



LEXIQUE

Génétique mitochondriale : le modèle de la levure

Les premiers mutants respiratoires à hérédité cytoplasmique furent isolés chez la levure *Saccharomyces cerevisiae* en 1949, par Ephrussi et Slonimski [1]. Ces mutants furent appelés « petite » en raison de la petite taille des colonies sur milieu gélosé. Le caractère « petite » semblait être contrôlé par un élément cytoplasmique auto-reproductible, le facteur *rho*. Dans les années 1960, l'existence d'un ADN mitochondrial (ADNmt) fut démontré chez les vertébrés et chez *S. cerevisiae*. Cet ADN correspondait au facteur *rho*, l'ADNmt des mutants « petite » ou *rho*⁻ présentant de grands réarrangements par rapport à celui de la souche sauvage. Par la suite, de nombreuses mutations mitochondriales ponctuelles furent isolées chez la levure, permettant l'établissement des règles de la transmission des caractères mitochondriaux et la réalisation d'une carte fonctionnelle du génome mitochondrial (pour revue, voir [2]). Enfin, au cours des quinze dernières années, les ADNmt de divers eucaryotes, tout particulièrement les levures, les plantes (pour revue, voir [3]) et l'homme (pour revue, voir [4, 5]) ont fait l'objet de nombreuses études moléculaires qui ont permis de mieux comprendre l'organisation et l'expression de ces divers génomes mitochondriaux et ont, en particulier, démontré l'importance des interactions nucléo-mitochondriales (pour revue, voir [5, 6]). Cet article fait le point sur cette question dans le modèle expérimental où l'étude est de loin la plus avancée, la levure *S. cerevisiae* tout en mentionnant les données connues dans d'autres systèmes, en particulier chez l'homme.

Mutations mitochondriales

La principale fonction de la mitochondrie est d'assurer la production d'énergie sous forme d'ATP, via l'activité de la chaîne respiratoire.

Chez *S. cerevisiae*, il est possible de bloquer les fonctions respiratoires sans aboutir à la mort de la cellule, la fermentation permettant une production d'ATP suffisante pour la survie. Il est donc possible d'isoler des mutants respiratoires viables. Quatre classes de mutations mitochondriales ont été isolées et caractérisées chez *S. cerevisiae*.

1. Les mutations *rho*⁻ correspondent à de grandes délétions du génome mitochondrial, pouvant couvrir plusieurs gènes. Ces délétions sont compensées par des répétitions de la région conservée. Le cas extrême correspond à une délétion complète de l'ADNmt (mutations *rho*^o). Les mutations *rho*⁻/*rho*^o se produisent spontanément avec une fréquence élevée (on observe quelques pour cent de mutants *rho*⁻/*rho*^o dans toutes les cultures de levure) mais on peut en augmenter la fréquence jusqu'à 100 % en cultivant les cellules en présence d'agents intercalants de l'ADN tel que le bromure d'éthidium. Physiologiquement ces mutants se caractérisent par des déficits multiples des activités de la chaîne respiratoire mitochondriale.

2. Les mutations ponctuelles *antR* sont responsables de résistance à des inhibiteurs qui affectent les ribosomes mitochondriaux (par exemple, le chloramphénicol) ou les complexes de la chaîne respiratoire (par exemple l'antimycine). Elles sont localisées dans les gènes codant, soit pour les ARNr des ribosomes mitochondriaux, soit pour certaines sous-unités des enzymes respiratoires (par exemple, le cytochrome *b* pour les mutations conférant la résistance à l'antimycine).

3. Les mutations ponctuelles *mit* provoquent une déficience de certains enzymes respiratoires et sont localisées dans les gènes codant pour les sous-unités de ces enzymes. A la différence des mutations *rho*⁻, elles n'affectent pas l'intégrité de l'ADNmt.

4. Les mutations *syn*⁻ sont des mutations ponctuelles qui affectent un composant de la machinerie de traduction mitochondriale (par exemple, ARNt). Le blocage de la traduction mitochondriale aboutissant à la perte du génome mitochondrial (production de mutants *rho*⁻/*rho*^o), seuls les mutants *syn*⁻ conditionnels sont stables.

Des mutations de type *antR* ou *mit* ont été également isolées chez une autre levure *Schizosaccharomyces pombe*. En revanche, les mutations *rho*⁻/*rho*^o sont létales chez *S. pombe* et cette levure est dite « petite négative ». Chez l'homme, de nombreuses maladies à déterminisme mitochondrial ont été décrites ces dernières années (pour revue, voir [4, 5, 7]). Elles sont dues, soit à des réarrangements (délétions, duplications) du génome mitochondrial comparables aux mutants *rho*⁻, soit à des mutations ponctuelles dans des ARNt ou dans des gènes codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire (équivalentes aux mutations *syn*⁻ ou *mit* de la levure). Il est également possible d'induire par le bromure d'éthidium la perte complète du génome mitochondrial des cellules humaines en culture (cellules *rho*^o). Enfin des réarrangements de l'ADNmt ont été également observés chez les plantes, en particulier dans les cas de stérilité mâle cytoplasmique (pour revue, voir [3]), et chez les champignons filamenteux au cours des phénomènes de sénescence et de mort prématurée (pour revue, voir [8]).

Règles de la génétique mitochondriale

Le génome mitochondrial est un système génétique à copies multiples (50 à 100 copies par cellule pour *S. cerevisiae*, des milliers pour l'homme), les deux parents pouvant apporter un nombre de copies différent lors du croisement et de la formation du zygote, le cas extrême

étant constitué dans les cas d'hérédité maternelle (par exemple chez l'homme) par un apport quasiment monoparental. Dans les cas d'hérédité mitochondriale biparentale comme chez *S. cerevisiae*, on observe une ségrégation très rapide des deux génomes mitochondriaux au cours des mitoses successives qui aboutit à la formation de diploïdes homoplasmiques ne possédant qu'un seul type de génome mitochondrial au bout d'une dizaine de générations. Il y a donc une ségrégation mitotique des caractères mitochondriaux. Lorsque des conditions défavorables de culture induisent la méiose dans un diploïde homoplasmique, on obtient quatre spores haploïdes ayant le même génotype mitochondrial que la cellule diploïde parentale.

La rapide ségrégation mitotique joue probablement un rôle important dans la sélection des mutants mitochondriaux. En effet, si une mutation apparaît sur une copie d'ADNmt au sein d'une population de molécules non mutées, le phénotype mutant ne pourra s'exprimer qu'après un certain enrichissement en molécules mutées par rapport aux molécules sauvages, l'ultime étape étant l'obtention d'un mutant homoplasmique. Cependant, dans les cas de réarrangements majeurs de l'ADNmt (par exemple dans les cas de myopathies humaines), l'état hétéroplasmique indispensable à la survie peut se maintenir au cours des divisions cellulaires.

L'analyse de croisements entre des souches haploïdes portant différentes mutations mitochondriales a montré qu'il existe des événements de recombinaison réciproque conduisant à la formation de nouveaux génotypes mitochondriaux. Cette recombinaison très efficace a lieu avant la ségrégation dans les diploïdes hétéroplasmiques. La fréquence maximum de recombinaison entre deux marqueurs indépendants est de 25 % si les deux parents possèdent le même nombre de copies d'ADNmt au moment du croisement. Cette fréquence est celle attendue si l'on suppose que les événements d'appariements se font au hasard, une molécule d'ADNmt ayant autant de chance de s'apparier et de recom-

biner avec une molécule qui lui est semblable qu'avec une molécule venant de l'autre parent.

A ces événements de recombinaison réciproque, s'ajoutent des phénomènes de conversion génique qui s'observent pour des marqueurs situés à proximité de certains introns mitochondriaux. Par exemple, lors d'un croisement entre une souche possédant un intron de groupe I mobile donné et une souche ne le possédant pas, l'endonucléase de l'ADN codée par cet intron reconnaît un site spécifique dans le gène mitochondrial ne possédant pas l'intron et réalise une coupure double brin. L'ADNmt coupé se répare ensuite en insérant une copie de l'intron par un mécanisme de conversion s'étendant aux marqueurs situés dans les exons voisins (phénomène de co-conversion).

Organisation du génome mitochondrial

Une combinaison d'études génétiques et moléculaires a permis de réaliser une carte fonctionnelle du génome mitochondrial de *S. cerevisiae*. Pour réaliser la carte génétique, les études classiques de fréquence de recombinaison entre deux marqueurs n'ont été que peu employées mais une autre technique utilisant les mutants *rho⁻/rho^o* a été très utilisée. Elle consiste à réaliser une cartographie par délétion en croisant systématiquement les mutants ponctuels (par exemple un mutant *rho⁺ mit⁻*) avec une collection de mutants (*rho⁻ mit⁺*) présentant différentes délétions du génome mitochondrial. Les mutants *rho⁻* ayant conservé la région de l'ADNmt portant l'allèle sauvage *mit⁺* peuvent par recombinaison apporter l'allèle *mit⁺* au génome *rho⁺* et donner des recombinés sauvages (*rho⁺ mit⁺*). Cette méthode repose sur le fait que la séquence retenue dans le génome *rho⁻* ne possède pas de délétions ou de réarrangements internes. On peut ainsi classer les mutations ponctuelles dans les intervalles définis par les extrémités des séquences retenues dans les *rho⁻*. Après comparaison avec la carte moléculaire des ADN *rho⁻*, ces intervalles peuvent être situés sur la carte physique de l'ADNmt.

La cartographie des mutations *antR*, *mit⁻* et *syn⁻* a permis de localiser les principaux gènes sur la carte du génome mitochondrial de *S. cerevisiae* et de déterminer leur fonction (figure 1A). Le génome mitochondrial de *S. cerevisiae* code pour, d'une part différentes sous-unités des complexes respiratoires et, d'autre part une protéine du ribosome mitochondrial et tous les ARN nécessaires à la traduction mitochondriale. De plus, trois gènes mitochondriaux sont morcelés et certains introns mitochondriaux codent pour des ADN-endonucléases ou des ARN-maturases. Les ADN-endonucléases sont responsables de la mobilité des introns d'un génome à un autre (voir plus haut). Les ARN-maturases sont nécessaires à l'exérèse des introns mitochondriaux, une ARN-maturase codée par un intron donné étant en général nécessaire à l'épissage de cet intron. En effet, bien que la plupart des introns mitochondriaux soient auto-épissables *in vitro*, cet épissage nécessite *in vivo* toute une panoplie de protéines codées, soit par les introns mitochondriaux, soit par le génome nucléaire. Le génome mitochondrial de nombreuses espèces a été étudié. Bien qu'il ne code dans tous les cas que pour un petit nombre de gènes, il présente une taille très variable selon les organismes : 17 kb chez l'homme, 75 kb chez *S. cerevisiae* et jusqu'à 2 500 kb chez certaines plantes. Le génome humain est très compact : les deux brins d'ADN sont codants, il y a de courtes régions intergéniques et pas d'intron, enfin l'ADNmt ne code souvent que pour le T du codon non-sens TAA, les deux A étant ajoutés lors de la polyadénylation (figure 1B). Quel que soit l'organisme, l'ADNmt code toujours pour les ARNr ainsi que pour le cytochrome *b* et la sous-unité I de la cytochrome oxydase. Les autres sous-unités des complexes respiratoires sont codées, selon les organismes, soit par le génome mitochondrial soit par le génome nucléaire. Par exemple, le génome mitochondrial humain code également pour sept sous-unités du complexe I de la chaîne respiratoire, les sous-unités II et III de la cytochrome oxydase et deux sous-unités de l'ATP synthase.

Expression du génome mitochondrial

Bien que le génome mitochondrial soit petit, la mitochondrie dispose d'une machinerie complète pour répliquer, transcrire et traduire son génome.

• Réplication et transcription

Chez la levure il n'existe pas d'origines de réplication « *sensu stricto* » ce qui explique que les ADNmt de levure *rho⁻* présentant des délétions variées soient capables de se répliquer. Cependant, certains fragments d'ADNmt semblent se répliquer plus efficacement que d'autres, ce qui suggère l'existence d'une certaine hiérarchie des séquences permettant l'initiation de la réplication. Les *rho⁻*, dont l'ADNmt présentent une forte

amplification d'une origine de réplication majeure, semblent ainsi pouvoir se répliquer plus vite que l'ADNmt non délété. Ces *rho⁻* sont dites hypersuppressives, car lors d'un croisement avec une souche *rho⁺*, la majorité de la descendance est identique à la *rho⁻* parentale. Chez l'homme, l'ADNmt, plus petit, contient seulement deux origines de réplication, une pour chaque brin d'ADNmt.

La transcription du génome mitochondrial de *S. cerevisiae* débute à un nonanucléotide strictement conservé, reconnu par un facteur de transcription spécifique et donne naissance à une dizaine de transcrits majeurs polycistroniques (figure 1A). La maturation de ces ARN a lieu au niveau d'un dodécamère situé à l'extrémité 3' des gènes mitochondriaux. Chez les mammifères, les deux brins

d'ADN sont transcrits sous la forme de deux grands ARN polycistroniques, les deux promoteurs étant localisés dans la même région non codante proche de l'origine de réplication du brin dit « lourd » (figure 1B). Ce sont les ARNt, situés entre les futurs ARNm, qui jouent le rôle de signaux de maturation. Certains ARN mitochondriaux sont ensuite épissés chez la levure et les plantes et/ou édités chez les trypanosomes et les plantes.

Un certain nombre de facteurs nécessaires à la réplication et la transcription de l'ADNmt semblent conservés de la levure à l'homme, bien que ces processus diffèrent sensiblement dans les deux organismes (pour revue, voir [9]). Par exemple, un facteur stimulant la transcription chez la levure peut être remplacé par le facteur humain homologue.

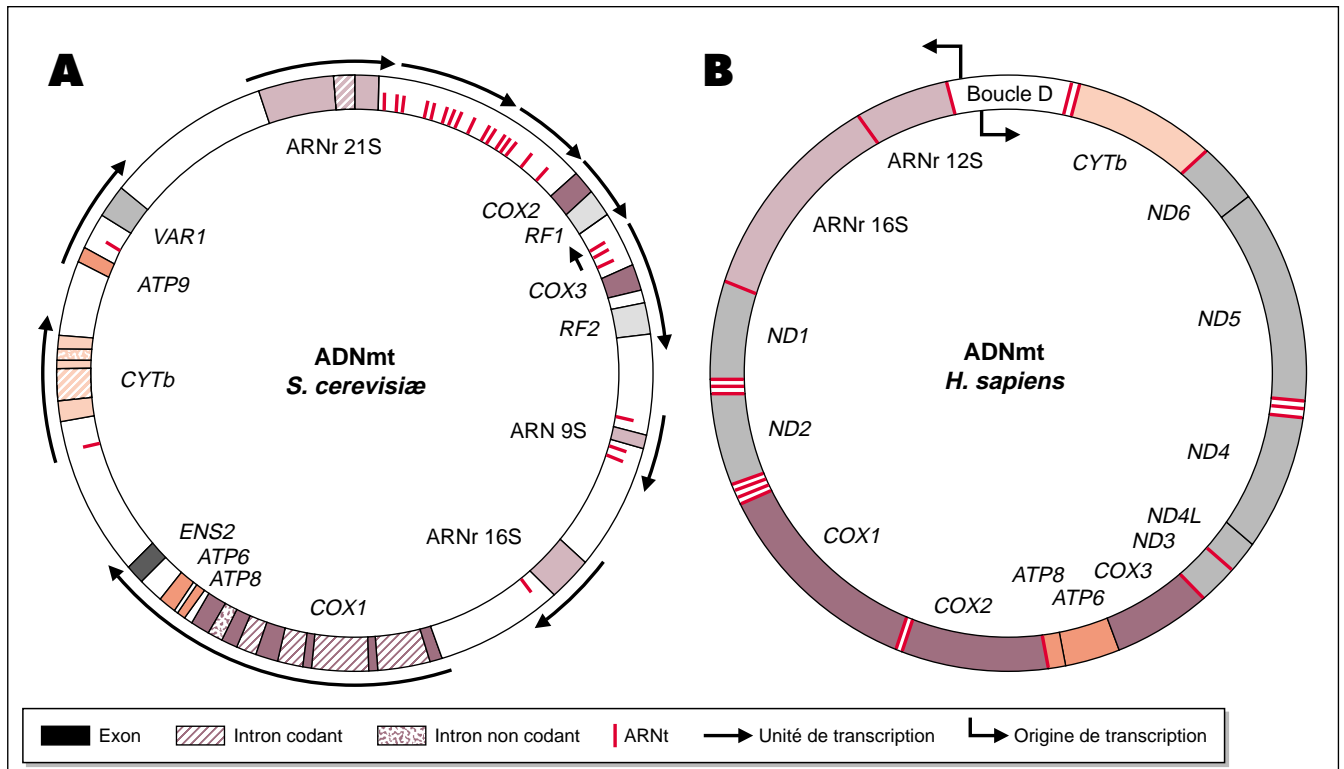


Figure 1. **Carte de l'ADN mitochondrial de *Saccharomyces cerevisiae* (A) et de *Homo sapiens* (B).** CYTb : code pour le cytochrome b de l'ubiquinone cytochrome c oxydo-réductase, COX1, COX2, COX3 : trois sous-unités de la cytochrome c oxydase, ATP6, ATP8, ATP9 : trois sous-unités de l'ATP synthase, ND1 à ND6 : sept sous-unités de la NADH déshydrogénase, VAR1 une protéine du ribosome mitochondrial et ENS2 : une endonucléase. ARNr : ARN du ribosome mitochondrial ; ARN 9S : ARN de la RNaseP mitochondriale. RF1 et RF2 sont deux phases ouvertes de lecture qui sont interrompues par un série de GC chez *S. cerevisiae*. Chez *S. cerevisiae*, le nombre d'introns présents dans les gènes CYTB et COX1 et dans le gène codant pour l'ARN 21S peut varier d'une souche à une autre et une souche parfaitement viable possédant un génome mitochondrial sans intron a pu être construite.

• Traduction

La traduction mitochondriale présente trois propriétés originales (pour revue, voir [10]). Premièrement, il y a une diversité de codes génétiques mitochondriaux qui diffèrent légèrement du code dit universel. Par exemple, chez les mitochondries de mammifères et de levure, le codon UGA code pour un tryptophane. De plus, chez les mammifères, le codon AGA fonctionne comme un codon stop et le codon AUA code pour une méthionine ou le codon d'initiation, au lieu d'une isoleucine et, chez la levure, les codons CUN codent pour une thréonine au lieu d'une leucine. Deuxièmement, un petit nombre d'ARNt sont utilisés (24 chez la levure, 22 chez les mammifères) ce qui s'explique principalement par le fait que, dans la mitochondrie, un seul ARNt avec un U non modifié en troisième position peut reconnaître les 4 codons d'une même famille codant pour le même acide aminé. Enfin, il existe chez la levure, pour chaque protéine codée par l'ADNmt, plusieurs protéines d'origine cytoplasmique contrôlant spécifiquement le début de la traduction. Ces facteurs spécifiques interagissent avec les régions 5' non traduites des ARNm mitochondriaux de levure. Il est peu probable que de tels facteurs existent chez les mammifères car leurs ARNm mitochondriaux ne présentent pas d'extension non traduite.

Interactions nucléo-mitochondriales

Étant donné la taille du génome mitochondrial, la plupart des protéines nécessaires à l'expression du génome mitochondrial sont codées par le noyau, traduites dans le cytoplasme puis importées dans la mitochondrie. Chez *S. cerevisiae*, on a étudié au cours de ces dix dernières années plusieurs centaines de mutants, appelés *pet*, conduisant à une déficience respiratoire et présentant une hérédité mendélienne classique. Par transformation de ces mutants *pet* avec une banque d'ADN génomique de levure sauvage suivie de la sélection des transformants ayant récupéré la capacité de respi-

rer, les gènes *PET* correspondant ont été clonés. Les gènes nucléaires codant pour l'ADN polymérase et pour la plupart des ARNt-synthétases et pour les protéines nécessaires à la traduction spécifique d'un ARNm ou à l'assemblage d'un complexe respiratoire – pour ne citer que quelques exemples –, ont été ainsi identifiés (pour revue, voir [6]). Il a été montré qu'en transformant ces mutants *pet* avec des banques d'ADNc de cellules humaines, il est possible de cloner des ADNc humains isofonctionnels aux gènes *PET* de levure [11-13]. D'autre part, des mutants *pet* ont aussi été utilisés pour préciser la fonction de gènes humains homologues (*ms n°1*, 1998, p. 104) [14, 15]. Ainsi, bien qu'il y ait des différences évidentes entre les génomes mitochondriaux de levure et de mammifères, la levure *S. cerevisiae* reste le modèle génétique de choix pour étudier non seulement la génétique mitochondriale mais aussi les gènes nucléaires contrôlant des fonctions mitochondriales conservées au cours de l'évolution, en particulier chez l'homme. En effet il existe également de nombreuses maladies mitochondriales dues à des mutations à hérédité mendélienne et se caractérisant par des déficits de la chaîne respiratoire. La levure peut ainsi servir d'intermédiaire pour isoler ou étudier la fonction des gènes nucléaires responsables de ces maladies ■

Remerciements

Je remercie le Professeur P.P. Slonimski, les Drs O. Groudinsky, J. Verdière et N. Bonnefoy pour leur lecture critique du manuscrit et l'Association Française contre les Myopathies pour son soutien financier.

Geneviève Dujardin

Directeur de recherche au Cnrs. Centre de génétique moléculaire, avenue de la Terrasse, 91198 Gif-sur-Yvette, France.

RÉFÉRENCES

1. Ephrussi B, Slonimski PP. Subcellular units involved in the synthesis of respiratory enzymes in yeast. *Nature* 1955; 176: 1207-9.

2. Dujon B. Mitochondrial genetics and functions. «The molecular biology of the yeast *Saccharomyces*: life cycle and inheritance» eds. JN Strathern, EW Jones & JR Broach. Cold Spring Harbor Laboratory, NY, 1981 : 505-635.

3. Newton KJ. Plant mitochondrial genomes. Organisation, expression and variation. *Annu Rev Plant Physiol Plant Mol Biol* 1988; 39: 503-32.

4. Wallace DC. Mitochondrial DNA sequence variation in human evolution and disease. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8739-46.

5. Larsson NG, Clayton DA. Molecular aspects of human mitochondrial disorders. *Annu Rev Genetics* 1995; 29: 151-78.

6. Poyton RO, McEwen JE. Crosstalk between nuclear and mitochondrial genomes. *Annu Rev Biochem* 1996; 65: 563-607.

7. Possekel S, Boitier E, Marsac C, Degoul F. Maladies mitochondriales : génétique, pathogénie et perspectives thérapeutiques. *Med Sci* 1996; 12: 64-7.

8. Sainsart-Chanet A, Sellem C, Silar P, Belcour L, Dequard-Chablat M, Picard M. Sénescence chez les champignons filamenteux. *Med Sci* 1994; 10: 574-6.

9. Schmidt ME, Clayton DA. Conserved features of yeast and mammalian mitochondrial DNA replication. *Curr Opin Genet Dev* 1993; 3: 769-74.

10. Costanzo MC, Fox TD. Control of mitochondrial gene expression in *Saccharomyces cerevisiae*. *Annu Rev Genet* 1990; 24: 91-113.

11. Glerum DM, Tzagoloff A. Isolation of a human cDNA for hemeA: farnesyltransferase by functional complementation of a yeast *cox10* mutant. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 8452-6.

12. Bonnefoy N, Kermorgant M, Groudinsky O, Minet N, Slonimski PP, Dujardin G. Cloning of a human gene involved in cytochrome oxidase assembly by functional complementation of an *oxa1-* mutation in *Saccharomyces cerevisiae*. *Proc Natl Acad Sci USA* 1994; 91: 11978-82.

13. Amaravadi R, Glerum MD, Tzagoloff A. Isolation of a cDNA encoding the human homolog of *COX17*, a yeast gene essential for mitochondrial copper recruitment. *Hum Genet* 1997; 99: 329-33.

14. Bourgeron T, Rustin P, Chretien D, Birch-Machin M, Bourgeois M, Viegas-Pequignot E, Munnich A, Rötig A. Mutation of a nuclear succinate dehydrogenase gene results in mitochondrial respiratory chain deficiency. *Nat Genet* 1995; 11: 144-9.

15. Rötig A, de Lonlay P, Chretien D, Foury F, Koenig M, Sidi D, Munnich A, Rustin P. Aconitase and mitochondrial iron-sulphur protein deficiency in Friedreich ataxia. *Nat Genet* 1997; 17: 215-7.

TIRÉS À PART

G. Dujardin.