gène *ATM1* a été obtenu, digéré avec *EcoRI* et purifié sur gel d'agarose en utilisant le kit commercial QIAEX II (QIAGEN). Ce produit de PCR a été inséré dans le vecteur pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985) préalablement digéré avec *EcoRI* et déphosphorylé, générant le plasmide pUC19/*ATM1*. Ce plasmide a ensuite été digéré avec *EcoRV*, afin d'enlever un fragment interne d'*ATM1* de 977 pb contenant les segments transmembranaires TM1 à TM6, et le fragment contenant les séquences flanquantes d'*ATM1* a été purifié sur gel d'agarose en utilisant le kit commercial QIAEX II (QIAGEN). Le marqueur de sélection *HIS3*, contenu sur un fragment *PvuII-SmaI* de 1.9 kb

provenant du vecteur pJJ217 (Jones et Prakash, 1990), a été inséré dans le fragment préalablement isolé, produisant le plasmide pUC19/ $\Delta atm1::HIS3$. Le plasmide pUC19/ $\Delta atm1::HIS3$ a été digéré avec *EcoRI* afin de générer un fragment linéaire de 3.0 kb contenant la cassette $\Delta atm1::HIS3$. Ce fragment a été utilisé pour transformer la souche diploïde W303 et les recombinants His⁺ ont été sélectionnés sur milieu SC-his.

2.4 Préparation d'ADN génomique et analyse de type Southern

L'excision du gène *ATMI* dans les transformants His⁺ de la souche W303 (section 2.3) a été vérifiée par une analyse de type Southern. L'ADN génomique a été préparé selon la méthode de Kaiser *et al.* (Kaiser *et al.*, 1994). Des cellules provenant d'une culture en phase stationnaire dans 15 ml de milieu SC-his d'un recombinant His⁺, obtenu suite à la transformation de la souche W303 avec le plasmide pUC19/ $\Delta atm1::HIS3$ linéarisé, ou de la souche sauvage poussée dans du milieu YPD, ont été récoltées, lavées avec 1 ml de tampon SE (1 M Sorbitol, 100 mM EDTA pH 8.0) puis resuspendues dans un volume final de 500 μ l de tampon SE. La digestion de la paroi cellulaire a été effectuée par l'addition de Zymolyase 100T (ICN Biomedicals) à une concentration finale de 0.4 mg/ml, suivie d'une incubation à 37°C pendant 60 minutes. Les sphéroplastes ont été récoltés par une centrifugation de 20 secondes à 6000 x g et resuspendus dans 500 μ l de tampon (50 mM Tris-HCl pH 7.4 et 20 mM EDTA pH 8.0). 50 μ l de SDS 10% ont ensuite été ajoutés aux échantillons et ces derniers ont été incubés immédiatement à 65°C pour une période de 30 minutes afin de solubiliser les membranes. 200 μ l d'acétate de potassium (KOAc) 5M ont ensuite été ajoutés aux échantillons qui ont été laissés sur glace 60 minutes avant d'être centrifugés 5 minutes à 14000 x g à 4°C. Les surnageants ont été précipités avec 1 volume d'isopropanol et les culots resuspendus dans 300 μ l de tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA pH 8.0). 1.5 μ l d'ARNase A (10 mg/ml) a ensuite été ajouté aux échantillons et ces derniers incubés 30 minutes à 37°C. Après une seconde centrifugation de 5 minutes à 14000 x g à 4°C, les surnageants ont été précipités avec 2.5 volumes d'EtOH 100% et 1/10 volume d'acétate de sodium (NaOAc) 3M pH 5.2. Après centrifugation, le culot contenant l'ADN a été lavé avec 500 μ l d'EtOH 70% et resuspendu finalement dans 200 μ l de TE (10 mM Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA pH 8.0). La concentration des échantillons a été déterminée à l'aide d'un fluoromètre (TKO 100, Hoefer Scientific Instruments). L'ADN génomique (2 μ g) a été digéré avec *EcoRI*, séparé

sur gel d'agarose 1% et transféré sur des membranes de nylon selon les recommandations du manufacturier (Hybond-N; Amersham Corp). Les membranes ont été pré-hybridées pour 6 heures à 65°C dans du 6X SSC (0.9 M NaCl et 0.09 M citrate de sodium), 5X solution Denhardt's (0.1% BSA, 0.1% Ficoll et 0.1% Polyvinyle pyrrolidone) et 10 mg/ml d'ADN de sperme de saumon dénaturé 10 minutes à 100°C. L'hybridation a eu lieu pendant 12 heures à 65°C dans la même solution en présence de 1×10^6 CPM/ml d'une sonde *ATM1* (produit de PCR, section 2.3) ou d'une sonde *HIS3* (fragment *PvuII-SmaI*, section 2.3) marquées au ^{32}P à l'aide d'amorces aléatoires. Les membranes ont été lavées une première fois pendant 30 minutes et une seconde fois pendant 90 minutes à 25°C dans du 2X SSC (0.3 M NaCl, 0.03 M citrate de sodium) contenant 0.1% de SDS. Les membranes ont par la suite été soumises à une autoradiographie à -80°C durant 12 heures avec deux écrans intensificateurs.

2.5 Criblage d'une banque d'ADN génomique de *S. cerevisiae* chez *E. coli*

Une banque d'ADN génomique provenant de la souche DBY939 de *S. cerevisiae* construite dans le vecteur YEp24 (obtenue du Dr Bernard Turcotte, Royal Victoria Hospital, Montréal) a été transformée dans la souche JM83 d'*E. coli* (Carlson et Botstein, 1982). 10 réactions de transformation, chacune d'elles contenant 100 ng de la banque d'ADN génomique et 200 μl de cellules JM83 compétentes, ont été effectuées selon le protocole classique de transformation bactérienne (Sambrook *et al.*, 1989). Après la transformation, les cellules ont été regroupées dans un volume final de 1 ml de LB/Amp (100 $\mu\text{g/ml}$). Une partie a été utilisée afin de déterminer le taux de transformation et le reste conservé à 4°C durant la nuit. Par la suite, 1400 transformants ont été étalés sur dix pétris LB/Amp (100 $\mu\text{g/ml}$), pour un total de 14000, et incubés 20 heures à 37°C. Les colonies ont été transférées sur des membranes de nitrocellulose (Millipore), incubées 4 heures à 37°C et ensuite répliquées deux fois sur des membranes de nitrocellulose fraîches, nous permettant ainsi de faire le criblage en duplicata. Après une incubation de 20 heures à 37°C, les membranes de nitrocellulose ont été incubées 5 minutes dans une solution de dénaturation (1.5 M NaCl, 0.5 NaOH), 5 minutes dans une solution de neutralisation (1.5 M NaCl, 0.5 M Tris-HCl pH 7.2, 1 mM EDTA pH 8.0), 5 minutes dans du 6X SSC (0.9 M NaCl et 0.09 M citrate de sodium) pour finalement être soumises à un pontage aux rayons ultraviolets à forte intensité durant 3 minutes. Les membranes ont été préhybridées une

première fois pendant 4 heures à 65°C dans du 6X SSC (0.9 M NaCl et 0.09 M citrate de sodium), 5X solution Denhardt's (0.1% BSA, 0.1% Ficoll et 0.1% Polyvinyle pyrrolidone) et une seconde fois pendant 12 heures dans la même solution. L'hybridation a eu lieu pendant 48 heures dans la même solution en présence de 4×10^5 CPM/ml du fragment *EcoRV* interne d'*ATM1* de 977 pb comme sonde (section 2.3), provenant de plasmide pUC19/*ATM1*, marqué au ^{32}P à l'aide d'amorces aléatoires. Les membranes ont été lavées une première fois pendant 30 minutes et une seconde fois pendant 90 minutes dans du 2X SSC (0.3 M NaCl et 0.03 M citrate de sodium) contenant 0.1% de SDS à 25°C. Les membranes ont ensuite été soumises à une autoradiographie à -80°C durant 12 heures avec deux écrans intensificateurs. Les clones bactériens présent dans les régions hybridant fortement avec la sonde *ATM1* ont été resuspendus dans 1 ml de milieu LB/Amp (100 µg/ml). 100 µl d'une dilution 1:250000 de chacune des régions positives ont été étalés (donnant environ 500 colonies par pétri) et soumis à un criblage secondaire identique au criblage primaire décrit plus haut. Les plasmides provenant des clones bactériens hybridant fortement avec la sonde *ATM1* lors du criblage secondaire ont été isolés et caractérisés par cartographie de restriction. L'un d'eux nommé YEp24-4a et contenant *ATM1* a été conservé pour les expériences ultérieures.

2.6 Isolement d'une souche haploïde viable *Δatm1*

Un fragment *EcoRI-HindIII* de 4.8 kb (*ATM1*-4.8), contenant une copie fonctionnelle d'*ATM1*, a été obtenu suite à une triple digestion du plasmide Yep24-4a (section 2.5) avec les enzymes de restriction *EcoRI*, *HindIII* et *AvaI* suivie de sa purification sur gel d'agarose en utilisant le kit commercial QIAEX II (QIAGEN). Une digestion additionnelle avec *AvaI* a été requise pour se débarrasser d'une bande contaminante migrant également à 4.8 kb. Les extrémités du fragment *ATM1*-4.8 ont été transformées en bouts francs avec l'ADN polymérase T4. Ce fragment a ensuite été inséré au site *SmaI* du vecteur pRS316 préalablement déphosphorylé, générant le plasmide pRS316/*ATM1*-4.8 (Sikorski et Hieter, 1989). La souche LPY1 (*ATM1/Δatm1::HIS3*) a été transformée avec le plasmide pRS316/*ATM1*-4.8 et les transformants Ura⁺ sélectionnés sur milieu SC-ura. Ces transformants ont été sporulés suite à une incubation de 3-5 jours sur un milieu de sporulation. La paroi des asques a été digérée suite à une incubation de 10 minutes à 25°C en présence de Zymolyase 100T (ICN Biomedicals). Les tétrades ainsi

obtenues ont été disséquées sur milieu SC-ura à l'aide d'un micromanipulateur. Les différentes auxotrophies des spores ont été évaluées sur milieu YPD, SC-ura, SC-his et SC-leu. Le type sexuel des spores a été déterminé par leur capacité à se conjuguer avec les levures de types sexuels connus DC14 (**a**) et DC17 (**α**) selon un protocole classique (Kaiser *et al.*, 1994).

2.7 Mutagénèse d'*ATMI*, criblage et sous-clonage des mutants thermosensibles

Le fragment *EcoRI-HindIII* de 4.8 kb (*ATMI*-4.8) (section 2.6) a été cloné dans le vecteur pRS315 coupé avec *SmaI* et déphosphorylé, générant ainsi le plasmide pRS315/*ATMI*-4.8 (Sikorski et Hieter, 1989). Deux techniques différentes ont été utilisées pour induire des mutations dans le plasmide pRS315/*ATMI*-4.8. La première est basée sur la méthode décrite par Rose et Fink (Rose et Fink, 1987). Brièvement, 10 µg d'ADN plasmidique de pRS315/*ATMI*-4.8 ont été incorporés dans 500 µl de solution d'hydroxylamine (0.45 M NaOH, 1 M Hydroxylamine) et incubés pour une période de 20 heures à 37°C. La réaction a ensuite été arrêtée par l'addition de 1 ml d'EtOH 100%, 50 µl de BSA (1 mg/ml) et 10 µl de NaCl 5M suivi d'une précipitation et d'un lavage à l'EtOH 70%. Le culot a ensuite été resuspendu dans 20 µl de tampon TE (10 mM Tris-HCl pH 7.4 et 1 mM EDTA pH 8.0). D'autre part, la souche XL1-Red (Stratagene) a été utilisée pour induire des mutations dans *ATMI* selon les recommandations du manufacturier. Brièvement, 30 ng du plasmide pRS315/*ATMI*-4.8 ont été transformés dans 100 µl de cellules XL1-Red compétentes. Suite à une incubation de 20 heures à 37°C sur milieu solide LB/Amp (100 µg/ml, pH 7.0), 200 transformants ont été inoculés dans 10 ml de milieu liquide LB/Amp (100 µg/ml, pH 7.0) et incubés à 37°C à 250 rpm. Après 16 heures d'incubation, 3 ml de la culture ont été utilisés pour purifier l'ADN plasmidique et les 7 ml restant placés de nouveau à 37°C à 250 rpm pour poursuivre la mutagénèse. Après un total de 24 heures d'incubation, 3 ml de culture ont été prélevés pour préparer à nouveau de l'ADN plasmidique et 100 µl de la même culture ont été utilisés pour inoculer 10 ml de milieu LB/Amp (100 µg/ml, pH 7.0) frais. Des prélèvements après 48, 72 et 88 heures d'incubation ont également été effectués dans le but d'obtenir l'ADN plasmidique.

Le système du 'plasmid shuffling' décrit à la section 3.1.1 a été utilisé dans le but d'identifier des mutations ts dans *ATMI*. La souche LPY1-12B ($\Delta atmi::HIS3$ pRS316/*ATMI*-4.8) a été transformée avec 2.5 µl d'ADN plasmidique provenant d'une

mutagénèse de 20 heures à 37°C du plasmide pRS315/*ATM1*-4.8 en présence d'hydroxylamine ou avec 5 µl d'ADN plasmidique pRS315/*ATM1*-4.8 issue d'une mutagénèse de 16 heures et de 48 heures dans la souche XL1-Red (Stratagene) en utilisant le protocole de Gietz *et al.* (section 2.2). Les transformants Ura⁺ Leu⁺ ont été sélectionnés sur 10 pétris SC-ura-leu, récoltés, congelés et titrés. 500 transformants Ura⁺ Leu⁺ ont été étalés sur des pétris SC-ura-leu et incubés 3 jours à 30°C. Les pétris ont ensuite été répliqués sur milieu SC-ura-leu contenant du 5-FOA et incubés 3 jour à 25°C dans le but d'induire la perte des plasmides *URA3* pRS316/*ATM1*-4.8. Les pétris ont ensuite été répliqués sur milieu SC-leu, incubés 3 jours à 25°C pour finalement être répliqués une dernière fois en duplicata sur milieu SC-leu. Après trois jours d'incubation à température permissive (25°C) et restrictive (35.5°C), les clones uniquement capables de croître à température permissive ont été conservés. Une température restrictive de 35.5°C a été utilisée lors du criblage puisque sous les conditions de croissance utilisées, la souche W303 sauvage a peine à croître à 37°C. Plus de 300 clones ts ont ainsi été identifiés et conservés pour leur caractérisation subséquente.

L'ADN génomique provenant de ces clones a été isolé et utilisé pour transformer *E. coli* dans le but d'obtenir le plasmide pRS315/*ATM1*-4.8 des mutants respectifs. Ces plasmides ont été transformés dans la souche LPY1-12B ($\Delta atm1::HIS3$, pRS316/*ATM1*-4.8) et le phénotype ts associé aux plasmides *LEU2* pRS315/*ATM1*-4.8 mutés vérifié sur milieu YPD après la contre-sélection du plasmide *URA3* pRS316/*ATM1*-4.8 et ce, dans le but d'éliminer les clones ts dû à un évènement chromosomique ou à une mutation ts se retrouvant dans le gène *LEU2* du plasmide pRS315/*ATM1*-4.8. Seulement trois mutants incapables de croître uniquement à tempéraure restrictive sur milieu YPD ont été obtenus, soient ceux présents sur les plasmides pRS315/ts36-2, pRS315/ts111-1 et pRS315/ts247-1. Les fragments *NdeI*-*SacII*, avec leurs extrémités transformées en bouts francs à l'aide de l'ADN polymérase T4 et possédant uniquement le cadre de lecture ouvert d'*ATM1* et son promoteur, provenant des plasmides pRS315/ts36-2, pRS315/ts111-1 et pRS315/ts247-1, ont été purifiés sur gel d'agarose à l'aide du kit commercial QIAEX II (QUIAGEN) et ensuite insérés dans le vecteur pRS315 coupé avec *SmaI* et déphosphorylé, générant respectivement les plasmides pRS315/ts36-2(*NdeI*-*SacII*), pRS315/ts111-1(*NdeI*-*SacII*) et pRS315/ts247-1 (*NdeI*-*SacII*) (Sikorski et Hieter, 1989).

Le fragment *StuI-PacI* du plasmide pRS315/ts111-1 contenant la mutation N-terminale et le fragment *PacI-NheI* contenant la mutation C-terminale ont été purifiés sur gel d'agarose à l'aide du kit commercial QIAEX II (QIAGEN). Ces fragments ont été insérés respectivement dans le vecteur pRS315/*ATM1*-4.8 non-muté coupé soit avec *StuI-PacI* soit avec *PacI-NheI* et déphosphorylé, générant respectivement les plasmides pRS315/ts111-1 (N-term) et pRS315/ts111-1 (C-term). Le phénotype ts des plasmides pRS315/ts111-1 (N-term) et pRS315/ts111-1 (C-term) a ensuite été évalué dans la souche LPY1-12B (*Δatm1::HIS3* pRS316/*ATM1*-4.8) par 'plasmid shuffling' comme décrit plus haut.

2.8 Séquençage des mutants thermosensibles d'*Atm1*

Les réactions de séquençage ont été effectuées par PCR en utilisant le kit commercial ABI PRISM™ *Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit* (Perkin Elmer Applied Biosystems) selon les recommandations du fabricant. Les réactions de PCR ont eu lieu dans un volume final de 20 µl contenant 8 µl de mixture de séquençage (Terminator Ready Reaction Mix), 3.2 pmoles de l'oligonucléotide utilisé comme amorce (Tableau 1) et 750 ng d'ADN plasmidique. Les échantillons ont été soumis à 25 cycles de 30 secondes à 94°C, 15 secondes à 50°C et 4 minutes à 60°C. Après la réaction de PCR, 20 µl de MgCl₂ 20 mM et 55 µl d'EtOH 100% ont été ajoutés et les échantillons incubés pendant 15 minutes à 25°C puis soumis à une centrifugation de 30 minutes à 14000 x g. Les culots ont ensuite été lavés avec de l'EtOH 70%, séchés et resuspendus dans 6 µl de tampon de chargement (5:1 v/v formamide/25 mM EDTA pH 8.0, 50 mg/ml bleu de dextran). L'analyse des échantillons a été effectuée avec le système ABI Prism 7200 (Perkin Elmer) en suivant les recommandations du fabricant et les résultats analysés avec le logiciel Chromas version 1.43 (Conor McCarty, School of Biomolecular et Biomedical Science, Griffith University, Australia).

2.9 Production d'anticorps polyclonaux anti-*Atm1*

Une protéine de fusion GST-*Atm1* a été construite en insérant les 245 derniers acides aminés d'*Atm1* (positions 445 à 690), comprenant tout le DLA d'*Atm1*, en phase avec la Glutathione S-transférase (GST). Pour ce faire, le plasmide YEp24-4a a été digéré

Tableau 1. Liste des oligonucléotides utilisés au cours des expérimentations. La séquence des oligonucléotides, leurs positions dans *ATM1* par rapport au codon d'initiation ainsi que le brin d'ADN sur lequel ils se trouvent sont indiqués. Les oligonucléotides MR48, MR49, MR282, MR283, MR284 et MR285 ont été utilisés dans des réactions de PCR, l'oligonucléotide MR160 dans le but d'insérer un site *NotI* en amont du codon de terminaison d'*ATM1* et les oligonucléotides MR281, MR287, MR288, MR289, MR290 et MR291 lors du séquençage du cadre de lecture ouvert complet d'*ATM1*. Les sites *NotI* (GCGGCCGC), *EcoRI* (GAATTC) et *PstI* (CTGCAG) incorporés dans les oligonucléotides sont soulignés.

Tableau 1. Oligonucléotides utilisés.

Nom	Séquence	Position	Brin
MR48	5'- <u>GGAATTCA</u> TGCTGCTTCTTCCAAGA-3'	+1	codant
MR49	5'-GGAATTCTCATAGTTCTTGCTGGTC-3'	+2072	non-coda
MR160	5'-TTAGAGAAATGAACTAAAGACCAGCAAAGAACGGC GCCGCTGAACGCTCGTAGTAAATATTGATTTTATA-3'	+2037	codant
MR281	5'-GAGTACAATTCGAAAATTG	-72	codant
MR282	5'-AACTGCAGCAAATGCTGCTTCTTCCAAGA-3'	-3	non-coda
MR283	5'-AACTGCAGTCAGCGCCGCCAACACTACCAAGAAAATT TAG-3'	+1552	codant
MR284	5'-AACTGCAGCAAATGTACAGAGATTT AAAGCAGTC-3'	+1550	non-coda
MR285	AACTGCAGTCAGCGCCGCCCTAGTTCTTGCTGGT CTTT TAG-3'	+2072	non-coda
MR286	5'-TCCTTAAATCTTGAAAAACT-3'	+2128	on-codan
MR287	5'-CAAAAAGGATATTACGCAC-3'	+163	codant
MR288	5'-TTGTCTCAGTCTATGTGCG-3'	+1906	non-coda
MR289	5'-CAAGCAAACATTGATTCAAATG-3'	+396	codant
MR290	5'-CACACCAAATCACCTTCTCTCAAAG-3'	+1542	non-coda
MR291	5'-CATTTGCCGCAATAACATTCAG-3'	+770	codant

avec *EcoRV* et *SacII* et les extrémités ont été transformées en bouts francs à l'aide de l'ADN polymérase T4. Un fragment *EcoRV-SacII* de 821 pb, codant pour les acides aminés 445 à 690 d'Atm1 et possédant 22 nucléotides de séquence 3' non-traduite, a été purifié sur gel d'agarose en utilisant le kit commercial QIAEX II (QIAGEN) pour ensuite être inséré au site *SmaI* du vecteur pGEX4T-3 (Pharmacia) préalablement déphosphorylé, générant ainsi le plasmide pGEX4T-3/*ATM1*. Ce plasmide a été introduit dans la souche DH5 α d'*E. coli* et la production de la protéine de fusion a été induite en présence de 0.1 mM d'isopropyl- β -D-thiogalactoside (IPTG) à 37°C durant 4 heures à 250 rpm. La protéine de fusion, majoritairement insoluble, a été purifiée à partir de corps d'inclusion en utilisant la méthode décrite par Nagai et Thogersen (Nagai et Thogersen, 1987). Les corps d'inclusion purifiés ont été séparés par SDS-PAGE sur un gel préparatif de 10%. Après migration, une bande de 53 kDa correspondant au poids moléculaire de la GST (26 kDa) fusionnée au domaine C-terminal d'Atm1 (27 kDa) a été excisée et électroéluée en utilisant l'électroéluéur *Model 422* (BioRad) selon les recommandations du manufacturier. La protéine de fusion GST-Atm1 a par la suite été utilisée pour immuniser deux lapins 'New Zealand White' selon un protocole standard d'immunisation (Harlow et Lane, 1988). La spécificité de l'anticorps anti-Atm1 polyclonal a été vérifiée en comparant des extraits protéiques totaux ou des extraits enrichis en mitochondries provenant de la souche W303 surexprimant ou non Atm1. Pour ce faire, la souche W303 a été transformée avec les plasmides p426GPD et p426GPD/*ATM1*. Le plasmide p426GPD/*ATM1* a été obtenu suite à l'amplification de la région codante d'*ATM1* (+1 à +2085) par la technique de PCR comme décrit à la section 2.3. Un fragment d'environ 2.1 kb correspondant à la taille du gène *ATM1* a été obtenu, digéré avec *EcoRI* et purifié sur gel d'agarose en utilisant le kit commercial QIAEX II (QIAGEN). Ce fragment a été cloné au site *EcoRI* du vecteur p426GPD préalablement déphosphorylé pour générer ainsi le plasmide p426GPD/*ATM1*.

2.10 Purification des anticorps polyclonaux anti-Atm1

La production de la protéine de fusion GST-Atm1 a été effectuée comme décrit à la section 2.9. Pour chaque 250 ml de culture, le culot bactérien a été resuspendu dans 4 ml de tampon de lyse (10% sucrose, 100 mM Tris-HCl pH 8.0 et 1.5 mM EDTA) et 80 μ l de lysosyme (5 mg/ml). Suite à une incubation de 30 minutes sur glace, 32.5 ml de tampon d'extraction (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 0.16 mM EDTA, 0.43 mM 1-10-phenanthroline, 1% sucrose, 0.5 mM DTT et 50 mM NaCl) et du N-lauroylsarcosine (0.2% final) ont été

ajoutés. Les échantillons ont ensuite été soniqués trois fois 30 secondes à intensité moyenne. Après une centrifugation de 15 minutes à 32000 x g, du Triton X-100 a été ajouté aux surnageants à une concentration finale de 2%. Les échantillons ont ensuite été incubés avec une légère agitation pendant 15 minutes à 4°C. Après l'addition de MgCl₂ et de CaCl₂ à des concentrations finales respectives de 1.25 mM et 1 mM, les échantillons ont été incubés à 4°C pendant 20 minutes pour finalement être centrifugés pendant 30 minutes à 27000 x g à 4°C. De la Glutathione Sépharose[®] 4B (Pharmacia) a été utilisée pour purifier la protéine de fusion GST-Atm1 présente dans les surnageants selon les recommandations du manufacturier, à l'exception du tampon d'élution qui était composé de 20 mM glutathione réduite, 100 mM Tris-HCl pH 8.0 et 120 mM NaCl. Le dosage de la protéine de fusion a été effectué selon la méthode de Bradford, en utilisant un kit commercial (BioRad) selon les recommandations du manufacturier (Bradford, 1976). La protéine de fusion a été conservée à -80°C jusqu'à son utilisation.

Afin de générer une matrice spécifique aux anticorps anti-Atm1, 360 mg de billes de Sépharose CNBr[®] 4B activées (Pharmacia) ont été lavés avec 200 ml de 1 mM HCl et ensuite trois fois avec 2 ml de 0.1 M NaHCO₃ pH 8.3 pour finalement être resuspendus dans un volume final de 2 ml de 0.1 M NaHCO₃ pH 8.3. Par la suite, 1 mg de la protéine de fusion GST-Atm1 a été incubé pendant 60 minutes avec une légère agitation à 25°C en présence de 450 µl de billes de Sépharose CNBr[®] 4B activée dans un volume final de 1.3 ml de 0.1 M NaHCO₃ pH 8.3. Les billes ont ensuite été lavées cinq fois avec du 0.1 M NaHCO₃ pH 8.3 avant d'être incorporées à 40 ml de Tris-HCl pH 7.5 contenant 2 ml de sérum anti-Atm1 pour ensuite être incubées pendant 12 heures à 4°C avec une légère agitation. Ces billes ont par la suite été utilisées pour générer une colonne qui a été équilibrée avec 5 volumes de 10 mM Tris-HCl pH 7.5. L'élution des anticorps anti-Atm1 fixés aux billes de Sépharose CNBr[®] 4B a été effectuée par l'addition successive de 200 µl de tampon d'élution (0.1 M glycine pH 2.5) et chaque fraction a été récoltée dans 20 µl de 1 M Tris-HCl pH 9.0. Les fractions ont été regroupées pour ensuite être utilisées directement en analyse de type Western.

2.11 Préparation d'extraits protéiques totaux

20 DO₆₀₀ de cultures de levures poussées à saturation dans des milieux SC appropriés ont été récoltés par une centrifugation de 5 minutes à 3000 x g et resuspendus

dans 300 μl de 0.05 M Tris-HCl pH 7.4, 1 mM EDTA pH 8.0, 1 mM PMSF, 2 $\mu\text{g}/\text{ml}$ aprotinine, 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ leupeptine et 3 $\mu\text{g}/\text{ml}$ pepstatine. 150 μl de billes de verre (Sigma, 425-600 microns) ont été ajoutés à chacun des échantillons qui ont ensuite été vortexés pour 5 cycles de 1 minute entrecoupés d'une incubation de 1 minute sur glace. Les billes de verre et les débris cellulaires ont été éliminés par une centrifugation d'une minute à 500 x g. Le dosage protéique des surnageants a été effectué selon la méthode de Bradford en utilisant un kit commercial (BioRAD) selon les recommandations du manufacturier et les échantillons ensuite conservés à -80°C jusqu'à leur utilisation (Bradford, 1976). Lorsque de grandes quantités de protéines ont été requises, le même protocole a été utilisé et les surnageants résultants regroupés avant le dosage protéique. Pour chaque 20 DO_{600} de cellules, des rendements se situant entre 300 à 600 μg étaient généralement obtenus.

2.12 Préparation des mitochondries

La purification des mitochondries a été effectuée selon la méthode décrite par Daum *et al.* (Daum *et al.*, 1982). Les cellules provenant de cultures de 500 ml à température permissive (25°C) et restrictive (35.5°C) dans un milieu de croissance favorisant la biogénèse des mitochondries ont été récoltées par centrifugation de 5 minutes à 3000 x g lorsque les cultures ont atteint une DO_{600} de 1.2. Les cellules ont été lavées une fois avec de l'eau distillée, resuspendues dans 2 ml par gramme de cellules dans une solution de réduction (0.1 M Tris- H_2SO_4 pH 9.4, 10 mM dithiothreitol) et incubées 10 minutes à 30°C . Elles ont ensuite été lavées une fois avec du sorbitol 1.2 M et resuspendues dans 6.7 ml, par gramme de cellules, dans une solution de digestion (1.2 M sorbitol, 20 mM KP_i pH 7.4). De la Zymolyase 100T (ICN Biomedical) a été ajoutée à une concentration finale de 5 mg par gramme de cellules et les échantillons incubés à 30°C avec une légère agitation durant 60 minutes. Les sphéroplastes ont été récoltés par une centrifugation de 5 minutes à 3000 x g et lavés deux fois avec du sorbitol 1.2 M. Toutes les manipulations ultérieures ont été effectuées à 4°C . Les sphéroplastes ont été resuspendus dans un tampon d'homogénéisation (0.6 M mannitol, 10 mM Tris-HCl pH 7.4, 0.1% BSA et 1 mM PMSF) à raison d'un ml par 0.15 g de sphéroplastes. Après avoir été refroidis sur glace, les sphéroplastes ont été homogénéisés à l'aide de 10-15 coups dans un homogénéisateur Dounce. L'homogénat a ensuite été dilué dans 1 volume de tampon d'homogénéisation et centrifugé 5 minutes à 3000 x g. Le surnageant a été conservé et le culot homogénéisé de

nouveau comme décrit précédemment. Les surnageants ont ensuite été centrifugés 10 minutes à 9000 x g et les culots, contenant les mitochondries, resuspendus dans du tampon d'homogénéisation et centrifugés 5 minutes à 3000 x g pour se débarrasser des débris cellulaires. Les surnageants ont été centrifugés à nouveau 10 minutes à 9000 x g et les culots mitochondriaux lavés à deux reprises dans du tampon d'homogénéisation et une fois dans du tampon d'homogénéisation sans BSA ni PMSF, chaque lavage étant suivi d'une centrifugation de 10 minutes à 9000 x g. Les mitochondries ont finalement été resuspendues dans un certain volume (dépendant du poids du culot contenant les mitochondries) d'un tampon contenant 0.6 M mannitol et 10 mM Tris-HCl pH 7.4 afin d'obtenir une concentration finale d'environ 2 µg et conservées à -80°C jusqu'à utilisation.

2.13 Constructions plasmidiques pour les expériences de co-immunoprécipitation

Afin de générer des formes d'Atm1 étiquetées avec les épitopes HA et *c-myc*, un site *NotI* a été inséré immédiatement en amont du codon de terminaison d'*ATM1*. Pour ce faire, le fragment *EcoRI-HindIII* (*ATM1*-4.8) a été cloné entre les sites *EcoRI* et *HindIII* du vecteur pAlter[®]-1 (Promega), produisant le plasmide pAlter/*ATM1*. L'oligonucléotide MR160 (5'-TTAGAGAATGAACTAAAAGACCAGCAAGAACGCGGCCGCTGAACGCTCGTAAGTAAATATTGATTTATA-3'), incorporant un site *NotI* (souligné), a été utilisé dans une réaction de mutagenèse sur de l'ADN simple brin provenant de la construction pAlter/*ATM1* préparé selon les recommandations du fabricant, générant la construction pAlter/*ATM1-NotI*. Des fragments *NotI* contenant les triples épitopes HA et *c-myc*, provenant des vecteurs pMPY-3xHA et pMPY-3xMYC, ont été purifiés sur gel d'agarose en utilisant le kit commercial QIAEX II (QIAGEN) et insérés au site *NotI* du vecteur pAlter/*ATM1-NotI* préalablement déphosphorylé pour générer respectivement pAlter/*ATM1*-HA et pAlter/*ATM1*-MYC (Schneider *et al.*, 1995). Les vecteurs pMPY-3xHA et pMPY-3xMYC possèdent respectivement en tandem trois épitopes de l'hémagglutine A du virus influenza (YPYDVPDYA) (Field *et al.*, 1988) et du proto-oncogène *c-myc* (EQKLISEEDL) (Evan *et al.*, 1985) flanqués de sites de restrictions *NotI* (obtenus du Dr Pierre Belhumeur, Département de microbiologie et immunologie, Université de Montréal). Les plasmides pAlter/*ATM1*-HA et pAlter/*ATM1*-MYC ont été digérés avec *EcoRI* et *HindIII* et les fragments *EcoRI/HindIII* (*ATM1*-4.8 contenant les épitopes HA et *c-myc*) ont été purifiés sur gel d'agarose en utilisant le kit commercial QIAEX II (QIAGEN) après avoir transformé leurs extrémités en bouts francs avec l'ADN

polymérase T4. Ces fragments ont été insérés dans les vecteurs pRS424 et pRS425 (Christianson *et al.*, 1992) (obtenus de C. Csank, Institut de recherche en biotechnologie, Montreal, Canada) coupés avec *Sma*I et déphosphorylés, générant ainsi les constructions pRS424/*ATM1*-HA, pRS424/*ATM1*-MYC, pRS425/*ATM1*-HA et pRS425/*ATM1*-MYC

Afin de générer des formes étiquetées avec les épitopes HA et *c-myc* du DTM d'*Atm1*, les oligonucléotides MR282 (5'-AACTGCAGCAAATGCTGCTTCTTCCAAGA-3') et MR283 (5'-AACTGCAGTCAGCGGCCGCCAACACTACCAAGAAAATTAG-3'), incorporant des sites de restriction *Pst*I et *Not*I en 5' (soulignés), ont été utilisés pour amplifier le DTM d'*ATM1* par PCR. La réaction a eu lieu dans un volume final de 100 µl comprenant 10 µl de tampon 10X (100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 200 mM Tris-HCl pH 8.75, 20 mM MgSO₄, 1% Triton X-100 et 1 mg/ml BSA), 50 µM de dNTPs, 200 pmole de chaque oligonucléotide, 200 ng d'ADN génomique provenant de la souche JPY201 et 1 unité d'ADN polymérase *Pfu* (Stratagene). Le programme était composé de 32 cycles de 1 minute à 94°C, 1 minute à 47°C et 3 minutes à 72°C avec une élongation finale de 6 minutes à 72°C. Un produit majeur d'environ 1.3 kb correspondant au DTM d'*ATM1* a été purifié sur gel d'agarose en utilisant le kit commercial QIAEX II (QIAGEN) et digéré avec *Pst*I pour finalement être inséré au site *Pst*I des vecteurs p424GPD et p425GPD préalablement déphosphorylés, générant les constructions p424GPD/TMD-*Not*I et p425GPD/TMD-*Not*I (Mumberg *et al.*, 1995). Les fragments *Not*I contenant les triples épitopes HA et *c-myc* provenant des vecteurs pMPY-3xHA et pMPY-3xMYC ont été et insérés au site *Not*I des constructions p424GPD/TMD-*Not*I et p425GPD/TMD-*Not*I, générant ainsi les constructions p424GPD/TMD-HA, p424GPD/TMD-MYC, p425GPD/TMD-HA et p425GPD/TMD-MYC.

Afin de générer des formes étiquetées avec les triples épitopes HA et *c-myc* du DLA d'*Atm1*, les oligonucléotides MR284 (5'-AACTGCAGCAAATGTACAGAGATTTAAAGCAGTC-3') et MR285 (5'-AACTGCAGTCAGCGGCCGCCTAGTTCTTGCTGGTCTTTAG-3'), incorporant des sites de restriction *Pst*I et *Not*I en 5' (soulignés), ont été utilisés pour amplifier le DLA d'*ATM1* par PCR. Les conditions de PCR utilisées sont identiques à celle décrites plus haut pour les DTM. Un produit majeur d'environ 0.8 kb correspondant au DLA d'*ATM1* a été obtenu et purifié sur gel d'agarose en utilisant le kit commercial QIAEX II (QIAGEN) suite à une digestion avec *Pst*I pour finalement être inséré au site *Pst*I des vecteurs p424GPD et p425GPD préalablement déphosphorylés,

généralant ainsi les constructions p424GPD/NBF-*NotI* et p425GPD/NBF-*NotI*. Les fragments *NotI* contenant les triples épitopes HA et *c-myc* provenant des vecteurs pMPY-3xHA et pMPY-3xMYC ont été insérés au site *NotI* des constructions p424GPD/NBF-*NotI* et p425GPD/NBF-*NotI* préalablement déphosphorylés pour ainsi générer les constructions p424GPD/NBF-HA, p424GPD/NBF-MYC, p425GPD/NBF-HA et p425GPD/NBF-MYC.

Afin de pouvoir générer des formes complètes de Mas6 (Tim23) étiquetées avec les triples épitopes HA et *c-myc*, les oligonucléotides MR279 (5'-CAATCATGTCGTG GCTTTTGG-3') et MR280 (5'-GTTGCTCAGCGGCCGCTTTCAAGTAGTCTTTT CTTG-3') incorporant un site de restriction *NotI* unique en 5' de *MAS6* (souligné) ont été utilisés pour amplifier par PCR la région codante de *MAS6* tout en insérant un site *NotI* pour le clonage ultérieur des triples épitopes HA et *c-myc*. La réaction de PCR a eu lieu dans un volume final de 100 µl comprenant 10 µl de tampon 10X (100 mM KCl, 100 mM (NH₄)₂SO₄, 200 mM Tris-HCl pH 8.75, 20 mM MgSO₄, 1% Triton X-100 et 1000 mg/ml BSA), 50 µM de dNTPs, 200 pmole de chaque oligonucléotide, 200 ng d'ADN génomique provenant de la souche JPY201 et 2.5 unités d'ADN polymérase *Pfu* (Stratagene). Le programme consistait en 31 cycles de 1 minute à 94°C, 1 minute à 48°C et 3 minutes à 72°C avec une élongation finale de 6 minutes à 72°C. Un produit majeur d'environ 600 pb correspondant au gène *MAS6* a été purifié sur gel d'agarose après avoir transformé ces extrémités en bouts francs avec l'ADN polymérase T4 et phosphorylés avec la polynucléotide kinase (PNK). Le fragment résultant a été inséré au site *SmaI* des vecteurs p424GPD et p425GPD préalablement déphosphorylés pour générer les constructions p424GPD/*MAS6-NotI* et p425GPD/*MAS6-NotI*. Les fragments *NotI* contenant les triples épitopes HA et *c-myc* ont été insérés au site *NotI* des constructions p424GPD/*MAS6-NotI* et p425GPD/*MAS6-NotI* pour générer les constructions p424GPD/*MAS6-HA*, p424GPD/*MAS6-MYC*, p425GPD/*MAS6-HA* et p425GPD/*MAS6-MYC*.

2.14 Co-immunoprécipitations

Les expériences de co-immunoprécipitation ont été effectuées selon la méthode de Shani et Vale (Shani et Valle, 1996). Ainsi, 200 µg (pour les DLA étiquetés) ou 500 µg (pour les formes complètes d'Atm1 étiquetées) d'extraits protéiques totaux ont été incubés sur glace durant 15 minutes dans 1 ml de tampon de solubilisation (1% Triton X-100, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA pH 8.0, 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM PMSF, 2 µg/ml

aprotinine, 3 µg/ml leupeptine et 3 µg/ml pepstatine). Les échantillons ont ensuite été centrifugés 15 minutes à 4°C à 14000 x g pour se débarrasser du matériel non soluble. Le surnageant a ensuite été incubé pour une période de 12-16 heures à 4°C avec une légère agitation en présence de 100 µl de surnageant de culture d'hybridomes 12CA5 (anti-HA) ou 200 µl de surnageant de culture d'hybridomes 9E10 (anti-*myc*). Après une centrifugation additionnelle de 5 minutes à 4°C à 14000 x g, le surnageant a été incubé en présence de 50 µl de Protéine A Sépharose[®] CL-4B (Pharmacia) pour une durée de 2 heures à 4°C avec une légère agitation. Les billes de Protéine A Sépharose[®] CL-4B ont été préparées selon les recommandations du fabricant. Les billes ont ensuite été lavées deux fois avec 1 ml de tampon A (0.1% Triton X-100, 0.02% SDS, 150 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0, 50 mM Tris-HCl pH 7.5, 1 mM PMSF, 2 µg/ml aprotinine, 3 µg/ml leupeptine et 3 µg/ml pepstatine), une fois avec du tampon final (150 mM NaCl, 5 mM EDTA pH 8.0 et 50 mM Tris-HCl pH 7.5), resuspendues dans 40 µl de tampon Laemmli (125 mM Tris pH 6.8, 20% glycérol, 4% SDS, 0.2% bleu de bromophénol et 572 mM β-mercaptoéthanol) et incubées 10 minutes à 55°C. Les protéines liées aux billes ont été soumises à une analyse de type Western comme décrit à la section 2.15.

2.15 Analyses de type Western

Les extraits protéiques totaux et les préparations de mitochondries ont été dénaturés et réduits suite à une incubation de 10 minutes à 55°C en présence de tampon Laemmli, séparés par SDS-PAGE sur gels de 8-12% et transférés sur des membranes de nitrocellulose (Bio-Rad) selon les recommandations du fabricant. Les membranes de nitrocellulose ont été incubées dans une solution de TBST (10 mM Tris-HCl pH 8.0, 150 mM NaCl et 0.05% Tween-20) contenant 5% de lait en poudre pour une heure à 25°C. La solution de blocage a ensuite été retirée et une nouvelle solution de TBST contenant 5% de lait en poudre et les anticorps primaires provenant des surnageants de cultures d'hybridomes 12CA5 (anti-HA, dilution 1:100) ou 9E10 (anti-*myc*, dilution 1:50) ou les anticorps polyclonaux anti-Atm1 non purifiés (dilution 1:1000), anti-Atm1 purifiés (dilution 1:500) et anti-PGK (obtenus de Josée Ash, Institut de recherche en biotechnologie, Montréal, Canada, dilution 1:10000) ou l'anticorps monoclonal anti-Porin (Molecular Probes, dilution 1:1000) a été utilisée. Après une légère agitation d'une heure à 25°C, les membranes ont été lavées quatre fois 5 minutes dans du TBST avec une agitation

vigoureuse. Les protéines reconnues par les anticorps ont été révélées à l'aide du kit commercial BM (BM Chemiluminescence Western Blotting, Boehringer Mannheim, dilution 1:1000) ou à l'aide d'un anticorps secondaire anti-Ig de lapin (Bio-Rad, dilution 1:2000) ou anti-Ig de souris (Bio-Rad, dilution 1:2000) couplé à la phosphatase alcaline, selon les recommandations du manufacturier.

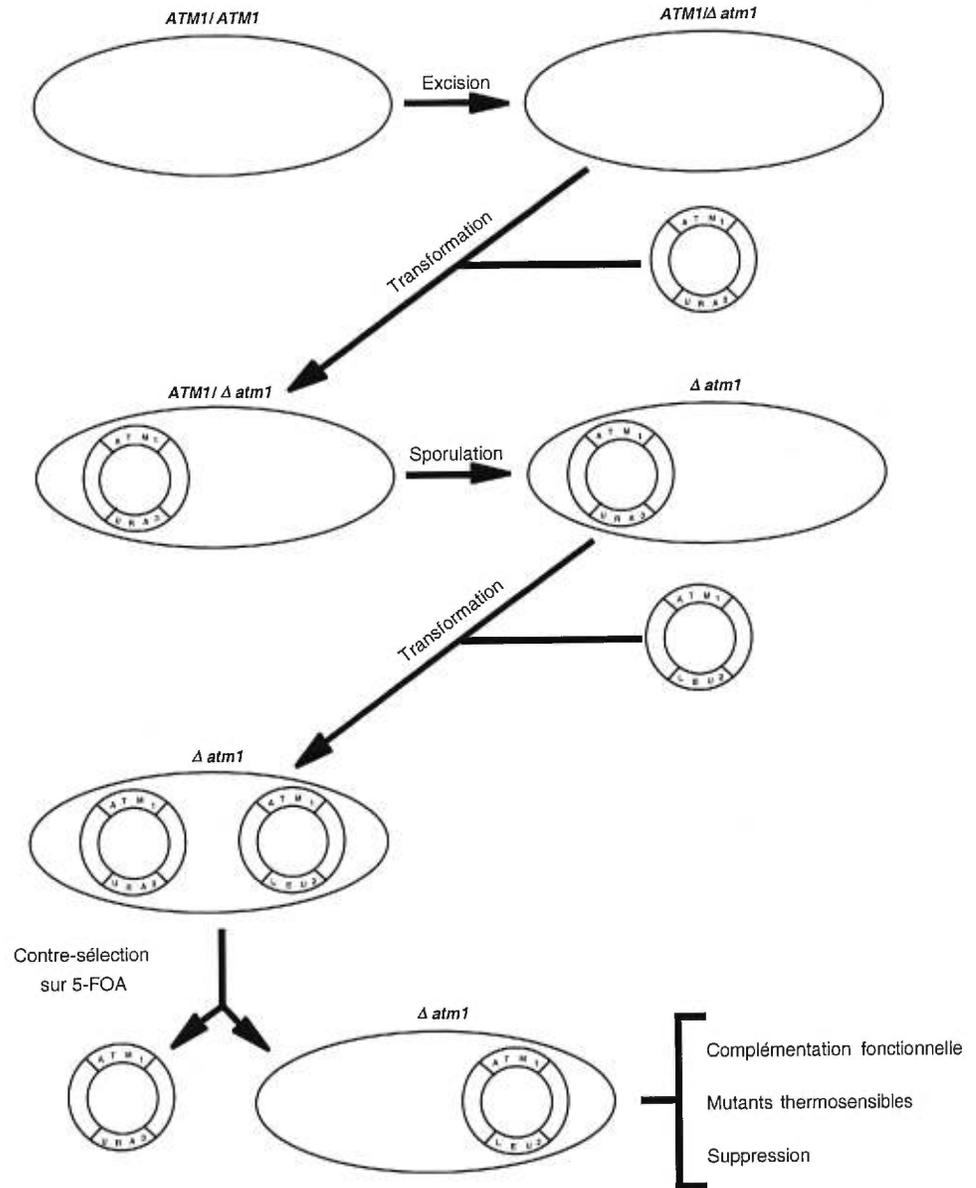
CHAPITRE 3. RÉSULTATS

3.1 Construction d'une souche *Δatm1* viable

3.1.1 Utilisation de la technique du 'plasmid shuffling' pour étudier *ATMI*

L'étude d'un gène essentiel dans une souche haploïde cause un problème puisque l'absence de l'allèle sauvage se traduit par un phénotype non-viable. Une technique appelée 'plasmid shuffling' est couramment utilisée pour surmonter ce problème (Boeke *et al.*, 1987). Cette technique est basée sur l'échange de plasmides par contre-sélection de plasmides *URA3* en présence de 5-FOA (Boeke *et al.*, 1987). Le gène *URA3* de *S. cerevisiae* code pour l'enzyme orotidine-5-phosphate décarboxylase qui est requis pour la biosynthèse de l'uracile (Bach *et al.*, 1979). Le produit de gène *URA3* transforme le 5-FOA en 5-fluorouracil, un produit toxique pour les cellules, les obligeant ainsi à perdre leur plasmide *URA3* de manière à survivre et permettant donc la sélection des cellules ayant perdu leur plasmide (Boeke *et al.*, 1987). Afin de pouvoir utiliser le 'plasmid shuffling' pour étudier *ATMI*, nous avons premièrement dû exciser un allèle d'*ATMI* dans une souche diploïde sauvage en utilisant un marqueur de sélection autre que *URA3*, soit *HIS3* dans notre cas (figure 2). Cette souche hétérozygote (*ATMI/Δatm1*) a ensuite été transformée avec un plasmide centromérique portant une copie fonctionnelle d'*ATMI* ainsi que le marqueur de sélection *URA3* (figure 2). Les transformants Ura⁺ ont ensuite été sporulés et les tétrades résultantes disséquées dans le but d'isoler une spore haploïde dans laquelle la copie endogène d'*ATMI* est excisée (*Δatm1*) mais qui est capable de croître grâce à la présence d'une copie fonctionnelle d'*ATMI* portée par le plasmide *URA3* (figure 2). Une telle souche haploïde viable peut être transformée avec un plasmide *LEU2* portant soit des allèles mutés d'*ATMI*, soit une banque d'ADN génomique provenant d'un autre organisme dans le but d'identifier, suite à la contre-sélection du plasmide *URA3* et à l'analyse du phénotype associé au plasmide *LEU2*, des mutants d'*ATMI*, des suppresseurs intragéniques ou extragéniques de différents mutants d'*ATMI* et des homologues d'*ATMI* chez d'autres espèces (figure 2).

Figure 2. Représentation schématique de la technique du ‘plasmid shuffling’. Cette technique est basée sur l’échange de plasmides par contre-sélection d’un plasmide *URA3* en présence d’acide 5-fluoroorotique (5-FOA). Cette technique permet d’analyser le phénotype associé à un gène porté par un plasmide *LEU2* et peut être utilisée dans le but d’identifier des mutants ts, des homologues par complémentation fonctionnelle ou des supprimeurs.

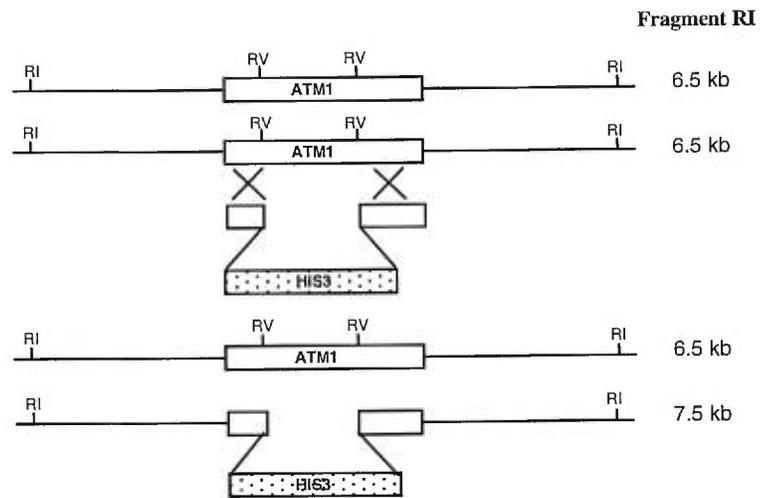


3.1.2 Génération d'une souche hétérozygote *ATM1/Δatm1*

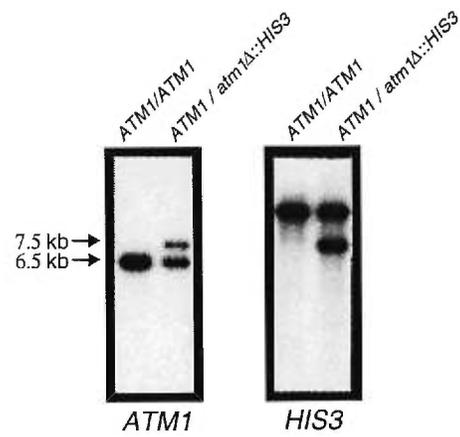
Afin d'exciser un des deux allèles d'*ATM1* dans la souche diploïde sauvage W303, le plasmide pUC19/*Δatm1::HIS3* a été construit et utilisé selon la méthode d'excision génique en une étape décrite par Kaiser *et al.* (Kaiser *et al.*, 1994). Pour ce faire, nous avons premièrement amplifié par PCR le cadre de lecture ouvert complet d'*ATM1* (+1 à +2085) (Leighton et Schatz, 1995b). Un produit majeur d'environ 2.1 kb correspondant à *ATM1* a été obtenu et inséré dans le vecteur pUC19 (Yanisch-Perron *et al.*, 1985). Un fragment *EcoRV* interne à *ATM1* de 977 pb (+545 à +1522), codant pour les segments transmembranaires TM3 à TM6 et le motif Walker A, a ensuite été remplacé par le marqueur de sélection *HIS3*, générant ainsi la cassette d'excision pUC19/*Δatm1::HIS3*. L'introduction dans la souche W303 du plasmide pUC19/*Δatm1::HIS3*, rendu linéaire suite à une digestion avec l'enzyme de restriction *EcoRI*, devrait générer des colonies His⁺ ayant été l'objet d'une recombinaison homologue entre l'allèle sauvage et la cassette d'excision (figure 3A). Une digestion de l'ADN génomique d'un recombinant His⁺ avec l'enzyme *EcoRI* devrait donner lieu à des fragments diagnostiques de 6.5 kb pour l'allèle sauvage et de 7.5 kb pour l'allèle excisé puisque le fragment *HIS3* introduit dans *ATM1* possède une taille de 1.9 kb comparativement au fragment *EcoRV* interne de 977 pb (figure 3A). Dans le but de confirmer l'intégration de la cassette d'excision au bon locus, une analyse de type Southern avec de l'ADN génomique d'un recombinant His⁺ et de la souche sauvage W303 digéré avec *EcoRI* a été effectuée, utilisant comme sondes marquées au ³²P le gène *ATM1* pleine longueur amplifié par PCR et le marqueur de sélection *HIS3*. Nous avons observé, comme prédit, la présence dans la souche W303 (*ATM1/ATM1*) d'une bande intense de 6.5 kb correspondant aux deux allèles d'*ATM1* de type sauvage et la présence d'une bande de 6.5 kb et d'une bande de 7.5 kb dans le cas de la souche hétérozygote pour la délétion (*ATM1/Δatm1::HIS3*), confirmant ainsi la délétion d'un allèle d'*ATM1* dans la souche hétérozygote (figure 3B, panneau de gauche). La bande de 7.5 kb est légèrement moins intense que celle de 6.5 kb, ce qui est probablement causé par la moins grande région d'homologie entre la sonde *ATM1* et l'allèle excisé d'*ATM1* (qui contient le marqueur de sélection *HIS3* à la place du fragment *EcoRV* interne d'*ATM1*) qu'entre la sonde *ATM1* et l'allèle de type sauvage (figure 3B, panneau de gauche). L'excision d'un allèle d'*ATM1* dans la souche hétérozygote (*ATM1/Δatm1::HIS3*) a également été confirmée avec la sonde *HIS3*, puisque la bande 7.5 kb correspondant à l'allèle excisé est uniquement observée chez

Figure 3. Délétion du gène *ATM1* dans la souche diploïde W303 de *S. cerevisiae*. **(A)** Représentation schématique du locus d'*ATM1* avant et après son excision. La taille (kb) des fragments *EcoRI* attendus pour l'allèle sauvage et l'allèle excisé est indiquée à droite. **(B)** Analyse de type Southern avec de l'ADN génomique provenant de la souche sauvage W303 et d'une souche hétérozygote pour la délétion d'*ATM1*, digéré avec *EcoRI* et analysé avec les sondes *ATM1* et *HIS3* marquées au ^{32}P . La taille (kb) des fragments détectés est indiquée à gauche.

A



B



la souche hétérozygote pour la délétion (figure 3B, panneau de droite). La bande de poids moléculaire plus élevé hybridant avec la sonde *HIS3* correspond au locus *HIS3* endogène et est présente dans les deux souches (figure 3B, panneau de droite). La souche hétérozygote pour la délétion a été nommée LPY1 et a été utilisée tout au cours des expériences ultérieures.

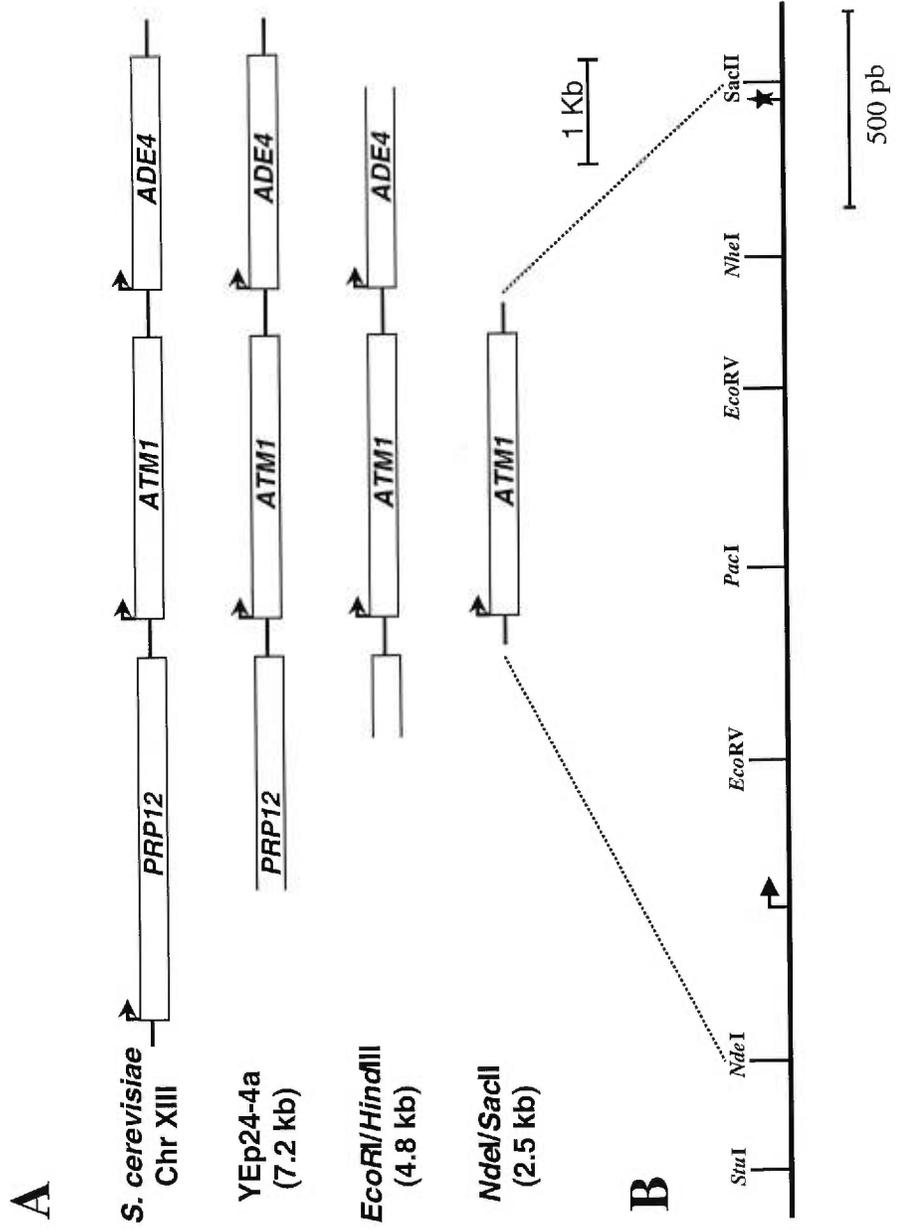
3.1.3 Isolement d'un fragment génomique contenant une copie sauvage d'*ATM1*

Afin d'obtenir une copie sauvage du gène *ATM1* contenant les régions 5' et 3' non-traduites requises pour son expression normale, nous avons criblé une banque d'ADN génomique de *S. cerevisiae* construite dans le vecteur 2 μ YEp24 portant le marqueur de sélection *URA3* (Carlson et Botstein, 1982). La banque a été transformée dans la souche JM83 d'*E. coli* et les transformants ont été criblés en utilisant le fragment *EcoRV* interne d'*ATM1* comme sonde (figure 4B). Plusieurs clones hybridant fortement avec la sonde ont été isolés et caractérisés par cartographie avec des enzymes de restriction. L'un d'entre eux, nommé Yep24-4a, possédait un insert d'environ 7.2 kb provenant du chromosome XIII de *S. cerevisiae* et contenait le cadre de lecture ouvert complet d'*ATM1* avec ses régions 5' et 3' non-traduites (figure 4A). Ce dernier contenait également en amont d'*ATM1* la partie 3' du gène *PRP12* et en aval la totalité du gène *ADE4* (figure 4A). Le gène *PRP12* code pour une protéine membranaire localisée à la membrane interne des mitochondries et impliquée dans la maturation des ARN tandis que le gène *ADE4* code pour une phosphoribosylpyrophosphate aminotransférase impliquée dans la biosynthèse de l'adénine (Mantsala et Zalkin, 1984; Thorsness et Fox, 1993). Deux fragments provenant de l'insert du clone YEp24-4a ont été utilisés pour les expériences ultérieures. Le premier fragment, nommé *ATM1*-4.8, provient d'une digestion *EcoRI/HindIII* du plasmide Yep24-4a. Ce fragment, d'une taille de 4.8 kb, contient le cadre de lecture ouvert complet d'*ATM1*, la partie 3' de *PRP12* et la partie 5' d'*ADE4* (figure 4A). Le second fragment, nommé *ATM1*-2.5, provient d'une digestion *NdeI/SacII* du plasmide Yep24-4a. Ce fragment d'une taille de 2.5 kb contient uniquement le cadre de lecture ouvert complet d'*ATM1* et ses séquences 5' et 3' non-traduites (figure 4B). Le fragment *EcoRI/HindIII* (*ATM1*-4.8) a été utilisé pour la majorité des expériences ultérieures.

3.1.4 Isolement et caractérisation d'une souche haploïde viable $\Delta atm1$

Dans le but d'obtenir une souche haploïde viable dans laquelle la copie chromosomique d'*ATM1* est excisée mais qui est capable de croître grâce à la présence

Figure 4. Clonage d'un fragment d'ADN génomique de *S. cerevisiae* contenant le gène *ATM1*. **(A)** Représentation schématique du locus d'*ATM1* sur le chromosome XIII de *S.cerevisiae*. Les cadres de lecture ouverts voisins d'*ATM1*, soient *ADE4* et *PRP12*, sont indiqués. L'insert provenant du clone YEp24-4a ainsi que les fragments *EcoRI-HindIII* et *NdeI-SacII* utilisés lors de nos expériences sont également montrés avec leur taille respective (kb) **(B)** Carte de restriction du cadre de lecture ouvert d'*ATM1* et de ses séquences 5' et 3' non-traduites.



d'une copie fonctionnelle d'*ATM1* portée par un plasmide *URA3*, nous avons transformé la souche LPY1, hétérozygote pour l'excision d'*ATM1*, avec le plasmide pRS316/*ATM1*-4.8. Ce dernier provient de l'insertion du fragment *ATM1*-4.8 dans le vecteur centromérique pRS316 portant le marqueur de sélection *URA3* (figure 4A). Un vecteur centromérique a été utilisé dans le but de faciliter la perte des plasmides *URA3*, éliminant ainsi le bruit de fond associé aux plasmides 2μ , présents en plusieurs copies dans les cellules, lors de la contre-sélection sur 5-FOA (Boeke *et al.*, 1987). Les transformants Ura⁺ obtenus ont été étalés sur un milieu contenant de l'acétate de potassium dans le but d'induire la sporulation des cellules diploïdes. Des analyses microscopiques ont confirmé la présence de tétrades après quelques jours d'incubation à température de la pièce. Plusieurs de ces tétrades ont été disséquées et leur spores analysées. Une analyse détaillée de la tétrade 12 a démontré que ses quatre spores ont la capacité de croître sur milieu YPD ainsi que sur milieu SC-ura dû à la présence du plasmide *URA3* pRS316/*ATM1*-4.8 (figure 5). Deux spores (12-B et 12-D) sont His⁺ indiquant qu'elles possèdent l'allèle $\Delta atm1::HIS3$ tandis que les deux autres (12-A et 12-C) sont His⁻, indiquant qu'elles ont hérité de l'allèle d'*ATM1* de type sauvage (figure 5). Les quatre spores sont Leu⁻, tout comme la souche parentale W303 (figure 5). Le type sexuel des spores a également été déterminé montrant la présence de deux spores de type sexuel a (12-A et 12-C) et deux spores de type sexuel α (12-B et 12-D) (figure 5). La spore LPY1-12B a été utilisée pour les expériences ultérieures car elle possède à la fois l'allèle excisée d'*ATM1* et le plasmide *URA3* portant la copie fonctionnelle d'*ATM1* et l'auxotrophie envers la leucine permettant le criblage subséquent de mutants ts.

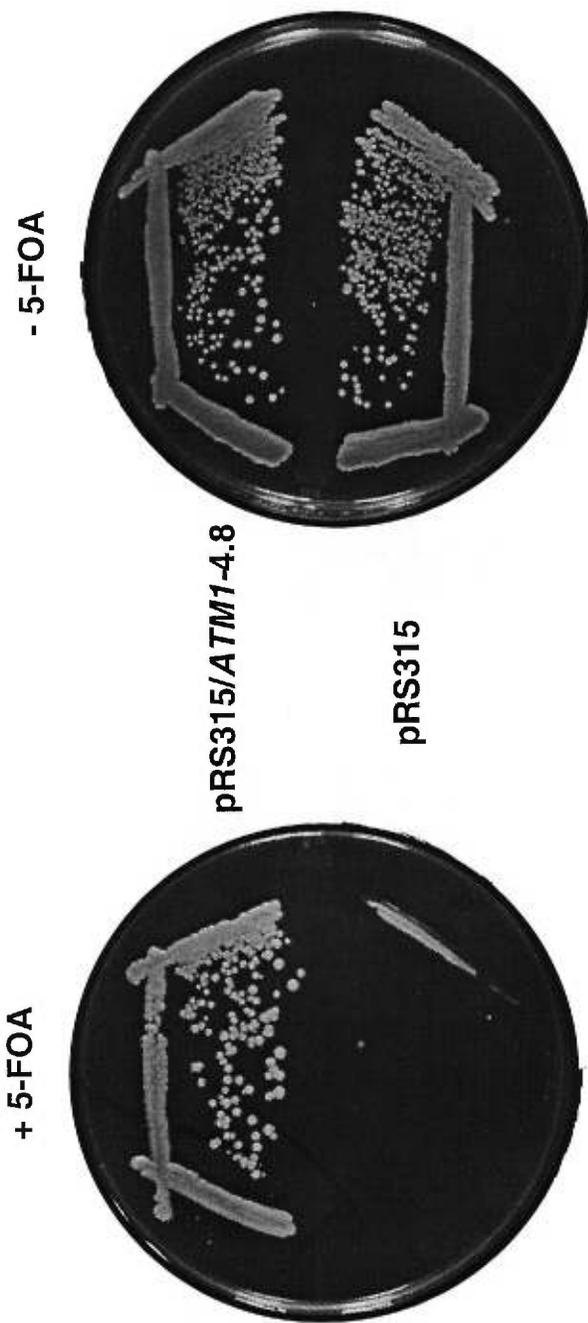
3.1.5 Utilisation de la souche LPY1-12B dans le système du 'plasmid shuffling'

Dans le but de déterminer si la technique du 'plasmid shuffling' pouvait être utilisée afin d'entreprendre l'analyse fonctionnelle d'*ATM1*, nous avons transformé la souche LPY1-12B ($\Delta atm1::HIS3$ pRS316/*ATM1*-4.8) avec les plasmides centromériques *LEU2* pRS315/*ATM1*-4.8, contenant le fragment *EcoRI/HindIII ATM1*-4.8 provenant du plasmide Yep24-4a, ou pRS315 comme contrôle. Les transformants Ura⁺ Leu⁺ ont été striés sur milieu SC-leu contenant ou non du 5-FOA. Nous remarquons qu'en présence de 5-FOA, la souche possédant le plasmide pRS315/*ATM1*-4.8 est capable de croître suite à la contre-sélection du plasmide *URA3* tandis que la souche transformée avec le vecteur seul (pRS315) n'est pas viable (figure 6, panneau de gauche). Ceci démontre qu'en présence de

Figure 5. Caractérisation de la tétrade 12. La souche LPY1 (*ATM1/Δatm1::HIS3*) a été transformée avec le plasmide pRS316/*ATM1*-4.8, les transformants sporulés et les tétrades résultantes disséquées à l'aide d'un micromanipulateur. Les spores individuelles provenant de la tétrade 12 ont été caractérisées par rapport à leur capacité de croître sur les milieux YPD, SC-ura, SC-his et SC-leu. Leur type sexuel (MAT) a également été déterminé selon leur capacité de se conjuguer avec des levures de type sexuel connu.

Spore	MAT	YPD	SD-HIS	SD-URA	SD-LEU
12-A	a	+	-	+	-
12-B	α	+	+	+	-
12-C	a	+	-	+	-
12-D	α	+	+	+	-

Figure 6. Contre-sélection sur l'acide 5-fluoroorotique (5-FOA) de plasmides *URA3*. La souche LPY1-12B ($\Delta atm1::HIS3$ pRS316/*ATM1*-4.8) dans laquelle la copie chromosomique d'*ATM1* est excisée mais qui a la capacité de croître grâce à la présence d'un plasmide contenant *ATM1* et le marqueur de sélection *URA3* (pRS316/*ATM1*-4.8) a été transformée avec les plasmides centromériques *LEU2* pRS315 ou pRS315/*ATM1*-4.8. Les transformants Ura⁺ Leu⁺ ont été striés sur milieu SC-leu contenant (+5-FOA) ou pas (-5-FOA) du 5-FOA et ont été incubés pendant 3 jours à 30°C.

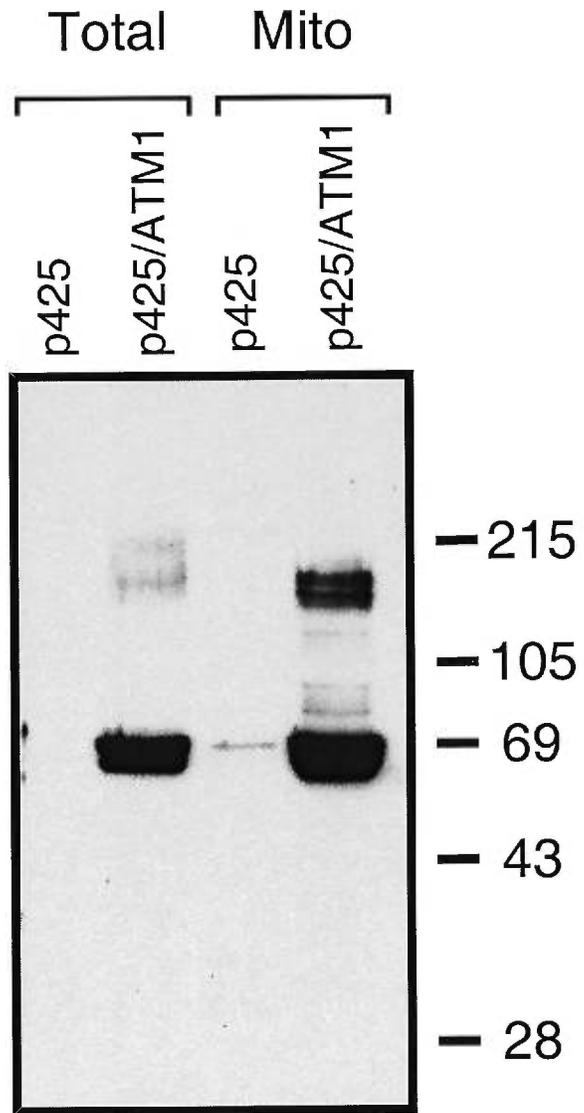


5-FOA une copie fonctionnelle d'*ATM1* portée par le plasmide *LEU2* est requise pour compenser la perte du plasmide pRS316/*ATM1* dans la souche LPY1 et donc que la contre-sélection des plasmides *URA3* s'effectue efficacement en présence de 5-FOA. En absence de 5-FOA, la souche LPY1-12B est capable de croître car elle contient toujours le plasmide *URA3* portant une copie fonctionnelle d'*ATM1* (figure 6, panneau de droite). Ces résultats confirment que la souche LPY1-12B peut être utilisée en 'plasmid shuffling' dans le but d'effectuer une étude fonctionnelle d'*ATM1*.

3.2 Production d'anticorps polyclonaux anti-Atm1

Des anticorps polyclonaux anti-Atm1 ont été produits dans le but de pouvoir caractériser, au niveau protéique, les mutants ts d'Atm1 que nous avons isolés (section 3.3.3.2). Pour ce faire, une protéine de fusion possédant les 245 derniers acides aminés d'Atm1 insérés en phase avec la Glutathione-S-transférase (GST) a été purifiée et utilisée pour immuniser des lapins. Puisqu'*ATM1* est essentiel pour la croissance normale des cellules et que, par conséquent, il n'est pas possible de préparer des extraits protéiques provenant d'une souche $\Delta atm1$ comme contrôle négatif, nous avons été dans l'obligation de confirmer la spécificité de notre anticorps polyclonal anti-Atm1 en comparant les niveaux d'expression de la protéine reconnue par l'anticorps dans une souche de type sauvage et dans une souche surexprimant Atm1. Pour ce faire, des extraits protéiques totaux ou enrichis en mitochondries provenant de la souche W303 transformée avec les plasmides p425GPD ou p425GPD/*ATM1* ont été préparés. La présence du gène *ATM1* sous le contrôle du promoteur du gène codant pour la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GPD), un promoteur constitutif dix fois plus fort que celui de l'alcool déshydrogénase (ADH), et ce dans un vecteur multicopie devrait résulter en un très fort niveau d'expression d'Atm1 (Mumberg *et al.*, 1995). Les extraits protéiques ont été séparés par SDS-PAGE sur un gel de 10%, transférés sur une membrane de nitrocellulose et soumis à une analyse de type Western avec l'anticorps polyclonal anti-Atm1. Dans les extraits cellulaires totaux nous observons la présence de deux bandes, sous forme de doublet, de poids moléculaires apparents de 69 kDa et de 64 kDa uniquement lorsqu'*ATM1* est surexprimé (p425/*ATM1*) (figure 7). Ces deux bandes pourraient correspondre au précurseur (69 kDa) d'Atm1 et à sa forme mature (64 kDa) étant donné qu'Atm1 possède un signal de localisation à la mitochondrie dans ses 53 premiers acides aminés, ce qui, après clivage de la séquence signal, résulterait en une protéine mature ayant un poids moléculaire inférieur d'environ 6

Figure 7. Production d'anticorps polyclonaux anti-Atm1. 25 µg d'extraits cellulaires totaux (Total) ou d'extraits enrichis en mitochondries (Mito) provenant de la souches W303 surexprimant (p425/*ATM1*) ou pas (p425) *Atm1* ont été séparés par SDS-PAGE sur un gel de 10%, transférés sur une membrane de nitrocellulose et soumis à une analyse de type Western avec un anticorps anti-*Atm1* polyclonal non-purifié (dilution 1:1000). La position des marqueurs de poids moléculaires connus (kDa) est indiquée à droite.



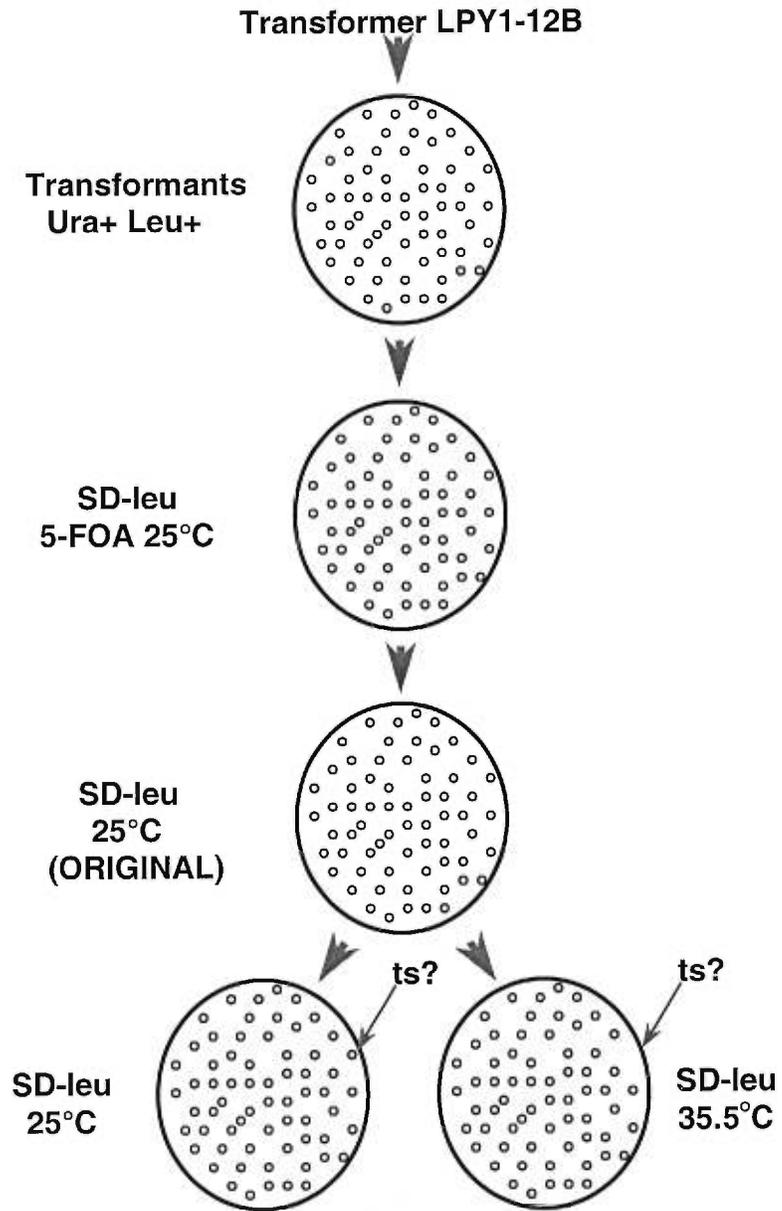
kDa (Leighton et Schatz, 1995b). Les poids moléculaires prédits selon la séquence peptidique pour le précurseur d'Atm1 et la forme mature sont de 77 kDa et de 70 kDa respectivement, si l'on soustrait du poids moléculaire du précurseur le poids moléculaire théorique des 53 premiers acides aminés (SWISS-PROT P40416). L'absence des bandes dans l'extrait protéique total provenant de la souche ne surexprimant pas Atm1 (p425) nous permet de confirmer la spécificité de notre anticorps envers Atm1 mais également de douter de la capacité de ce dernier à détecter des niveaux endogènes d'Atm1 à partir d'extraits cellulaires totaux. Dans les extraits enrichis en mitochondries ne surexprimant pas Atm1 (p425), nous détectons la bande de 69 kDa et très légèrement celle de 64 kDa (pas visible à la figure 7 mais présente lors d'une exposition plus longue) tandis que les deux bandes sont présentes à de hauts niveaux dans les mitochondries de la souche surexprimant Atm1 (p425/ATM1) (figure 7). Des études récentes ont démontré la présence d'un produit unique spécifique à Atm1 d'environ 69 kDa dans des mitochondries purifiées à partir d'une souche sauvage (Kispal *et al.*, 1997). Ceci suggère donc que le produit observé à 64 kDa serait plutôt un produit de dégradation et non pas la forme mature d'Atm1 et que le précurseur d'Atm1 n'est pas détectable sous les conditions utilisées. Finalement, il est important de noter la présence d'un produit spécifique à Atm1 à environ 140 kDa qui pourrait représenter un homodimère d'Atm1 ou un hétérodimère d'Atm1 avec une autre protéine d'environ 70 kDa (figure 7). Des formes dimériques résistantes au SDS ont déjà été observées chez différentes protéines, par exemple chez le récepteur β_2 -adrénergique (Hebert *et al.*, 1996). Globalement, ces résultats confirment la spécificité de notre anticorps envers Atm1 mais démontrent également que ce dernier ne détecte pas les niveaux endogènes d'Atm1 à partir d'extraits cellulaires totaux et difficilement les niveaux endogènes d'Atm1 à partir d'extraits enrichis en mitochondries.

3.3 Identification et caractérisation de mutants thermosensibles d'Atm1

3.3.1 Isolement de mutants thermosensibles

Nous avons utilisé la technique du 'plasmid shuffling' pour identifier des mutations ts dans Atm1 (figure 2). Des banques d'allèles mutés d'ATM1 portés par le plasmide centromérique *LEU2* pRS315, provenant soit d'une mutagénèse de 20 heures à 37°C en présence d'hydroxylamine soit d'une mutagénèse de 16 heures dans la souche

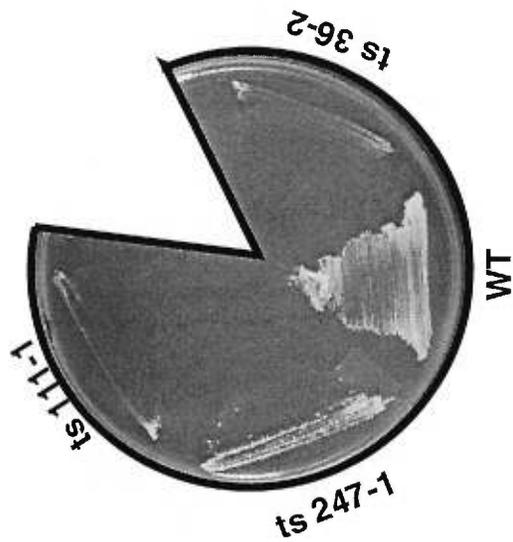
Figure 8. Stratégie utilisée lors du criblage pour des mutations ts dans *Atm1*. La souche LPY1-12B ($\Delta atm1::HIS3$ pRS316/ATM1-4.8) a été transformée avec des banques d'allèles mutés d'*ATM1* portés sur le plasmide pRS315, un vecteur centromérique ayant le marqueur de sélection *LEU2*. Les transformants Ura^+ Leu^+ ont été sélectionnés, répliqués une première fois sur milieu SC-leu contenant du 5-FOA et incubés à température permissive (25°C) pour induire la perte du plasmide *URA3*. Les transformants ont ensuite été répliqués sur milieu SD-leu à température permissive (25°C) et le phénotype ts associé aux plasmides *LEU2* analysé à température permissive (25°C) et restrictive (35.5°C) dans le but d'identifier des clones incapable de croître uniquement à température restrictive.



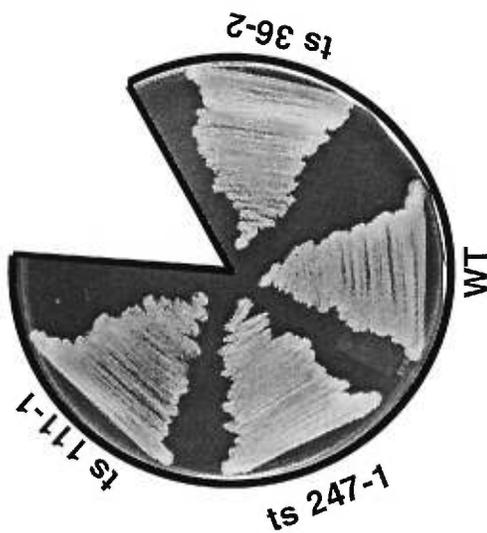
XL1-Red ont été transformées dans la souche haploïde viable LPY1-12B ($\Delta atm1::HIS3$ pRS316/*ATM1*-4.8). Une représentation schématique de la façon dont le criblage a été effectué est montrée (figure 8). Les transformants Ura⁺ Leu⁺ ont été répliqués sur milieu SC-leu contenant du 5-FOA et incubés trois jours à température permissive (25°C) pour induire la perte du plasmide pRS316/*ATM1*-4.8 portant la copie fonctionnelle d'*ATM1*. Ces clones ont ensuite été répliqués sur milieu SC-leu et le phénotype associé aux plasmides *LEU2*, contenant les allèles mutés d'*ATM1*, analysé à température permissive (25°C) et à température restrictive (35.5°C) dans le but d'identifier des clones incapables de croître uniquement à température restrictive. Plusieurs clones ont ainsi été identifiés. Dans le but de nous assurer que le phénotype ts était associé aux allèles mutés d'*ATM1* portés par les plasmides *LEU2* pRS315/*ATM1*-4.8 mutés et non pas à un événement chromosomique ou à une mutation ts ailleurs dans le plasmide, l'ADN génomique provenant de ces clones a été préparé et utilisé pour transformer une souche d'*E. coli* pour ensuite isoler les plasmides. Seulement trois plasmides conférant un phénotype ts sur milieu YPD ont été identifiés, soient les plasmides pRS315/ts36-2, pRS315/ts111-1 et pRS315/ts247-1, nous permettant de nous assurer que le phénotype observé n'était pas dû à une mutation dans le gène *LEU2* du plasmide pRS315/*ATM1*-4.8. Les fragments *NdeI-SacII* des plasmides pRS315/ts36-2, pRS315/ts111-1 et pRS315/ts247-1, possédant le cadre de lecture ouvert ainsi que le promoteur d'*ATM1*, ont été clonés dans le plasmide pRS315. Ces constructions ont ensuite été transformées dans la souche LPY1-12B ($\Delta atm1::HIS3$ pRS316/*ATM1*-4.8) et le phénotype ts analysé suite à la contre-sélection sur 5-FOA du plasmide pRS316/*ATM1*-4.8 (figure 9). Nous remarquons que les mutants ts36-2, ts111-1 et ts247-1 sont incapables de croître à température restrictive tandis que la présence d'un allèle sauvage d'*ATM1* sur le plasmide pRS315/*ATM1*-4.8 (WT) permet la croissance des cellules aux deux températures (figure 9). Il est intéressant de noter que le mutant ts247-1, à la différence des mutants ts ts36-2 et ts111-1, semble réverter sur milieu SC-leu solide. Ces résultats confirment que les mutations dans *ATM1* responsables du phénotype ts des mutants ts36-2, ts111-1 et ts247-1 se trouvent bien dans les fragments *NdeI-SacII* présents dans les plasmides *LEU2* pRS315/ts36-2, pRS315/ts111-1 et pRS315/ts247-1.

Figure 9. Identification de mutants thermosensibles d'Atm1. La souche LPY1-12B ($\Delta atm1::HIS3$ pRS316/ATM1-4.8) a été transformée avec le plasmide pRS315/ATM1(*Nde*I-*Sac*II) sauvage ou les plasmides pRS315/ts36-2(*Nde*I-*Sac*II), pRS315/ts111-1(*Nde*I-*Sac*II) et pRS315/ts247-1(*Nde*I-*Sac*II). La perte des plasmides *URA3* a été induite en présence de 5-FOA à température permissive (25°C) et les cellules ont ensuite été striées sur milieu SC-leu et les pétris incubés à température permissive (25°C) ou restrictive (35.5°C) durant trois jours.

35.5°C



25°C



3.3.2 Identification des mutations dans *ATM1* responsables pour le phénotype thermosensible

Dans le but d'identifier dans *ATM1* les mutations responsables du phénotype ts des mutants ts36-2, ts111-1 et ts247-1, nous avons déterminé la séquence correspondant à la région codante d'*ATM1* dans les plasmides pRS315/ts36-2, pRS315/ts111-1 et pRS315/ts247-1. L'analyse de la séquence nucléotidique d'*ATM1* chez le mutant ts36-2 a permis d'identifier une mutation unique changeant une guanine pour une adénine à la position +1925, causant la substitution Ile642Asn dans la protéine résultante. Les mutations changeant une thymidine pour une cytosine aux positions +350 et +1328 causant respectivement les substitutions Leu117Pro et Phe443Ser chez la protéine résultante ont été identifiées chez le mutant ts111-1. En ce qui concerne le mutant ts247-1, les mutations remplaçant une cytosine par une thymidine à la position +1397 et une guanine pour une adénine à la position +1451, causant respectivement les substitutions Ala466Val et Arg484Lys chez la protéine de ce mutant, ont été identifiées. La présence d'une mutation unique dans le mutant ts36-2 nous permet de conclure que la substitution Ile642Asn est responsable du phénotype ts. Afin de déterminer laquelle des deux substitutions présentes chez le mutant ts111-1, c'est-à-dire Leu117Pro ou Phe443Ser, est responsable du phénotype ts, nous avons introduit indépendamment chacune des deux mutations dans une copie de type sauvage d'*ATM1*. Pour ce faire, nous avons remplacé dans le plasmide pRS315/*ATM1*-4.8 non-muté un fragment *StuI-PacI* contenant la mutation N-terminale ou un fragment *PacI-NheI* contenant la mutation C-terminale provenant du plasmide pRS315/ts111-1 (figure 4B). Suite à la transformation de ces constructions dans la souche LPY1-12B ($\Delta atm1::HIS3$ pRS316/*ATM1*-4.8) et l'analyse de leur phénotype ts par 'plasmid shuffling', nous avons déterminé que la mutation N-terminale était responsable du phénotype ts (résultats non présentés). En ce qui concerne le mutant ts247-1, la proximité des deux mutations (54 nucléotides) et l'absence de sites de restriction permettant le sous-clonage indépendant des deux mutations ne nous a pas permis de déterminer si une seule des deux mutations ou si les deux mutations sont requises pour le phénotype ts. La position dans *Atm1* des substitutions causant le phénotype ts des mutants ts36-2, ts111-1 et ts247-1 est présenté à la figure 10. La substitution Ile642Asn du mutant ts36-2 se retrouve à 36 résidus en aval du motif Walker B, la substitution Leu117Pro du mutant ts111-1 se trouve à

Figure 10. Séquence peptidique et positions des mutations thermosensibles dans Atm1. La position des segments transmembranaires d'Atm1 a été déterminée en utilisant l'algorithme TMpred (Hofmann et Stoffel, 1993) (TM1 à TM6). Les sites consensus Walker A, Walker B et 'Signature ABC' ont été identifiés en utilisant le programme MOTIFS (Genetic Computer Group, Madison, Wisc). Les résidus mutés sont encadrés. Les mutations Ile642Asn chez le mutant ts36-2, Leu117Pro chez le mutant ts111-1 et Ala466Val et Arg484Lys chez le mutant ts247-1 sont indiquées en blanc sur fond noir. Le motif CPV est souligné. La séquence peptidique d'Atm1 a été obtenue de la banque de données SWISS-PROT, numéro d'accèsion P40416.

1 MLLLPRCPCVIGRIVRSKFRSGLIRNHSPVIFTVSKLSTQRPLLFN SAVNL
 51 WNQAQKDITHKKSVEQFSSAPKVKTQVKKTSKAPTLSELKILKDLFRYIW
 101 PKGNNKVRIRVLIALGLISAKILNVQVPFFFKQTIDSMNIAWDDPTVAL
 151 PAAIGLTILCYGVARFGSVLFGELRNAVFAKVAQNAIRTVSLQTFQHLMK
 201 LDLGWHLRSRQTGGLTRAMDRGTKGISQVLTAMVFHIIPISFEISVVCGIL
 251 TYQFGASFAAITFSTMLLYSIFTIKTTAWRTHFRRDANKADNKAASVALD
 301 SLINFEAVKYFNNEKYLADKYNGSLMNYRDSQIKVSQSLAFLNLSGQNLIFF
 351 TTALTAMMYMGCTGVIGGNLTVGDLVVLINQLVFLSVPLNFLGVSRYRDLK
 401 QSLIDMETLFLKLRKNEVKIKNAERPLMLPENVPYDITFENVTFGYHPDRK
 451 ILKNASFTIPAGWKTIVGSSGSGKSTILKLVFRFFYDPESEGRILINGRDI
 501 KEYDIDALRKVIGVVPQDTPLFNNTI WENVKFGRIDATDEEVITVVEKAQ
 551 LAPLIKLPQGFDTIVGERGLMISGGEKQRLAIARVLLKNARIMFFDEAT
 601 SALDTHTEQALLRTIRDNFTSGSRTSVYIAHRLRTIADADKTIIVLDNGRV
 651 REEGKHLELLAMPGLYRELWTIQEDLDHLENELKDQOEL

TM1
 TM2 P^{ts111-1}
 TM3
 TM4
 TM5
 TM6
 Walker A
 V^{ts247-1} K^{ts247-1}
 ABC Walker B
 N^{ts36-2}

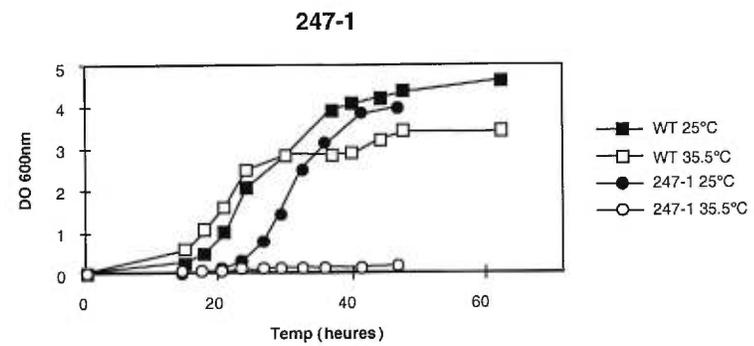
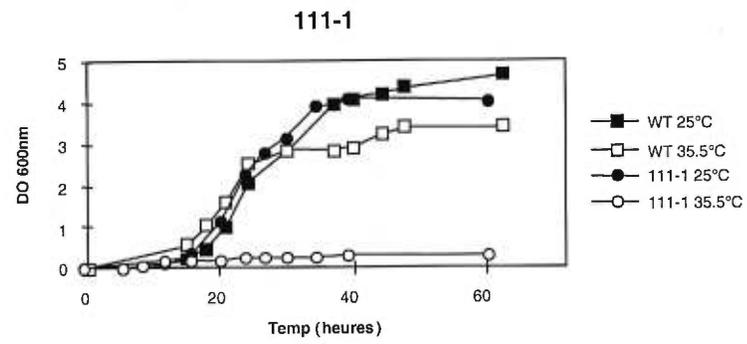
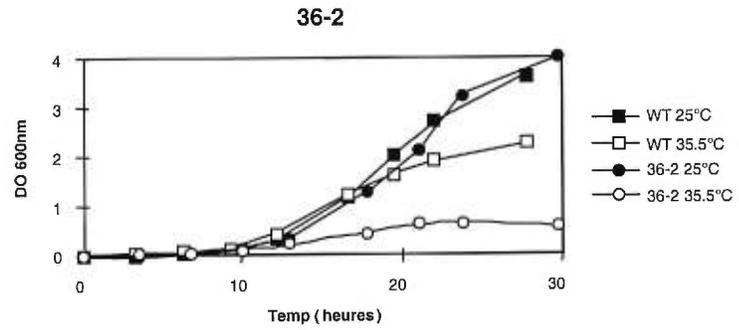
l'intérieur du premier segment transmembranaire et les substitutions Ala466Val et Arg484Lys du mutant ts247-1 se retrouvent de chaque côté du motif Walker A (figure 10).

3.3.3 Caractérisation des mutants thermosensibles

3.3.3.1 Courbes de croissance des mutants thermosensibles

Dans le but d'établir les caractéristiques de croissance des mutants ts36-2, ts111-1 et ts247-1, des courbes de croissance de ces derniers ainsi que de la souche sauvage ont été tracées à température permissive (25°C) et à température restrictive (35.5°C). Pour ce faire, la souche haploïde viable LPY1-12B a été transformée avec les plasmides pRS315/*ATM1*-4.8, pRS315/ts36-2, pRS315/ts111-1 et pRS315/ts247-1. Après la contre-sélection du plasmide pRS316/*ATM1*-4.8 en présence de 5-FOA, des cultures à saturation des différents transformants Leu⁺ poussés dans du milieu SC-leu à température permissive ont été utilisées pour inoculer du milieu SC-leu à une DO₆₀₀ initiale de 0.005 et ces nouvelles cultures ont été incubées à température permissive et à température restrictive. La densité optique a ensuite été mesurée à intervalles réguliers (figure 11). Les résultats de cette expérience montrent que les mutants ts36-2, ts111-1 et ts247-1 ont une croissance comparable à celle de la souche sauvage à température permissive (figure 11). À température restrictive, les trois mutants sont incapables de croître, tandis que la souche sauvage démontre une croissance aussi rapide à température restrictive qu'à température permissive, atteignant cependant une phase stationnaire légèrement moins dense à 35.5°C (figure 11). Il est important de souligner que ces courbes de croissance ont été obtenues à partir de cultures ayant une DO₆₀₀ initiale de 0.005 puisque l'utilisation de DO₆₀₀ plus élevées, par exemple 0.1, ne permettrait pas de mettre en évidence une différence de croissance entre les mutants ts et la souche sauvage. Ces résultats suggèrent que les mutants ts36-2, ts111-1 et ts247-1 sont en mesure de croître à température restrictive durant quelques divisions cellulaires, soit entre quatre et sept divisions dépendant des mutants (résultats non présentés). Il semble que l'apparition de révertants que nous avons observée sur milieu solide avec le mutant ts247-1 (figure 9) ne soit pas détectable en milieu liquide. En effet, même suite à une incubation prolongée de 72 heures à température restrictive, il n'y a pas d'augmentation significative de la DO₆₀₀ pour ce mutant (résultats non présentés). L'apparition de révertants se traduirait par une augmentation drastique et rapide de la

Figure 11. Courbes de croissance des mutants ts36-2, ts111-1 et ts247-1 et de la souche sauvage (WT) à températures permissive (25°C) et restrictive (35.5°C). La souche LPY1-12B ($\Delta atm1::HIS3$ pRS316/ATM1-4.8) a été transformée avec le plasmide pRS315/ATM1-4.8 sauvage ou les plasmides pRS315/ts36-2, pRS315/ts111-1 et pRS315/ts247-1. Après la contre-sélection des plasmides *URA3* en présence de 5-FOA, la DO_{600} des cultures, diluées à une DO_{600} initiale de 0.005, a été mesurée à intervalles réguliers. Ces courbes ont été tracées en utilisant la moyenne de trois expériences indépendantes en duplicata. La déviation standard ne dépassait jamais 18% de la valeur moyenne.

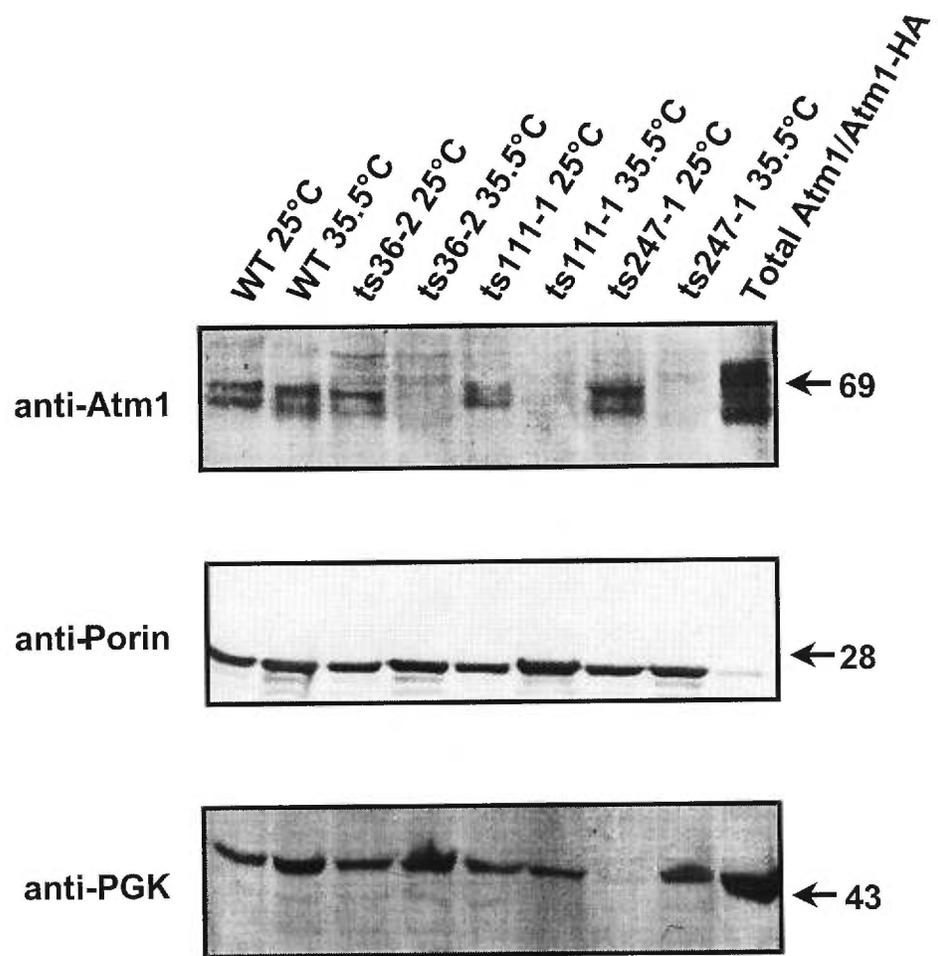


densité optique. Cette différence pourrait être due aux différentes conditions de croissance présentes en milieu solide et celles présentes en milieu liquide.

3.3.3.2 Analyse des mutants thermosensibles au niveau protéique

Afin de caractériser les mutants ts d'Atm1 au niveau protéique, la souche haploïde viable LPY1-12B a été transformée avec les plasmides pRS315/*ATM1*-4.8, pRS315/ts36-2, pRS315/ts111-1 et pRS315/ts247-1. La contre-sélection du plasmide *URA3* pRS316/*ATM1*-4.8 a été effectuée en présence de 5-FOA à température permissive. Des cultures à saturation, dans du milieu contenant de l'acide lactique comme source principale de carbone dans le but de favoriser le développement de mitochondries et d'augmenter ainsi l'enrichissement en mitochondries, ont été utilisées pour inoculer des volumes plus grands du même milieu (Daum *et al.*, 1982). Ces cultures ont été incubées à température permissive (25°C) et restrictive (35.5°C) et les cellules de ces dernières utilisées pour préparer des extraits enrichis en mitochondries. Des quantités égales de ces extraits ont ensuite été séparées par SDS-PAGE sur un gel de 10% et transférées sur des membranes de nitrocellulose. Une analyse de type Western utilisant l'anticorps polyclonal anti-Atm1 purifié a permis de mettre en évidence l'absence marquée d'Atm1 dans les mitochondries des mutants ts à température restrictive tandis qu'à température permissive, les niveaux d'Atm1 sont semblables à ceux détectés dans la souche sauvage (figure 12). Un extrait protéique total contenant à la fois Atm1 et Atm1-HA a également été analysé, nous permettant de confirmer que les deux bandes observées à 69 kDa et 64 kDa dans les extraits enrichis en mitochondries correspondent à Atm1 puisque dans l'extrait protéique total, deux bandes additionnelles de poids moléculaire légèrement supérieur, dues à la présence du triple épitopes HA, sont détectées. L'analyse avec un anticorps monoclonal anti-porin, une protéine présente uniquement à la membrane externe des mitochondries, a servi de contrôle démontrant que les préparations de mitochondries à température restrictive ne sont pas dégradées (figure 12). Ainsi, l'absence d'Atm1 dans les mitochondries des mutants ts36-2, ts111-1 et ts247-1 à température restrictive n'est pas due à une dégradation non-spécifique des protéines. De plus, un enrichissement d'environ dix fois en mitochondries entre les préparations de mitochondries et l'extrait cellulaire total est observé. D'autre part, l'analyse des échantillons avec un anticorps polyclonal anti-PGK, reconnaissant la protéine cytosolique 3-phosphoglycérate kinase, montre que nos préparations de mitochondries, quoiqu'enrichies en mitochondries comparativement à l'extrait cellulaire total, sont

Figure 12. Analyse d'Atm1 dans les mitochondries à températures permissive (25°C) et restrictive (35.5°C). La souche LPY1-12B ($\Delta atm1::HIS3$ pRS316/ATM1-4.8) a été transformée avec le plasmide pRS315/ATM1-4.8 ou les plasmides pRS315/ts36-2, pRS315/ts111-1 et pRS315/ts247-1. Après la contre-sélection des plasmides *URA3* en présence de 5-FOA, des extraits enrichis en mitochondries ont été préparés à partir de cultures à températures permissive (25°C) et restrictive (35.5°C), séparés par SDS-PAGE sur un gel 10% et transférés sur des membranes de nitrocellulose. Ces membranes ont ensuite été soumises à une analyse de type Western avec un anticorps polyclonal anti-Atm1 purifié (dilution 1:250) ou les anticorps monoclonaux anti-porin (dilution 1:1000) et anti-PGK (dilution 1:10000). La taille (kDa) correspondant à des marqueurs de poids moléculaires connus est indiquée à droite.



toutefois contaminées par des quantités variables de protéines cytosoliques (figure 12). Finalement, considérant à la fois l'enrichissement en mitochondries observé, le faible niveau d'expression d'Atm1 lors de la préparation des mitochondries (sur un plasmide centromérique sous son propre promoteur) et la faible affinité de notre anticorps anti-Atm1 polyclonal, il ne nous a pas été possible de déterminer si l'absence d'Atm1 dans les mitochondries à température restrictive est due à une localisation cytosolique ou à une dégradation spécifique de la protéine mutante.

3.4 Atm1 forme des homodimères

3.4.1 Constructions plasmidiques pour les expériences de co-immunoprécipitation

3.4.1.1 Stratégie utilisée pour les expériences de co-immunoprécipitation

Une analyse détaillée du génome complet de *S. cerevisiae*, utilisant l'algorithme TBLASTN (Altschul *et al.*, 1990) avec des séquences de protéines ABC connues, nous a permis de générer un dendrogramme comprenant toutes les protéines ABC présentes chez *S. cerevisiae*. Cette analyse a révélé l'absence de partenaire possible avec qui le 'demi-transporteur' Atm1 pourrait hétérodimériser, cela en comparaison avec les protéines Pxa1 et Pxa2 (Pat1 et Pat2) qui hétérodimérisent (Shani et Valle, 1996) et les protéines Mdl1 et Mdl2 qui potentiellement forment des hétérodimères (Dean *et al.*, 1994) et qui sont très proches de leur partenaire au niveau de la séquence peptidique (figure 13). Nous avons donc émis l'hypothèse qu'Atm1 pourrait fonctionner sous forme d'homodimères, en accord avec le modèle fonctionnel proposé pour les transporteurs ABC (Higgins, 1992) (voir section 1.1.3.1). Afin de déterminer biochimiquement, par des expériences de co-immunoprécipitation, si Atm1 forme des homodimères, nous devons être en mesure de détecter spécifiquement deux formes de la même protéine. Pour ce faire, nous avons décidé d'insérer deux épitopes différents à l'extrémité C-terminale d'Atm1, soit un épitope HA, provenant de l'hémagglutinine A du virus influenza (YPYDVPDYA) (Field *et al.*, 1988) soit un épitope *c-myc* provenant du proto-oncogène *c-myc* (EQKLISEEDL) (Evan *et al.*, 1985) pour lesquels il existe des anticorps monoclonaux commerciaux. Si Atm1 forme des homodimères, l'immunoprécipitation d'Atm1-HA avec un anticorps anti-HA, à partir d'un extrait cellulaire contenant à la fois Atm1-HA et Atm1-MYC, devrait permettre de co-immunoprécipiter Atm1-MYC, cette dernière pouvant être détectée par une analyse de type

Figure 13. Dendrogramme représentant la similarité entre Atm1 et les autres membres de la super-famille des protéines ABC chez *S. cerevisiae*. Un alignement de séquences multiples a été créé avec le programme PILEUP (Genetic Computer Group, Madison, Wisc). La distance entre deux branches horizontales est inversement proportionnelle au niveau de similitude entre les deux séquences protéiques correspondantes. **A:** Transporteurs des sous-classes N-(ABC-TM₆)-C ou N-(ABC-TM₆)₂-C; **B:** Transporteurs des sous-classes N-(TM₆-ABC)-C or N-(TM₆-ABC)₂-C; **C:** Protéines ABC de la famille des facteurs d'élongation.

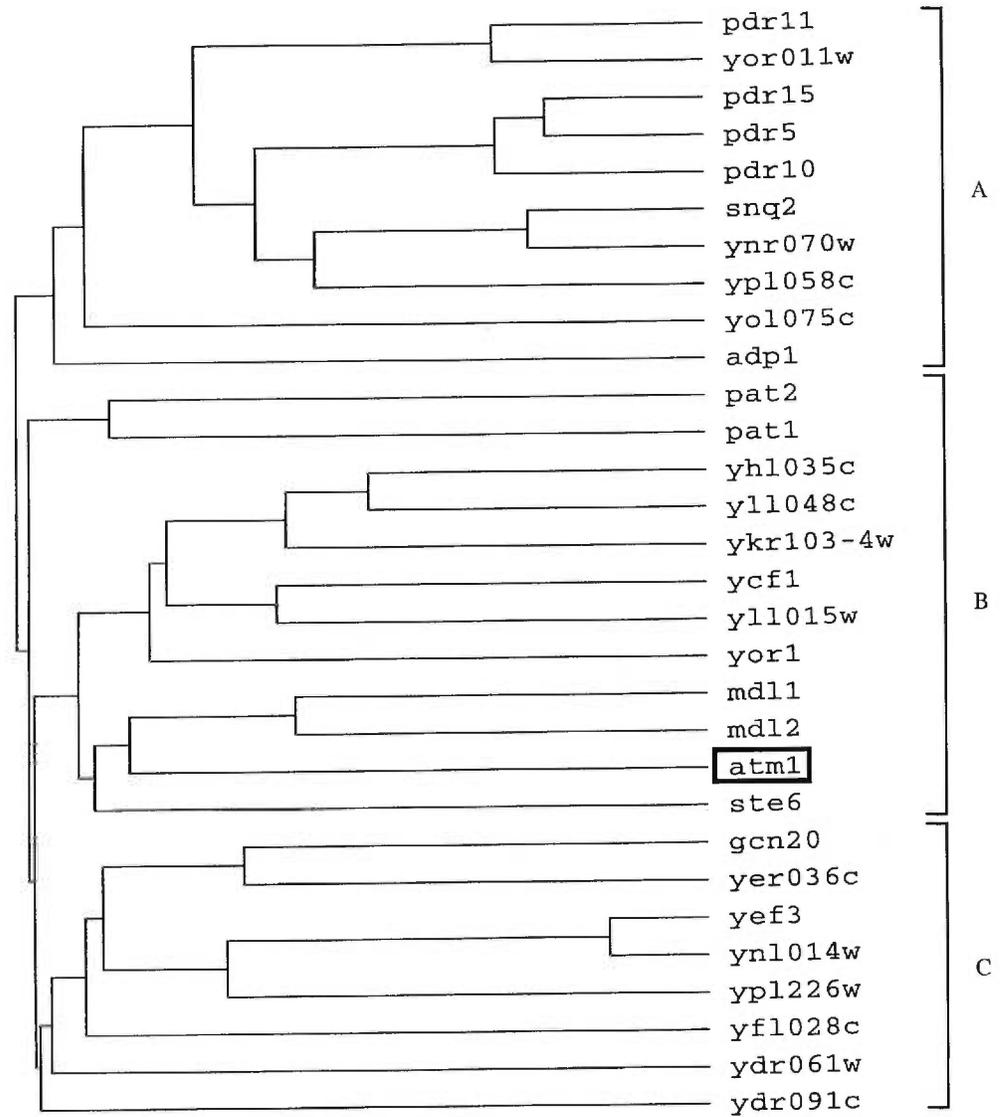
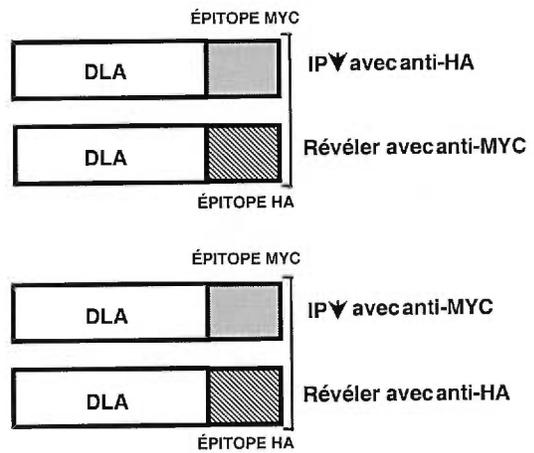
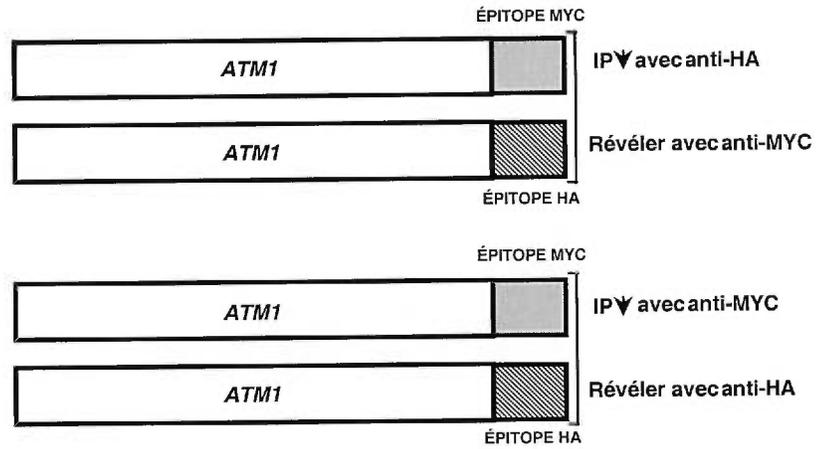


Figure 14. Étiquetage d'Atm1. Des épitopes HA (gris) et *c-myc* (hachurés) ont été insérés en C-terminal d'une forme complète d'Atm1 et d'une forme tronquée ne possédant que le domaine de liaison à l'ATP (DLA). Ces formes étiquetées ont été générées pour être utilisées dans des expériences de co-immunoprécipitation (IP↓). Théoriquement, s'il y a présence d'homodimères d'Atm1, il sera possible en immunoprécipitant avec un anticorps anti-MYC de co-immunoprécipiter la forme *ATMI*-HA qui sera détectable par analyse de type Western avec un anticorps anti-HA. L'inverse est également possible, soit immunoprécipiter avec un anticorps anti-HA et révéler avec un anticorps anti-MYC.



Western du complexe immun avec un anticorps anti-MYC (figure 14). L'inverse est également possible, c'est-à-dire que l'immunoprécipitation d'Atm1-MYC avec un anticorps anti-MYC devrait permettre de co-immunoprécipiter Atm1-HA, cette dernière pouvant être détectée par une analyse de type western du complexe immun avec un anticorps anti-HA (figure 14). Dans un premier temps, nous avons inséré par mutagenèse dirigée un site de restriction *NotI* unique immédiatement en amont du codon de terminaison d'*ATMI* qui avait été préalablement cloné dans le vecteur pAlter-1[®](pAlter/*ATMI*), générant le plasmide pAlter/*ATMI-NotI*. L'introduction d'un site *NotI* dans *ATMI* insère trois acides aminés en C-terminal de la protéine, soient une arginine suivie d'une glycine et d'une arginine. Des fragments d'ADN contenant la séquence codant pour trois épitopes HA ou *c-myc* flanqués de sites de restriction *NotI* ont été isolés des plasmides pMPY-3xHA et pMPY-3xMYC (Schneider *et al.*, 1995) et insérés en phase avec *ATMI* dans le plasmide pAlter/*ATMI-NotI*, générant les plasmides pAlter/*ATMI-HA* et pAlter/*ATMI-MYC*. Les fragments *ATMI-NotI*, *ATMI-HA* et *ATMI-MYC* ont ensuite été clonés dans les vecteurs pRS424 (2 μ , *TRP1*) et pRS425 (2 μ , *LEU2*), générant ainsi les plasmides pRS424/*ATMI-NotI*, pRS424/*ATMI-HA*, pRS424/*ATMI-MYC*, pRS425/*ATMI-NotI*, pRS425/*ATMI-HA* et pRS425/*ATMI-MYC*.

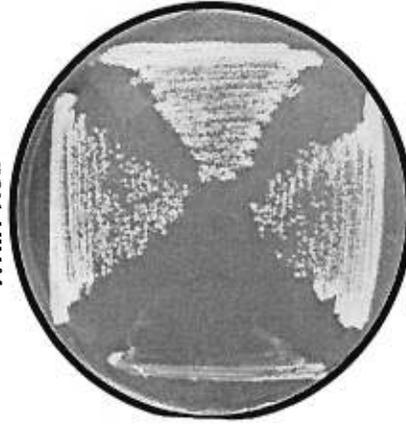
3.4.1.2 Les formes étiquetées d'Atm1 sont fonctionnelles

Afin de vérifier si les formes d'Atm1 étiquetées étaient fonctionnelles, nous avons transformé les plasmides pRS424, pRS424/*ATMI-HA*, pRS424/*ATMI-MYC*, pRS424/*ATMI-NotI*, pRS425, pRS425/*ATMI-HA*, pRS425/*ATMI-MYC* et pRS425/*ATMI-NotI* dans la souche LPY1-12B ($\Delta atm1::HIS3$ pRS316/*ATMI-4.8*). Les transformants ont été sélectionnés sur milieu SC-ura-leu (série des plasmides pRS425) ou sur milieu SC-ura-trp (série des plasmides pRS424) et ensuite striés sur milieu SC-leu ou SC-trp contenant du 5-FOA. Nous avons pu observer qu'après la perte du plasmide *URA3* contenant la copie fonctionnelle d'*ATMI* (pRS316/*ATMI-4.8*), les différentes formes d'Atm1 contenant le triple épitope HA, le triple épitope *c-myc* ou uniquement le site de restriction *NotI* permettent de compenser pour la perte d'Atm1 (figure 15). Par ailleurs, le vecteur seul n'est pas capable de compenser pour l'absence d'Atm1, confirmant que les formes étiquetées présentes sur les plasmides pRS424 et pRS425 sont responsables de la complémentation (figure 15). Ces résultats indiquent donc que l'introduction dans Atm1 d'un site *NotI* ou des triples épitopes HA et *c-myc* n'altère pas sa fonction. De plus, ces

Figure 15. Les formes étiquetées d'Atm1 pleine longueur sont fonctionnelles. La souche LPY1-12B ($\Delta atm1::HIS3$ pRS316/*ATM1*-4.8) a été transformée avec les plasmides pRS424 (2 μ , *TRP1*), pRS424/*ATM1*-HA, pRS424/*ATM1*-MYC, pRS424/*ATM1*-NotI et les plasmides pRS425 (2 μ , *LEU2*), pRS425/*ATM1*-HA, pRS425/*ATM1*-MYC et pRS425/*ATM1*-Not. Les transformant Ura⁺ Leu⁺ ou Ura⁺ Trp⁺ ont été sélectionnés et striés sur milieu SC-leu ou SC-trp contenant du 5-FOA et incubés 3 jours à 30°C.

pRS424

ATM1-NotI



Vecteur

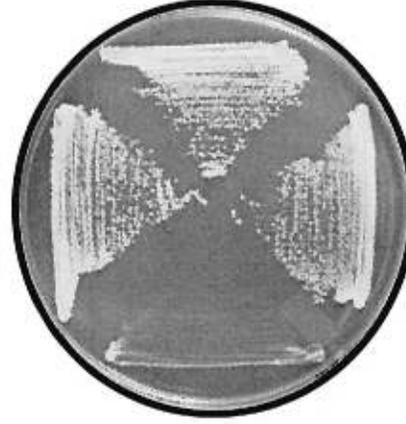
ATM1-HA Vecteur

ATM1-MYC

SD-TRP 5-FOA

pRS425

ATM1-NotI



ATM1-HA

ATM1-MYC

SD-LEU 5-FOA

résultats indiquent que la surexpression d'Atm1 à partir d'un vecteur 2 μ n'affecte pas la croissance des cellules (figure 15). La démonstration que les formes étiquetées d'Atm1 sont fonctionnelles suggère qu'elles sont correctement localisées à la membrane interne de la mitochondrie et qu'elles sont donc adéquates pour les expériences de co-immunoprécipitation.

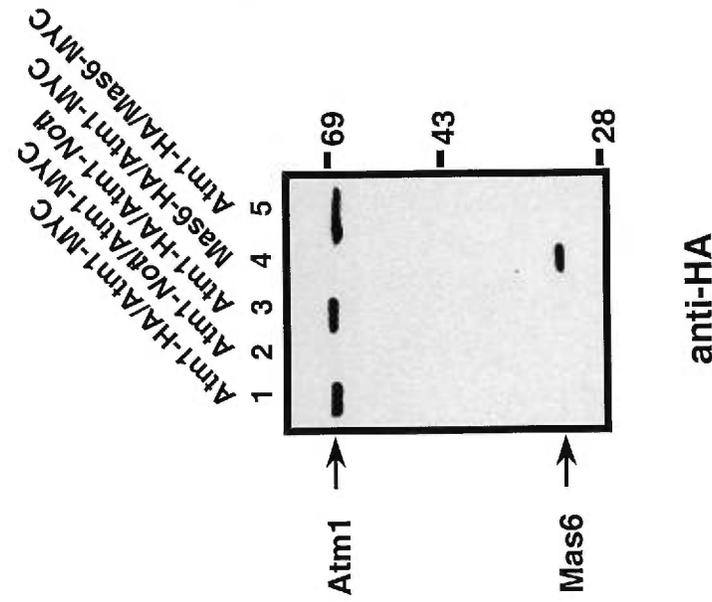
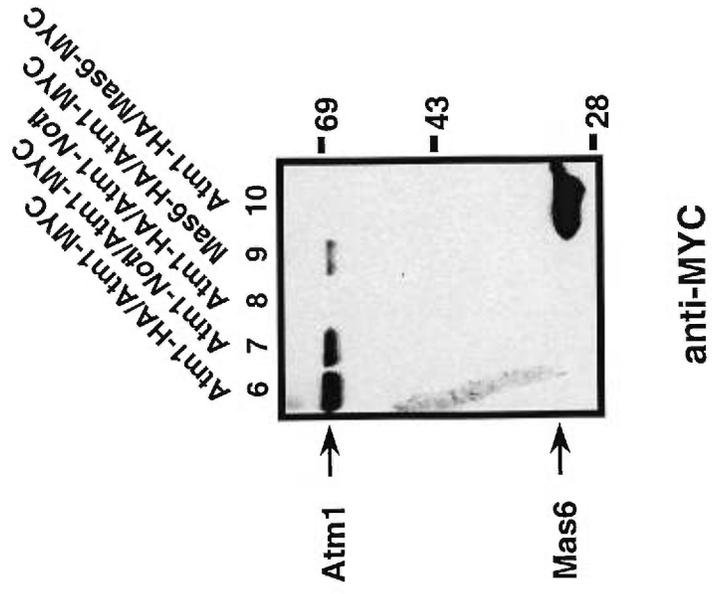
3.4.1.3 Construction d'un contrôle pour démontrer la spécificité de l'interaction

Afin de s'assurer que la co-immunoprécipitation potentiellement observée ne serait pas due à une interaction non-spécifique causée par la surexpression des formes étiquetées d'Atm1 sur des plasmides 2 μ , nous avons décidé d'utiliser la protéine Mas6 (Tim23) de *S. cerevisiae* comme contrôle. Tout comme Atm1, Mas6 est localisée à la membrane interne des mitochondries et possède plusieurs segments transmembranaires prédits (Bauer *et al.*, 1996). Pour ce faire, nous avons amplifié le cadre de lecture ouvert de Mas6 par PCR en utilisant deux oligonucléotides dont l'un incorporait un site de restriction *NotI* unique en 3' (voir section 2.13). Le produit de PCR a été inséré dans les vecteurs p424GPD (2 μ , *TRP1*) et p425GPD (2 μ , *LEU2*) sous le contrôle du promoteur du gène de la glyceraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GPD) dans le but d'assurer un haut niveau d'expression de la protéine, générant ainsi les plasmides p424GPD/Mas6-*NotI* et p425GPD/Mas6-*NotI* (Mumberg *et al.*, 1995). Des fragments d'ADN contenant la séquence codant pour les triples épitopes HA ou *c-myc* flanqués de sites de restriction *NotI* ont ensuite été insérés en phase avec Mas6, pour générer les plasmides p424GPD/Mas6-HA, p424GPD/Mas6-MYC, p425GPD/Mas6-HA et p425GPD/Mas6-MYC.

3.4.1.4 Les protéines étiquetées sont correctement exprimées

Nous avons ensuite voulu vérifier si les protéines Atm1 et Mas6 étiquetées avec les épitopes HA et *c-myc* étaient bien exprimées. Pour ce faire, la souche LPY1-12B (*$\Delta atm1::HIS3$ pRS316/ATM1-4.8*) a été co-transformée avec les plasmides pRS424/Atm1-HA et pRS425/Atm1-MYC, pRS424/Atm1-*NotI* et pRS425/Atm1-MYC, pRS424/Atm1-HA et pRS425/Atm1-*NotI*, p424GPD/Mas6-HA et pRS425/Atm1-MYC et également pRS424/Atm1-HA et p425GPD/Mas6-MYC. Les transformants Ura⁺ Leu⁺ Trp⁺ ont été sélectionnés et la perte du plasmide *URA3 pRS316/ATM1-4.8* induite en présence de 5-FOA. Les doubles transformants Leu⁺ Trp⁺ ont été cultivés en milieu sélectif et des extraits

Figure 16. Les formes étiquetées d'Atm1 et de Mas6 sont exprimées. 60 µg d'extraits protéiques totaux provenant de la souche LPY1-12B ($\Delta atm1::HIS3$ pRS316/ATM1-4.8) transformée soit avec les plasmides pRS424/Atm1-HA et pRS425/Atm1-MYC, pRS424/Atm1-NotI et pRS425/Atm1-MYC, pRS424/Atm1-HA et pRS425/Atm1-NotI, p424GPD/Mas6-HA et pRS425/Atm1-MYC et finalement pRS424/Atm1-HA et p425GPD/Mas6-MYC ont été séparés par SDS-PAGE sur un gel 10%, transférés sur des membranes de nitrocellulose et soumis à une analyse de type Western avec un anticorps anti-HA et un anticorps anti-MYC. La taille (kDa) correspondant à des marqueurs de poids moléculaires connus est indiquée à droite tandis que les bandes correspondant à Atm1 et à Mas6 sont indiquées à gauche.



cellulaires totaux de ces cultures ont été préparés. Des quantités égales de protéines provenant de chacun de ces extraits ont ensuite été séparées sur gel en duplicata, transférées sur des membranes de nitrocellulose et analysées en Western avec un anticorps anti-HA (figure 16, panneau de gauche) et un anticorps anti-MYC (figure 16, panneau de droite). Les résultats de cette expérience montrent que i) la souche transformée avec pRS424/Atm1-HA et pRS425/Atm1-MYC exprime à la fois Atm1-HA et Atm1-MYC au poids moléculaire attendu d'environ 69 kDa (figure 16, lignes 1 et 6); ii) dans la souche transformée avec pRS424/Atm1-*NotI* et pRS425/Atm1-MYC nous détectons uniquement la forme Atm1-MYC (figure 16, lignes 2 et 7); iii) dans la souche transformée avec pRS424/Atm1-HA et pRS425/Atm1-*NotI* nous détectons uniquement Atm1-HA (figure 16, lignes 3 et 8); iv) la souche transformée avec p424GPD/Mas6-HA et pRS425/Atm1-MYC exprime à la fois Atm1-MYC et Mas6-HA au poids moléculaire attendu d'environ 28 kDa (figure 16, lignes 4 et 9) et v) la souche transformée avec pRS424/Atm1-HA et p425GPD/Mas6-MYC exprime à la fois Atm1-HA et Mas6-MYC (figure 16, lignes 5 et 10). Ces résultats démontrent que les protéines étiquetées sont exprimées correctement et ce, à des niveaux facilement détectables par analyse de type Western. Par conséquent, les souches exprimant les différentes combinaisons de protéines étiquetées sont adéquates pour entreprendre les expériences de co-immunoprécipitation.

3.4.2 Co-immunoprécipitations

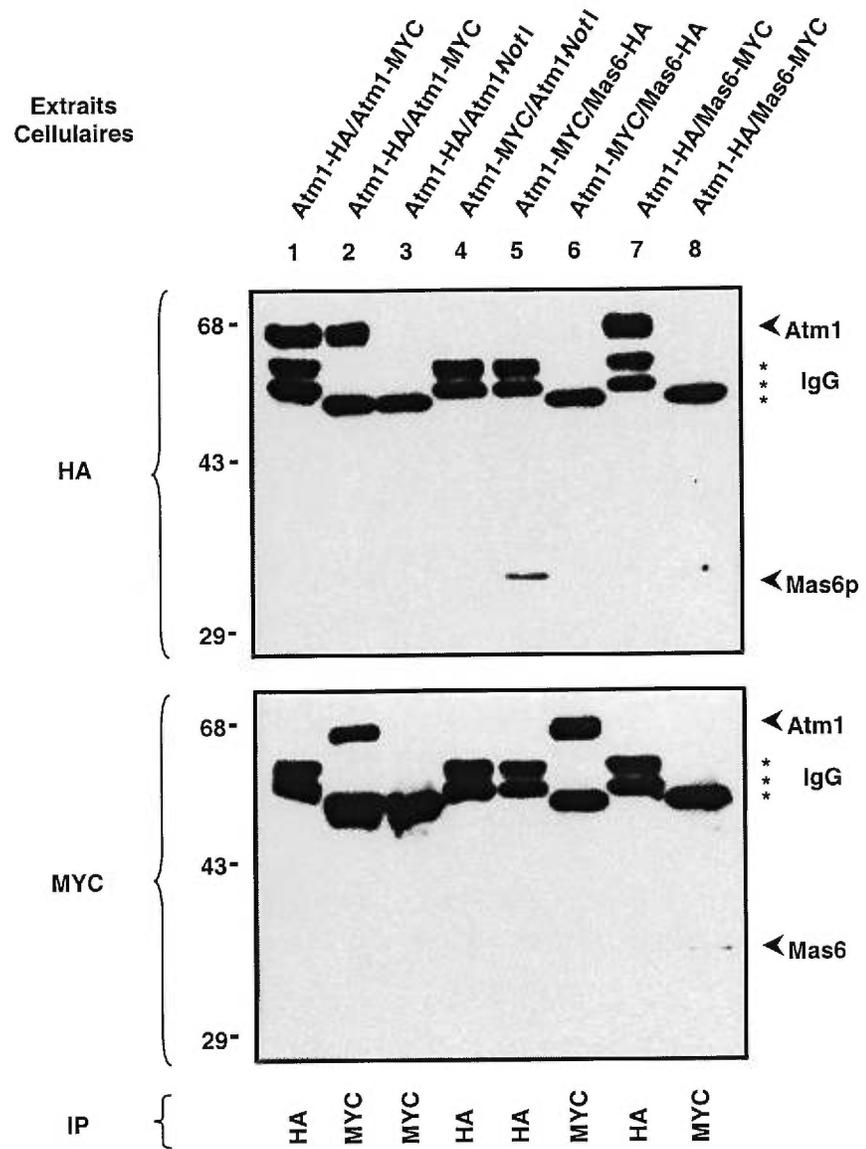
3.4.2.1 Co-immunoprécipitations des formes étiquetées d'Atm1

Des extraits protéiques totaux provenant de souches surexprimant Atm1-HA et Atm1-MYC, Atm1-*NotI* et Atm1-MYC, Atm1-HA et Atm1-*NotI*, Mas6-HA et Atm1-MYC ou Atm1-HA et Mas6-MYC ont été préparés et utilisés dans des expériences de co-immunoprécipitation. Ces extraits protéiques ont été soumis, après solubilisation avec un détergent non-ionique, à une immunoprécipitation soit avec un anticorps anti-HA, soit avec un anticorps anti-MYC. Les complexes immuns ont ensuite été récoltés à l'aide de billes de Protéine A Sépharose, séparés sur gel en duplicata, transférés sur des membranes de nitrocellulose et analysés en Western avec un anticorps anti-HA et un anticorps anti-MYC (figure 17). Nos résultats démontrent qu'en immunoprécipitant un extrait cellulaire total contenant à la fois Atm1-HA et Atm1-MYC avec un anticorps anti-MYC, nous sommes capables de détecter en Western la forme Atm1-MYC avec un anticorps anti-MYC mais

également la forme Atm1-HA avec un anticorps anti-HA (figure 17, ligne 2). Ces résultats démontrent donc la présence d'homodimères Atm1-HA/Atm1-MYC, probablement via une interaction physique directe entre les deux formes étiquetées d'Atm1. Cependant, en immunoprécipitant un extrait cellulaire contenant à la fois Atm1-HA et Atm1-MYC avec un anticorps anti-HA, nous ne sommes pas en mesure de détecter par analyse de type Western, la forme Atm1-MYC. Puisque nous sommes capables d'immunoprécipiter la forme Atm1-HA en utilisant un anticorps anti-HA (figure 17, lignes 2 et 7), il est possible que l'épitope HA ne puisse pas être immunoprécipité sous forme de dimère Atm1-HA/Atm1-MYC, n'étant pas accessible à l'anticorps anti-HA. L'épitope *c-myc* de son côté serait accessible sous forme de dimère Atm1-HA/Atm1-MYC et ainsi immunoprécipitable avec un anticorps anti-MYC.

Afin de confirmer que l'interaction physique observée entre Atm1-HA et Atm1-MYC est spécifique et non pas due à une interaction non-spécifique entre Atm1-HA et les IgG ou les billes de Protéine A Sépharose, nous avons immunoprécipité un extrait cellulaire contenant à la fois Atm1-HA et Atm1-*NotI* avec un anticorps anti-MYC, à titre de contrôle négatif. Une analyse de type Western du complexe immun avec un anticorps anti-HA ne nous permet pas de détecter la forme Atm1-HA et confirme ainsi la spécificité de l'interaction observée entre Atm1-HA et Atm1-MYC (figure 17, ligne 3). D'autre part, afin de nous assurer que l'interaction observée entre Atm1-HA et Atm1-MYC n'est pas due i) à l'immunoprécipitation non-spécifique de la membrane interne des mitochondries avec l'anticorps anti-MYC, qui indirectement permettrait de détecter la forme Atm1-HA en absence d'interaction physique entre les deux protéines; ii) à l'interaction entre deux protéines hydrophobes possédant plusieurs segments transmembranaires ou iii) à la surexpression des formes étiquetées d'Atm1 sur des plasmides 2 μ , nous avons effectué des immunoprécipitations sur des extraits cellulaires totaux contenant à la fois Atm1-HA et Mas6-MYC ou Atm1-MYC et Mas6-HA. Suite à l'immunoprécipitation de ces extraits avec soit un anticorps anti-HA, soit un anticorps anti-MYC, une analyse de type Western des complexes immuns ne nous a pas permis de détecter une co-immunoprécipitation entre Atm1-HA et Mas6-MYC ou Atm1-MYC et Mas6-HA (figure 17, lignes 5-8). Ces résultats confirment à nouveau la spécificité de l'interaction observée entre Atm1-HA et Atm1-MYC (figure 17, ligne 2). Cependant, il est vrai qu'avec les conditions de co-immunoprécipitation utilisées, que Mas6 ne semble pas être immunoprécipitée aussi efficacement que les formes étiquetées d'Atm1 avec chacun des deux anticorps (figure 17,

Figure 17. Co-immunoprécipitation des formes complètes d'Atm1. Des extraits protéiques totaux provenant de souches surexprimant Atm1-HA et Atm1-MYC, Atm1-HA et Atm1-*NotI*, Atm1-*NotI* et Atm1-MYC, Atm1-HA et Atm1-*NotI*, Mas6-HA et Atm1-MYC ou Atm1-HA et Mas6-MYC ont été utilisés dans des expériences de co-immunoprécipitation. Les extraits protéiques (500 µg) ont été soumis, après solubilisation, à une immunoprécipitation avec un anticorps anti-HA ou un anticorps anti-MYC, tel qu'indiqué au bas de la figure. Les complexes immuns ont été récoltés à l'aide de billes de Protéine A Sépharose, séparés par SDS-PAGE sur un gel 10%, transférés sur des membranes de nitrocellulose et analysés par Western avec un anticorps anti-HA et un anticorps anti-MYC, tel qu'indiqué à gauche. La position des marqueurs de poids moléculaires connus (kDa) est indiquée à gauche tandis que les bandes correspondant à Atm1, Mas6 et aux différentes chaînes d'immunoglobulines (IgG) sont indiquées à droite.

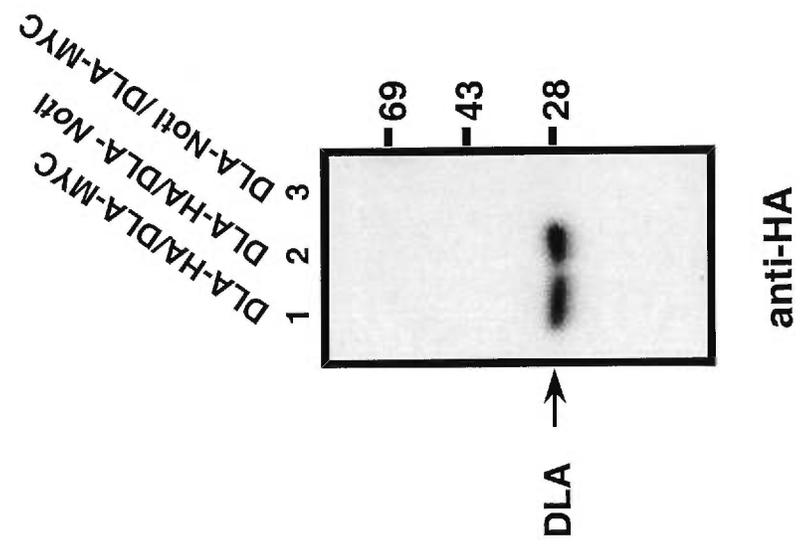
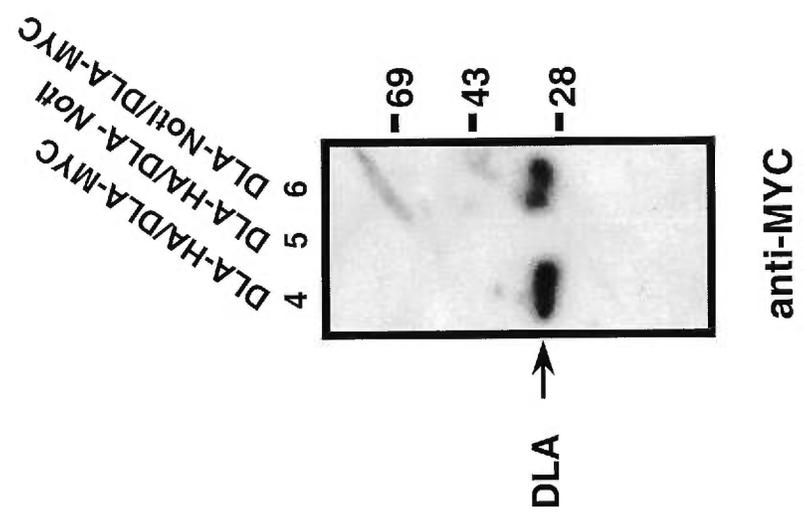


lignes 5 et 8). Par-contre, Mas6 est aussi facilement détectable qu'Atm1 en Western, suggérant qu'elle est exprimée à des niveaux similaires dans les extraits utilisés (figure 16) et donc, avec les quantités d'Atm1 qui ont été immunoprécipitées (figure 17, lignes 6 et 7), s'il y avait présence d'une interaction non-spécifique entre Atm1 et Mas6, nous aurions été en mesure de la détecter suite à une analyse de type Western. Globalement, ces résultats démontrent une interaction physique spécifique entre Atm1-HA et Atm1-MYC, ce qui concorde avec le modèle fonctionnel des 'demi-transporteurs' ABC selon lequel ces derniers doivent dimériser afin d'être fonctionnels (Higgins, 1992). Ces résultats constituent la première démonstration biochimique qu'un 'demi-transporteur' ABC a la capacité d'homodimériser.

3.4.2.2 Co-immunoprécipitations de la partie C-terminale d'Atm1

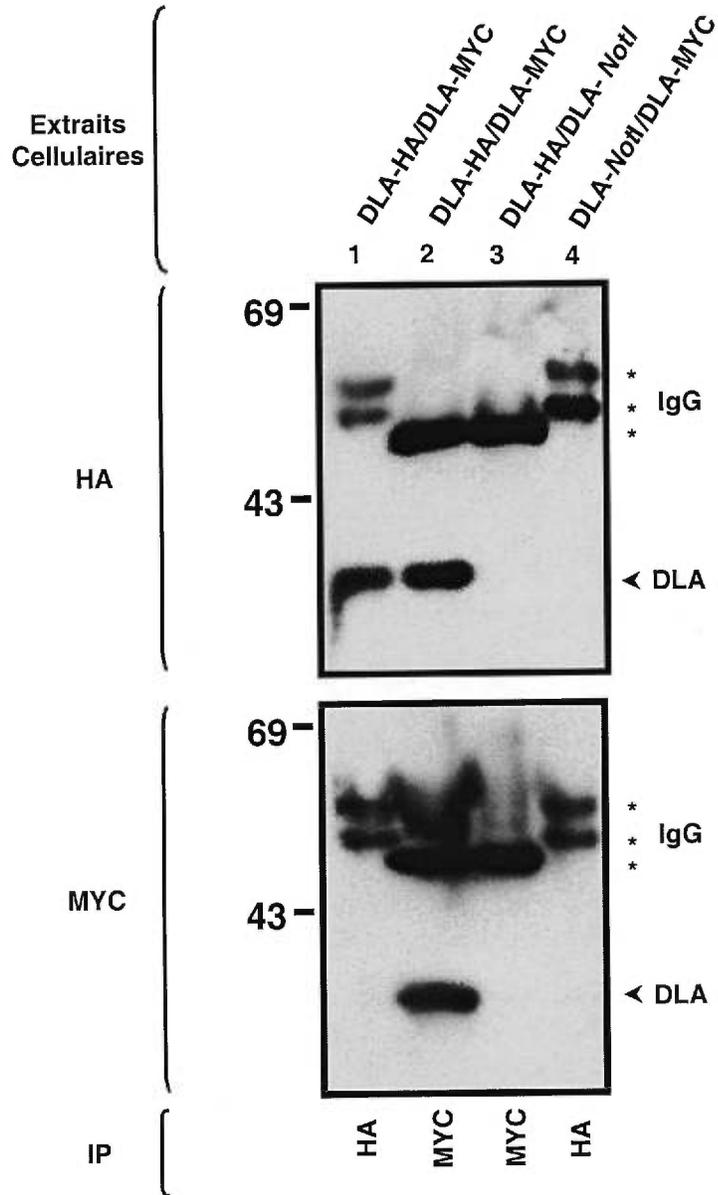
Dans le but de déterminer quel(s) domaine(s) d'Atm1 médie(nt) l'homodimérisation observée avec les formes étiquetées complètes, nous avons construit des plasmides exprimant seulement les DTM ou les DLA d'Atm1 étiquetés avec les triples épitopes HA et *c-myc*. Pour ce faire, nous avons amplifié par PCR la région d'*ATM1* codant pour le DTM (résidus 1 à 395) et la région codant pour le DLA (résidus 396 à 690) d'Atm1 en utilisant deux oligonucléotides dont l'un incorporait un site de restriction *NotI* unique en 3'. Ces produits de PCR ont été clonés dans les vecteurs p424GPD (2 μ , *TRP1*) et p425GPD (2 μ , *LEU2*) sous le contrôle du promoteur du gène de la glycéraldéhyde-3-phosphate déshydrogénase (GPD), générant les plasmides p424GPD/DLA-*NotI*, p425GPD/DLA-*NotI*, p424GPD/DTM-*NotI* et p425GPD/DTM-*NotI*. Des fragments d'ADN codant pour les triples épitopes HA ou *c-myc* flanqués de sites de restriction *NotI* ont ensuite été insérés en phase avec le DTM ou le DLA, générant les plasmides p424GPD/DLA-HA, p424GPD/DLA-MYC, p425GPD/DLA-HA, p425GPD/DLA-MYC, p424GPD/DTM-HA, p424GPD/DTM-MYC, p425GPD/DTM-HA et p425GPD/DTM-MYC. La souche LPY1-12B (*Δatm1::HIS3* pRS316/*ATM1*-4.8) a été co-transformée avec les plasmides p424GPD/DLA-HA et p425GPD/DLA-MYC, p424GPD/DLA-HA et p425GPD/DLA-*NotI*, p424GPD/DLA-*NotI* et p425GPD/DLA-MYC, p424GPD/DTM-HA et p425GPD/DTM-MYC, p424GPD/DTM-HA et p425GPD/DTM-*NotI* et également p424GPD/DTM-*NotI* et p425GPD/DTM-MYC. Les transformants Ura⁺ Leu⁺ Trp⁺ ont été sélectionnés et la perte du plasmide *URA3* pRS316/*ATM1*-4.8 a été induite en présence de 5-FOA. Les doubles transformants Leu⁺ Trp⁺ ont été cultivés en milieu sélectif et des extraits cellulaires totaux

Figure 18. Les domaines de liaison à l'ATP d'Atm1 étiquetés sont exprimés. 25 µg d'extraits protéiques totaux provenant de la souche LPY1-12B ($\Delta atm1::HIS3$ pRS316/*ATM1*-4.8) transformée avec les plasmides p424GPD/DLA-HA et p425GPD/DLA-MYC, p424GPD/DLA-HA et p425GPD/DLA-NotI et également p424GPD/DLA-NotI et p425GPD/DLA-MYC ont été séparés par SDS-PAGE sur un gel 10%, transférés sur des membranes de nitrocellulose et analysés en Western avec un anticorps anti-HA et un anticorps anti-MYC. La position des marqueurs de poids moléculaires connus (kDa) est indiquée à droite tandis que les bandes correspondant aux DLA d'Atm1 sont indiquées à gauche.



de ces cultures ont été préparés. Des quantités égales de protéines provenant de chacun de ces extraits ont été séparées sur gel en duplicata, transférées sur des membranes de nitrocelluloses et analysées en Western avec un anticorps anti-HA (figure 18, panneau de gauche) et un anticorps anti-MYC (figure 18, panneau de droite). Les résultats de cette expérience montrent que i) la souche transformée avec p424GPD/DLA-HA et p425GPD/DLA-MYC exprime à la fois DLA-HA et DLA-MYC au poids moléculaire attendu d'environ 28 kDa (figure 18, lignes 1 et 4); ii) la souche transformée avec p424/DLA-HA et p425/DLA-*NotI* exprime uniquement la forme DLA-HA (figure 18, lignes 2 et 5) et iii) la souche transformée avec p424/DLA-*NotI* et p425GPD/DLA-MYC exprime uniquement la forme DLA-MYC (figure 18, lignes 3 et 6). Ces résultats démontrent que les DLA étiquetés sont exprimés correctement et ce, à des niveaux facilement détectables par analyse de type Western. Malheureusement, les DTM étiquetés ne sont pas détectables au niveau protéique, quoique de forts niveaux d'ARN soient détectés par analyse de type Northern et n'ont, par conséquent, pas pu être utilisés dans les expériences de co-immunoprécipitation (résultats non présentés). Ceci pourrait être causé par des mutations introduites lors de la réaction de PCR menant à des protéines tronquées n'ayant pas l'épitope HA ou MYC ou bien à une version peptidique étiquetée instable. Les extraits protéiques exprimant les différentes combinaisons de DLA étiquetés ont été soumis à une immunoprécipitation et les complexes immuns récoltés et analysés en Western, de la même façon qu'avec les formes complètes d'Atm1 (section 3.4.2.1). Nos résultats démontrent qu'en immunoprécipitant un extrait cellulaire contenant à la fois DLA-HA et DLA-MYC avec un anticorps anti-MYC, nous sommes capable de détecter dans l'immunoprécipité la forme DLA-MYC mais également la forme DLA-HA (figure 19, ligne 2). Ceci suggère qu'il y a présence d'homodimères DLA-HA/DLA-MYC, probablement via une interaction physique directe entre les deux formes étiquetées du DLA. Encore une fois cependant, en immunoprécipitant un extrait cellulaire contenant à la fois DLA-HA et DLA-MYC avec un anticorps anti-HA, nous n'arrivons pas à détecter la forme Atm1-MYC en analyse de type Western avec un anticorps anti-MYC (figure 19, ligne 1). Ceci pourrait être à nouveau attribuable au fait que l'épitope HA ne puisse pas être immunoprécipité sous forme de dimère DLA-HA/DLA-MYC, n'étant pas accessible à l'anticorps anti-HA. L'immunoprécipitation d'un extrait cellulaire exprimant à la fois DLA-HA et DLA-*NotI* avec un anticorps anti-MYC ne nous permet pas de détecter la forme Atm1-HA suite à une analyse de type Western avec un anticorps anti-HA de

Figure 19. Co-immunoprécipitation du DLA d'Atm1. Des extraits protéiques totaux provenant de souches surexprimant soit DLA-HA et DLA-MYC, DLA-HA et DLA-*NotI* ou DLA-*NotI* et DLA-MYC ont été utilisés dans des expériences de co-immunoprécipitation. Les extraits protéiques (200 µg) ont été soumis, après solubilisation, à une immunoprécipitation avec un anticorps anti-HA ou un anticorps anti-MYC, tel qu'indiqué au bas de la figure. Les complexes immuns ont été récoltés à l'aide de billes de Protéine A[®]Sépharose, séparés par SDS-PAGE 8%, transférés sur des membranes de nitrocellulose et analysés par Western avec un anticorps anti-HA et un anticorps anti-MYC, tel qu'indiqué à gauche de la figure. La position des marqueurs de poids moléculaires connus (kDa) est indiquée à gauche tandis que les bandes correspondant au DLA d'Atm1 et aux différentes chaînes d'immunoglobulines (IgG) sont indiquées à droite.



l'immunoprécipité, confirmant ainsi la spécificité de l'interaction observé entre DLA-HA et DLA-MYC (figure 19, ligne 3). Globalement, ces résultats confirment qu'Atm1 a la capacité de former des homodimères et que son DLA est, du moins en partie, impliqué dans cette interaction.

CHAPITRE 4. DISCUSSION

4.1 Structure et fonction d'Atm1: mise à jour

La protéine Atm1 de *S. cerevisiae* représente le seul transporteur ABC identifié jusqu'à présent qui est essentiel pour la survie de la cellule (Leighton et Schatz, 1995b). Atm1 est membre d'un sous-groupe de transporteurs ABC qui inclut, entre autres, les P-glycoprotéines impliquées dans la résistance des cellules aux agents anticancéreux (Michaelis et Berkower, 1995). Le caractère essentiel d'Atm1 procure un phénotype avantageux pour effectuer une analyse des relations structure-fonction qui existent chez ce transporteur. Les informations obtenues sur Atm1 pourraient également nous permettre de mieux comprendre la structure et la fonction des autres membres du sous-groupe de transporteurs auquel appartient Atm1.

4.1.1 Analyse de la séquence peptidique d'Atm1

Nous avons effectué une étude détaillée de la séquence d'Atm1, une telle étude n'ayant pas été publiée lors du clonage d'*ATM1* (Leighton et Schatz, 1995b). Le gène *ATM1* code pour une protéine de 690 acides aminés ayant un poids moléculaire prédit, avant le clivage du signal de localisation mitochondrial, de 77.5 kDa (SWISS-PROT P40416) et un point isoélectrique de 10.42, calculé à l'aide du programme ISOELECTRIC (Genetic Computer Group, Madison, Wisc). La protéine Atm1 possède une structure caractéristique d'un sous-groupe de transporteurs ABC dont la conformation est de type N-(TM₆-ABC)-C ou N-(TM₆-ABC)₂-C (figures 1 et 10) (Michaelis et Berkower, 1995). L'algorithme TMpred (Hofmann et Stoffel, 1993) prévoit avec une forte probabilité six segments transmembranaires dans la partie N-terminale d'Atm1; leur position dans la protéine est illustrée à la figure 10 (TM1-TM6). Le domaine C-terminal est hydrophile et comprend les motifs Walker A, Walker B (Walker *et al.*, 1982) et la 'Signature ABC' (PROSITE, entrée PS00211) (Bairoch, 1992). Le motif Walker A d'Atm1 a comme séquence GSSGSGKS (positions 469 à 476) qui correspond exactement à la séquence consensus GxxGxGKS/T (Walker *et al.*, 1982) (figure 10). Le motif Walker B a comme séquence RVLLKNARIMFFDEATSALD (positions 586 à 605) qui concorde également avec le consensus Rx₍₆₋₈₎ΘΘΘΘD, où Θ représente un acide aminé hydrophobe, suivi de la séquence EATSALD (en caractères gras) qui est hautement conservée chez le sous-groupe de transporteurs ABC dont Atm1 fait partie (Michaelis et Berkower, 1995). La 'Signature

ABC' ISGGE (positions 574 à 578) est présente entre les motifs Walker A et Walker B mais diverge de la séquence consensus LSGGQ par la présence d'une isoleucine et d'un acide glutamique (soulignés) au lieu d'une leucine et d'une glutamine (soulignées) (figure 10) (PROSITE, entrée PS00211) (Bairoch, 1992). Un motif Cys-Pro-Val (CPV) est présent dans le signal de localisation mitochondrial (positions 7 à 9) (figure 10). Il a été démontré qu'un tel motif a la capacité de lier l'hème et qu'il est impliqué dans la régulation de l'activité transcriptionnelle de Hap1 ainsi que dans la régulation de la localisation de la δ -aminolevulinate synthase à la mitochondrie (Zhang et Guarente, 1994; Lathrop et Timko, 1993; Fytlovich *et al.*, 1993). Ce motif pourrait donc également être impliqué dans le contrôle de la localisation mitochondriale d'Atm1 ou dans la régulation de sa fonction.

Nous avons effectué des recherches dans différentes bases de données dans le but d'identifier les transporteurs ABC partageant une forte homologie de séquence avec Atm1. Des analyses utilisant l'algorithme TBLASTN (Altschul *et al.*, 1990) nous ont permis d'identifier deux protéines fortement homologues à Atm1, encodées par des gènes présents sur les clones d'ADN génomique AJ003004 et Z99168 provenant respectivement de *Rattus norvegicus* et *S. pombe* (Tableau 2). Ces protéines possèdent respectivement 62% et 47% de similitude et 52% et 36% d'identité avec Atm1. De plus, deux protéines fortement homologues à Atm1 ont été identifiées, soit la protéine murine mABC7 (Genbank U43892) (Savary *et al.*, 1997) et la protéine humaine hABC7 (Shimada *et al.*, 1998) qui possèdent respectivement 57% et 50% d'identité avec Atm1 et 92% d'identité entre elles. Ces quatre protéines pourraient être les orthologues d'Atm1 considérant l'homologie beaucoup plus grande existant entre Atm1 et ces dernières comparativement aux autres protéines présentes dans le Tableau 2. La fonction biologique et la localisation sub-ellulaire de ces protéines n'ont cependant pas encore été caractérisées. Il serait donc intéressant d'évaluer si l'homologie retrouvée au niveau de la séquence protéique et de la structure chez ces protéines se traduit en une homologie de fonction. Pour ce faire, nous pourrions déterminer la capacité de ces quatre protéines à compenser pour l'absence d'Atm1 en utilisant le système de 'plasmid shuffling' que nous avons mis au point. Atm1 possède également une forte homologie avec les protéines Hmt1, HlyB et *pfmdr2* de *P. falciparum* mais à un niveau plus bas qu'avec celles encodées par les gènes présents sur les clones Z99168 et AJ003004 et les protéines hABC7 et mABC7 (Tableau 2). Les moitiés N-terminales et C-terminales de la P-glycoprotéine humaine (MDR1) et de Ste6 et aussi les protéines

Tableau 2. Pourcentages d'identité et de similitude entre Atm1 et ses plus proches homologues. Les pourcentages de similitude, c'est-à-dire les résidus identiques et les résidus conservés, et les pourcentages d'indidentité entre Atm1 et ses plus proches homologues ont été calculés en utilisant le programme GAP (Genetic Computer Group, Madison, Wisc). Les séquences peptidiques utilisées sont celles d'Atm1 de *S. cerevisiae* (SWISS-PROT P40416), celle traduite d'un clone génomique de *S. pombe* (Genbank Z99168), celle traduite d'un clone génomique de *M. musculus* (Genbank U43892), celle traduite d'un clone génomique de *R. norvegicus* (Genbank AJ003004), d'Hmt1 de *S. pombe* (SWISS-PROT Q02592), de *pfmdr2* de *P. falciparum* (Genbank PFU04640), d'HlyB d'*E. coli* (SWISS-PROT P40416), de MDR1 d'*H. sapiens* (SWISS-PROT P08183) et de Ste6, Mdl1 et Mdl2 de *S. cerevisiae* (SWISS-PROT P12866, P33310 et P33311, respectivement).

Tableau 2. Pourcentages d'identité et de similitude entre Atm1 et ses plus proches homologues.

Protéine	Organisme	% de similitude	% d'identité
Z99168	<i>S. pombe</i>	62	52
hABC7	<i>H. sapiens</i>	nd	49
mABC7	<i>M. musculus</i>	57	46
AJ003004	<i>R. norvegicus</i>	47	36
Hmt1	<i>S. pombe</i>	42	32
<i>pfmdr2</i>	<i>P. faciparum</i>	40	30
HlyB	<i>E. coli</i>	39	29
P-glycoprotéine (N)	<i>H. sapiens</i>	35	26
P-glycoprotéine (C)	<i>H. sapiens</i>	34	24
Ste6 (N)	<i>S. cerevisiae</i>	36	24
Ste6 (C)	<i>S. cerevisiae</i>	31	21
Mdl1	<i>S. cerevisiae</i>	35	25
Mdl2	<i>S. cerevisiae</i>	35	25

Mdl1 et Mdl2 de *S. cerevisiae* partagent un niveau de similitude avec Atm1 qui varie entre 31% et 38%. Un alignement entre les séquences protéiques d'Atm1 et quelques-uns de ses homologues, soit la P-glycoprotéine (MDR1), Hmt1 et HlyB a été généré (figure 20). Nous remarquons qu'il existe une homologie beaucoup plus forte en C-terminal, là où se trouvent les DLA qui sont caractéristiques des transporteurs ABC. De plus, il est intéressant de noter que très peu d'intervalles (gaps) ont besoin d'être introduits pour générer un alignement et ce, même au niveau des DTM, indiquant que l'homologie de séquence observée chez les membres de ce sous-groupe est significative. Les transporteurs ABC ayant une configuration de type N-(TM₆-ABC)-C ou N-(TM₆-ABC)₂-C mais ne faisant pas partie du même sous-groupe qu'Atm1, comme CFTR et Ycf1 (Michaelis et Berkower, 1995), ne peuvent être alignés avec Atm1 en utilisant le programme GAP (Genetic Computer Group, Madison, Wisc) ou alors démontrent des pourcentages de similitude de l'ordre de 25%, indiquant qu'il existe entre ces transporteurs et Atm1 des divergences structurales importantes (Michaelis et Berkower, 1995). Si l'on considère la grande homologie de séquence qui existe entre Atm1 et les autres membres de son sous-groupe de transporteurs, il est possible que les acides aminés identifiés comme étant importants pour la fonction d'Atm1 le soient également pour d'autres membres de ce sous-groupe, incluant la P-glycoprotéine.

4.1.2 Fonctions biologiques possibles pour Atm1

La délétion du gène *ATM1* dans une souche haploïde est létale (Leighton et Schatz, 1995b). Les phénotypes associés à la délétion incluent la présence d'un génome mitochondrial instable, c'est-à-dire que les mitochondries ont tendance à devenir ρ^- en perdant des parties de leur ADN mitochondrial, ainsi que la présence de mitochondries blanches dû à l'absence totale de cytochromes (Leighton et Schatz, 1995b). Une étude récente a démontré que les cellules $\Delta atm1$ accumulent trente fois plus de fer à l'intérieur des mitochondries que les cellules sauvages (Kispal *et al.*, 1997). Cette quantité accrue de Fe^{2+} cause un stress oxydatif important qui se traduit par la présence d'un haut niveau de glutathion oxydé et une sensibilité accrue aux agents oxydants (Kispal *et al.*, 1997). De plus, les cellules $\Delta atm1$ ne possèdent pas d'holoformes de protéines contenant un groupement hème, comme les cytochromes et la catalase, et cela probablement dû au dommage oxydatif causé à ces dernières en présence de fortes concentrations de Fe^{2+} .

Figure 20. Alignement de séquences multiples de quelques membres du sous-groupe de transporteurs ABC dont Atm1 fait partie. Cette figure a été produite en utilisant le programme BOXSHADE sur un alignement de séquences multiples produit à l'aide du programme PILEUP (Genetic Computer Group, Madison, Wisc) avec les séquences peptidiques d'Atm1 de *S. cerevisiae* (SWISS-PROT P40416), Hmt1 de *S. pombe* (SWISS-PROT Q02592), MDR1 *H. sapiens* (SWISS-PROT P08183) et HlyB d'*E. coli* (SWISS-PROT P40416). Les sites consensus Walker A, Walker B et 'Signature ABC' ont été identifiés en utilisant le programme MOTIFS et sont soulignés (Genetic Computer Group, Madison, Wisc). Les positions équivalentes dans Hmt1, Mdr1 et HlyB des résidus mutés des mutants ts36-2, ts111-1 et ts247-1 soient les résidus Leu117, Ala466, Arg484 et Ile642 sont identifiés. Les résidus conservés dans plus de 60% (3 sur 5) des protéines sont encadrés en noir quand il s'agit de résidus identiques ou en gris pour les résidus similaires. Les résidus non-conservés ne sont pas encadrés.

(Kispal *et al.*, 1997). Il semblerait donc qu'Atm1 soit impliquée dans l'homéostasie cellulaire du Fe^{2+} (Kispal *et al.*, 1997).

Kispal *et al.* ont proposé que le rôle d'Atm1 pourrait être direct, par exemple en transportant à l'extérieur des mitochondries un chélateur de fer. L'absence d'Atm1 causerait une accumulation de ce chélateur à l'intérieur des mitochondries et par conséquent une accumulation nette de Fe^{2+} à des niveaux qui seraient toxiques pour la cellule (Kispal *et al.*, 1997). Un rôle similaire a été attribué à la protéine Hmt1 de *S. pombe* qui est localisée à la membrane vacuolaire et qui confère la résistance au cadmium en transportant à l'intérieur des vacuoles des complexes phytochélatines- Cd^{2+} (Ortiz *et al.*, 1992; Ortiz *et al.*, 1995). Atm1 pourrait aussi agir indirectement, à titre de régulateur d'un autre transporteur de Fe^{2+} . La régulation indirecte d'un transporteur ABC par un autre transporteur a déjà été proposée (Higgins, 1995). Quoiqu'il en soit, le rôle biologique joué par Atm1 dans les mitochondries n'a pas encore été complètement élucidé et l'identification de mutants ts d'Atm1, et la caractérisation éventuelle de suppresseurs extragéniques et intragéniques de ces derniers, pourrait aider à mieux comprendre son rôle dans les mitochondries.

4.2 Mutants thermosensibles

4.2.1 Mutations thermosensibles identifiées dans Atm1

Nous avons pris avantage du caractère essentiel d'Atm1 pour identifier des mutants ts d'Atm1 à l'aide de la technique du 'plasmid shuffling'. La caractérisation de tels mutants pourrait mener à une meilleure compréhension au niveau de la structure et de la fonction d'Atm1. Les informations ainsi obtenues sur Atm1 pourraient nous permettre de faire des prédictions vérifiables expérimentalement chez d'autres transporteurs ABC, en particulier sur des membres de son sous-groupe comme la P-glycoprotéine (Michaelis et Berkower, 1995). Nous avons généré des banques d'allèles mutés d'*ATM1* soit par mutagenèse chimique avec de l'hydroxylamine, soit à l'aide d'une souche d'*E. coli* mutante à plusieurs niveaux de la voie de réparation d'erreurs d'appariement de l'ADN. Ces banques d'allèles mutés ont été criblées à l'aide de la technique du 'plasmid shuffling', ce qui nous a permis d'identifier trois mutants ts d'Atm1, soient les mutants ts36-2, ts111-1 et ts247-1. Ces mutants démontrent une croissance normale à température permissive mais

sont tous les trois incapables de croître à température restrictive (figures 9 et 11). Ces mutants sont uniquement affectés à température restrictive suggérant que les modifications présentes dans la protéine sont mineures et qu'elles nécessitent une température de 35.5°C pour l'apparition du phénotype. Elles influencent donc probablement la structure tertiaire ou quaternaire d'Atm1. Le séquençage du cadre de lecture ouvert complet de ces mutants a permis d'identifier les mutations causant la substitution Ile642Asn chez le mutant ts36-2, Leu117Pro chez le mutant ts111-1 et les substitutions Ala466Val et Arg484Lys chez le mutant ts247-1 comme étant responsables du phénotype thermosensible (figure 10). La substitution Leu117Pro se situe dans le DTM d'Atm1 tandis que les substitutions Ile642Asn, Ala466Val et Arg484Lys se retrouvent dans le DLA (figure 10, voir plus bas). Une analyse de type Western d'extraits enrichis en mitochondries préparés à partir de cultures à température permissive et à température restrictive des mutants ts36-2, ts111-1 et ts247-1 a révélé l'absence d'Atm1 dans les mitochondries des cellules cultivées à température restrictive (figure 12). À température permissive, les niveaux d'Atm1 de ces mutants sont comparables à ceux de la souche sauvage et les protéines ont une mobilité électrophorétique semblable (figure 12). Étant donné le caractère plutôt drastique des substitutions identifiées dans ces mutants, il est probable que l'absence des protéines mutantes dans les mitochondries à température restrictive soit due à une instabilité accrue ou à une localisation sub-cellulaire erronée à température restrictive (voir plus bas).

Le DTM d'Atm1 contient six segments transmembranaires prédits (figure 10). Plusieurs mutations dans la P-glycoprotéine, affectant sa spécificité envers différents substrats, ont été identifiées dans les segments transmembranaires, ce qui coïncide avec les endroits où des analogues photoactivables de substrats de la P-glycoprotéine se lient (Germann, 1996). Ainsi, selon le modèle actuel, les domaines transmembranaires de la P-glycoprotéine sont considérés comme étant impliqués dans la reconnaissance des différents substrats de la P-glycoprotéine (Germann, 1996). D'un autre côté, des mutations ts dans les DTM de la P-glycoprotéine, empêchant sa localisation à la membrane plasmique via une rétention au réticulum endoplasmique par la calnexine, ont été identifiées et seraient causées par un repliement erroné de la P-glycoprotéine à la température restrictive (Loo et Clarke, 1994a). Le mutant ts111-1 d'Atm1 possède la substitution Leu117Pro dans le premier segment transmembranaire prédit (figure 10). Le remplacement d'une leucine par une proline à cette position pourrait causer des problèmes au niveau du repliement de la

protéine. En effet, les prolines, qui contiennent un groupement cyclique, induisent des courbures dans les hélices α de l'ordre de 25 degrés (Barlow et Thornton, 1988). Il est donc possible que cette substitution altère la structure secondaire d'Atm1 à température restrictive, résultant ainsi en sa dégradation et par conséquent son absence dans les mitochondries.

Le motif Walker A forme possiblement une boucle flexible entre un feuillet β et une hélice α (Amano *et al.*, 1994). Des études suggèrent que la liaison de l'ATP induirait un changement de conformation de cette boucle ce qui permettrait ainsi de contrôler l'accès au DLA (Amano *et al.*, 1994; Fry *et al.*, 1986). La lysine conservée serait impliquée dans une interaction directe entre un des groupements phosphate de l'ATP et donc nécessaire à l'activité ATPasique. De son côté, le motif Walker B serait à proximité de la boucle flexible riche en glycines (Walker A) et formerait une pochette pour l'adénine hydrophobe de l'ATP, conférant ainsi la spécificité du site de liaison au nucléotide (Amano *et al.*, 1994; Fry *et al.*, 1986). La substitution Ile642Asn du mutant ts36-2 se retrouve à 45 résidus de l'extrémité du motif Walker B et les substitutions Ala466Val et Arg484Lys du mutant ts247-1 de chaque côtés du motif Walker A (figure 10). Considérant la structure tertiaire importante requise pour la liaison et l'hydrolyse de l'ATP, il est possible que les substitutions Ala466Val et Arg484Lys chez le mutant ts247-1 altèrent la conformation requise pour la liaison de l'ATP, uniquement à température restrictive, rendant ainsi la protéine non-fonctionnelle. Il serait possible que le remplacement d'une alanine par une valine, qui possède une chaîne latérale plus grosse, puisse interférer avec le changement de conformation de la boucle flexible qui est requis pour donner accès au DLA. De son côté, la substitution Ile642Asn du mutant ts36-2, qui introduit un résidu ayant une chaîne latérale polaire comparativement à chaîne latérale non-polaire, pourrait également affecter la liaison ou l'hydrolyse de l'ATP. Des mutations dans la glycine et la lysine conservées du motif Walker A du gène *mdr1* murin donnent lieu à des protéines toujours capables de lier l'ATP mais ayant perdu la capacité de conférer la résistance à différentes drogues (Azzaria *et al.*, 1989). Il serait donc possible que les mutations ts identifiées ici n'empêchent pas la liaison de l'ATP mais plutôt l'hydrolyse de l'ATP ou la liaison et la translocation du substrat d'Atm1. Considérant l'absence d'Atm1 dans les mitochondries de ces mutants à température restrictive, il est cependant plus probable que les changements structuraux induits par ces substitutions dans Atm1 causent la dégradation de la protéine. Des

substitutions présentes dans les DLA de CFTR et de la P-glycoprotéine menant ces dernières à la dégradation ont été identifiées (Bakos *et al.*, 1997; Cheng *et al.*, 1990). Il est intéressant de noter que trois des quatre résidus mutés (Ala466, Arg484 et Ile642) sont présents chez tous les membres du sous-groupe de transporteurs ABC dont Atm1 fait partie (figure 20). Ces résidus pourraient donc être mutés chez d'autres transporteurs ABC, comme la P-glycoprotéine et CFTR, afin de déterminer l'effet de ces substitutions chez ces transporteurs. La seule divergence est au niveau de la substitution Ala466Val, où il y a présence d'une glycine à la position équivalente dans HlyB (figure 20). Il est intéressant de noter que le résidu Ala466 est également présent dans la partie C-terminale de Pdr5, Snq2, Cdr1 et de tous les autres membres de ce sous-groupe de transporteurs ABC (Michaelis et Berkower, 1995). Ce résidu est cependant très peu conservé chez les autres sous-groupes de transporteurs ABC et le rôle fonctionnel de cette alanine chez ces derniers pourrait être analysé.

Les mutants ts36-2, ts111-1 et ts247-1 qui ont été identifiés au cours de nos criblages seront utilisés dans des expériences où il y aura une déplétion progressive d'Atm1 dans les mitochondries induite par le passage des cellules de la température permissive à la température restrictive. Puisque nous avons remarqué une absence marquée d'Atm1 dans les mitochondries uniquement à température restrictive, une déplétion progressive d'Atm1 nous permettrait de caractériser plus en détail l'effet causé par l'absence d'Atm1 sur le contenu en Fe²⁺ et en cytochromes dans les mitochondries, l'état oxydatif des cellules, l'intégrité du génome mitochondrial ou tout autre phénotype associé à l'absence d'Atm1. Il serait également intéressant d'entreprendre des études semblables avec la protéine sauvage sous le contrôle d'un promoteur induit en présence de galactose et réprimé en présence de glucose dans la souche $\Delta atm1$. Ceci pourrait possiblement permettre une déplétion plus progressive d'Atm1 que celle obtenue lors du passage des mutants ts à la température restrictive. Ce type d'expériences permettrait de générer des informations importantes pouvant mener à une meilleure compréhension du rôle joué par Atm1 dans les mitochondries.

4.2.2 Caractérisation éventuelle de suppresseurs intragéniques et extragéniques

La présence d'interactions entre différents domaines d'un transporteur peut être démontrée biochimiquement mais aussi génétiquement (Berkower *et al.*, 1996; Loo et

Clarke, 1995b). Par exemple, des supprimeurs intragéniques de mutants de la perméase du lactose chez *E. coli* (Pazdernik *et al.*, 1997; Jessen-Marshall et Brooker, 1996; Jessen-Marshall *et al.*, 1997) et de l'ATPase à protons chez *S. cerevisiae* (Anand *et al.*, 1995) ont été identifiés et ont ainsi permis de caractériser des interactions entre différents domaines de ces protéines. Des études similaires avec des protéines chimériques Ste6/CFTR ont permis d'identifier deux mutations dans CFTR, soit Arg553Met et Arg553Gln, capables de supprimer l'effet de la délétion Δ Phe508, suggérant que les régions contenant les résidus Phe508 et Arg553 interagissent entre elles (Teem *et al.*, 1993). Il serait donc intéressant de prendre avantage du système génétique possible chez *S. cerevisiae* afin d'identifier des résidus dans Atm1 impliqués dans de telles interactions intramoléculaires. L'identification de supprimeurs intragéniques des mutants ts36-2, ts111-1, ts247-1 qui seraient capables de restaurer la capacité de ces derniers à croître à température restrictive permettrait possiblement de révéler des interactions entre différents résidus de la protéine. Par la suite, la relation fonctionnelle entre les deux résidus interagissant génétiquement pourrait être étudiée plus en profondeur en modifiant la charge et la taille de la chaîne latérale aux deux positions par mutagenèse dirigée. Ce type d'information peut s'avérer fort utile considérant le peu de données cristallographiques disponibles sur la structure des protéines membranaires polytopiques et pourrait être utilisé pour faire des prédictions testables chez d'autres transporteurs ABC comme la P-glycoprotéine et CFTR, menant éventuellement à une meilleure compréhension de la topologie des transporteurs ABC en général.

D'autre part, il existe chez *S. cerevisiae* une approche génétique qui peut aider à mieux comprendre la fonction biologique d'une protéine. Cette approche consiste à identifier des supprimeurs extragéniques de différents mutants. Par exemple, des supprimeurs extragéniques des transporteurs de la vitamine B12 et de complexes sidérophores-fer chez *E. coli* (Kadner, 1990) ou du transporteur de potassium Trk1 chez *S. cerevisiae* (Vidal *et al.*, 1990) ont été identifiés. La caractérisation de ces derniers a permis de démontrer que des mutations dans la protéine TonB, membre d'un complexe impliqué dans la génération d'énergie à partir d'un gradient de protons et de son couplage à la translocation du substrat, sont capables de restaurer le transport via une interaction directe. Cette approche a également permis d'identifier et caractériser un système d'import de potassium de faible affinité (Vidal *et al.*, 1990). Des mutations compensatoires présentes dans des protéines interagissant physiquement ou fonctionnellement avec Atm1, ou alors la surexpression de telles protéines, pourraient restaurer le phénotype sauvage de mutants ts

d'Atm1 à température restrictive et nous permettre ainsi de les identifier. L'identification et la caractérisation éventuelle de ces protéines pourrait mener à une meilleure compréhension du rôle biologique joué par Atm1 dans les mitochondries. Avant d'entreprendre ce type d'étude, il est important de bien choisir les mutants ts qui vont être utilisés lors du criblage. Idéalement, les mutants ts d'Atm1 qui devraient être utilisés pour la recherche de suppresseurs extragéniques devraient être bien localisés à la mitochondrie, stables à température restrictive et déficients uniquement au niveau fonctionnel. Ceci permettrait d'éviter d'identifier des suppresseurs qui auraient comme rôle de protéger Atm1 contre la protéolyse ou de corriger des problèmes de localisation mitochondriale à température restrictive. Par exemple, un mutant ts d'Atm1 instable à température restrictive a été utilisé dans un tel criblage et a permis d'identifier un suppresseur multicopie nommé Bat1, codant pour une transaminase d'acides aminés à chaînes latérales qui est localisée à la matrice mitochondriale (Kispal *et al.*, 1996). Cependant, la cause de la suppression observée n'a pu être clairement établie et le lien entre ce dernier et Atm1 n'est pas clair et pourrait fort bien être indirect (Kispal *et al.*, 1996). Lors de nos criblages, quelques dizaines de mutants ts autre que les mutants ts36-2, ts111-1 et ts247-1 ont été identifiés mais n'ont pas encore été caractérisés. Il est possible que certains d'entre eux possèdent les caractéristiques idéales énumérées plus haut et soient donc adéquats afin de cribler pour des suppresseurs extragéniques d'Atm1. La caractérisation de ces mutants est présentement en cours dans le laboratoire.

4.3 Homodimérisation

Une des caractéristiques importantes des transporteurs ABC est leur structure modulaire. En effet, ils sont composés de quatre domaines, soit deux DTM contenant le plus souvent six segments transmembranaires chacun et deux DLA possédant les motifs Walker A, Walker B et 'Signature ABC'. Ces quatre domaines peuvent être présents sur le même polypeptide ou sur des polypeptides différents, soit deux dans le cas des 'demi-transporteurs' ABC soit trois ou quatre dans le cas des perméases bactériennes (Higgins, 1992). Les 'demi-transporteurs' ABC contiennent dans le même polypeptide un DTM et un DLA et selon le modèle actuel doivent dimériser afin d'être fonctionnels (Higgins, 1992). Il existe des démonstrations biochimiques d'hétérodimérisation entre les 'demi-transporteurs' Tap1 et Tap2 (Kelly *et al.*, 1992; Spies *et al.*, 1992) et Pxa1 et Pxa2 (Pat1 et Pat2) (Shani et Valle, 1996) ainsi que des évidences génétiques d'hétérodimérisation entre

les protéines *brown*, *white* et *scarlet* de *D. melanogaster* (Ewart *et al.*, 1994). En ce qui concerne la capacité des ‘demi-transporteurs’ ABC à fonctionner sous forme d’homodimères, seules des évidences génétiques avec le transporteur d’hémolysine HlyB d’*E. coli* supportent cette hypothèse (Koronakis et Hughes, 1993). Ainsi, la démonstration biochimique formelle qu’un ‘demi-transporteur’ ABC a la capacité d’homodimériser était à ce jour manquante.

Une fois le génome de *S. cerevisiae* complètement séquencé, nous avons effectué son analyse à l’aide du programme TBLASTN (Genetic Computer Group, Madison, Wisc) dans le but d’identifier toutes les protéines ABC présentes chez *S. cerevisiae* (Altschul *et al.*, 1990). Nous avons ainsi généré un dendrogramme qui nous a permis de remarquer l’absence de partenaire possible avec qui le ‘demi-transporteur’ ABC Atm1 pourrait homodimériser, cela en comparaison avec les protéines Pxa1 et Pxa2 (Pat1 et Pat2) qui hétérodimérisent (Shani et Valle, 1996) et les protéines Mdl1 et Mdl2 qui potentiellement forment des hétérodimères (Dean *et al.*, 1994) et qui sont très proches de leur partenaire au niveau de la séquence peptidique (figure 13). Cependant, le ‘demi-transporteur’ ABC de *S. cerevisiae*, Mdl1, possède un signal de localisation mitochondrial potentiel (PSORT, Paul Horton, University of California, Berkeley) mais le caractère non essentiel de cette protéine rend peu probable la possibilité qu’elle hétérodimérise avec Atm1 pour former un transporteur mitochondrial fonctionnel (Dean *et al.*, 1994). Ces observations nous ont donc incité à poser l’hypothèse qu’Atm1 fonctionne sous forme d’homodimères dans les mitochondries.

Afin de vérifier cette hypothèse biochimiquement, nous avons inséré des épitopes HA et *c-myc* à l’extrémité C-terminale d’Atm1. Des expériences de co-immunoprécipitation ont ensuite été réalisées sur des extraits protéiques totaux provenant de souches exprimant à la fois une forme Atm1-HA et une forme Atm1-MYC, nous permettant ainsi de détecter spécifiquement deux formes de la même protéine en utilisant les anticorps monoclonaux anti-HA et anti-MYC. Nos résultats démontrent qu’Atm1 est présente sous forme d’homodimères dans ces extraits puisque lorsque nous immunoprécipitons avec un anticorps anti-MYC, nous détectons la forme Atm1-HA dans le complexe immun suite à une analyse de type Western avec un anticorps anti-HA (figure 17, ligne 2). Nos résultats démontrent qu’Atm1 forme des homodimères et deviennent ainsi la première démonstration biochimique qu’un ‘demi-transporteur’ ABC a la capacité d’homodimériser.

Afin de déterminer si l'homodimérisation d'Atm1 est médiée via les DTM et/ou les DLA, nous avons cloné séparément des triples épitopes HA et *c-myc* en 3' de ces derniers. Une analyse de type Western sur les DLA et les DTM étiquetés a révélé que les DLA étaient correctement exprimés mais que malheureusement, quoique de grandes quantités d'ARNm spécifique aux DTM étiquetés étaient détectées par analyse de type Northern, les DTM ne l'étaient pas. Ceci pourrait être dû à une dégradation rapide des DTM étiquetés ou bien à une préparation protéique, qui à cause de l'extrême hydrophobicité des DTM, ne nous permet pas d'obtenir ces derniers dans les extraits. Quoiqu'il en soit, des expériences de co-immunoprécipitation ont été réalisées sur un extrait protéique total provenant d'une souche exprimant à la fois une forme DLA-HA et une forme DLA-MYC. Nos résultats démontrent que le DLA d'Atm1 a la capacité de former des homodimères puisque, lorsque nous immunoprécipitons avec un anticorps anti-MYC, nous sommes en mesure de détecter la forme DLA-HA dans l'immunoprécipité par une analyse de type Western avec un anticorps anti-HA (figure 18, ligne 2). Ces résultats confirment qu'Atm1 homodimérise et indique que cette homodimérisation est médiée, du moins en partie, par le DLA d'Atm1. Malheureusement, considérant les problèmes d'expression des DTM d'Atm1 étiquetés, nous ne pouvons nous prononcer sur le rôle du DTM d'Atm1 dans l'homodimérisation. Une approche alternative serait d'utiliser la technique de 2-hybrides ou le système SOS pour déterminer le rôle du DTM d'Atm1 dans l'homodimérisation (Fields et Song, 1989; Aronheim *et al.*, 1997). Le système SOS serait cependant plus approprié pour étudier les interactions avec un polypeptide membranaire polytopique comme le DTM d'Atm1 puisque les interactions se passent à la membrane plasmique plutôt qu'à l'intérieur du noyau dans le cas de la technique de 2-hybrides (Fields et Song, 1989; Aronheim *et al.*, 1997). Le DLA d'Atm1 a la capacité de former des dimères, comme c'est le cas avec les deux DLA de la P-glycoprotéine lorsqu'ils sont co-exprimés en polypeptides séparés (Loo et Clarke, 1995b). En ce qui concerne la protéine Ste6, aucune interaction entre le DLA C-terminal (DLA2) et une protéine tronquée DTM1-DLA1-DTM2 n'est observée. Ceci suggère que les DLA de Ste6, ou du moins le DLA2, n'est pas impliqué dans les interactions physiques et fonctionnelles observées entre les deux moitiés de la protéine (Berkower et Michaelis, 1991; Berkower *et al.*, 1996). Considérant la divergence des résultats obtenus ici avec Atm1 et précédemment avec la P-glycoprotéine et Ste6 en ce qui concerne le rôle des DLA au niveau des interactions physiques, il nous est impossible de proposer un rôle général pour ces derniers dans les interactions intramoléculaires ou

intermoléculaires chez les transporteurs ABC. D'un autre côté, les DTM de la P-glycoprotéine sont aussi impliqués dans des interactions intramoléculaires via une interaction avec son DLA respectif (DTM1-DLA1 et DTM2-DLA2) et entre eux (DTM1-DTM2) (Loo et Clarke, 1995b). Une interaction physique et fonctionnelle entre le DTM1 de Ste6 et un dérivé tronqué (DLA1-DTM2-DLA2) a également été démontrée (Berkower *et al.*, 1996). À la lumière de ces résultats, il est possible que le DTM d'Atm1 soit impliqué également dans l'homodimérisation observée mais notre incapacité d'exprimer les dérivés étiquetés du DTM ne nous a pas permis confirmer cette hypothèse.

Des expériences de co-immunoprécipitation additionnelles sur des formes tronquées du DTM et du DLA d'Atm1, en conjonction avec des études de mutagenèse, pourraient permettre d'identifier précisément le ou les résidu(s) d'Atm1 impliqué(s) dans l'homodimérisation. Par la suite, le rôle fonctionnel des interactions médiées par ces régions pourrait être analysé en regardant l'effet de différentes mutations, à l'intérieur de ces dernières, en utilisant la technique du 'plasmid shuffling' que nous avons mis au point pour étudier Atm1.

CONCLUSION

Les résultats présentés ici démontrent clairement que la technique du ‘plasmid shuffling’ que nous avons utilisé pour étudier Atm1 nous a permis d’acquérir des informations importantes sur cette protéine. Premièrement, nous avons identifié plusieurs mutants thermosensibles dont trois ont été caractérisés. La caractérisation biochimique, ainsi que l’identification de supprimeurs intragéniques et extragéniques de ces derniers, pourrait permettre d’identifier des interactions entre différents domaines d’Atm1 ainsi que de fournir des informations importantes pouvant mener à une meilleure compréhension du rôle joué par Atm1 dans les mitochondries. De plus, les mutations responsables du phénotype thermosensible causent des substitutions au niveau de résidus d’acide aminés qui sont majoritairement conservés chez le sous-groupe de transporteurs ABC dont Atm1 fait partie, qui inclut entre-autre la P-glycoprotéine, et pourraient donc nous permettre de faire des prédictions vérifiables chez des transporteurs ABC d’une grande importance médicale comme les P-glycoprotéines. Ainsi, il serait possible de prendre avantage du phénotype thermosensible d’Atm1 pour mieux comprendre la structure et la fonction d’autres transporteurs ABC. D’un autre côté, nous avons réussi à démontrer une interaction physique entre les DLA étiquetés d’Atm1 qui sont responsables de son homodimérisation, constituant ainsi la première démonstration biochimique qu’un ‘demi-transporteur’ ABC a la capacité d’homodimériser. Le système que nous avons utilisé pour faire cette démonstration nous permettra de déterminer plus précisément les résidus impliqués dans cette homodimérisation. Globalement, nos expériences nous ont permis d’identifier des acides aminés importants pour la fonction d’Atm1 ainsi qu’un domaine impliqué dans la structure quaternaire de ce transporteur en plus d’augmenter les connaissances globales sur la structure et la fonction des transporteurs ABC en général.

RÉFÉRENCES

- Altschul, S.F., W. Gish, W. Miller, E.W. Myers et D.J. Lipman. 1990. Basic local alignment search tool. *Journal of Molecular Biology* 215:403-410.
- Amano, T., M. Yoshida, Y. Matsuo et K. Nishikawa. 1994. Structural model of the ATP-binding domain of the F1-beta subunit based on analogy to the RecA protein. *FEBS Letters* 351:1-5.
- Ambudkar, S.V., I.H. Lelong, J. Zhang, C.O. Cardarelli, M.M. Gottesman et I. Pastan. 1992. Partial purification and reconstitution of the human multidrug-resistance pump: characterization of the drug-stimulatable ATP hydrolysis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:8472-8476.
- Ames, G.F. 1986. Bacterial periplasmic transport systems: structure, mechanism, and evolution. [Revue]. *Annual Review of Biochemistry* 55:397-425.
- Ames, G.F., C.S. Mimura, S.R. Holbrook et V. Shyamala. 1992. Traffic ATPases: a superfamily of transport proteins operating from *Escherichia coli* to humans. [Revue]. *Advances in Enzymology & Related Areas of Molecular Biology* 65:1-47.
- Anand, S., D. Seto-Young, D.S. Perlin et J.E. Haber. 1995. Mutations of G158 and their second-site revertants in the plasma membrane H(+)-ATPase gene (*pma1*) in *Saccharomyces cerevisiae*. *Biochimica and Biophysica Acta* 1234:127-132.
- Anderson, M.P., R.J. Gregory, S. Thompson, D.W. Souza, S. Paul, R.C. Mulligan, A.E. Smith et M.J. Welsh. 1991. Demonstration that CFTR is a chloride channel by alteration of its anion selectivity. *Science* 253:202-205.
- Anderson, M.P., D.P. Rich, R.J. Gregory, A.E. Smith et M.J. Welsh. 1991. Generation of cAMP-activated chloride currents by expression of CFTR. *Science* 251:679-682.
- Andre, B. 1995. An overview of membrane transport proteins in *Saccharomyces cerevisiae*. [Revue]. *Yeast* 11:1575-1611.
- Aronheim, A., Zandi, E., Hennemann, H., Elledge, S.J., and Karin, M. 1997. Isolation of an AP-1 repressor by a novel method for detecting protein-protein interactions. *Molecular & Cellular Biology* 17, 3094-3102.
- Ashby, M.N., S.Y. Kutsunai, S. Ackerman, A. Tzagoloff et P.A. Edwards. 1992. COQ2 is a candidate for the structural gene encoding para-hydroxybenzoate: polyprenyltransferase. *Journal of Biological Chemistry* 267:4128-4136.
- Azzaria, M., E. Schurr et P. Gros. 1989. Discrete mutations introduced in the predicted nucleotide-binding sites of the *mdr1* gene abolish its ability to confer multidrug resistance. *Molecular & Cellular Biology* 9:5289-5297.
- Bach, M.L., F. Lacroute et D. Botstein. 1979. Evidence for transcriptional regulation of orotidine-5'-phosphate decarboxylase in yeast by hybridization of mRNA to the

yeast structural gene cloned in *Escherichia coli*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 76:386-390.

- Bairoch, A. 1992. PROSITE: a dictionary of sites and patterns in proteins. *Nucleic Acids Research* 20 Suppl:2013-2018.
- Bakos, E., I. Klein, E. Welker, K. Szabo, M. Muller, B. Sarkadi et A. Varadi. 1997. Characterization of the human multidrug resistance protein containing mutations in the ATP-binding cassette signature region. *Biochemical Journal* 323:777-783.
- Balzi, E. et A. Goffeau. 1991. Multiple or pleiotropic drug resistance in yeast. [Revue]. *Biochimica et Biophysica Acta* 1073:241-252.
- Balzi, E. et A. Goffeau. 1994. Genetics and biochemistry of yeast multidrug resistance. [Revue]. *Biochimica et Biophysica Acta* 1187:152-162.
- Balzi, E., M. Wang, S. Leterme, L. van Dyck et A. Goffeau. 1994. PDR5, a novel yeast multidrug resistance conferring transporter controlled by the transcription regulator PDR1. *Journal of Biological Chemistry* 269:2206-2214.
- Barlow, D.J. et J.M. Thornton. 1988. Helix geometry in proteins. *Journal of Molecular Biology* 201:601-619.
- Bauer, M.F., C. Sirrenberg, W. Neupert et M. Brunner. 1996. Role of Tim23 as voltage sensor and presequence receptor in protein import into mitochondria. *Cell* 87:33-41.
- Beckman, D.L., D.R. Trawick et R.G. Kranz. 1992. Bacterial cytochromes c biogenesis. *Genes & Development* 6:268-283.
- Bergeron, J.J., M.B. Brenner, D.Y. Thomas et D.B. Williams. 1994. Calnexin: a membrane-bound chaperone of the endoplasmic reticulum. [Revue]. *Trends in Biochemical Sciences* 19:124-128.
- Berkower, C. et S. Michaelis. 1991. Mutational analysis of the yeast a-factor transporter STE6, a member of the ATP binding cassette (ABC) protein superfamily. *EMBO Journal* 10:3777-3785.
- Berkower, C., D. Taglicht et S. Michaelis. 1996. Functional and physical interactions between partial molecules of STE6, a yeast ATP-binding cassette protein. *Journal of Biological Chemistry* 271:22983-22989.
- Berthold, J., M.F. Bauer, H.C. Schneider, C. Klaus, K. Dietmeier, W. Neupert et M. Brunner. 1995. The MIM complex mediates preprotein translocation across the mitochondrial inner membrane and couples it to the mt-Hsp70/ATP driving system. *Cell* 81:1085-1093.
- Binet, R., S. Letoffe, J.M. Ghigo, P. Delepelaire et C. Wandersman. 1997. Protein secretion by Gram-negative bacterial ABC exporters--a review. [Revue]. *Gene* 192:7-11.

- Bissinger, P.H. et K. Kuchler. 1994. Molecular cloning and expression of the *Saccharomyces cerevisiae* *STS1* gene product. A yeast ABC transporter conferring mycotoxin resistance. *Journal of Biological Chemistry* 269:4180-4186.
- Blight, M.A., C. Chervaux et I.B. Holland. 1994. Protein secretion pathway in *Escherichia coli*. [Revue]. *Current Opinion in Biotechnology* 5:468-474.
- Blight, M.A., A.L. Pimenta, J.C. Lazzaroni, C. Dando, L. Kotelevets, S.J. Seror et I.B. Holland. 1994. Identification and preliminary characterization of temperature-sensitive mutations affecting HlyB, the translocator required for the secretion of haemolysin (HlyA) from *Escherichia coli*. *Molecular and General Genetics* 245:431-440.
- Boeke, J.D., J. Trueheart, G. Natsoulis et G.R. Fink. 1987. 5-Fluoroorotic acid as a selective agent in yeast molecular genetics. *Methods in Enzymology* 154:164-175.
- Bosch, I., K. Dunussi-Joannopoulos, R.L. Wu, S.T. Furlong et J. Croop. 1997. Phosphatidylcholine and phosphatidylethanolamine behave as substrates of the human MDR1 P-glycoprotein. *Biochemistry* 36:5685-5694.
- Boscoboinik, D., M.T. Debanne, A.R. Stafford, C.Y. Jung, R.S. Gupta et R.M. Epand. 1990. Dimerization of the P-glycoprotein in membranes. *Biochimica et Biophysica Acta* 1027:225-228.
- Bradford, M.M. 1976. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry* 72:248-254.
- Broeks, A., B. Gerrard, R. Allikmets, M. Dean et R.H. Plasterk. 1996. Homologues of the human multidrug resistance genes *MRP* and *MDR* contribute to heavy metal resistance in the soil nematode *Caenorhabditis elegans*. *EMBO Journal* 15:6132-6143.
- Bruggemann, E.P., S.J. Currier, M.M. Gottesman et I. Pastan. 1992. Characterization of the azidopine and vinblastine binding site of P-glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 267:21020-21026.
- Butow, R.A., R. Docherty et V.S. Parikh. 1988. A path from mitochondria to the yeast nucleus. *Philosophical Transactions of the Royal Society of London - Series B: Biological Sciences* 319:127-133.
- Carlson, M. et D. Botstein. 1982. Two differentially regulated mRNAs with different 5' ends encode secreted with intracellular forms of yeast invertase. *Cell* 28:145-154.
- Chen, C.J., J.E. Chin, K. Ueda, D.P. Clark, I. Pastan, M.M. Gottesman et I.B. Roninson. 1986. Internal duplication and homology with bacterial transport proteins in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene from multidrug-resistant human cells. *Cell* 47:381-389.

- Cheng, S.H., R.J. Gregory, J. Marshall, S. Paul, D.W. Souza, G.A. White, C.R. O'Riordan et A.E. Smith. 1990. Defective intracellular transport and processing of CFTR is the molecular basis of most cystic fibrosis. *Cell* 63:827-834.
- Cheng, S.H., D.P. Rich, J. Marshall, R.J. Gregory, M.J. Welsh et A.E. Smith. 1991. Phosphorylation of the R domain by cAMP-dependent protein kinase regulates the CFTR chloride channel. *Cell* 66:1027-1036.
- Choi, K.H., C.J. Chen, M. Kriegler et I.B. Roninson. 1988. An altered pattern of cross-resistance in multidrug-resistant human cells results from spontaneous mutations in the *mdr1* (P-glycoprotein) gene. *Cell* 53:519-529.
- Christianson, T.W., R.S. Sikorski, M. Dante, J.H. Shero et P. Hieter. 1992. Multifunctional yeast high-copy-number shuttle vectors. *Gene* 110:119-122.
- Cleves, A.E. et R.B. Kelly. 1996. Rehearsing the ABCs. Protein translocation. [Revue]. *Current Biology*. 6:276-278.
- Cole, S.P., G. Bhardwaj, J.H. Gerlach, J.E. Mackie, C.E. Grant, K.C. Almquist, A.J. Stewart, E.U. Kurz, A.M. Duncan et R.G. Deeley. 1992. Overexpression of a transporter gene in a multidrug-resistant human lung cancer cell line. *Science* 258:1650-1654.
- Colonna, M., T. Spies, J.L. Strominger, E. Ciccone, A. Moretta, L. Moretta, D. Pende et O. Viale. 1992. Alloantigen recognition by two human natural killer cell clones is associated with HLA-C or a closely linked gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:7983-7985.
- Costanzo, M.C. et T.D. Fox. 1986. Product of *Saccharomyces cerevisiae* nuclear gene *PET494* activates translation of a specific mitochondrial mRNA. *Molecular & Cellular Biology* 6:3694-3703.
- Costanzo, M.C. et T.D. Fox. 1988. Specific translational activation by nuclear gene products occurs in the 5' untranslated leader of a yeast mitochondrial mRNA. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85:2677-2681.
- Costanzo, M.C. et T.D. Fox. 1990. Control of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. [Revue]. *Annual Review of Genetics* 24:91-113.
- Cui, Z.F., D. Hirata, E. Tsuchiya, H. Osada et T. Miyakawa. 1996. The multidrug resistance-associated protein (MRP) subfamily (YSR1/YOR1) of *Saccharomyces cerevisiae* is important for the tolerance to a broad range of organic anions. *Journal of Biological Chemistry* 271:14712-14716.
- Cutting, G.R., L.M. Kasch, B.J. Rosenstein, J. Zielenski, L.C. Tsui, S.E. Antonarakis et H.J. Kazazian. 1990. A cluster of cystic fibrosis mutations in the first nucleotide-binding fold of the cystic fibrosis conductance regulator protein. *Nature* 346:366-369.

- Daum, G., P.C. Bohni et G. Schatz. 1982. Import of proteins into mitochondria. Cytochrome b2 and cytochrome c peroxidase are located in the intermembrane space of yeast mitochondria. *Journal of Biological Chemistry* 257:13028-13033.
- Davidson, A.L. et H. Nikaido. 1991. Purification and characterization of the membrane-associated components of the maltose transport system from *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 266:8946-8951.
- de Vries, S. et C.A. Marres. 1987. The mitochondrial respiratory chain of yeast. Structure and biosynthesis and the role in cellular metabolism. [Revue]. *Biochimica et Biophysica Acta* 895:205-239.
- Dean, M., R. Allikmets, B. Gerrard, C. Stewart, A. Kistler, B. Shafer, S. Michaelis et J. Strathern. 1994. Mapping and sequencing of two yeast genes belonging to the ATP-binding cassette superfamily. *Yeast* 10:377-383.
- Decottignies, A. et A. Goffeau. 1997. Complete inventory of the yeast ABC proteins. *Nature Genetics* 15:137-145.
- Delepelaire, P. et C. Wandersman. 1991. Characterization, localization and transmembrane organization of the three proteins PrtD, PrtE and PrtF necessary for protease secretion by the gram-negative bacterium *Erwinia chrysanthemi*. *Molecular Microbiology* 5:2427-2434.
- Deshaies, R.J., B.D. Koch et R. Schekman. 1988. The role of stress proteins in membrane biogenesis. [Revue]. *Trends in Biochemical Sciences* 13:384-388.
- Devree, J.L., E. Jacquemin, E. Sturm, D. Cresteil, P.J. Bosma, J. Aten, J.F. Deleuze, M. Desrochers, M. Burdelski, O. Bernard, R.O. Elferink et M. Hadchouel. 1998. Mutations in the *MDR3* gene cause progressive familial intrahepatic cholestasis. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95:282-287.
- Dhir, R., K. Grizzuti, S. Kajiji et P. Gros. 1993. Modulatory effects on substrate specificity of independent mutations at the serine 939/941 position in predicted transmembrane domain 11 of P-glycoprotein. *Biochemistry* 32:9492-9499.
- Doige, C.A. et G.F. Ames. 1993. ATP-dependent transport systems in bacteria and humans: relevance to cystic fibrosis and multidrug resistance. [Revue]. *Annual Review of Microbiology* 47:291-319.
- Ebner, E., T.L. Mason et G. Schatz. 1973. Mitochondrial assembly in respiration-deficient mutants of *Saccharomyces cerevisiae*. Effect of nuclear and extrachromosomal mutations on the formation of cytochrome c oxidase. *Journal of Biological Chemistry* 248:5369-5378.
- Endicott, J.A. et V. Ling. 1989. The biochemistry of P-glycoprotein-mediated multidrug resistance. [Revue]. *Annual Review of Biochemistry* 58:137-171.

- Evan, G.I., G.K. Lewis, G. Ramsay et J.M. Bishop. 1985. Isolation of monoclonal antibodies specific for human *c-myc* proto-oncogene product. *Molecular & Cellular Biology* 5:3610-3616.
- Ewart, G.D., D. Cannell, G.B. Cox et A.J. Howells. 1994. Mutational analysis of the traffic ATPase (ABC) transporters involved in uptake of eye pigment precursors in *Drosophila melanogaster*. Implications for structure-function relationships. *Journal of Biological Chemistry* 269:10370-10377.
- Felmlee, T., S. Pellett, et R.A. Welch. 1985. Nucleotide sequence of an *Escherichia coli* chromosomal hemolysin. *Journal of Bacteriology* 163:94-105.
- Field, J., J. Nikawa, D. Broek, B. MacDonald, L. Rodgers, I.A. Wilson, R.A. Lerner et M. Wigler. 1988. Purification of a RAS-responsive adenylyl cyclase complex from *Saccharomyces cerevisiae* by use of an epitope addition method. *Molecular & Cellular Biology* 8:2159-2165.
- Fields, S. and Song, O. 1989. A novel genetic system to detect protein-protein interactions. *Nature* 340, 245-246.
- Florkiewicz, R.Z., R.A. Majack, R.D. Buechler et E. Florkiewicz. 1995. Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *Journal of Cellular Physiology* 162:388-399.
- Forsburg, S.L. et L. Guarente. 1989. Communication between mitochondria and the nucleus in regulation of cytochrome genes in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. [Revue]. *Annual Review of Cell Biology* 5:153-180.
- Froshauer, S., G.N. Green, D. Boyd, K. McGovern et J. Beckwith. 1988. Genetic analysis of the membrane insertion and topology of MalF, a cytoplasmic membrane protein of *Escherichia coli*. *Journal of Molecular Biology* 200:501-511.
- Fry, D.C., S.A. Kuby et A.S. Mildvan. 1986. ATP-binding site of adenylate kinase: mechanistic implications of its homology with ras-encoded p21, F1-ATPase, and other nucleotide-binding proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 83:907-911.
- Fytlovich, S., M. Gervais, C. Agrimonti et B. Guiard. 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 Journal* 12:1209-1218.
- Gao, M., M. Yamazaki, D.W. Loe, C.J. Westlake, C.E. Grant, S.P. Cole et R.G. Deeley. 1998. Multidrug resistance protein. Identification of regions required for active transport of leukotriene C4. *Journal of Biological Chemistry* 273:10733-10740.
- Germann, U.A. 1996. P-glycoprotein--a mediator of multidrug resistance in tumour cells. [Revue]. *European Journal of Cancer* 32A:927-944.
- Gething, M.J. et J. Sambrook. 1992. Protein folding in the cell. [Revue]. *Nature* 355:33-45.

- Gietz, R.D., R.H. Schiestl, A.R. Willems et R.A. Woods. 1995. Studies on the transformation of intact yeast cells by the LiAc/SS-DNA/PEG procedure. *Yeast* 11:355-360.
- Gilson, L., H.K. Mahanty et R. Kolter. 1990. Genetic analysis of an MDR-like export system: the secretion of colicin V. *EMBO Journal* 9:3875-3894.
- Glaser, P., H. Sakamoto, J. Bellalou, A. Ullmann et A. Danchin. 1988. Secretion of cyclolysin, the calmodulin-sensitive adenylate cyclase-haemolysin bifunctional protein of *Bordetella pertussis*. *EMBO Journal* 7:3997-4004.
- Gottesman, M.M., C.A. Hrycyna, P.V. Schoenlein, U.A. Germann et I. Pastan. 1995. Genetic analysis of the multidrug transporter. [Revue]. *Annual Review of Genetics* 29:607-649.
- Greenberger, L.M. 1993. Major photoaffinity drug labeling sites for iodoaryl azidoprazosin in P-glycoprotein are within, or immediately C-terminal to, transmembrane domains 6 et 12. *Journal of Biological Chemistry* 268:11417-11425.
- Guarente, L. et T. Mason. 1983. Heme regulates transcription of the *CYCI* gene of *S. cerevisiae* via an upstream activation site. *Cell* 32:1279-1286.
- Hachiya, N., T. Komiya, R. Alam, J. Iwahashi, M. Sakaguchi, T. Omura et K. Mihara. 1994. MSF, a novel cytoplasmic chaperone which functions in precursor targeting to mitochondria. *EMBO Journal* 13:5146-5154.
- Harlow, E. et D. Lane. 1988. Antibodies: a laboratory manual. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Harter, C. et F. Wieland. 1996. The secretory pathway: mechanisms of protein sorting and transport. [Revue]. *Biochimica et Biophysica Acta* 1286:75-93.
- Hebert, T.E., S. Moffett, J.P. Morello, T.P. Loisel, D.G. Bichet, C. Barret et M. Bouvier. 1996. A peptide derived from a beta2-adrenergic receptor transmembrane domain inhibits both receptor dimerization and activation. *Journal of Biological Chemistry* 271:16384-16392.
- Hettema, E.H., C.W. van Roermund, B. Distel, M. van denBerg, C. Vilela, C. Rodrigues-Pousada, R.J. Wanders et H.F. Tabak. 1996. The ABC transporter proteins Pat1 and Pat2 are required for import of long-chain fatty acids into peroxisomes of *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO Journal* 15:3813-3822.
- Higgins, C.F. 1992. ABC transporters: from microorganisms to man. [Revue]. *Annual Review of Cell Biology* 8:67-113.
- Higgins, C.F. 1994. Flip-flop: the transmembrane translocation of lipids. [Revue]. *Cell* 79:393-395.
- Higgins, C.F. 1995. The ABC of channel regulation. [Revue]. *Cell* 82:693-696.

- Higgins, C.F., P.D. Haag, K. Nikaido, F. Ardeshir, G. Garcia et G.F. Ames. 1982. Complete nucleotide sequence and identification of membrane components of the histidine transport operon of *S. typhimurium*. *Nature* 19;298:723-727.
- Hofmann, K. et W. Stoffel. 1993. TMbase - A database of membrane spanning proteins segments. *Biological Chemistry Hoppe-Seyler* 374,166.
- Hurt, E.C., B. Pesold-Hurt et G. Schatz. 1984a. The amino-terminal region of an imported mitochondrial precursor polypeptide can direct cytoplasmic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix. *EMBO Journal* 3:3149-3156.
- Hurt, E.C., B. Pesold-Hurt et G. Schatz. 1984b. The cleavable prepiece of an imported mitochondrial protein is sufficient to direct cytosolic dihydrofolate reductase into the mitochondrial matrix. *FEBS Letters* 178:306-310.
- Hyde, S.C., P. Emsley, M.J. Hartshorn, M.M. Mimmack, U. Gileadi, S.R. Pearce, M.P. Gallagher, D.R. Gill, R.E. Hubbard et C.F. Higgins. 1990. Structural model of ATP-binding proteins associated with cystic fibrosis, multidrug resistance and bacterial transport. *Nature* 346:362-365.
- Jessen-Marshall, A.E. et R.J. Brooker. 1996. Evidence that transmembrane segment 2 of the lactose permease is part of a conformationally sensitive interface between the two halves of the protein. *Journal of Biological Chemistry* 19;271:1400-1404.
- Jessen-Marshall, A.E., N.J. Parker et R.J. Brooker. 1997. Suppressor analysis of mutations in the loop 2-3 motif of lactose permease: evidence that glycine-64 is an important residue for conformational changes. *Journal of Bacteriology* 179:2616-2622.
- Jones, B.A. et W.L. Fangman. 1992. Mitochondrial DNA maintenance in yeast requires a protein containing a region related to the GTP-binding domain of dynamin. *Genes & Development* 6:380-389.
- Jones, J.S. et L. Prakash. 1990. Yeast *Saccharomyces cerevisiae* selectable markers in pUC18 polylinkers. *Yeast* 6:363-366.
- Juvvadi, S.R., J.S. Glavy, S.B. Horwitz et G.A. Orr. 1997. Domain organization of murine mdr1b P-glycoprotein: the cytoplasmic linker region is a potential dimerization domain. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 230:442-447.
- Kadner, R.J. 1990. Vitamin B12 transport in *Escherichia coli*: energy coupling between membranes. [Revue]. *Molecular Microbiology* 4:2027-2033.
- Kaiser, C.A., S. Michaelis et A. Mitchel. 1994. Methods in Yeast Genetics. Cold Spring Harbour Laboratory Press.
- Kamijo, K., S. Taketani, S. Yokota, T. Osumi et T. Hashimoto. 1990. The 70-kDa peroxisomal membrane protein is a member of the Mdr (P-glycoprotein)-related ATP-binding protein superfamily. *Journal of Biological Chemistry* 265:4534-4540.

- Kartner, N., J.W. Hanrahan, T.J. Jensen, A.L. Naismith, S.Z. Sun, C.A. Ackerley, E.F. Reyes, L.C. Tsui, J.M. Rommens et C.E. Bear. 1991. Expression of the cystic fibrosis gene in non-epithelial invertebrate cells produces a regulated anion conductance. *Cell* 64:681-691.
- Kast, C., V. Canfield, R. Levenson et P. Gros. 1995. Membrane topology of P-glycoprotein as determined by epitope insertion: transmembrane organization of the N-terminal domain of *mdr3*. *Biochemistry* 34:4402-4411.
- Katzmann, D.J., T.C. Hallstrom, M. Voet, W. Wysock, J. Golin, G. Volckaert et W.S. Moye-Rowley. 1995. Expression of an ATP-binding cassette transporter-encoding gene (*YORI*) is required for oligomycin resistance in *Saccharomyces cerevisiae*. *Molecular & Cellular Biology* 15:6875-6883.
- Kellems, R.E., V.F. Allison et R.A. Butow. 1975. Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. Attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria. *Journal of Cell Biology* 65:1-14.
- Kelly, A., S.H. Powis, L.A. Kerr, I. Mockridge, T. Elliott, J. Bastin, B. Uchanska-Ziegler, A. Ziegler, J. Trowsdale et A. Townsend. 1992. Assembly and function of the two ABC transporter proteins encoded in the human major histocompatibility complex. *Nature* 355:641-644.
- Kere, J., R. Norio, E. Savilahti, X. Estivill et A. de la Chapelle. 1989. Cystic fibrosis in Finland: a molecular and genealogical study. *Human Genetics* 83:20-25.
- Kerppola, R.E., V.K. Shyamala, P. Klebba et G.F. Ames. 1991. The membrane-bound proteins of periplasmic permeases form a complex. Identification of the histidine permease HisQMP complex. *Journal of Biological Chemistry* 266:9857-9865.
- Kispal, G., P. Csere, B. Guiard et R. Lill. 1997. The ABC transporter Atm1p is required for mitochondrial iron homeostasis. *FEBS Letters* 418:346-350.
- Kispal, G., H. Steiner, D.A. Court, B. Rolinski et R. Lill. 1996. Mitochondrial and cytosolic branched-chain amino acid transaminases from yeast, homologs of the *myc* oncogene-regulated Eca39 protein. *Journal of Biological Chemistry* 271:24458-24464.
- Koronakis, V. et C. Hughes. 1993. Bacterial signal peptide-independent protein export: HlyB-directed secretion of hemolysin. [Revue]. *Seminars in Cell Biology* 4:7-15.
- Kronidou, N.G., W. Oppliger, L. Bolliger, K. Hannavy, B.S. Glick, G. Schatz et M. Horst. 1994. Dynamic interaction between Isp45 and mitochondrial hsp70 in the protein import system of the yeast mitochondrial inner membrane. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 91:12818-12822.
- Kuchler, K., R.E. Sterne et J. Thorner. 1989. *Saccharomyces cerevisiae* STE6 gene product: a novel pathway for protein export in eukaryotic cells. *EMBO Journal* 8:3973-3984.

- Lathrop, J.T. et M.P. Timko. 1993. Regulation by heme of mitochondrial protein transport through a conserved amino acid motif. *Science* 259:522-525.
- Leighton, J. 1995. ATP-binding cassette transporter in *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Methods in Enzymology* 260:389-396.
- Leighton, J. et G. Schatz. 1995. An ABC transporter in the mitochondrial inner membrane is required for normal growth of yeast. *EMBO Journal* 14:188-195.
- Li, Z.S., Y.P. Lu, R.G. Zhen, M. Szczypka, D.J. Thiele et P.A. Rea. 1997. A new pathway for vacuolar cadmium sequestration in *Saccharomyces cerevisiae*: YCF1-catalyzed transport of bis(glutathionato)cadmium. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 94:42-47.
- Loo, T.W. et D.M. Clarke. 1993. Functional consequences of proline mutations in the predicted transmembrane domain of P-glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 268:3143-3149.
- Loo, T.W. et D.M. Clarke. 1994a. Prolonged association of temperature-sensitive mutants of human P-glycoprotein with calnexin during biogenesis. *Journal of Biological Chemistry* 269:28683-28689.
- Loo, T.W. et D.M. Clarke. 1994b. Reconstitution of drug-stimulated ATPase activity following co-expression of each half of human P-glycoprotein as separate polypeptides. *Journal of Biological Chemistry* 269:7750-7755.
- Loo, T.W. et D.M. Clarke. 1995a. Membrane topology of a cysteine-less mutant of human P-glycoprotein. *Journal of Biological Chemistry* 270:843-848.
- Loo, T.W. et D.M. Clarke. 1995b. P-glycoprotein. Associations between domains and between domains and molecular chaperones. *Journal of Biological Chemistry* 270:21839-21844.
- Loo, T.W. et D.M. Clarke. 1996. The minimum functional unit of human P-glycoprotein appears to be a monomer. *Journal of Biological Chemistry* 271:27488-27492.
- Lundin, M., H. Baltscheffsky et H. Ronne. 1991. Yeast *PPA2* gene encodes a mitochondrial inorganic pyrophosphatase that is essential for mitochondrial function. *Journal of Biological Chemistry* 266:12168-12172.
- Mantsala, P. et H. Zalkin. 1984. Glutamine nucleotide sequence of *Saccharomyces cerevisiae* ADE4 encoding phosphoribosylpyrophosphate amidotransferase. *Journal of Biological Chemistry* 259:8478-8484.
- Martin, J., K. Mahlke et N. Pfanner. 1991. Role of an energized inner membrane in mitochondrial protein import. $\Delta\Psi$ drives the movement of presequences. *Journal of Biological Chemistry* 266:18051-18057.

- Mayfield, S.P. 1990. Chloroplast gene regulation: interaction of the nuclear and chloroplast genomes in the expression of photosynthetic proteins. [Revue]. *Current Opinion in Cell Biology* 2:509-513.
- McConnell, S.J., L.C. Stewart, A. Talin et M.P. Yaffe. 1990. Temperature-sensitive yeast mutants defective in mitochondrial inheritance. *Journal of Cell Biology* 111:967-976.
- McGrath, J.P. et A. Varshavsky. 1989. The yeast *STE6* gene encodes a homologue of the mammalian multidrug resistance P-glycoprotein. *Nature* 340:400-404.
- McIntosh, I., M.L. Lorenzo et D.J. Brock. 1989. Frequency of $\Delta F508$ mutation on cystic fibrosis chromosomes in UK. *Lancet* 2:1404-1405.
- Michaelis, S. et C. Berkower. 1995. Sequence comparison of yeast ATP-binding cassette proteins. *Cold Spring Harbor Symposia on Quantitative Biology* 60:291-307.
- Mimura, C.S., S.R. Holbrook et G.F. Ames. 1991. Structural model of the nucleotide-binding conserved component of periplasmic permeases. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 88:84-88.
- Mosser, J., A.M. Douar, C.O. Sarde, P. Kioschis, R. Feil, H. Moser, A.M. Poustka, J.L. Mandel et P. Aubourg. 1993. Putative X-linked adrenoleukodystrophy gene shares unexpected homology with ABC transporter. *Nature* 361:726-730.
- Mourez, M., N. Hofnung et E. Dassa. 1997. Subunit interactions in ABC transporters - A conserved sequence in hydrophobic membrane proteins of periplasmic permeases defines an important site of interaction with the ATPase subunits. *EMBO Journal* 16:3066-3077.
- Muller, M., E. Bakos, E. Welker, A. Varadi, U.A. Germann, M.M. Gottesman, B.S. Morse, I.B. Roninson et B. Sarkadi. 1996. Altered drug-stimulated ATPase activity in mutants of the human multidrug resistance protein. *Journal of Biological Chemistry* 271:1877-1883.
- Mumberg, D., R. Muller et M. Funk. 1995. Yeast vectors for the controlled expression of heterologous proteins in different genetic backgrounds. *Gene* 156:119-122.
- Nagai, K. et H.C. Thogersen. 1987. Synthesis and sequence-specific proteolysis of hybrid proteins produced in *Escherichia coli*. *Methods Enzymol* 153:461-481.
- Naito, M. et T. Tsuruo. 1992. Functionally active homodimer of P-glycoprotein in multidrug-resistant tumor cells. *Biochemical & Biophysical Research Communications* 185:284-290.
- Neupert, W. 1997. Protein import into mitochondria. [Revue]. *Annual Review of Biochemistry* 66:863-917.

- Ortiz, D.F., L. Kreppel, D.M. Speiser, G. Scheel, G. McDonald et D.W. Ow. 1992. Heavy metal tolerance in the fission yeast requires an ATP-binding cassette-type vacuolar membrane transporter. *EMBO Journal* 11:3491-3499.
- Ortiz, D.F., T. Ruscitti, K.F. McCue et D.W. Ow. 1995. Transport of metal-binding peptides by HMT1, a fission yeast ABC-type vacuolar membrane protein. *Journal of Biological Chemistry* 270:4721-4728.
- Panagiotidis, C.H., M. Reyes, A. Sievertsen, W. Boos et H.A. Shuman. 1993. Characterization of the structural requirements for assembly and nucleotide binding of an ATP-binding cassette transporter. The maltose transport system of *Escherichia coli*. *Journal of Biological Chemistry* 268:23685-23696.
- Parikh, V.S., M.M. Morgan, R. Scott, L.S. Clements et R.A. Butow. 1987. The mitochondrial genotype can influence nuclear gene expression in yeast. *Science* 235:576-580.
- Pazdernik, N.J., S.M. Cain et R.J. Brooker. 1997. An analysis of suppressor mutations suggests that the two halves of the lactose permease function in a symmetrical manner. *Journal of Biological Chemistry* 272:26110-26116.
- Pearce, S.R., M.L. Mimmack, M.P. Gallagher, U. Gileadi, S.C. Hyde et C.F. Higgins. 1992. Membrane topology of the integral membrane components, OppB and OppC, of the oligopeptide permease of *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology* 6:47-57.
- Pelham, H.R. 1996. The dynamic organisation of the secretory pathway. [Revue]. *Cell Structure & Function* 21:413-419.
- Pfanner, N., M.G. Douglas, T. Endo, N.J. Hoogenraad, R.E. Jensen, M. Meijer, W. Neupert, G. Schatz, U.K. Schmitz et G.C. Shore. 1996. Uniform nomenclature for the protein transport machinery of the mitochondrial membranes. *Trends in Biochemical Sciences* 21:51-52.
- Pind, S., J.R. Riordan et D.B. Williams. 1994. Participation of the endoplasmic reticulum chaperone calnexin (p88, IP90) in the biogenesis of the cystic fibrosis transmembrane conductance regulator. *Journal of Biological Chemistry* 269:12784-12788.
- Pon, L.A. et G. Schatz. 1991. Biogenesis of yeast mitochondria. *The molecular and cellular biology of the yeast Saccharomyces: Genome dynamics, Protein Synthesis, and Energetics*. Cold Spring Harbor Laboratory Press. 333-406.
- Poruchynsky, M.S. et V. Ling. 1994. Detection of oligomeric and monomeric forms of P-glycoprotein in multidrug resistant cells. *Biochemistry* 33:4163-4174.
- Poyton, R.O. et P.V. Burke. 1992. Oxygen regulated transcription of cytochrome c and cytochrome c oxidase genes in yeast. [Revue]. *Biochimica et Biophysica Acta* 1101:252-256.

- Prasad, R., W.P. De, A. Goffeau et E. Balzi. 1995. Molecular cloning and characterization of a novel gene of *Candida albicans*, *CDR1*, conferring multiple resistance to drugs and antifungals. *Current Genetics* 27:320-329.
- Prossnitz, E., A. Gee et G.F. Ames. 1989. Reconstitution of the histidine periplasmic transport system in membrane vesicles. Energy coupling and interaction between the binding protein and the membrane complex. *Journal of Biological Chemistry* 264:5006-5014.
- Rassow, J., A.C. Maarse, E. Krainer, M. Kubrich, H. Muller, M. Meijer, E.A. Craig et N. Pfanner. 1994. Mitochondrial protein import: biochemical and genetic evidence for interaction of matrix hsp70 and the inner membrane protein MIM44. *Journal of Cell Biology* 127:1547-1556.
- Riordan, J.R., J.M. Rommens, B. Kerem, N. Alon, R. Rozmahel, Z. Grzelczak, J. Zielenski, S. Lok, N. Plavsic, J.L. Chou *et al.* 1989. Identification of the cystic fibrosis gene: cloning and characterization of complementary DNA. *Science* 245:1066-1073.
- Rose, M.D. et G.R. Fink. 1987. *KAR1*, a gene required for function of both intranuclear and extranuclear microtubules in yeast. *Cell* 48:1047-1060.
- Rubartelli, A. et R. Sitia. 1991. Interleukin 1 beta and thioredoxin are secreted through a novel pathway of secretion. [Revue]. *Biochemical Society Transactions* 19:255-259.
- Ruetz, S. et P. Gros. 1994. Phosphatidylcholine translocase: a physiological role for the *mdr2* gene. *Cell* 77:1071-1081.
- Sadee, W., V. Drubbisch, et G.L. Amidon. 1995. Biology of membrane transport proteins. [Revue]. *Pharmaceutical Research* 12:1823-1837.
- Safa, A.R., R.K. Stern, K. Choi, M. Agresti, I. Tamai, N.D. Mehta et I.B. Roninson. 1990. Molecular basis of preferential resistance to colchicine in multidrug-resistant human cells conferred by Gly-185---Val-185 substitution in P-glycoprotein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 87:7225-7229.
- Sambrook, J., T. Maniatis et Fritsch E.F. 1989. Molecular Cloning. A laboratory manual. 2nd edition. Cold Spring Harbor Laboratory Press.
- Sanglard, D., F. Ischer, M. Monod et J. Bille. 1997. Cloning of *Candida albicans* genes conferring resistance to azole antifungal agents: characterization of *CDR2*, a new multidrug ABC transporter gene. *Microbiology* 143:405-416.
- Saraste, M., P.R. Sibbald et A. Wittinghofer. 1990. The P-loop--a common motif in ATP- and GTP-binding proteins. [Revue]. *Trends in Biochemical Sciences* 15:430-434.
- Saurin, W., W. Koster et E. Dassa. 1994. Bacterial binding protein-dependent permeases: characterization of distinctive signatures for functionally related integral cytoplasmic membrane proteins. *Molecular Microbiology* 12:993-1004.

- Savary, S., R. Allikmets, F. Denizot, M.F. Luciani, M.G. Mattei, M. Dean et G. Chimini. 1997. Isolation and chromosomal mapping of a novel ATP-binding cassette transporter conserved in mouse and human. *Genomics* 41:275-278.
- Schneider, B.L., W. Seufert, B. Steiner, Q.H. Yang et A.B. Futcher. 1995. Use of polymerase chain reaction epitope tagging for protein tagging in *Saccharomyces cerevisiae*. *Yeast* 11:1265-1274.
- Schneider, H.C., J. Berthold, M.F. Bauer, K. Dietmeier, B. Guiard, M. Brunner et W. Neupert. 1994. Mitochondrial Hsp70/MIM44 complex facilitates protein import. *Nature* 371:768-774.
- Seibert, F.S., P. Linsdell, T.W. Loo, J.W. Hanrahan, J.R. Riordan et D.M. Clarke. 1996. Cytoplasmic loop three of cystic fibrosis transmembrane conductance regulator contributes to regulation of chloride channel activity. *Journal of Biological Chemistry* 271:27493-27499.
- Seraphin, B., M. Simon, A. Boulet et G. Faye. 1989. Mitochondrial splicing requires a protein from a novel helicase family. *Nature* 337:84-87.
- Servos, J., E. Haase et M. Brendel. 1993. Gene *SNQ2* of *Saccharomyces cerevisiae*, which confers resistance to 4-nitroquinoline-N-oxide and other chemicals, encodes a 169 kDa protein homologous to ATP-dependent permeases. *Molecular & General Genetics* 236:214-218.
- Shani, N. et D. Valle. 1996. A *Saccharomyces cerevisiae* homolog of the human adrenoleukodystrophy transporter is a heterodimer of two half ATP-binding cassette transporters. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 93:11901-11906.
- Shani, N., P.A. Watkins et D. Valle. 1995. *PXA1*, a possible *Saccharomyces cerevisiae* ortholog of the human adrenoleukodystrophy gene. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:6012-6016.
- Shimada, Y., S. Okuno, A. Kawai, H. Shinomiya, A. Saito, M. Suzuki, Y. Omori, N. Nishino, N. Kanemoto, T. Fujiwara, M. Horie et E. Takahashi. 1998. Cloning and chromosomal mapping of a novel ABC transporter gene (*hABC7*), a candidate for X-linked sideroblastic anemia with spinocerebellar ataxia. *Journal of Human Genetics* 43:115-122.
- Sikorski, R.S. et P. Hieter. 1989. A system of shuttle vectors and yeast host strains designed for efficient manipulation of DNA in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 122:19-27.
- Skala, J., B. Purnelle et A. Goffeau. 1992. The complete sequence of a 10.8 kb segment distal of *SUF2* on the right arm of chromosome III from *Saccharomyces cerevisiae* reveals seven open reading frames including the *RVS161*, *ADP1* and *PGK* genes. *Yeast* 8:409-417.

- Smart, C.C. et A.J. Fleming. 1996. Hormonal and environmental regulation of a plant PDR5-like ABC transporter. *Journal of Biological Chemistry* 271:19351-19357.
- Smit, J.J., A.H. Schinkel, E.P. Oude, A.K. Groen, E. Wagenaar, L. van Deemter, C.A. Mol, R. Ottenhoff, N.M. van derLugt, M.A. van Roon *et al.* 1993. Homozygous disruption of the murine *mdr2* P-glycoprotein gene leads to a complete absence of phospholipid from bile and to liver disease. *Cell* 75:451-462.
- Spies, T., V. Cerundolo, M. Colonna, P. Cresswell, A. Townsend et R. DeMars. 1992. Presentation of viral antigen by MHC class I molecules is dependent on a putative peptide transporter heterodimer. *Nature* 355:644-646.
- Stepien, P.P., S.P. Margossian, D. Landsman et R.A. Butow. 1992. The yeast nuclear gene *svv3* affecting mitochondrial post-transcriptional processes encodes a putative ATP-dependent RNA helicase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89:6813-6817.
- Stewart, L.C. et M.P. Yaffe. 1991. A role for unsaturated fatty acids in mitochondrial movement and inheritance. *Journal of Cell Biology* 115:1249-1257.
- Susek, R.E., F.M. Ausubel et J. Chory. 1993. Signal transduction mutants of Arabidopsis uncouple nuclear CAB and RBCS gene expression from chloroplast development. *Cell* 74:787-799.
- Szczyпка, M.S., J.A. Wemmie, W.S. Moye-Rowley et D.J. Thiele. 1994. A yeast metal resistance protein similar to human cystic fibrosis transmembrane conductance regulator (CFTR) and multidrug resistance-associated protein. *Journal of Biological Chemistry* 269:22853-22857.
- Teem, J.L., H.A. Berger, L.S. Ostedgaard, D.P. Rich, L.C. Tsui et M.J. Welsh. 1993. Identification of revertants for the cystic fibrosis $\Delta F508$ mutation using STE6-CFTR chimeras in yeast. *Cell* 73:335-346.
- Thomas, P.M., G.J. Cote, N. Wohllk, B. Haddad, P.M. Mathew, W. Rabl, L. Aguilar-Bryan, R.F. Gagel et J. Bryan. 1995. Mutations in the sulfonyleurea receptor gene in familial persistent hyperinsulinemic hypoglycemia of infancy. *Science* 268:426-429.
- Thorsness, P.E. et T.D. Fox. 1993. Nuclear mutations in *Saccharomyces cerevisiae* that affect the escape of DNA from mitochondria to the nucleus. *Genetics* 134:21-28.
- Townsend, A. et J. Trowsdale. 1993. The transporters associated with antigen presentation. [Review]. *Seminars in Cell Biology* 4:53-61.
- Treptow, N.A. et H.A. Shuman. 1985. Genetic evidence for substrate and periplasmic-binding-protein recognition by the MalF and MalG proteins, cytoplasmic membrane components of the *Escherichia coli* maltose transport system. *Journal of Bacteriology* 163:654-660.

- Tusnady, G.E., E. Bakos, A. Varadi et B. Sarkadi. 1997. Membrane topology distinguishes a subfamily of the ATP-binding cassette (ABC) transporters. [Revue]. *FEBS Letters* 402:1-3.
- Tzagoloff, A. et C.L. Dieckmann. 1990. PET genes of *Saccharomyces cerevisiae*. [Revue]. *Microbiological Reviews* 54:211-225.
- Tzagoloff, A. et A.M. Myers. 1986. Genetics of mitochondrial biogenesis. [Revue]. *Annual Review of Biochemistry* 55:249-285.
- Ueda, K., C. Cardarelli, M.M. Gottesman et I. Pastan. 1987. Expression of a full-length cDNA for the human "MDR1" gene confers resistance to colchicine, doxorubicin, and vinblastine. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 84:3004-3008.
- van Helvoort, H.A., A.J. Smith, H. Sprong, I. Fritzsche, A.H. Schinkel, P. Borst et G. van Meer. 1996. MDR1 P-glycoprotein is a lipid translocase of broad specificity, while MDR3 P-glycoprotein specifically translocates phosphatidylcholine. *Cell* 87:507-517.
- Verner, K. 1993. Co-translational protein import into mitochondria: an alternative view. [Revue]. *Trends in Biochemical Sciences* 18:366-371.
- Vidal, M., A.M. Buckley, F. Hilger et R.F. Gaber. 1990. Direct selection for mutants with increased K⁺ transport in *Saccharomyces cerevisiae*. *Genetics* 125:313-320.
- von Heijne, G. 1986. Mitochondrial targeting sequences may form amphiphilic helices. *EMBO Journal* 5:1335-1342.
- Walker, J.E., M. Saraste, M.J. Runswick et N.J. Gay. 1982. Distantly related sequences in the alpha- and beta-subunits of ATP synthase, myosin, kinases and other ATP-requiring enzymes and a common nucleotide binding fold. *EMBO Journal* 1:945-951.
- Wang, R.C., S.J. Seror, M. Blight, J.M. Pratt, J.K. Broome-Smith et I.B. Holland. 1991. Analysis of the membrane organization of an *Escherichia coli* protein translocator, HlyB, a member of a large family of prokaryote and eukaryote surface transport proteins. *Journal of Molecular Biology* 217:441-454.
- Wilson, C.M., A.E. Serrano, A. Wasley, M.P. Bogenschutz, A.H. Shankar et D.F. Wirth. 1989. Amplification of a gene related to mammalian *mdr* genes in drug-resistant *Plasmodium falciparum*. *Science* 244:1184-1186.
- Yanisch-Perron, C., J. Vieira et J. Messing. 1985. Improved M13 phage cloning vectors and host strains: nucleotide sequences of the M13mp18 and pUC19 vectors. *Gene* 33:103-119.
- Zaman, G.J., M.J. Flens, M.R. van Leusden, M. de Hass, H.S. Mulder, J. Lankelma, H.M. Pinedo, R.J. Scheper, F. Baas, H.J. Broxterman *et al.* 1994. The human multidrug resistance-associated protein MRP is a plasma membrane drug-efflux pump.

Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America 91:8822-8826.

Zaman, G.J., J. Lankelma, O. van Teelingen, J. Beijnen, H. Dekker, C. Paulusma, E.P. Oude, F. Baas et P. Borst. 1995. Role of glutathione in the export of compounds from cells by the multidrug-resistance-associated protein. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 92:7690-7694.

Zhang, L. et L. Guarente. 1994. HAP1 is nuclear but is bound to a cellular factor in the absence of heme. *Journal of Biological Chemistry* 269:14643-14647.