

#### Etudes des ATPases AAA+ ATAD3A et ATAD3B

Nicolas Merle

#### ▶ To cite this version:

Nicolas Merle. Etudes des ATPases AAA+ ATAD3A et ATAD3B. Autre [q-bio.OT]. Université de Grenoble, 2011. Français. NNT: 2011GRENV069 . tel-00684481

#### HAL Id: tel-00684481 https://theses.hal.science/tel-00684481

Submitted on 2 Apr 2012

**HAL** is a multi-disciplinary open access archive for the deposit and dissemination of scientific research documents, whether they are published or not. The documents may come from teaching and research institutions in France or abroad, or from public or private research centers. L'archive ouverte pluridisciplinaire **HAL**, est destinée au dépôt et à la diffusion de documents scientifiques de niveau recherche, publiés ou non, émanant des établissements d'enseignement et de recherche français ou étrangers, des laboratoires publics ou privés.

#### UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

#### **THÈSE**

Pour obtenir le grade de

### DOCTEUR DE L'UNIVERSITÉ DE GRENOBLE

Spécialité : Biologie Cellulaire

Arrêté ministériel : 7 août 2006

Présentée par

#### **Nicolas Merle**

Thèse dirigée par **Jacques Baudier** et codirigée par **Emmanuel Taillebourg** 

préparée au sein du Laboratoire Biologie à Grande Echelle dans l'École Doctorale Chimie et Sciences du Vivant

# Etudes des ATPases AAA+ ATAD3A et ATAD3B

Thèse soutenue publiquement le **Mardi 22 Novembre 2011** devant le jury composé de :

#### Pr Eva PEBAY-PEYROULA

Professeur, Grenoble, Présidente

#### Mme Mahnaz AMELI-MORADI

Maître de conférences, Lyon, Rapporteur

#### Mr Manuel ROJO

Directeur d'équipe, Bordeaux, Rapporteur

#### **Mr Olivier FERAUD**

Ingénieur de Recherche, Paris, Examinateur



#### Remerciements

Le travail présenté dans ce mémoire a été réalisé au CEA de Grenoble dans l'équipe Biomics, dirigée par Xavier Gidrol, dans le laboratoire Biologie à Grande Echelle. Je tiens à remercier Eva Pebay-Peyroula d'avoir accepté de présider ce jury de thèse. J'exprime également toute ma gratitude et ma reconnaissance à Mahnaz Améli-Moradi, Manuel Rojo et Olivier Feraud, qui ont accepté de faire partie de ce jury et de consacrer du temps afin d'examiner, juger et d'améliorer ce mémoire de thèse.

Je dédie cette thèse à la mémoire de mon père et de mon grand-père, qui ont eu la patience de m'écouter parler des débuts de ce projet, sans pouvoir être encore là pour en voir la fin.

Je tiens à remercier les personnes suivantes :

Tout d'abord, Jacques Baudier, mon directeur de thèse, pour la confiance et la liberté qu'il a su m'accorder. Ta passion pour la paillasse et ta grande culture ont toujours été utile lors des hauts et des bas de ce projet. Pour mon codirecteur, Emmanuel Taillebourg, tu as été un modèle à suivre pour ta capacité à prendre soins des petites drosophiles, de prévoir et d'expliquer les croisements avec une facilité déconcertante! Ensemble, vous m'avez beaucoup appris sur le travail en équipe et sur la gestion de projets.

Cette double vie entre l'équipe « Jacques » et l'équipe « droso » puis entre les bâtiments C3 et 40.20, m'a permis de côtoyer un bon nombre de personnes, experts en leurs domaines et avec une grande capacité à insuffler la bonne humeur au labo :

Nicole, la mama philosophe de l'équipe, Dominique, qui ne baisse jamais les bras ni devant un sommet ni devant un blot, Marie-Odile, attentionnée et toujours à l'écoute, et « mes » co-thésardes, Jackie, Elodie, Anne-Claire et Perrine pour leurs innombrables histoires du matin et leur soutien sans faille. Olivia, même si tu ne te souviens pas de notre rencontre en quatrième à Stendhal, j'ai beaucoup apprécié tes cours de rattrapages sur la psychologie, la culture française et les *jeun's*.

Qu'ils soient biologistes de formation ou non, je tiens aussi à remercier les *BioMicsiens*, qui m'ont accueilli lors de la dernière année, dont Eric (un jour tu le créeras, ce laboratoire en haut de la montagne), Laurent (Mr **Robio**cop), Maxime (Mad Max), mais aussi Vincent, Lamya, Claudie, Clément, Mathieu, et les pétillantes et merveilleuses Amandine, Fred <sup>2</sup>, Nathalie<sup>2</sup>, Patricia<sup>2</sup>, Stéphanie<sup>2</sup> (et oui, ca en fait du monde !). Un grand merci pour le duo formé par Patricia Lecluyse et le directeur de l'équipe, Xavier Gidrol, pour les nombreux conseils et l'aide qu'ils ont pu me fournir.

Ce projet de thèse a aussi été rythmé par les projets associatifs de 38Globule et du Réseau BIOTechno, qui m'ont permis d'apprendre beaucoup aux côtés de jeunes chercheurs formidables lors d'innombrables réunions le soir et le week-ends. Merci aussi à la SNCF, qui m'a permit de démontrer qu'il est tout à fait possible de faire une thèse sur Grenoble tout en vivant à Lyon avec le sourire, tant que le train de 5h n'est pas supprimé! En écrivant ce manuscrit, j'ai aussi une pensée pour tous les chercheurs qui, chaque été depuis 2003, m'ont ouvert les portes de leurs laboratoires: Muriel Jacquier-Sarlin, Bernard Priem, Béatrice Eymin et Denis Rousseau.

Un grand merci à toute ma famille, en particulier à ma mère, mon frère et mes sœurs. Même à l'autre bout de la terre, vous avez su être présent et à l'écoute.

Et enfin *muyto obrigado* pour toi Elodie. Ton amour, ton énergie et tes conseils auront été d'une valeur inestimable, et maintenant que c'est à ton tour de finir ta thèse, j'espère pouvoir te rendre la pareil.

## **Sommaire**

Liste (	des abréviations	4
Liste d	des figures	5
Introd	luctionluction	6
I.	Les mitochondries	7
a.	Caractéristiques	
b.	Structure des mitochondries	
c.	Import et localisation des protéines mitochondriales	11
d.	Topologie des protéines membranaires mitochondriales	13
e.	Producteur d'énergie et de produits toxiques	17
f.	Réseau mitochondrial	20
II.	Les mitochondries et la transition métabolique du cancer	24
III.	Rôle des mitochondries dans la pluripotence	26
a.	Cas des cellules souches adultes	
b.	Cas des cellules pluripotentes induites	
c.	Cas des cellules souches cancéreuses	28
IV.	La famille des ATPases de type AAA +	31
a.	Structure commune, fonctions diverses	
b.	AAA + mitochondriales	33
V.	Etude de la famille des ATAD3	36
a.	Etat de l'art sur les ATAD3	36
Résult	tats	40
I.	ATAD3A contrôle les dynamiques mitochondriales à l'interface des l	membranes
mito	chondriales interne et externe	40
a.	Résumé de l'article	40
b.		41
c.	Article	42
d.	Discussion et résultats complémentaires	56
	ATAD3B, marqueur mitochondriale de pluripotence qui est réexprin	
cellu	ıles cancéreuses	
a.		
b.		70
c.		84
d.		
Concl	usion générale et perspectives	98
Annex	xes	103
Annex	xe 1 : Protocole de l'étude de dATAD3A chez D. melanogaste	r 103
Référe	ences	104

#### Liste des abréviations

AAA: ATPases Associated with diverse cellular Activities

ADN: Acide Désoxyribo Nucléique

ARN: Acide RiboNucléique

ATAD: ATPase family, AAA Domain

ATP: Adénosine TriPosphate

ANT: Adenine Nucleotide Translocase, Transporteur ADP/ATP

ADNmt : Acide Désoxyribo Nucléique mitochondriale

CSC: Cellules Souches Cancéreuses

D-loop: **D**isplacement-loop, boucle D

hESC: human Embryonic Stem Cell

HSP: Heat Shock Protein

IMS: InterMembrane Space

iPs: induced Pluripotent stem cells

MARCM: Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker

Mfn: Mitofusin

OPA1 : **Optic A**trophy type 1

OXPHOS: Oxidative Phosphorylation, Phosphorylation oxidative

PTP: Permeability Transition Pore

ROS: Reactive Oxygen Species, dérivé réactif de l'oxygène

SiARN: Silencing RNA, Petits ARN interférents

SRH : Seconde Région d'Homologie

TIM: Translocase of the Inner Membrane

TOM: Translocase of the Outer Membrane

TOR: Target Of Rapamycin

WA: WalkerA

WB: WalkerB

## Liste des figures

Figure 1 : Représentation schématique d'une mitochondrie et marquage du réseau
mitochondrial d'une cellule en culture
Figure 2 : Image de mitochondrie en microscopie électronique et représentation en 3D 9
Figure 3 : Schéma de l'organisation de l'ADN mitochondrial chez l'homme (16,6 kb) 10
Figure 4 : Schéma explicatif de l'importation des protéines au sein des mitochondries 12
Figure 5 : Méthode d'analyse de la topographie d'une protéine mitochondriale par digestion
trypsique
Figure 6 : Schéma récapitulatif de la phosphorylation oxydative, de la production de ROS et
de l'ouverture du pore PTP.
Figure 7 : Variabilité du réseau mitochondrial à travers les types cellulaires
Figure 8: Fusion et fission du réseau mitochondrial de fibroblastes en culture
Figure 9: Fonctions biologiques de la dynamique mitochondriale, de la biogénèse à la
dégradation (Westermann 2010).
Figure 10 : Représentation schématique des différences de phosphorylation oxydative, de
glycolyse anaérobique et de glycolyse aérobique (Vander Heiden, 2009)
Figure 11 : Schéma résumant les modifications mitochondriales lors de la reprogrammation
des cellules hIps et de leur différenciation (Prigione, Fauler et al. 2010).
Figure 12 : Structure secondaire et motifs clefs des ATPases AAA +
Figure 13 : Dimères des ATPases (a) et modélisation de la poche ATPase (b) (Erzberger and
Berger 2006)
Figure 14 : Représentation linéaire des AAA + mitochondriales humaines (Truscott, Lowth et
al. 2010)
Figure 15 : Schéma des isoformes humaines de hATAD3A, hATAD3B et hATAD3C 37
Figure 16 : Comparaison des séquences d'acides aminés d'hATAD3A et hATAD3B
Figure 17 : Étude de dATAD3A chez <i>Drosophila melanogaster</i>
Figure 18: Schéma d'explication de la méthode MARCM (Mosaic Analysis with a
repressible Cell Marler), (Wu and Luo 2006)
Figure 19: Quantité d'ARNm codant pour dATAD3A à 48h et 72h de développement
larvaire en absence de TOR ou non. 67
Figure 20 : Schéma de bilan et d'hypothèses sur la localisation, les structures et les fonctions
d'ATAD3A et ATAD3B

**Introduction** 

#### I. Les mitochondries

#### a. Caractéristiques

Dans son livre *Micrographia* (1665), Robert Hooke décrit pour la première fois les « cellules » qui ressemblent, pour lui, aux cellules de moines ou de prison. Dans ces « cellules de prison » que sont les cellules eucaryotes, nous y retrouvons des « prisonniers » ancestraux bien particuliers, les mitochondries (Lane 2005).

Les mitochondries sont des organites intracellulaires d'eucaryotes semi-autonomes qui seraient issues de l'endosymbiose d'une alpha-protéobractérie (Emelyanov 2003; Szklarczyk and Huynen 2010). Elles possèdent deux membranes qui les séparent du cytoplasme et qui forment une structure complexe et dynamique (Logan 2006). Ces bicouches lipidiques délimitent plusieurs compartiments, dont la matrice, les crêtes et l'espace intermembranaire (Fig. 1) décrits dans le chapitre suivant.

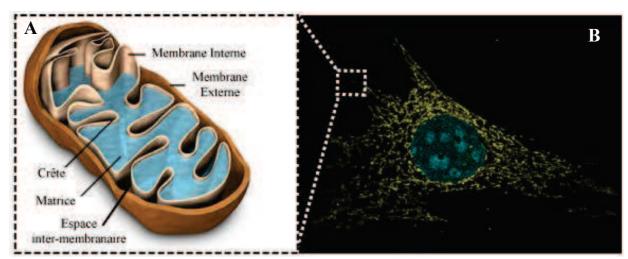


Figure 1 : Représentation schématique d'une mitochondrie et marquage du réseau mitochondrial d'une cellule en culture.

A : Schéma de la structure interne d'une mitochondrie.

B : Marquage de mitochondries (en jaune), par immunodétection de la F1-ATPase avec un anticorps secondaire couplé à une sonde fluorescente (jaune), et du noyau (DAPI, bleue) d'une cellule 3T3 (laboratoire BGE, CEA-Grenoble).

Les mitochondries sont présentes dans la cellule sous forme de cylindres de longueur variable, de 1 à 10 µm, capables de fusionner ou de fissionner, formant ainsi un réseau dynamique (Bereiter-Hahn and Jendrach 2010). Étudiées historiquement pour leur fonction de

« centrale énergétique » des cellules, les mitochondries jouent un rôle important dans la biosynthèse de lipides, d'acides aminés, d'hormones stéroïdiennes et autres composés essentiels. Elles jouent également un rôle de plateforme de signalisation intracellulaire, impliquées dans divers processus comme l'apoptose ou l'immunité intracellulaire (Newmeyer and Ferguson-Miller 2003; West, Shadel et al. 2011).

Chaque mitochondrie possède au sein de sa matrice plusieurs copies d'une molécule d'ADN mitochondriale circulaire (ADNmt) de 16,6 kDa. Cette dernière code pour treize protéines impliquées dans la phosphorylation oxydative, ainsi que pour des ARNs ribosomiques et de transfert (Falkenberg, Larsson et al. 2007)(Fig. 3). Cet ADNmt serait un vestige de l'ADN de l'alpha-protéobractérie qui ne contiendrait plus que les gènes codants pour les protéines mitochondriales les plus hydrophobes (Emelyanov 2003; Szklarczyk and Huynen 2010).

#### b. Structure des mitochondries

Contrairement au schéma classique de la mitochondrie ovale avec une membrane interne simple, la mitochondrie possède une structure interne complexe et dynamique (Mannella, Marko et al. 1994; Mannella 2006).

La membrane externe est semi-perméable et parsemée de porines et de complexes d'import protéique. Les premières permettent l'import et export de molécules hydrophiles dans l'espace inter-membranaire et les deuxièmes facilitent l'intégration et/ou le passage de protéines et de lipides au sein de la membrane externe. L'espace inter-membranaire est une zone tampon d'échanges entre le cytoplasme et la matrice.

Contrairement à la membrane externe (OM, Outer Membrane), la membrane interne (IM, Inner Membrane) est imperméable aux ions et autres petites molécules. Elle forme des invaginations tubulaires vers l'intérieur de la mitochondrie, de longueur variable, appelées crêtes (cristae en anglais) (Fig. 2). Ces crêtes cloisonnent un milieu différent du reste de l'espace inter-membranaire, à l'aide de complexes qui forment un « bouchon » protéique, aussi appelé « cristae junction » (Rabl, Soubannier et al. 2009; Darshi, Mendiola et al. 2011). Le nombre et la morphologie des crêtes sont liés à l'état métabolique de la mitochondrie. Il existe deux états extrêmes de la structure interne mitochondriale, celui d'une conformation orthodoxe avec une matrice importante et des crêtes fines, et la conformation condensée où

les crêtes sont gonflées (Frey and Mannella 2000). Les crêtes permetent de compartimenter un espace riche en ATP et en sous-produits de sa production hautement réactif, les ROS. En effet, des études de microscopie électronique ont mis en évidence un enrichissement des complexes OXPHOS (responsable de la production d'ATP) dans les crêtes (Gilkerson, Selker et al. 2003) (Davies, Strauss et al. 2011). Associés à ces complexes, on retrouve une forte concentration de cytochrome c, protéine de la chaîne de transport d'élections et activateur des voies de signalisations de l'apoptose. Lors de l'ouverture du pore de transition de perméabilité membranaire, le cytochrome c est relargué dans le cytoplasme, engageant ainsi la cellule vers l'apoptose.

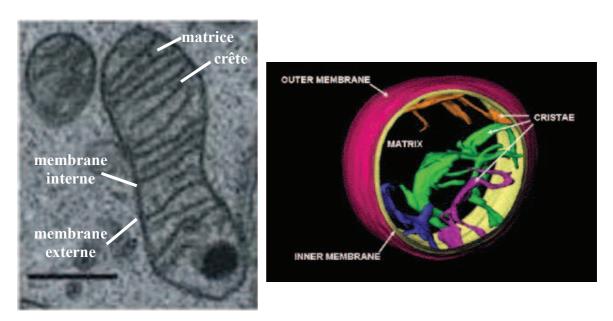


Figure 2 : Image de mitochondrie en microscopie électronique et représentation en 3D.

A : Les mitochondries de cellules HeLa sont visualisées par microscopie électronique en transmission (échelle :  $25~\mu m$ )(Perkins, Sun et al. 2009)

B : Le modèle en 3D est dérivé de d'images de cryomycroscopie (Mannella 2006)

La matrice est un environnement dense qui contient à la fois les enzymes du cycle de Krebs et l'ADN mitochondrial (ADNmt). Une molécule d'ADNmt est compactée au sein de petites structures protéiques (100nm) ancrées à la membrane interne (Albring, Griffith et al. 1977; Kukat, Wurm et al. 2011). Ces ensembles, semblables aux complexes nucléoides-ADN bactériens, réguleraient la réplication et la transcription de l'ADNmt (Albring, Griffith et al. 1977). On retrouve parmi les protéines du nucléoide mitochondrial la mtTFA (mitochondrial Transcription Factor A), la TOP1MT (topoisomerase mitochondriale) et la SSBP1 (Single stranded DNA binding protein1) (Spelbrink 2010). La réplication de l'ADNmt débute dans

une séquence non-codante, la boucle-D (Displacement-loop ou D-loop), qui a la particularité d'être composée d'un triple brin d'ADN (Fig. 3).

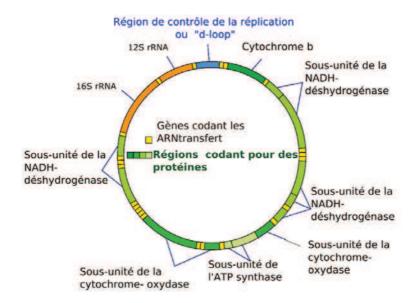


Figure 3 : Schéma de l'organisation de l'ADN mitochondrial chez l'homme (16,6 kb)

L'ADNmt contient treize gènes codant pour des éléments du complexe OXPHOS (NADH-déshydrogénase, cytochrome-oxydase, et ATP-synthase), et des ARNs ribosomiques (16S et 12S) et des ARNs de transfert. Elle contient aussi la D-loop (région de contrôle de la réplication).

Les treize protéines encodées par l'ADN mitochondrial sont des éléments essentiels des complexes OXPHOS (I, III, IV et V) situés à la membrane interne, au sein des crêtes (Fig. 4). Ces gènes sont transcrits puis traduits par des polymérases et ribosomes mitochondriaux. En parallèle, leur insertion dans la membrane est facilitée par Oxa1 (Desai, Myers et al. 2002). Cette protéine permet aussi l'insertion de protéines encodées par l'ADN nucléaire, qui sont d'abord importées dans la matrice puis intégrées à la membrane interne.

L'import de lipides, métabolites ou protéines vers la matrice est réalisé au niveau de zones de contact entre la membrane externe et interne (Reichert and Neupert 2002). Dans ces zones, l'épaisseur totale des deux membranes est divisée par deux et fait environ 12 nm (Nicastro, Frangakis et al. 2000). Ces zones de contacts sont enrichies en différents éléments importants, comme la cardiolipin et la créatine kinase mitochondriale, et appauvries en cholestérol (Hackenbrock 1968; Pon, Moll et al. 1989; Ardail, Privat et al. 1990). La cardiolipin est un lipide présent uniquement dans la mitochondrie, en particulier dans la membrane interne mais également en faible quantité dans la membrane externe. Ces petits domaines de contact (10-20 nm de diamètre) sont d'importance lors de l'apoptose mitochondrie-dépendante. Ils participent à l'ouverture du PTP (Permeability Transition Port),

le pore de transition de perméabilité membranaire (Kuwana, Mackey et al. 2002). Il y a alors exposition de cardiolipin à la membrane externe qui, comme le relargage du cytochrome c, participe à l'apoptose de la cellule (Schug and Gottlieb 2009). D'autres fonctions ont été décrites pour les zones de contacts, comme la régulation de la fusion/fission des mitochondries (Reichert and Neupert 2002). De même que pour les crêtes, la fréquence et la composition des zones de contact sont dépendantes de l'activité métabolique de la cellule. Néanmoins, les jonctions de crêtes et les zones de contact ne semblent pas colocaliser (Perkins, Renken et al. 1997).

Une mitochondrie contient environ 1500 protéines solubles et membranaires, dont la quasi-totalité est encodée par des gènes nucléaires puis synthétisée dans le cytoplasme avant d'être importée, via des pores spécifiques (Chacinska, Koehler et al. 2009), vers l'espace inter-membranaire ou la matrice.

#### c. <u>Import et localisation des protéines mitochondriales</u>

La plupart des protéines mitochondriales ont pour terminaison amine une préséquence de 10 à 80 acides aminés, formant des hélices amphipatiques clivables qui leur sont suffisantes et nécessaires pour être importées (Neupert and Herrmann 2007). D'autres protéines possèdent diverses séquences internes d'adressage non-consensus, mais qui ont été décrites comme étant hydrophobes et chargées positivement (Rehling, Pfanner et al. 2003).

Les TOMs (Translocase of the Outer Membrane) servent de « porte d'entrée » et sont composés d'un pore central entouré de récepteurs. TOM20, TOM22 et TOM70 vont reconnaître les séquences d'adressage des protéines, qui vont alors traverser le canal formé par TOM40 (Perry, Rimmer et al. 2008).

L'interaction entre les complexes TOM et TIM (Translocase of Inner Membrane) permet aux protéines avec la préséquence d'être importées dans la matrice à l'aide du moteur PAM (Presequence Translocase-associated Motor). Si ces protéines possèdent un second signal d'adressage hydrophobe, elles seront alors intégrées dans la membrane interne (Chacinska, Koehler et al. 2009; Schleiff and Becker 2010)

Une fois importées les protéines doivent se replier dans une conformation active, ce qui nécessite, pour la plupart, la présence de chaperones (Hartl and Hayer-hartl 2009). Dans la matrice, il existe plusieurs chaperones qui sont des HSPs (Heat Shock Protein) : la mtHSP70

et le tandem HSP60/HSP10 (homologue du complexe GroEL/GroES présent dans les bactéries). Une chaperone va se lier aux acides aminés hydrophobes exposés de la protéine importée ou dépliée, et, par un cycle ATP-dépendant d'interaction et de relâchement, elle va favoriser le bon repliement de la protéine dans une conformation stable avec les domaines hydrophobes enfouis. Dans la mitochondrie, les chaperones, de part leur interaction avec la cyclophiline D, inhiberaient l'ouverture du PTP (Altieri 2011). Cette fonction anti-apoptotique pourrait alors expliquer la sur-expression de ces chaperones dans les tumeurs.

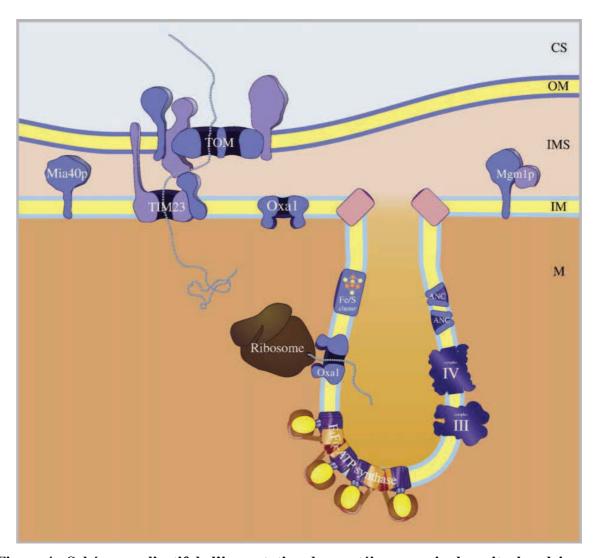


Figure 4 : Schéma explicatif de l'importation des protéines au sein des mitochondries.

Extraits de « Cristae formation — linking ultrastructure and function of mitochondria » (Zick, Rabl et al. 2009).

Les différents complexes d'imports protéiques sont représentés, TOM, TIM et Mia40p, ainsi que la machinerie de traduction et d'import de protéines encodées par l'ADNmt, le couple ribosome-Oxa1. Les complexes OXPHOS, le transporteur ADP/ATP, ANC, et la protéine de fusion Mgm1p sont également représentés.

Beaucoup de protéines de l'espace inter-membranaire (IMS : InterMembrane Space) sont de petites tailles et possèdent des motifs cystéiques (Stojanovski, Müller et al. 2008), qui font partie de la séquence d'adressage MISS (Mitochondrial Intermembrane Space Signal). Ces protéines repliées sont importées avec des cystéines sous formes réduites. Ce n'est qu'au sein de l'espace inter-membranaire que le complexe Mia40 va reconnaître l'une des cystéines de MISS et permettre aux protéines de rentrer dans une confirmation structurée, en catalysant la création de ponts disulfures entre cystéines.

Pour les protéines de la membrane externe, l'insertion dans cette membrane peut se faire à l'aide de divers éléments TOM, parfois en interaction avec le complexe SAM (Sorting and Assembly Machinery), mais ces mécanismes sont encore peu compris à ce jour.

La localisation et l'orientation des protéines membranaires au sein des mitochondries sont des éléments déterminants de la fonction de ces protéines, qui vont se trouver dans des environnements bien distincts.

#### d. Topologie des protéines membranaires mitochondriales

Les études de topologie de protéines membranaires sont souvent axées sur le segment transmembranaire et son orientation vis-à-vis de la membrane (von Heijne 2006). On estime que le quart des protéines sont transmembranaires, la plupart possédant une simple hélice alpha transmembranaire. Plus que des ancres inertes, ces domaines transmembranaires sont dynamiques, flexibles et peuvent contribuer au fonctionnement de la protéine. Ces domaines sont notamment sensibles aux compositions lipidiques qui, au sein des mitochondries, peuvent varier. Néanmoins, pour avoir une appréciation plus précise des rôles et du fonctionnement d'une protéine, il est important de pouvoir connaître la topologie de tous les différents domaines, transmembranaires ou non.

Pour déterminer la topologie de ces protéines transmembranaires mitochondriales, plusieurs techniques peuvent être employées : la purification sur gradient de sucrose, l'insertion de marqueurs, la microscopie électronique ou la digestion protéique (van Geest and Lolkema 2000) :

• La purification consiste à séparer des extraits solubilisés de mitochondries, en centrifugeant les échantillons à haute vitesse sur gradient de sucrose. L'enrichissement

de la protéine étudiée dans les extraits est alors analysé par western blot et comparé à celui des protéines de références.

L'insertion de marqueurs (site de glycolysation ou biotinylation, cystéines, etc) sur différents domaines de la protéine, permet, avec l'aide de réactifs non perméables, de localiser l'exposition ou non de ce domaine à la surface de la membrane. Cette technique est efficace pour les protéines de la membrane externe mais elle est plus difficile à mettre en œuvre pour celles de la membrane interne, pour lesquelles une étape supplémentaire de perméabilisation spécifique est souvent nécessaire.

Des réactifs hydrophobes (membrane-permissif) peuvent être employés, comme par exemple le « cross-linker » DTS (dithiobis [succinimidylpropionate]). Cette molécule crée des ponts chimiques entre des amines primaires du côté N-terminale ou des lysines des protéines. Ces dernières vont former des oligomères stables qui vont migrer en élécrophorèse (western blot) à des tailles supérieures. En comparant la présence ou non d'oligomères formées avec le DTS ou sa version hydrophile, DTSSP (dithiobis [sulfosuccinimidyl propionate]), on peut alors avoir une appréciation de l'exposition à la surface de la membrane de la protéine étudiée.

- L'observation en microscopie électronique d'une protéine est réalisée grâce à un immunomarquage avec des anticorps primaires spécifiques qui sont reconnus par des anticorps secondaires. Ces derniers sont couplés à des billes d'or (de taille variable en cas de co-marquage) qui seront denses aux électrons (Perkins and Frey 2000). Cette méthode permet d'obtenir une meilleure résolution que la microscopie confocale qui, limitée à une résolution de 0,2 μm, ne permet pas de résoudre la localisation intramitochondriale. Par exemple, grâce à cette technique, la distribution dynamique de protéines de la membrane interne, au sein des crêtes, a pu être étudiée (Vogel, Bornhovd et al. 2006). Néanmoins, la microscopie électronique est délicate car elle nécessite l'utilisation d'anticorps compatibles avec les traitements de préparation des échantillons (Bleazard, McCaffery et al. 1999; Vogel, Bornhovd et al. 2006).
- L'analyse de topologie par digestion protéique peut être réalisée sur des protéines endogènes contenues dans des extraits de mitochondries (Fig. 5). L'accessibilité des épitopes à la digestion est déterminée en réalisant des westerns blots spécifiques de ces épitopes. Cette technique consiste à extraire des mitochondries à partir de cellules en culture ou de tissus, de les enrichir dans un tampon spécifique et de rajouter une protéase. L'enzyme, par hydrolyse, clive les ponts peptidiques entre les acides aminés de la protéine, la morcelant en plusieurs fragments. La réaction

enzymatique est arrêtée à l'aide d'inhibiteurs et le profil de digestion, c'est-à-dire les divers fragments contenant les épitopes de la protéine étudiée, est analysé par western blot et comparé aux profils d'autres protéines standards (Fig. 5).

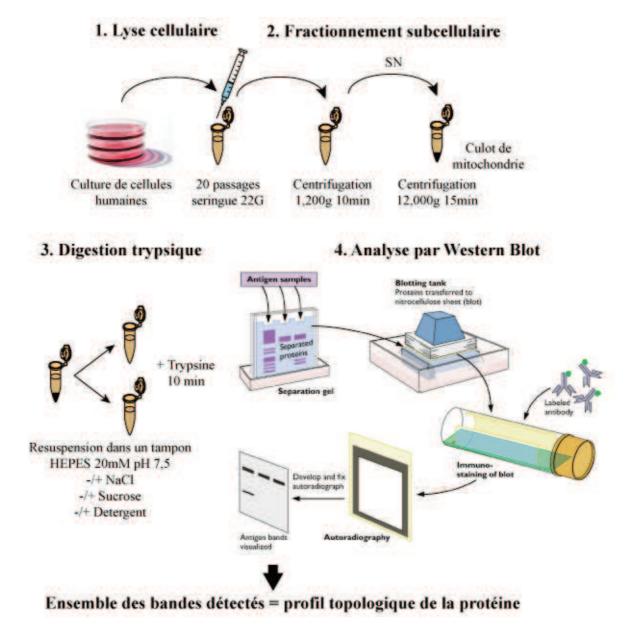


Figure 5 : Méthode d'analyse de la topographie d'une protéine mitochondriale par digestion trypsique

Les cellules en culture sont lysées par passage à travers une seringue 22g, puis les mitochondries sont purifiées par fractionnement subcellulaire. Après la dernière centrifugation, elles sont resuspendues dans un tampon adéquat puis incubées 10 min à 37°C avec de la trypsine. La digestion est arrêtée à l'aide d'inhibiteurs et les fragments peptidiques sont analysés par immunodétection en western blot. Le profil de digestion de la protéine étudiée est alors comparé aux profils de protéines standards.

Pour analyser les résultats de la digestion, il est courant d'employer comme référence des protéines appartenant à la membrane externe (récepteurs TOM), ou à la membrane interne (complexes OXPHOS)(Gotow, Shibata et al. 2000). Des études précédentes ont permis de caractériser la localisation et la topologie de ces protéines au travers d'expériences de blocage d'importation (cf. l'insertion de marqueurs décrits précédemment) ou d'immunomarquage en microscopie électronique. En comparant le profil de digestion de ces différentes protéines de références au profil de digestion de la protéine étudiée, on peut estimer la localisation de celle-ci. Pour avoir une localisation plus précise, j'ai utilisé, au cours de ma thèse, une série de quatre protéines de référence situées dans différents environnements au sein de la mitochondrie. À l'opposé de TOM20, protéine transmembranaire du complexe d'import TOM de la membrane externe, j'ai employé la sousunité F1-ATPase située dans la matrice (dont la fonction est décrite dans le chapitre suivant). Une étude récente par cryomicroscopie a confirmé la localisation du complexe F0-F1 ATPase, enfoui au plus profond des crêtes mitochondriales (Davies, Strauss et al. 2011). Les protéines prohibitin et OPA1 sont aussi employées comme marqueurs, respectivement, de la membrane interne ou de l'espace inter-membranaire aux environs des jonctions de crêtes (Olichon, Emorine et al. 2002; Olichon, Baricault et al. 2003; Tatsuta, Model et al. 2005).

Une multitude de protéases peuvent être employées, d'efficacité variable et plus ou moins sensibles aux conditions de digestion, tels que le pH, la concentration en sels ou la température. Ces protéases ciblent des acides aminés particuliers, hydrophobes dans le cas de la pepsine (aspartate protéase) ou aliphatique pour la protéinase K (Rojo, Legros et al. 2002). La trypsine, une sérine protéase, comme la protéinase K, a la particularité de cliver uniquement les liaisons carboxyles de deux acides aminés, la lysine ou l'arginine, sauf s'ils sont suivis d'une proline. Cette enzyme est naturellement produite par le pancréas et participe à la dégradation de la nourriture dans le petit intestin. Avec un pH et une température optimale proche, respectivement, de 7,4 et 37°C, elle convient à la dégradation de protéines mitochondriales dans un état natif (Kuylenstierna, Nicholls et al. 1970; Fraser, Corstorphine et al. 1997). Il est à noter, qu'à concentration modérée (< 1 μg/mL) la trypsine est incapable de rendre perméable la membrane externe des mitochondries (Ohba and Schatz 1987). De façon générale, avec un poids moléculaire entre 20 et 35 kDa et à faible concentration, ces protéases ne sont pas capables de traverser les membranes.

L'ajout de détergents comme le Triton X-100 ou la digitonine va permettre la solubilisation des membranes, respectivement, globale ou spécifique (Gurtubay, Goñi et al.

1980; Gotow, Shibata et al. 2000; Wagner, Ruegg et al. 2009). À concentration suffisante, la digitonine solubilise le cholestérol, composant important de la membrane externe, ce qui donne accès à la trypsine non seulement à l'espace inter-membranaire mais également à la surface de la membrane interne.

La digestion protéique est aussi utilisée pour le séquençage peptidique, afin de générer de petits fragments exploitables en spectrométrie de masse. Il est intéressant de noter que, pour les protéines dont la structure cristallographique a été déterminée, la méthode d'échange deutérium permet de procéder à une étude plus fine de l'accessibilité des domaines protéiques internes, en comparaison avec celles qui sont transmembranaires ou complexés avec des ligands (Rey, Man et al. 2010). Si la fonction de la protéine est connue et selon l'accessibilité des épitopes, elle peut alors être étudiée en perturbant ses changements de conformation à l'aide d'anticorps monoclonaux.

#### e. Producteur d'énergie et de produits toxiques

Pour produire l'énergie qu'il lui est nécessaire pour vivre, la cellule dégrade de la matière organique, des carbohydrates comme le glucose. Lors de la glycolyse, le monosaccharide est progressivement transformé en pyruvate. Cet intermédiaire peut alors rentrer dans deux voies métaboliques. En absence d'oxygène, le pyruvate sera rapidement réduit en lactate dans le cytoplasme, ce qui permet de produire un peu d'énergie, sous forme d'ATP, et de recycler les coenzymes oxydées lors de la glycolyse. En présence d'oxygène, le pyruvate peut rentrer dans le cycle de Krebs au sein de la matrice mitochondriale, et permettre ainsi la réduction de coenzymes. L'ensemble de ces coenzymes sera alors oxydé par les complexes I, III, et IV. Ces derniers, avec le complexe II, constituent une chaîne de transport d'électrons jusqu'à l'oxygène, l'accepteur final, qui est alors réduit sous forme d'eau (Fig. 6).

Le passage d'électrons entre les différents complexes s'accompagne de l'expulsion de protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire, ce qui crée un gradient de protons de part et d'autre de la membrane interne imperméable. Cette énergie chimiosmotique, selon l'hypothèse de Mitchell, permet, lors du retour des protons dans la matrice, les changements conformationnels du complexe V, l'ATPsynthase (F0 et F1-ATPase), qui catalyse la synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique. Cet ATP est alors exporté vers l'espace inter-membranaire grâce à l'ANT (Adenine Nucleotide Translocase, transporteur de

nucléotide), puis au cytoplasme par la protéine VDAC (Voltage-Dependent Anion Channel). Dans l'espace inter-membranaire, le potentiel énergétique d'ATP peut être utilisé directement ou transféré à la créatine kinase. Cette kinase sous forme phosphorylée est le transporteur et le tampon énergétique principal au sein de la cellule, car il permet la synthèse et l'utilisation *in situ* de l'ATP. La respiration aérobie permet, au final, de produire plus d'énergie que la fermentation, mais elle requiert pour ce faire la présence d'oxygène. Cet élément peut être rare au cours de la progression tumorale (voir chapitre suivant).

Bien que la phosphorylation oxydative permette de produire dix-huit fois plus d'énergie que la glycolyse, celle-ci génère des radicaux libres et peroxydes, ROS (Reactive Oxygen Species), qui sont hautement réactifs. Les ROS ont été principalement connues pour leurs effets de mutagénèse sur l'ADN. Ces mutations entraînent la mise en place de chaînes de phosphorylations défectueuses et, produisant plus de ROS, créent ainsi un cercle vicieux ROS-ADNmt. Néanmoins, il a été mis en évidence que les ROS participent à des voies de signalisation (Hamanaka and Chandel 2010). Selon les signaux et à faible concentration de ROS, ces derniers interviennent dans les voies régulant l'équilibre prolifération/différentiation cellulaire ou d'autres voies d'adaptation aux conditions de vie (stabilisation du facteur HIF lors de l'hypoxie). Lorsque les cellules sont traitées au TNFalpha, le niveau de ROS augmente et active la voie JNK (c-Jun N-terminase Kinase), ce qui entraine l'apoptose.

Le potentiel membranaire facilite l'étude des mitochondries car il permet l'import sélectif de marqueurs fluorescents, qui seront oxydés et retenus par les mitochondries (De Vos and Sheetz 2007). Selon la stabilité du dit potentiel, les marqueurs sont retenus, ou non, au sein des mitochondries. En outre, le marqueur JC-1 peut être employé pour l'observation en direct de l'évolution du potentiel membranaire. À faible ou à fort potentiel membranaire, ce marqueur fluoresce, respectivement, dans le vert ou dans le rouge. De plus, l'import de protéines, marquées, au sein de la matrice ou de la membrane interne, nécessite la présence d'un potentiel membranaire (Geissler, Krimmer et al. 2000). Cette condition est importante lors de l'utilisation de marqueurs comme la mitoGFP, qui est une séquence d'adressage à la mitochondrie couplée à la protéine fluorescente GFP (Green Fluorescent Protein).

Les mitochondries jouent donc un rôle important dans la vie et la mort cellulaire, par la production d'énergie et par les voies de signalisations impliquant les ROS.

#### Structure + Energy = Life

Energy: fats + sugars + oxygen = energy (heat + work) + CO<sub>2</sub> + H<sub>2</sub>O

Reactive oxygen species: mitochondrial combustion → oxygen radical

**Apoptosis**: energy  $\downarrow$  + ROS  $\uparrow$  = mtPTP activated  $\rightarrow$  cell death (apoptosis)

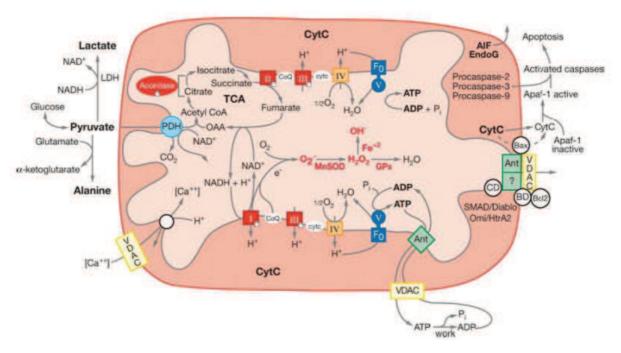


Figure 6 : Schéma récapitulatif de la phosphorylation oxydative, de la production de ROS et de l'ouverture du pore PTP.

Les complexes OXPHOS sont les suivants : complexe I (NADH-coenzyme Q oxydoréductase), complexe II (succinate-Q oxydoréductase), complexe III (coenzyme Q-cytochrome c oxydoréductase), complexe IV (cytochrome oxydase) et le complexe F0-F1 (ATPase-ATPsynthase mitochondriale) (Wallace 2005).

L'apoptose s'accompagne de l'ouverture du PTP et du relarguage du cytochrome c dans le cytoplasme. Lors de la formation de ROS, l'oxygène est partiellement réduit et devient un superoxide radicale  $0_2$ . Celui-ci est transformé par la MnSOD (Manganese Superoxide Dismutase) en peroxyde d'hydrogène, H2O2.

#### f. Réseau mitochondrial

Dans un organisme multicellulaire, chaque cellule est hautement spécialisée et remplit une ou plusieurs fonctions, nécessitant de l'énergie disponible à des endroits bien précis. Grâce à leur réseau et à leur morphologie dynamique, les mitochondries sont capables de répondre à ces besoins. Ainsi des études en microscopie électronique ont montré que dans les spermatozoïdes, les mitochondries forment des spirales fusionnées autour du flagelle alors que dans le muscle elles adoptent une distribution aussi régulière qu'un cristal (Fig. 7) (Vendelin, Beraud et al. 2005; Kuznetsov, Hermann et al. 2009)

Les kinésines 1 sont capables de fixer les mitochondries aux microtubules, la direction du mouvement étant contrôlée par la protéine mitochondriale MIRO (antérograde : noyau-> extrémité) ou la dynéine (rétrograde : extrémité-> noyau). Les mitochondries peuvent se déplacer rapidement le long des microtubules, mais sont ralenties à proximité des réseaux d'actine ou de filaments intermédiaires (Fehrenbacher, Yang et al. 2004; Boldogh and Pon 2007; Nekrasova, Mendez et al. 2011). Pour autant, au sein de *S. Cerevisiae*, le déplacement des mitochondries est dépendant essentiellement du cytosquelette d'actine.

De manière générale, le cytosquelette permet aux mitochondries de se déplacer et de s'amasser aux endroits qui ont un fort besoin en énergie, comme les synapses dans le cas des neurones (Rikhy, Kamat et al. 2007). Au sein de ces cellules, il existe d'une part, entre les synapses, un flux de mitochondries qui vont demeurer jusqu'à la baisse de leur potentiel énergétique, et d'autre part la zone peri-nucléaire dans laquelle les mitochondries vont pouvoir fusionner et ainsi se « recycler ».

Cet exemple illustre l'importance de l'équilibre entre les cycles de fusion et de fission des mitochondries (Fig. 8). La fusion de la membrane externe puis de la membrane interne permet l'échange soit transitoire et partiel, « kiss-and-run », soit permanent et complet de matériel entre deux mitochondries (Meeusen, McCaffery et al. 2004; Malka, Guillery et al. 2005; Liu and Weaver 2009). Le cytosquelette joue un rôle important lors de la fusion, car si les deux mitochondries se touchent longitudinalement, le long d'un même microtubule, ou latéralement la fusion sera alors, respectivement, complète ou transitoire.

La fusion de la membrane externe nécessite la présence des protéines transmembranaires Mitofusin1 (Mfn1, homologue de Fz01) et Mitofusin2, les deux étant aussi nécessaires pour le développement embryonnaire (Chen, McCaffery et al. 2007). Ces

protéines de la membrane externe permettent l'ancrage et la fusion des mitochondries par des interactions trans via leurs domaines coil-coils (Koshiba, Detmer et al. 2004)

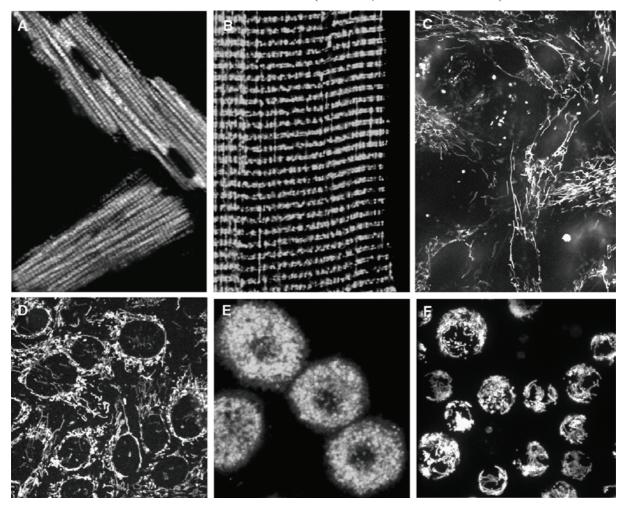
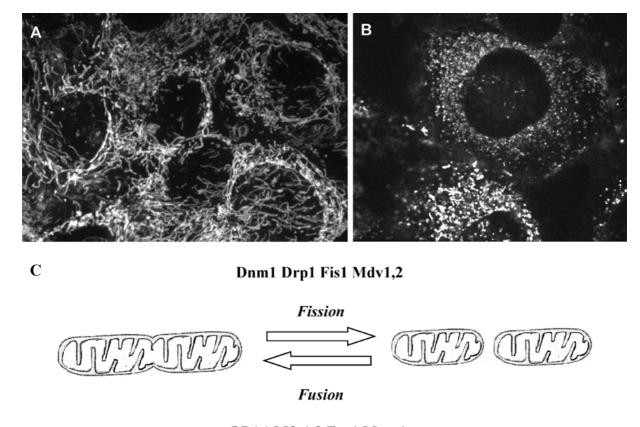


Figure 7 : Variabilité du réseau mitochondrial à travers les types cellulaires

Les réseaux mitochondriaux sont ici visualisés à l'aide d'un microscope confocal à fluorescence (Kuznetsov, Hermann et al. 2009) et de marquages spécifiques utilisant le MitoTracker (A, B, C, D et F) ou l'autofluorescence de flavoprotéines mitochondriales (E). Le réseau est régulier dans les cardiomyocites (A) et les cellules de muscles squelettiques (B) de rat. D'autres types cellulaires possèdent des longues mitochondries, comme les cellules pancréatiques humaines (C) ou les cellules HL-1 (D) présentant un phénotype cardiaque. De plus, il existe des phénotypes intermédiaires, comme avec les mitochondries d'hépatocytes (E) ou de petites cellules promyéloïdes (F).

Pour la membrane interne, la fusion est dépendante de son potentiel membranaire et de la protéine OPA1 (Optic atrophy type 1, homologue de Mgm1p chez la levure). Cette GTPase est localisée dans l'espace inter-membranaire et associée à la membrane interne. Il existe plusieurs isoformes d'OPA1, issus d'épissage alternatif, mais aussi du clivage de la protéine par des métalloprotéases, qui vont générer des formes courtes et solubles. Cette protéine possède d'autres fonctions mitochondriales, dont le maintien des crêtes, la

maintenance de l'ADNmt et le contrôle de l'apoptose. À l'instar de Mfn2, dont les mutations sont impliquées dans la neuropathie Charcot-Marie-Tooth, des mutants d'OPA1 sont responsables de la plupart des cas d'atrophie optique dominante (Delettre, Lenaers et al. 2000; Lenaers, Reynier et al. 2009). Ces GTPases de la membrane interne et externe sont toutes de la famille de la dynamin, capables de se tordre lors de l'hydrolyse du GTP.



OPA1 Mfn1,2 Fzo1 Mgm1

Figure 8: Fusion et fission du réseau mitochondrial de fibroblastes en culture.

A : Les fibroblastes en culture possèdent un réseau mitochondrial développé avec de longues mitochondries filamenteuses. B : Lorsque les fibroblastes sont soumis à un stress cellulaire, le réseau mitochondrial est fragmenté et les mitochondries sont petites et ponctué. Les marquages sont réalisés à l'aide de sondes spécifiques (MitoTracker).

C : Schéma récapitulatif des acteurs de la fusion/fission (Kuznetsov, Hermann et al. 2009) : Dnm1, Drp1, Fis1, Mdv1,2 (fission) et OPA1, Mfn1,2, Fzo1 et Mgm1 (fusion)

Lors de la fission, aux zones de contact du réticulum endoplasmique avec les mitochondries, Drp1 (Dynamin related protein 1) est recrutée à la surface des mitochondries, via son récepteur transmembranaire hFis1, et forme des complexes qui resserrent la mitochondrie jusqu'à séparation en deux mitochondries filles (Friedman, Lackner et al. 2011; Mears, Lackner et al. 2011). Il a été récemment découvert qu'il existe au sein de la membrane externe, chez les vertébrés, une protéine capable de lier et inactiver Drp1 (Zhao, Liu et al.

2011). De manière générale, la fission du réseau mitochondrial a lieu au cours du cycle cellulaire, en particulier lors de la division, afin de repartir équitablement les mitochondries entre les cellules filles (Fig. 9)

L'équilibre entre la fusion et la fission permet de maintenir l'homogénéité de l'ADNmt et de contrôler le niveau énergétique des mitochondries (Blackstone and Chang 2011)(Fig. 9). Des études récentes montrent qu'il existe une fission des particules mitochondriales à faible potentiel membranaire, qui sont ensuite englobées dans des « mitophagosome » (Wang and Klionsky 2011; Youle and Narendra 2011). Cette mitophagie permet à la cellule de dégrader les constituants des mitochondries. Ce « recyclage » élimine les mitochondries endommagées et limite les dommages liés au vieillissement cellulaire (Twig, Elorza et al. 2008). La fission des mitochondries est l'une des premières étapes de l'apoptose, avec le remodelage des crêtes, avant la perte du potentiel membranaire et l'ouverture du pore de transition de perméabilité P)(Fig. 9).

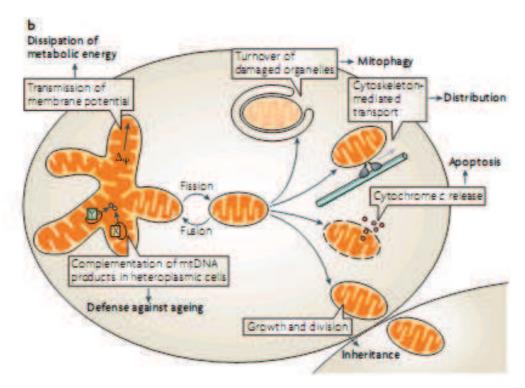


Figure 9: Fonctions biologiques de la dynamique mitochondriale, de la biogénèse à la dégradation (Westermann 2010).

La fission permet d'individualiser une mitochondrie pour qu'elle puisse se déplacer à travers la cellule, être dégradée et recyclée par un mitophagosome, relâcher du cytochrome c, ou être répartie, lors de la division, dans les cellules filles. Le réseau mitochondrial « recharge » les mitochondries et assure la distribution du potentiel membranaire à travers la cellule. De plus, le réseau mitochondriale permet de compléter l'ADNmt défectueux de certaines mitochondries et de diminuer l'impact du vieillissement (effet des ROS).

## II. <u>Les mitochondries et la transition métabolique du</u> <a href="mailto:cancer">cancer</a>

La transformation d'une cellule saine en cellule cancéreuse se fait en plusieurs étapes, par accumulation de mutations qui entraînent l'acquisition de nouvelles capacités. En 2000, Douglas Hanahan et Robert Weinberg ont résumé les marqueurs généraux du cancer comme étant les suivants : les cellules échappent à l'apoptose, peuvent se diviser à l'infini, sont insensibles aux signaux inhibiteurs de croissance, sont autosuffisantes pour les facteurs de croissance, induisent l'angiogénèse et peuvent envahir d'autres tissus et créer des métastases (Hanahan and Weinberg 2000). Les mitochondries, de part leur fonction pivot dans les voies de signalisation intracellulaire, sont impliquées dans les trois premiers marqueurs (Cairns, Harris et al. 2011). En 2011, deux nouvelles capacités des cellules cancéreuses ont été ajoutées à la liste par Hanahan et Weinberg : celle qui permet d'échapper au contrôle et à la destruction par le système immunitaire, ainsi que la reprogrammation métabolique (Tennant, Durán et al. 2009; Hanahan and Weinberg 2011).

En effet, les cellules cancéreuses sont généralement en hypoxie et consomment du glucose et de la glutamine en grande quantité. Dès 1923, le Pr Warburg (Prix Nobel en 1931) constate que les cellules cancéreuses favorisent le métabolisme glycolitique, en présence ou non d'oxygène (Warburg, Wind et al. 1927; Hsu and Sabatini 2008). Malgré une rentabilité énergétique plus faible que la phosphorylation oxydative, ce métabolisme ne nécessite pas d'oxygène et génère des intermédiaires nécessaires à la division cellulaire (Gogvadze, Orrenius et al. 2008; Vander Heiden, Cantley et al. 2009)(Fig. 10). Pourtant les complexes OXPHOS continuent à fonctionner et à générer un potentiel de proton de part et d'autre de la membrane interne. Ce potentiel serait détourné par les protéines découplantes UCP (UnCoupling Protein). Celles-ci favoriseraient l'oxydation d'acides gras et de glutamine mais ces protéines seraient des inhibiteurs du complexe F1-ATPsynthase (Derdak, Mark et al. 2008; Samudio, Fiegl et al. 2009). Les UCPs permettraient de diminuer le taux de ROS et indirectement favoriser la résistance des cellules cancéreuses aux traitements de chimiothérapies.

Tout comme les cancers, les mitochondries sont hétérogènes dans leurs fonctions et structures et il n'est pas rare de trouver des mitochondries « normales » dans des cellules cancéreuses. Néanmoins, il semblerait que les mitochondries de cellules cancéreuses présentent le plus souvent des défauts de structure interne, gonflement de la matrice, multiples

membranes internes, qui les rendent inaptes à produire de l'énergie (Arismendi-Morillo 2009). De plus, les mitochondries de cellules cancéreuses sont résistantes aux stimulations pro-apoptoptique (Cereghetti and Scorrano 2006).

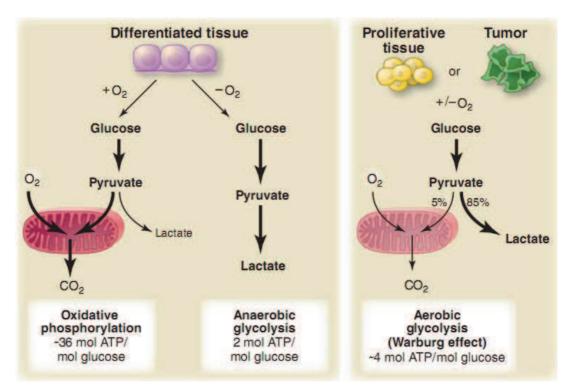


Figure 10 : Représentation schématique des différences de phosphorylation oxydative, de glycolyse anaérobique et de glycolyse aérobique (Vander Heiden, 2009)

En présence d'oxygène, les cellules différenciées consomment le glucose par glycolyse et oxydation phosphorylative. Les cellules prolifératives ou cancéreuses, en présence ou non de glucose, produisent essentiellement de l'énergie par glycolyse (effet Warburg).

La forte activité glycolytique des cellules cancéreuses est employée pour marquer les tumeurs lors de scans corporels utilisant un analogue du glucose. Des études récentes ont mis en évidence l'influence d'oncogènes (Ras, Akt, Myc) sur la glycolyse et notamment sur le devenir du pyruvate. Dans un modèle de tumorigénèse de foie induit par myc, Hu et ses collègues ont observé une forte concentration de lactate dans les tumeurs (Hu, Balakrishnan et al. 2011). Dans les étapes pré-tumorales, avant même des changements morphologiques ou histologiques, il y aurait au contraire un enrichissement en alanine, autre dérivé du pyruvate. L'utilisation de pyruvate marqué est actuellement en phase de test pour pouvoir détecter et suivre l'évolution de (pré) tumeurs chez des patients. Cet exemple illustre l'importance de la transition métabolique du cancer, dont la recherche peut être source de marqueurs et de traitements.

#### III. Rôle des mitochondries dans la pluripotence

#### a. Cas des cellules souches adultes

Les cellules souches ne sont pas uniquement présentes chez l'embryon, il existe des cellules souches dites « adultes », ou hESC (human Embryonic Stem Cell) qui ont été décrites dans la plupart des organes (Fuchs and Horsley 2011). Ces cellules multipotentes sont capables, théoriquement, de régénérer un organe en donnant naissance à plusieurs types cellulaires. Se divisant lentement et de manière asymétrique, elles s'auto-renouvellent tout en donnant naissance à une cellule fille « progénitrice » engagée dans une voie proliférative et de différenciative (Yamashita 2010).

Les cellules souches résident dans des niches peri-vasculaires, servant de support et sources de signaux régulant l'autoréplication et la différentiation (Mohyeldin, Garzon-Muvdi et al. 2010). Ces micro-environnements peuvent être pauvres en nutriments et en oxygène, inhibant ainsi les voies de signalisation contrôlant la prolifération et la différentiation.

Il y a encore peu d'études sur le métabolisme des cellules souches, mais des premiers résultats publiés indiquent que celui-ci est essentiellement glycolytique, en absence d'oxygène, avec des mitochondries isolées et péri-nucléaires. (Lonergan, Brenner et al. 2006; Lonergan, Bavister et al. 2007). Les mitochondries de ces cellules, possèdent un faible nombre de molécule d'ADNmt et une matrice peu développée. Les cellules souches surexpriment les enzymes protectrices des effets des ROS, réduisant d'autant plus l'impact négatif de l'activité mitochondriale (Saretzki, Walter et al. 2008). Pour autant cette activité mitochondriale serait nécessaire pour le maintien de la prolifération de ces cellules souches (Mandal, Lindgren et al. 2011)

Lorsque la cellule souche quitte l'état quiescent pour s'engager dans la voie de prolifération et de différentiation, il y a augmentation du besoin énergétique. Ce besoin est assuré par une élévation du taux de phosphorylation oxydative, qui se fait en parallèle du développement du réseau mitochondrial. De plus, ce développement du réseau mitochondrial se fait en amont de la perte d'expression des marqueurs de pluripotence (Nanog, Oct4). Au cours de la différentiation, il y a également une élévation de la quantité de mitochondries, de leur masse et du nombre de copies total d'ADNmt (St John, Ramalho-Santos et al. 2005)(Fig. 11)

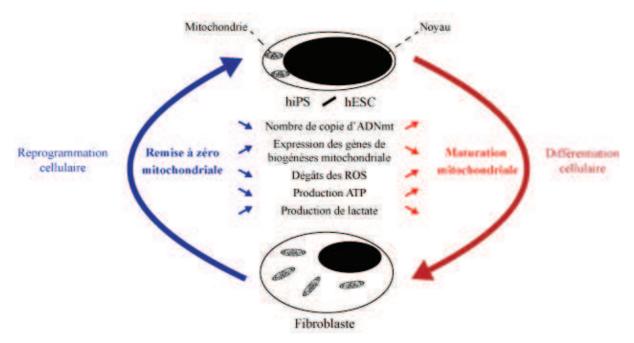


Figure 11 : Schéma résumant les modifications mitochondriales lors de la reprogrammation des cellules hIps et de leur différenciation (Prigione, Fauler et al. 2010).

La reprogrammation nucléaire implique une diminution du nombre de copie d'ADNmt, de la production de ROS et d'ATP et une augmentation de l'expression de biogénèse mitochondriale et de la production de lactate, contrairement à la différentiation cellulaire.

#### b. Cas des cellules pluripotentes induites

En 2007, Kazutoshi Takahashi et ShinyaYamanaka ont, pour la première fois, réussi à générer des cellules pluripotentes induites ou Ips (induced pluripotent stem) à partir de fibroblastes humains et à l'aide d'un cocktail de facteurs de transcription, dont les essentiels Oct4, Sox2, Klf4 et c-myc (Takahashi, Tanabe et al. 2007; Yu, Vodyanik et al. 2007). Ces cellules, pluripotentes comme les cellules embryonnaires, présentent néanmoins des différences de méthylation d'ADN et d'expression de gènes (Chin, Mason et al. 2009)

La reprogrammation de cellules différenciées est dépendante de l'activité glycolytique et est facilitée en hypoxie (moins d'oxygènes) (Folmes, Nelson et al. 2011). De plus, la reprogrammation métabolique a lieu avant l'expression de gènes marqueurs de pluripotence, *Fgf4*, *Nanog*, *Oct4* et *Sox2*. Ce résultat est cohérent avec ceux obtenus lors de la différentiation de cellules souches humaines, qui indiquent que de manière générale, les changements du réseau mitochondriale sont des indicateurs précoces d'une reprogrammation ou une différentiation cellulaire.

Les premiers articles comparant les hIps aux hESC indiquent un profil mitochondrial similaire, avec un faible nombre de mitochondries, présentant une morphologie semblable et un faible taux de ROS (Armstrong, Tilgner et al. 2010; Prigione, Fauler et al. 2010; Tamai, Yamashita et al. 2011). Les cellules pluripotentes humaines surexpriment G6P (glucose-6-phosphate) et PKD1 (Pyruvate dehydrogenase kinase iozyme 1) qui redirige les flux métaboliques vers une activité essentiellement glycolytique. La reprogrammation des hIps génère des mutations homoplasmique et hétéroplamisque dans l'ADNmt mais qui n'affecte pas l'activité mitochondriale (Prigione, Lichtner et al. 2011).

Lorsque les deux types de cellules sont mis à différencier, dans un modèle d'organogénèse de tissu hépatique, le métabolisme mitochondrial des hIps est similaire à celui des hESC (Tamai, Yamashita et al. 2011). Néanmoins, une comparaison des structures internes de mitochondries entre des hESC et des lignées d'hIps a révélé des différences avec des crêtes plus nombreuses et une matrice plus dense dans le cas des hIps. Les hIps possèdent une morphologie mitochondriale mixte qui serait plus proche de celle des cellules différenciées (Varum, Rodrigues et al. 2011).

Vue l'importance des mitochondries et du métabolisme dans le maintien du caractère « souche » des cellules, d'autres études complémentaires s'avèrent nécessaires.

#### c. Cas des cellules souches cancéreuses

Pour éliminer une tumeur maligne, il existe aujourd'hui un panel de stratégies qui, par chirurgie, chimio-, radio-, hormono- ou immuno-thérapie, permet de réduire considérablement la masse de cette tumeur. Néanmoins, la rémission complète n'est jamais garantie, car malgré la suppression des cellules tumorales qui sont prolifératives ou différenciées, il reste une sous-population de cellules résistante aux traitements (Al-Ejeh, Smart et al. 2011).

Pour essayer de comprendre et d'expliquer ce système complexe, il y a deux modèles, un dit stochastique et un autre, dit hiérarchique. Le premier modèle suppose qu'une tumeur est homogène et que toutes les cellules qui la composent possèdent la même capacité à former de nouvelles tumeurs dans un micro-environnement adapté. De plus, des facteurs intrinsèques ou externes influenceraient de manière individuelle les cellules qui adopteraient alors des fonctions particulières. Au contraire, le modèle hiérarchique est basé sur l'hypothèse

de « cellules souches cancéreuses » (CSC) qui limiteraient la capacité à générer de nouvelles tumeurs à une sous-population particulière de la tumeur. Une CSC peut alors être définie comme étant une cellule, au sein d'une tumeur, qui possède la capacité de s'auto-répliquer, et qui est la source de l'hétérogénéité des cellules cancéreuses qui composent la tumeur (Reya, Morrison et al. 2001; Clevers 2011).

En 1997, Dick et Bonnet ont publié des résultats indiquant qu'une sous-population de cellules leucémiques, des CSCs, était CD34 +/CD38-, à l'instar des cellules souches hématopoïétiques, et qu'elles étaient capables d'initier des tumeurs dans des souris immunodéficientes NOD/SCID. Depuis, de nombreuses publications ont mis en avant l'existence de CSCs en isolant ces dernières à partir d'un certain nombre de cancers différents. Dans ces expériences, la capacité et la fréquence des CSCs à former de nouvelles tumeurs hétérogènes dans des souris immunodéprimées nude sont testés, ainsi que leur capacité à exprimer des marqueurs des cellules souches du tissu d'origine. Néanmoins, les CSCs sont sources de nombreux débats concernant leur existence, leur fréquence et leurs caractéristiques. L'origine de ces CSCs est aussi sujette à controverse car plusieurs hypothèses sont envisageables : celles-ci peuvent être issues de cellules souches adultes, de progéniteurs (cellules souches proliférantes et engagées dans une lignée cellulaire) ou même de cellules différenciées, qui dans un contexte mutagène approprié peuvent devenir des CSCs.

Récemment, deux groupes de recherche ont réussi à générer des cellules souches cancéreuses à partir de fibroblastes humains, en les transformant avec hTERT et les antigènes SV40 LT et ST (qui améliorent le taux d'infection) (Paranjape, Mandal et al. 2011). Ce cocktail de gènes, semblable à celui utilisé pour créer des hIps, permet de reprogrammer des cellules différenciées en cellules qui possèdent les caractéristiques de CSCs. Cet outil va permettre d'étudier plus facilement les CSCs. Néanmoins, en absence d'un modèle de tumeur et de cellule souche cancéreuse unique et simple, il est primordial de les étudier sous tous les angles, y compris métabolique.

L'une des premières publications sur l'étude des mitochondries de cellules souches cancéreuses s'est basée sur une sous-population isolée à partir de la lignée cancéreuse de poumon humain A549 (Ye, Li et al. 2011). Pour isoler la sous-population de LCSC (Lung Cancer Stem Cell), les auteurs ont sélectionné les cellules d'A549 qui, cultivées dans un milieu sans sérum et adapté à la culture de cellules souches, formaient des sphères primaires puis secondaires. Ces cellules expriment des marqueurs de cellules souches, dont Oct4, Sox2, CD34, Nanog et CD133, et une fois greffées à des souris immunodéficientes nude, elles sont capables de former des tumeurs hétérogènes. Comme les cellules souches, les LCSC

possèdent une plus faible quantité d'ADNmt, d'ATP, de ROS et une plus faible consommation de glucose et d'oxygène, comparées aux cellules non-LCSC. Néanmoins, les LCSCs ont la particularité d'avoir la même masse mitochondriale que les non-LCSC, tout en ayant un potentiel membranaire plus élevé.

Les études présentées dans cette thèse ont été en partie réalisées sur la lignée H1299, une autre lignée de CSCs issues de non-petites cellules de carcinome de poumon. Comme A549, la lignée H1229 possède une sous-population (20 %) de cellules exprimant des marqueurs de cellules souches, mais dont l'étude des mitochondries n'a pas encore été réalisée (Pan, Zhang et al. 2010).

Comme les cellules souches adultes, les cellules souches cancéreuses ont été identifiées dans des niches particulières (Mohyeldin, Garzon-Muvdi et al. 2010). En effet, étant quiescente avec une faible activité mitochondriale, ces CSCs résisteraient à une grande partie des thérapies qui ciblent préférentiellement les cellules prolifératives consommant beaucoup d'énergie. Pour pouvoir traiter des tumeurs dans la globalité, il est donc important d'approfondir les connaissances sur le métabolisme de ces cellules souches cancéreuses.

#### IV. <u>La famille des ATPases de type AAA +</u>

#### a. Structure commune, fonctions diverses

Caractérisée en 1991 par Erdmann *et al*, la famille des ATPases AAA + (ATPase Associées à des Activités variées) regroupe des protéines aux fonctions variées, qui possèdent un domaine hautement conservé capable de lier et d'hydrolyser l'ATP (Erdmann, Wiebel et al. 1991). Ce domaine de 200 à 250 acides aminés a été établi sur la base d'une homologie de séquences, mais la comparaison a été élargie à d'autres ATPases ayant une forte ressemblance structurale. Au sein de ce domaine on retrouve une partie C-terminale composée de quatre hélices alpha et une partie N-terminale constituée de cinq feuillets bêta reliés par des hélices alpha (Fig. 12).

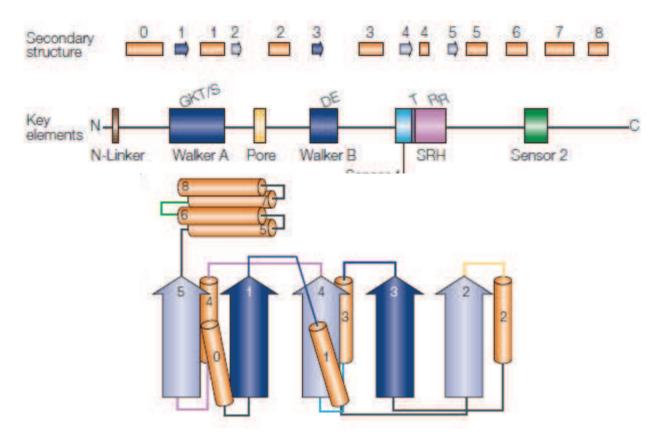


Figure 12: Structure secondaire et motifs clefs des ATPases AAA +.

Les différentes séquences d'intérêts d'un domaine ATPase AAA + sont représentées : hélice alpha N-terminale « N-linker », WalkerA, WalkerB, capteur-1 « sensor 1 », seconde région d'homologie « SRH », et le capteur-2 (Hanson and Whiteheart 2005). Les hélices alphas sont représentées sous forme de tube, et les feuillets bêtas sous forme de flèches.

Ce domaine possède plusieurs séquences d'intérêts: l'hélice alpha N-terminale, les motifs WalkerA (WA, aussi appelé «P-loop» ou boucle de liaison avec le phosphate), WalkerB (WB), la seconde région d'homologie (SRH) avec son « doigt arginine » (R-finger) et deux motifs « sensor-1 » et « sensor-2 » (Erzberger and Berger 2006)(Fig. 13). L'ensemble de ces éléments forme une poche qui lie le co-facteur ion magnésium et l'ATP permettant ainsi hydrolyse de ce dernier en ADP. Cette réaction provoque un changement de conformation du complexe protéique qui peut transmettre cette énergie à un complexe adjacent (Tucker and Sallai 2007). De plus, il a été récemment mis en évidence l'importance d'un glutamate, « glutamate switch », qui contrôlerait l'orientation du motif de WalkerB vers une conformation active (Yang, Li et al. 2009).

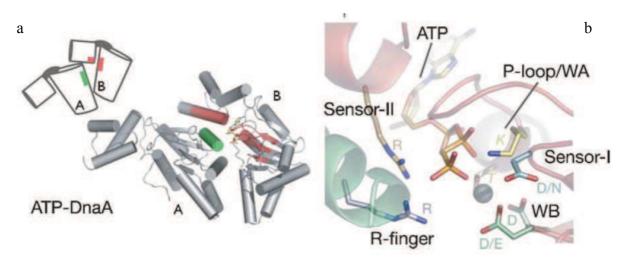


Figure 13 : Dimères des ATPases (a) et modélisation de la poche ATPase (b) (Erzberger and Berger 2006).

a : Les éléments d'une sous-unité (doigt arginine, A) interagissent avec le domaine de liaison à l'ATP d'une seconde unité.

b : Les différents motifs d'un domaine ATPase, WalkerA et B (WA, WB), sensor 1 et 2, et le doigt arginine (R-finger) forment une poche hydrophobe capable de lier et hydrolyser l'ATP.

Les mutations des différentes séquences du domaine ATPase fournissent des outils utiles pour l'étude de la fonction de ces protéines. Notamment, le changement de la lysine du motif Walker A (GXXXXGK [T/S]) en alanine inhibe la liaison avec l'ATP et celle de l'aspartate en glutamine du WalkerB (XXXDE) diminue grandement l'hydrolyse de l'ATP (Babst, Wendland et al. 1998). Les mutations d'autres domaines inhibent l'hydrolyse de l'ATP en modifiant aussi l'oligomérisation des protéines AAA + (Hanson and Whiteheart 2005), qui forment pour la plupart des hexamères. L'arginine de la région SRH d'une sous-unité est projetée dans la poche à nucléotide de la sous-unité adjacente, ce qui forme cet

hexamère. Il existe un équilibre entre les formes mono- ou dimérique, inactives, et la forme hexamèrique fonctionnelle (Tucker and Sallai 2007). Les modèles expérimentaux et les données cristallographiques ont montré que, dans certains cas, l'hexamère d'ATPase peut former un pore à travers lequel peuvent passer des protéines ou des brins de nucléotides dépliés. La majorité des ATPases AAA + possèdent un seul domaine ATPase par monomère, mais certains peuvent en avoir deux, voir six domaines par protéine, comme pour la dynéine. Il existe huit clades d'ATPases AAA + classés selon leur structure, la présence et la localisation d'inserts d'hélice alpha ou de feuillet bêta entre les motifs caractéristiques des ATPases. Ces inserts avec les domaines adjacents au domaine ATPase, contribuent à la reconnaissance de substrats et aux activités spécifiques à la protéine.

Les ATPases sont impliquées dans de nombreux processus cellulaires, comme le trafic entre membranes (protéine de fusion NSF), le dépliement de protéines, le fonctionnement du protéasome (sous-unité 19s du protéasome), la biogénèse d'organelles et la régulation des microtubules (spastines) (Patel and Latterich 1998; White and Lauring 2007). Ces fonctions sont liées à la localisation de la protéine, de ses domaines adjacents au domaine ATPase et des ligands qui peuvent moduler l'activité ATPase (Dunn, Tamura et al. 2008).

#### b. AAA + mitochondriales

On retrouve des protéines AAA + dans chaque règne, avec environ 60 membres encodés dans le génome humain, dont moins d'une dizaine serait mitochondriale (Frickey and Lupas 2004; Truscott, Lowth et al. 2010). La plupart de ces protéines possèdent une préséquence en N-terminal, suivie ou non d'une séquence hydrophobe, mais d'autres comme Bcs1p ont des séquences internes d'adressage à la mitochondrie (Fig. 14). Il est intéressant de noter que la protéine ClpX peut changer de fonction, protéase ou chaperone, respectivement en présence ou non de son ligand CLPP (Kang, Ortega et al. 2002). Parmi les huit familles d'ATPases AAA mitochondriales que l'on retrouve chez l'homme, seules deux sont spécifiques à ce dernier : la SKD3 (suppressor of K transport defect, protein 3) et les ATAD3 (ATPase family, AAA domain). La SKD3 qui, contrairement à son nom, n'est pas impliquée dans le transport de potassium, n'a pas encore de fonctions connues à ce jour (Perier, Radeke et al. 1995).

À l'instar des autres ATPases AAA, il n'y a que peu de données, notamment structurelles et fonctionnelles, sur les ATPases AAA + mitochondriales (Fig. 14). Une étude, par cryomicroscopie, de la structure de la protéase m-AAA isolée à partir de mitochondries de levures, a révélé une organisation hexamérique similaire à celles d'autres ATPases AAA (Lee, Augustin et al. 2011). Ce complexe serait stabilisé par le domaine ATPase ainsi que par la partie transmembranaire de la protéine. La protéase m-AAA joue un double rôle : clivage des protéines spécifiques comme OPA1, et dégradation de protéines mal repliées. Selon l'étude, l'espace entre le domaine transmembranaire et le domaine ATPase de la protéine serait suffisamment large pour permettre l'insertion d'une protéine non repliée. Ce polypeptide serait alors importé au sein du complexe, de manière ATP-dépendante, jusqu'au domaine de dégradation de la protéase m-AAA.

Les ATPases AAA + mitochondriales sont des protéines peu connues dont l'étude peut être aidée par les modèles dérivés des études d'autres AAA +. Ces protéines mitochondriales ont la particularité d'être dans des conditions bien spécifiques (pH, potentiel redox, concentration en ions), et certaines sont de plus transmembranaires. Pour pouvoir étudier une ATPase AAA + mitochondriale il est donc important de prendre en compte l'ensemble de ces paramètres et informations.

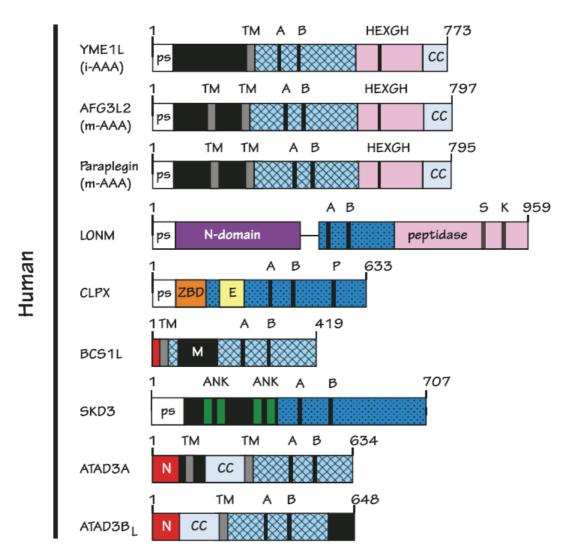


Figure 14: Représentation linéaire des AAA + mitochondriales humaines (Truscott, Lowth et al. 2010).

Les ATPases AAA + mitochondriales font parti du clade des ATPases AAA classiques (YME1L, AFG3L2, Paraplegin, BCS1L, ATAD3A et ATAD3B) ou du clade HCLR (LONM, CLPX et SKD3). Toutes les ATPases AAA + mitochondriales possèdent les motifs de Walker A (A) et de Walker B (B). D'autres domaines sont ici représentés : domaine transmembranaire (TM), pré-sequence d'adressage à la mitochondrie (PS), domaine coil-coil (CC), domaine d'interaction avec le zinc (ZBD), domaine de répétition ankyrin et le motif HEXGH.

# V. Étude de la famille des ATAD3

# a. État de l'art sur les ATAD3

La protéine ATAD3A a été pour la première fois séquencée comme étant une protéine mitochondriale de la membrane interne, exprimée dans le rein de souris (Mootha, Bunkenborg et al. 2003). Chez l'homme, on retrouve dans le génome trois gènes, *hatad3a*, *hatad3b* et *hatad3C*, dont les deux premiers ont été l'objet d'étude de cette thèse (Fig. 15 et 16). Plusieurs noms pour ces protéines ont été employés dans la littérature, dont MSBP pour ATAD3A et KIAA 1273, ATAD3p et AAA-TOB3 pour ATAD3B. La protéine ATAD3C n'a pas encore été étudiée à ce jour, et nous ne l'avons pas détectée dans les différentes lignées cellulaires testées.

Jusqu'en 2008, seuls cinq articles exposant des études sur ATAD3A et/ou ATAD3B ont été publiés. Olivier Gires a identifié, pour la première fois, hATAD3B comme étant fortement exprimée dans des carcinomes de la tête et du cou et lié à la progression tumorale (Gires, Munz et al. 2004; Schaffrik, Mack et al. 2006). L'équipe d'Ian Holt a ensuite isolé hATAD3B dans un extrait de protéines interagissant avec l'ADN mitochondrial (Fig. 3). En utilisant un fragment correspondant au domaine N-terminal de h-TAD3B, commun à hATAD3A de l'acide aminé 44 à 247, ils ont montré que cette interaction se faisait préférentiellement au niveau de la boucle D de l'ADNmt (He, Mao et al. 2007). Pour autant, le groupe de Bogenhagen n'a pas retrouvé hATAD3B dans des préparations de nucléoprotéines liées par cross-linking ciblant l'ADNmt (Bogenhagen, Rousseau et al. 2008).

Hormis un rôle proposé d'ATAD3A/B comme participant à la formation ou la ségrégation de nucléoides mitochondriaux, il restait à déterminer la ou les fonctions de ces protéines. En 2008, Arnaud Hubstenberger publie une comparaison d'oligodendrogliome avec des gliobastome montrant que hATAD3B est, par délétion chromosomique et contrairement à hATAD3A, un marqueur positif de ce deuxième type de cancer (Hubstenberger, Labourdette et al. 2008).

Pour pouvoir comprendre le rôle de ces deux protéines, il est donc nécessaire de faire une étude rigoureuse de la topologie et des fonctions des différents domaines de la protéine ATAD3A.

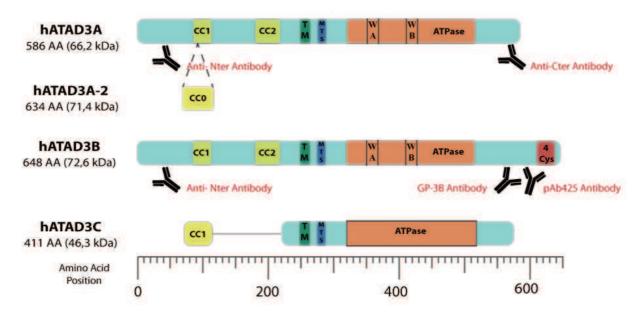


Figure 15 : Schéma des isoformes humaines de hATAD3A, hATAD3B et hATAD3C

Les domaines d'intérêts sont ici représentés suivant leurs positions : coil-coil (CC1 & CC2), transmembranaire (TM), ATPase avec les séquences Walker A (WA) et Walker B (WB). Les protéines d'intérêts, hATAD3A (Q9NV17-2) et hATAD3B (Q5T9A4) sont affichées, ainsi que la deuxième isoforme d'ATAD3A, hATAD3A-2 (Q9NV17) et hATAD3C (Q5T2N8). Les anticorps utilisés au cours des expériences présentées ici sont les suivants : anti-N-terminal (reconnait hATAD3A et hATAD3B), anti-C-terminal (spécifique à hATAD3A), GP-3B et pAb425 (hATAD3B spécifique). Le domaine C-terminal supplémentaire de hATAD3B possède 4 cystéines qui pourraient former un doigt de zinc (4Cys).

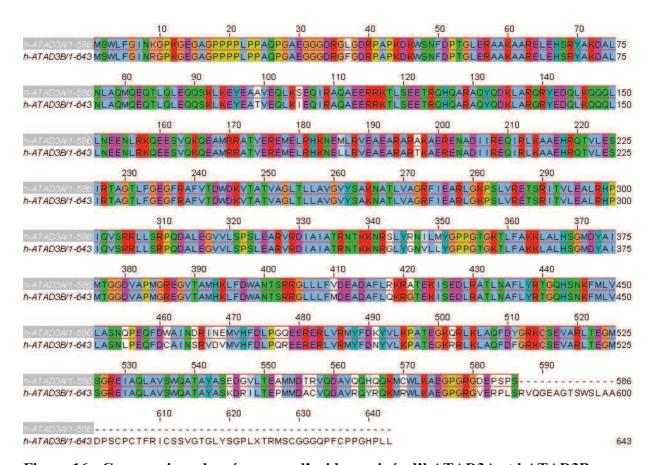


Figure 16 : Comparaison des séquences d'acides aminés d'hATAD3A et hATAD3B.

Les deux protéines sont à 93 % identiques, avec très peu de variations avant la séquence spécifique de hATAD3B. Le domaine C-terminal supplémentaire de hATAD3B possède 6 cystéines, dont 4 pourraient former un doigt de zinc.

II- <u>Résultats</u>

# Résultats

Au cours de ce chapitre, je vous présenterai la première partie de mes travaux qui s'est focalisée sur l'étude de la topologie de hATAD3A. Ces résultats font partie de l'article « The AAA + ATPase ATAD3A controls mitochondrial dynamics at the interface of the inner and outer membranes » publié dans Molecular and Cellular Biology en avril 2010. Lors de la discussion, je présenterai les résultats de digestion trypsique accompagnés de modèles explicatifs ainsi que des résultats complémentaires à l'étude *in vivo* de dATAD3A dans un modèle *Drosophile melanogaster* (non publiés). L'étude de la topologie de hATAD3A sera abordée, avec celle de hATAD3B, dans la discussion de la deuxième partie.

Pour la deuxième partie, mon projet s'est axé sur ATAD3B dont l'ensemble des résultats sont ici présentés. Ces résultats seront complétés par des travaux sur cette protéine dans un modèle de cellule souche, issus d'une collaboration en cours avec le Dr Olivier Feraud du laboratoire d'Anne-Lise Bennaceur-Griscelli (U935-Plateforme cellules souches-Institut André Lwoff Villejuif).

# I. <u>ATAD3A contrôle les dynamiques mitochondriales à</u> <u>l'interface des membranes mitochondriales interne et externe</u>

# a. Résumé de l'article

Les interactions dynamiques entre les éléments des membranes externe et interne contrôlent un certain nombre de fonctions mitochondriales importantes comme le transfert de métabolites et la fission et fusion coordonnées. Nous avons identifié ici l'ATPase AAA + mitochondriale ATAD3A, protéine spécifique des eucaryotes multicellulaires, comme étant un acteur de ces interactions. Le domaine N-terminal interagit avec la membrane mitochondriale externe. Un segment transmembranaire central ancre la protéine à la membrane interne et positionne le domaine ATPase AAA +, du domaine C-terminal, dans la matrice. Des études d'invalidation dans *Drosophila melanogaster* et dans une lignée cellulaire stéroidogénique ont montré qu'ATAD3A est nécessaire pour la croissance cellulaire et le

transport du cholestérol aux zones de contact. En utilisant des mutants dominants négatifs, notamment un mutant incapable de lier l'ATP, ainsi qu'un mutant auquel manquent les 50 premiers acides aminés, nous avons montré qu'ATAD3A régule les interactions dynamiques entre les membranes externe et interne sous contrôle du système de fission. L'influence d'ATAD3A sur des fonctions mitochondriales essentielles suggère que cette protéine possède des propriétés uniques qui lui permettant de réguler les dynamiques mitochondriales et leurs fonctions dans les organismes multicellulaires.

# b. Introduction

La S100B est une calciprotéine spécifique des cellules gliales, localisée dans le cytoplasme et le noyau. Cette protéine est surexprimée chez des patients trisomiques ou atteints de la maladie d'Alzheimer. De plus, la S100B est fortement exprimée lors de la maturation des cellules progénitrices oligodendrogliales. Afin de mieux comprendre les acteurs de la maturation de ces cellules, l'équipe de Jacques Baudier s'était lancée à la recherche de partenaires de la S100B. Dans ces cellules progénitrices, la S100B s'accumule dans des régions péri-nucléaires riches en mitochondries. Avec la technique de Far Western (technique de western blot avec comme sonde de la S100B radiomarquée), un partenaire majeur a été identifié, purifié par colonne échangeuse d'ions et séquencé (au laboratoire EDyP de Jerôme Garin): la protéine hATAD3A (human ATPase family AAA domain containing 3A) (Gilquin, Cannon et al. 2010) (Thèse d'Arnaud Hubstenberger).

Pour comprendre la localisation et les fonctions de hATAD3A, le laboratoire a généré une suite de mutants ponctuels et de délétion et a mené des études dans des modèles *in vitro* et *in vivo*. Ainsi, nous avons pu démontrer que, malgré l'absence de pré-séquence d'adressage à la mitochondrie, la protéine possède une séquence interne d'adressage qui est adjacente au domaine transmembranaire. Grâce au modèle de *Drosophila melanogaster* qui exprime de manière conditionnelle le siRNA ciblant l'homologue d'ATAD3A, bor (ou dATAD3A), il a été montré que la présence de dATAD3A est nécessaire pour la croissance cellulaire et le développement de l'organisme. Son activité ATPase est également importante, car des lignées cellulaires transfectées avec le mutant dominant-négatif WalkerA (chapitre 4.a)) présentent un réseau mitochondrial fissionné. De plus, ce rôle de hATAD3A dans la dynamique mitochondriale est dépendant de la présence de Drp1.

Comme il a été démontré pour d'autres ATPases AAA + mitochondriales (ex : HClpP), l'environnement dans lequel se trouve le domaine ATPase joue un rôle prépondérant dans le fonctionnement de celui-ci (Kang, Ortega et al. 2002). La première partie de ma thèse s'est donc concentrée sur la topologie de la protéine hATAD3A. L'équipe avait déjà mis en évidence le caractère transmembranaire de cette protéine mitochondriale, mais il restait à déterminer si celle-ci appartenait à la membrane externe ou interne.

Pour cela, j'ai réalisé une étude de topologie par digestion protéique en utilisant la trypsine, comme décrit dans la section 1.d). Cette enzyme convient à l'étude de hATAD3A, car cette protéine est riche en lysine et arginine, qui sont réparties de manière homogène (Fig.16). En ajoutant ou non du sucrose (choc osmotique), des sels ou des détergents au tampon de suspension des mitochondries isolées, j'ai pu démontrer que hATAD3A est une protéine de la membrane interne, située au niveau des zones de contact avec la membrane externe. La protéine ATAD3A étant fortement conservée entre les espèces, il est fort probable que la topologie, soit de même, conservée. Lors de la présentation et discussion des résultats de l'étude de la topologie, le terme « hATAD3A » et ATAD3A seront donc utilisés de manière équivalente. Pour plus de clarté, chaque résultat est représenté avec le modèle correspondant dans la discussion. Le domaine N-terminal de la protéine serait dans l'espace intermembranaire, proche de la membrane externe, alors que le domaine C-terminal résiderait dans la matrice.

# c. Article

Benoît Gilquin, Emmanuel Taillebourg, Nadia Cherradi, Arnaud Hubstenberger, Olivia Gay, **Nicolas Merle**, Nicole Assard, Marie-Odile Fauvarque, Shiho Tomohiro, Osamu Kuge et Jacques Baudier:

« The AAA + ATPase ATAD3A controls mitochondrial dynamics at the interface of the inner and outer membranes » Mol Cell Biol. 2010 Apr; 30 (8): 1984-96

# The AAA<sup>+</sup> ATPase ATAD3A Controls Mitochondrial Dynamics at the Interface of the Inner and Outer Membranes<sup>▽</sup>

Benoît Gilquin, <sup>1,2,3</sup> Emmanuel Taillebourg, <sup>1,2,3</sup> Nadia Cherradi, <sup>3,4</sup> Arnaud Hubstenberger, <sup>1,2,3</sup> Olivia Gay, <sup>1,2,3</sup> Nicolas Merle, <sup>1,2,3</sup> Nicole Assard, <sup>1,2,3</sup> Marie-Odile Fauvarque, <sup>1,2,3</sup> Shiho Tomohiro, <sup>5</sup> Osamu Kuge, <sup>5</sup> and Jacques Baudier <sup>1,2,3</sup>\*

INSERM, Unité 873, Grenoble F-38054, France<sup>1</sup>; CEA, Laboratoire Transduction du Signal, iRTSV, Grenoble F-38054, France<sup>2</sup>; Université Joseph Fourier, Grenoble F-38054, France<sup>3</sup>; INSERM, Unité 878, Grenoble F-38054, France<sup>4</sup>; and Department of Chemistry, Faculty of Sciences, Kyushu University, Fukuoka 812-8581, Japan<sup>5</sup>

Received 6 January 2010/Returned for modification 8 January 2010/Accepted 27 January 2010

Dynamic interactions between components of the outer (OM) and inner (IM) membranes control a number of critical mitochondrial functions such as channeling of metabolites and coordinated fission and fusion. We identify here the mitochondrial AAA<sup>+</sup> ATPase protein ATAD3A specific to multicellular eukaryotes as a participant in these interactions. The N-terminal domain interacts with the OM. A central transmembrane segment (TMS) anchors the protein in the IM and positions the C-terminal AAA<sup>+</sup> ATPase domain in the matrix. Invalidation studies in *Drosophila* and in a human steroidogenic cell line showed that ATAD3A is required for normal cell growth and cholesterol channeling at contact sites. Using dominant-negative mutants, including a defective ATP-binding mutant and a truncated 50-amino-acid N-terminus mutant, we showed that ATAD3A regulates dynamic interactions between the mitochondrial OM and IM sensed by the cell fission machinery. The capacity of ATAD3A to impact essential mitochondrial functions and organization suggests that it possesses unique properties in regulating mitochondrial dynamics and cellular functions in multicellular organisms.

Mitochondria not only supply cells with the bulk of their ATP but also contribute to the fine regulation of metabolism, calcium homeostasis, and apoptosis (27). Coordination of these functions is dependent on the dynamic nature of mitochondria (5). These organelles constantly fuse and divide to form small spheres, short rods, or long tubules and are actively transported to specific subcellular locations. These processes are essential for mammalian development, and defects can lead to degenerative diseases and cancers (9, 17). In eukaryotes, these organellar gymnastics are controlled by numerous pathways that preserve proper mitochondrial morphology and function (30, 45). The best-understood mitochondrial process is the fusion and fission pathways, which rely on conserved GTPases, and their binding partners to regulate organelle connectivity (10, 18, 45). There are also evidences that dynamic interactions between the outer membrane (OM) and inner membrane (IM) exist for coordinated fusion and fission, channeling of metabolites, and protein transport, but proteins playing a role in these interactions have yet to be identified (34). In the present study, we provide a detailed biochemical and functional characterization of the mitochondrial AAA+ ATPase ATAD3A protein that is present exclusively in multicellular eukaryotes and which participates in the control of mitochondrial dynamics at the interface between the IMs and OMs. Proteins related to the Atad3A genes have been previously identified in proteomic surveys of mouse brain mitochondria (28) and liver mitochondrial inner membrane (8), as mitochondrial DNA-binding proteins (4, 21, 44) and as nuclear mRNAassociated proteins (6). The Atad3A protein has also been identified as a cell surface antigen in some human tumors (16). Functional genomics identified the Drosophila Atad3A ortholog (bor) as a major gene positively regulated by the TOR (for target of rapamycin) signaling pathway involved in cell growth and division (19). In our laboratory, we identified ATAD3A as a specific target for the Ca2+/Zn2+-binding S100B protein (B. Gilquin et al., unpublished data). We here show that ATAD3A is anchored into the mitochondrial IM at contact sites with the OM. The N-terminal domain of ATAD3A interacts with the inner surface of the OM and its C-terminal AAA ATPase domain localizes in a specific matrix compartment. Thanks to its simultaneous interaction with two membranes, ATAD3A regulates mitochondrial dynamics at the interface between the IMs and OMs and controls diverse cell responses ranging from cell growth, channeling of cholesterol, and mitochondrial fission.

#### MATERIALS AND METHODS

Drosophila strains. w; PBc05441/TM6b (42) and UAS-MitoGFP (32) strains were from the Bloomington Stock Center. The y, w, hsFLP; Act5C>CD2>Gal4 strain was kindly provided by Renald Delanoue (ISBDC-UMR CNRS 6543, Université de Nice). The UAS-ATAD3AIR transgenic line was obtained from the Vienna Drosophila RNAi Center (11).

Cells. U373 cells were purchased from the American Type Culture Collection and maintained in Dulbecco modified Eagle medium (DMEM-Gutamax), supplemented with 10% fetal calf serum,  $100~\rm U$  of penicillin/ml, and  $100~\rm \mu g$  of streptomycin/ml.

Antibodies. Affinity-purified polyclonal antibodies to ATAD3A were raised in rabbit. Pan-specific N-terminal antibodies were obtained against the RPAPKD KWSNFDPTGC peptide, and human-specific C-terminal antibodies against the

<sup>\*</sup> Corresponding author. Mailing address: INSERM Unité 873/TS-iRTSV, CEA Grenoble, 17 Rue des Martyrs, 38054 Grenoble Cedex 9, France. Phone: (33) 4 38 78 43 28. Fax: (33) 4 38 78 50 58. E-mail: jbaudier@cea.fr.

Published ahead of print on 12 February 2010.

CLKAEGPGRGDEPSPS peptide (23). Monoclonal anti-Myc IgG was homemade hybridoma supernatant. Rabbit polyclonal anti-ATP synthase was a generous gift of G. Brandolin. The following commercial primary antibodies were used: mouse monoclonal anti-ATP synthase beta, rabbit anti-CytC, rabbit anti-OPAI, and rabbit antiprohibitin (Abcam); mouse monoclonal anti-GM130 and anti-DRP1 (BD Biosciences); and mouse anti-TOM20 (Santa Cruz). Secondary antibodies conjugated to cyanin 3 were from Jackson Immunoresearch Laboratories. Secondary antibodies conjugated to Alexa Fluor 488 were from Molecular Probes, Inc.

Yeast two-hybrid assay. The yeast two-hybrid assay was performed by using the Matchmaker two-hybrid system 3 (Clontech) according to the manufacturer's instructions. For assays of protein interaction, the AH109 yeast strains carrying pGBKT7-ATAD3A1-245 and the empty pGBKT7 DNA-BD vector were transformed with the prey vectors, the pGADT7-ATAD3A1-245 or the empty pGADT7 AD vector, plated on the SD/–Leu/–Trp medium, and then incubated at 30°C. After 3 days, the transformants were replica plated to the SD/–Ade/–His/–Leu/–Trp medium containing X-α-Gal and incubated at 30°C for 6 days. In this yeast two-hybrid system, the transformants that were able to grow and form blue colonies on the SD/–Ade/–His/–Leu/–Trp/X-α-Gal plates contained the cDNA clones encoding interacting proteins. The growth phenotype of each transformant was reevaluated by spot test.

Mitochondrial preparation. Cells grown in 100-mm plates were resuspended in 1 ml of buffer containing 0.28 M sucrose, 1 mM EDTA, and 10 mM Tris-HCl (pH 7.4). Cell suspension was homogenized with 20 passages through a G25 needle. The homogenate was centrifuged at  $1,200 \times g$  for 10 min. The supernatant was subsequently centrifuged at  $11,000 \times g$  for 15 min. The pellet contained mitochondria and mitochondrion-associated membranes.

Submitochondrial fractionation. Submitochondrial fractionation was performed according to the method of Pon et al. (33). Crude mitochondria were resuspended in 1 ml of swelling buffer (10 mM HEPES-KOH [pH 7.4], 0.5 mM EDTA). After a 10-min incubation on ice, 0.38 ml of sucrose 55% (wt/vol) was added, and mitochondria were further incubated for 15 min on ice. After sonication (those pulses of 1 min each), remaining intact mitochondria and large fragments were removed by centrifugation (15,000 × g for 10 min). The supernatant was centrifuged at 200,000 × g for 60 min at 4°C in a Beckman Optima MAX-XP centrifuge equipped with a TLS-55 rotor. The pellet was resuspended in 100 µl of buffer containing 10 mM HEPES-KOH (pH 7.4), 10 mM KCl, 15% sucrose, and 0.5 mM EDTA and loaded onto a discontinuous sucrose gradient (made with 280 µl of 55% [wt/vol] sucrose, 1,000 µl of 46% [wt/vol] sucrose, 460 μl of 38% [wt/vol] sucrose, and 280 μl of 29% [wt/vol] sucrose in 10 mM HEPES-KOH [pH 7.4] and 10 mM KCI). After centrifugation (100,000 × g for 6 h, 4°C), 150-μl fractions were collected from bottom to top. Then, 15 μl was loaded on SDS-PAGE gels for Western blot analyses.

Mitochondrion tryptic digestion. A standardized method was used. Mitochondrial pellets were resuspended in either isotonic buffer containing 0.28 M sucrose in 20 mM HEPES (pH 7.5) or in hypotonic buffer containing 20 mM HEPES (pH 7.5), in the absence or presence of 120 mM NaCl. Mitochondrial preparations (150 µg/ml) were incubated with various amounts of trypsin for various amounts of time at 30°C. For combined trypsin digestion with detergents, Triton X-100 (10% solution) or digitonin (5-mg/ml solution) were added and incubated for 5 min with the mitochondrial preparation prior to trypsin. Digestion was stopped by the addition of a trypsin inhibitor (Pefabloe) and SDS loading buffer containing 4 mM EGTA and 20 mM dithiothreitol (DTT), after which the samples were kept at 95°C for 5 min.

Protein solubility experiments. The mitochondrial preparation was solubilized in 40 mM Tris (pH 7.4)–150 mM NaCl buffer (control), 1 M NaCl–0.1 M Na2CO<sub>3</sub> (pH 11.5) (NaCO<sub>3</sub>)–2 M urea, or 0.5% Triton X-100 (Triton) as indicated on the figure panels. After centrifugation at  $11,000 \times g$  for 15 min, the soluble protein supernatants (S) and the membranous pellets (P) were analyzed by immunoblot.

Immunoprecipitation. Total cell lysates in 1 ml of immunoprecipitation buffer (50 mM Tris [pH 8.0], 150 mM NaCl, 0.3% Triton X-100, 4 mM EGTA, and protease inhibitor cocktail) were incubated with anti-Myc monoclonal antibody, together with protein G-Sepharose (Pharmacia) for 1 h of rotation at 4°C. The immunoprecipitates were washed three times in incubation buffer and transferred to a new Eppendorf tube, and the beads were boiled in 1× Laemmli with 20 mM DTT. Proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting.

Cross-linking experiments. For cross-linking experiments, mitochondria were prepared in buffer containing 0.28 M sucrose, 1 mM EDTA, and 20 mM HEPES (pH 7.4). Crude mitochondria were incubated at 30°C in the presence of 0.5 mM DSP or DTSSP. Cross-linking was stopped by the addition of SDS loading buffer

without reducing agents. The proteins were resolved on by SDS-PAGE on 10.5 or 6% polyacrylamide gels.

Immunocytochemistry. For immunocytochemical analysis, cells were plated onto poly-L-lysine (Sigma)-coated glass coverslips. U373 cells were fixed either with methanol (5 min) or 4% paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) and permeabilized with 0.2% Triton X-100 for 10 min, washed in Trisbuffered saline (TBS), and blocked in TBS containing 5% normal goat serum (NGS) for 30 min. After incubation with primary antibodies in NGS-TBS overnight at 4°C, the cells were washed in TBS and stained with secondary antibodies. Images were obtained with a Zeiss Axiovert 200M microscope or with a Leica TCS SP2 confocal microscope. Hoechst, Alexa 488, and cyanine 3 (Cy3) fluorescences were excited and determined sequentially (400 Hz line by line) by using wavelengths of 405 nm for Hoechst, 488 nm for Alexa 488, and 543 nm for Cy3 excitation. Fluorescence emissions were collected from 415 to 465 nm for Hoechst, from 500 to 542 nm for Alexa 488, and from 560 to 655 nm for Cy3. Quantifications were performed by using the Leica analysis software.

Transfections. cDNA and siRNA transfections of U373 cells were performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacturer's protocols in Opti-MEM culture medium. For siRNA, cells growing on 10-cm dishes at 50% confluence were transfected with an equimolar mix (100 pM) of three different or individual siRNAs directed against human ATAD3A/B (23), with a single Drp1 siRNA (15), or with scrambled nucleotide. The cells were transfected a second time at 24 h. At 24 h after the last transfection, cells were treated with trypsin and seeded onto plastic dishes or poly-1-lysine (Sigma)-coated glass coverslips.

NCI H295R cell culture, transfection, and steroid measurements. NCI H295R cells were cultured as previously described (3). Cells were harvested by trypsinization and pelleted by centrifugation at 200 × g for 5 min, resuspended in growth medium, counted, and then resuspended again at  $2 \times 10^6$  cells/ml in 100 μl of Amaxa cell line optimization Nucleofector solution R. Then, 0.5 μg of ATAD3A siRNA was added, and the mixture were transferred into the Amaxa electroporation cuvette. Electroporation was performed using program T-16. A total of 500 µl of DMEM/F-12 medium containing 2% Ultroser (Ciphergen, Cergy-Saint-Christophe, France) and 1% ITS+ (insulin, transferrin, and selenium premix; BD Biosciences Bedford, MA) was added immediately to the electroporation mixture, and the cells were transferred to six-well plates containing DMEM/F-12 medium supplemented with 2% Ultroser and 1% ITS+. At 48 h posttransfection, the cells were incubated in fresh DMEM/F-12 containing forskolin (FSK; 10 µM) or angiotensin II (10 nM) for 3 h at 37 C. After the incubation period, aliquots of the culture medium were assayed for cortisol or aldosterone content by radioimmunoassay (RIA).

#### RESULTS

Characteristics of the ATAD3 genes and proteins. Atad3 genes are conserved in multicellular organisms, but absent in unicellular organisms, including yeast. In the human genome, two genes encoding ATAD3 proteins, Atad3A and Atad3B, are located on chromosome 1 at locus p36.33. The ExPASy Molecular Biology Server revealed two alternatively spliced human transcripts derived from the Atad3A gene: Q9NVI7-2/ATAD3A (length, 586 amino acids) and variant Q9NVI7/ATAD3A-2 (length, 634 amino acids).

Characterization of ATAD3 transcripts in human U373 and HeLa cells by reverse transcription-PCR (RT-PCR) revealed that only ATAD3A (Q9NVI7-2) mRNA is expressed in these two cell lines (data not shown). The ATAD3A isoform is conserved in all mammals and *Drosophila*. The *Atad3B* gene is human specific and ATAD3B protein (648 amino acids; 72 kDa) is only expressed at very low level in specific human cell lines (23). Computer-assisted structural predictions identified two coiled-coil domains (CC1, amino acids 85 to 115; CC2, amino acids 180 to 220) with high oligomerization probability within the N terminus of ATAD3A. The coiled-coil domains are followed by a predicted transmembrane segment (TMS; amino acids 248 to 264) positioned in the central part of the molecule (Fig. 1a). The C terminus harbors a conserved

1986 GILQUIN ET AL. MOL. CELL. BIOL.

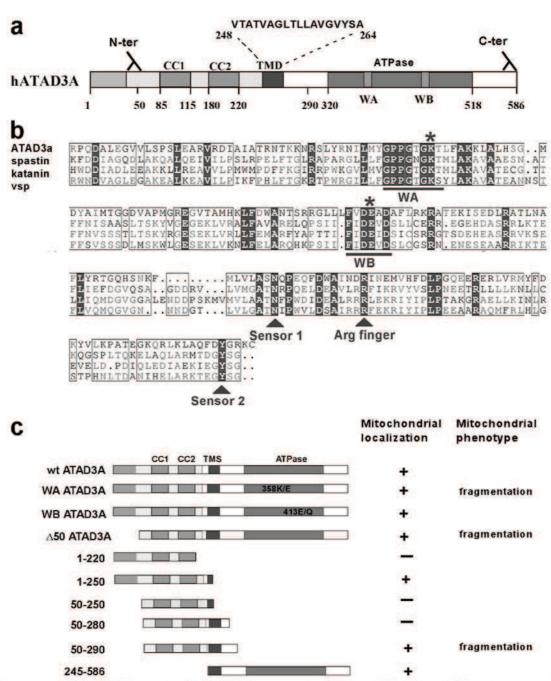


FIG. 1. Characteristics of the ATAD3A protein. (a) Schematic representation of human ATAD3A protein. The epitope domains for N-ter and C-ter antibodies, the two coiled-coil domains (CC1 and CC2), the predicted transmembrane sequence (TMS), and the ATP binding domain conserved in the AAA protein family are indicated. (b) Protein alignment of the AAA domain of hATAD3A with the AAA proteins spastin, katanin, and Vsp4 p. The asterisk indicates the lysine amino acid and glutamic amino acid whose mutation abrogates ATP binding or ATP hydrolysis in Vsp4p (1). (c) Schematic representation of the various C terminus Myc-tagged ATAD3A mutants used in the present study.

ATPase domain characteristic of the AAA+ATPase subfamily with ATP-binding and ATPase domains (Walker A and Walker B), including an SRH motif, sensor I and sensor II residues, and an Arg finger (Fig. 1b) (13).

Mitochondrial ATAD3A topology. Differential solubility assays showed that ATAD3A behaves as an integral mitochondrial membrane protein. ATAD3A is resistant to carbonate and high salt extraction and is soluble only in buffers containing Triton X-100 (see below). Submitochondrial membrane

vesicle fractionation by density gradient centrifugation showed that ATAD3A partitions in heavy-density fractions but is also present in intermediate and light fractions (Fig. 2a). These results suggest that ATAD3A is a protein anchored to the IM that can also interact with the OM (33).

To examine the submitochondrial localization of ATAD3A domains in more details, we analyzed the accessibility of the protein to trypsin digestion under various conditions. In isotonic buffer containing 0.28 M sucrose, ATAD3A was pro-

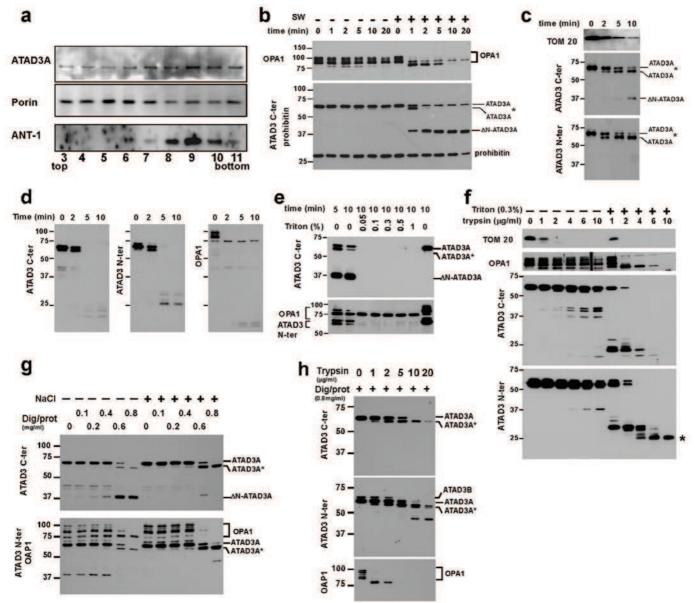


FIG. 2. Characterization of mitochondrial ATAD3A topology. (a) Sucrose-density gradient profile of mitochondrial membrane fragments. Fractions from top to bottom were analyzed by immunoblotting. Markers: Ant-1, an integral protein of the IM; porin, an integral protein of the OM that also interacts with the IM. (b to h) Trypsin sensitivity of mitochondrial ATAD3A. (b) Time course proteolysis of mitochondria in isotonic (SW −) or hypotonic (SW +) buffer, in the absence of NaCl. Trypsin was added at a concentration of 5 μg/ml. (c) Time course proteolysis of mitochondria with low trypsin concentration (0.5 μg/ml) in hypotonic buffer in the absence of NaCl. (d) Time course proteolysis of mitochondria in hypotonic buffer, in the absence of NaCl, and in the presence of 0.3% Triton X-100. Trypsin was added at a concentration of 1 μg/ml. (e) Mitochondria in hypotonic buffer, in the absence of NaCl, were incubated with trypsin (1 μg/ml). After 5 min, increasing concentrations of Triton X-100 were added, and the mitochondria were incubated for an additional 5 min. The right lane is the mitochondrial preparation that was left without trypsin during the time of the experiment. (f) Mitochondria in hypotonic buffer and in the presence of 120 mM NaCl were incubated with increasing trypsin concentrations as indicated, in the absence (−) or presence (+) of 0.3% Triton X-100 for 5 min. (g) Mitochondria in isotonic buffer in the absence (−) or in the presence (+) of 120 mM NaCl were incubated 10 min with trypsin (5 μg/ml) and increasing digitonin concentrations as indicated. (h) Mitochondria in isotonic buffer in the presence (+) of 0.8 mg of digitonin/ml were incubated for 10 min with increasing trypsin concentrations as indicated. In panels b to h, immunoblots were probed with antibodies as indicated in the left margins. In panel b, ATAD3A C-ter and prohibitin antibodies were used on the same Western blot membrane. See the text for details.

tected from proteolysis (Fig. 2b). In hypotonic swelling conditions, and in the absence of salt, ATAD3A became highly sensitive to trypsin (Fig. 2b and c). At a low trypsin/protein ratio, ATAD3A proteolysis generated two fragments sequentially, ATAD3A\* and ΔN-ATAD3A (37 kDa). The ATAD3A\*

fragment that is recognized by both N-ter and C-ter antibodies was produced with kinetics that paralleled proteolysis of the OM protein TOM20 (Fig. 2c). This indicates that the first 40 amino acids are positioned close to the mitochondrial surface. At higher trypsin/protein ratios, the ΔN-ATAD3A fragment

1988 GILQUIN ET AL. Mol., Cell. Biol.

that is specifically recognized by ATAD3A C-ter antibody remained protected from digestion, whereas OPA1, an inner membrane space (IMS) protein that peripherally associated with the outer surface of the IM (18), is fully degraded (Fig. 2b). Under the same conditions, prohibitin, an oligomeric transmembrane protein of the IM with a domain exposed to the IMS, is digested at much lower rate (Fig. 2b). To investigate whether resistance of the C-terminal  $\Delta N$ -ATAD3 fragment to trypsin is dependent on its specific submitochondrial localization, we combined trypsin digestion with Triton X-100 treatment in hypotonic buffer. Under these conditions, full proteolysis of the ATAD3A protein was observed (Fig. 2d). Similarly, if mitochondria were preincubated with a low trypsin concentration in hypotonic swelling conditions to promote formation of the ΔN-ATAD3A fragment, subsequent addition of Triton X-100 induced full proteolysis of this fragment at very low Triton X-100 concentrations (Fig. 2e). At low trypsin concentrations, Triton X-100 does not increase OPA1 proteolysis as OPA1 is an IMS protein whose accessibility to protease does not require IM permeabilization (Fig. 2e). These results indicated that the ATAD3A C-terminal domain is localized in a matrix compartment.

When protease treatment of mitochondria was carried out in hypotonic buffer that contained 120 mM NaCl, different proteolysis patterns were observed (Fig. 2f). In the absence of Triton X-100, ATAD3A, and OPA1 were partially protected from proteolysis. The protective effect of NaCl is assumed to be the result of mitochondrial condensation by the salt which, in turn, promoted OM resealing and shrinkage of the IMS. In the presence of Triton X-100, ATAD3A and OPA1 proteolyses were restored. However, low-molecular-weight trypsin-resistant ATAD3A fragments could be observed that were not present in the absence of salt (Fig. 2f). Notably, an N-terminal 25-kDa fragment (\*) remained visible even at high trypsin concentrations. To investigate whether salt protects ATAD3A from proteolysis via strengthened interactions between mitochondrial membranes, we combined trypsin digestion with digitonin extraction in an isotonic buffer in the absence or presence of 120 mM NaCl. A relatively low concentration of digitonin (0.65 to 0.75%) generate holes in and removes most of the OM, making IMS proteins accessible to cleavage by exogenous proteases (20). However, contact sites between the OM and the IM can withstand this relatively harsh treatment (20, 39). It is thus expected that proteins localized at contact sites will be protected from proteolysis in condensed mitochondria. In the absence and in the presence of 120 mM NaCl, solubilization of the OM was detectable by full digestion of OPA1 at low trypsin concentrations (Fig. 2g). OPA1 was even more efficiently proteolysed in the presence of NaCl. Considering ATAD3A, in the absence of NaCl, the digestion profile was similar to that observed for mitoplasts under hypotonic conditions. However, in the presence of 120 mM NaCl, ATAD3A was protected from proteolysis (Fig. 2g). Only the first 40 amino acids on ATAD3A were accessible to trypsin, resulting in the production of a single ATAD3A\* fragment recognized by both C-ter and N-ter antibodies. As digitonin also punctures the IM, thereby exposing matrix proteins to protease digestion (18), full ATAD3A proteolysis occurred at high trypsin concentrations with no intermediate ΔN-ATAD3A fragment (Fig. 2 h).

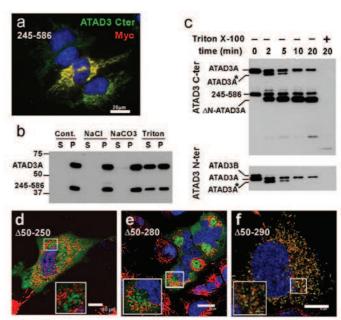


FIG. 3. Characterization of regions that determine mitochondrial targeting of ATAD3A. (a) Double immunofluorescence analysis of the 245-586 ATAD3A-Myc mutant in transfected U373 cells with anti-Myc (red) and anti-ATAD3-Cter (green) antibodies shows mitochondrial localization. (b) Analysis of the solubility of the mitochondrial 245-586 ATAD3A-Myc protein. Endogenous ATAD3A and 245-586 ATAD3A-Myc proteins in supernatants (S) and pellets (P) were analyzed with anti-ATAD3A C-ter antibody. (c) Time course proteolysis of mitochondria purified from transfected cells with 245-586 ATAD3A-Myc plasmid in isotonic buffer, in the absence or in the presence of Triton X-100. ATAD3A proteins were detected with anti-ATAD3A C-ter (upper panel) or N-ter (lower panel) antibodies. The positions of ATAD3 proteins and fragments are indicated in the left margin. (d to f) Indirect immunofluorescence analysis of U373 cells transfected with Myc-tagged Δ50-250 (d), Δ50-280 (e), and Δ50-290 (f) mutants with anti-Myc (green) and anti-ATP synthase F1 (red). DNA staining with Hoechst is in blue. High-magnification observations of squared areas are also shown. Bars: 10 μm (d and f) and 20 μm (e).

These data led us to conclude that ATAD3A is anchored into the mitochondrial IM and enriched in sites with the potential to form contacts with the OM. The N-terminal domain interacts with the inner surface of the OM and the C-terminal AAA ATPase domain localizes in a specific matrix compartment. Uncertainty remains regarding the exact localization of the 40 first amino acids, but the high sensitivity of this region to protease attack suggests that they may be located close to the mitochondrial surface (see also the discussion section and Fig. 10).

The C-terminal ATAD3A domain controls mitochondrial targeting and inner membrane insertion. The complex topology of ATAD3A and its interactions with mitochondrial membranes, in addition to the absence of a predicted mitochondrial targeting signal, raises questions regarding the mitochondrial targeting and anchoring mechanisms. To identify the import signal for ATAD3A, we constructed several Myc-tagged truncated versions of the protein and examined their cellular localization (Fig. 1c). We first analyzed the 245-586 ATAD3A-Myc protein that carries the predicted TMS and the AAA domain. When expressed in U373 cells, this mutant protein localized exclusively to mitochondria (Fig. 3a). Solubility ex-

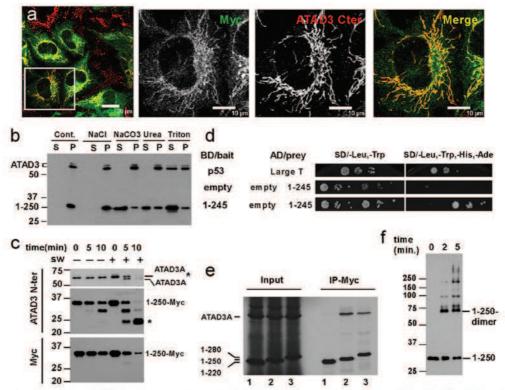


FIG. 4. Characterization of the ATAD3A N-terminal domain. (a) U373 cells transfected with 1-250 ATAD3A-Myc plasmid were double immunostained with anti-Myc antibody (green) and anti-ATAD3A C-ter antibody (red). Cells were observed under confocal microscopy at a low resolution (left panel; bar, 20 μm) and the squared area was observed at a high resolution (right panels; bar, 10 μm). (b) Analysis of the mitochondrial 1-250 ATAD3A-Myc protein solubility. Endogenous ATAD3A/B and 1-250 ATAD3A-Myc protein in supernatants (S) and pellets (P) were analyzed with anti-ATAD3 N-ter antibody. (c) Time course proteolysis of mitochondria purified from transfected cells with 1-250 ATAD3A-Myc plasmid in isotonic (SW−) or hypotonic (SW+) buffer. Proteins were analyzed with anti-ATAD3 N-ter and anti-Myc antibodies as indicated. Asterisks indicate the position of a trypsin-resistant N-ter fragment. (d) Analysis of 1-245 ATAD3A oligomerization in Yeast two-hybrid assay. Serial dilution (1, 1:10, and 1:1,000) of yeast strains coexpressing each pair of the indicated bait and prey proteins were grown on SD/-Leu/-Trp and SD/-Ade/-His/-Leu/-Trp agar plates at 30° for 4 days. DNA-BD/murine p53 fusion protein and AD/SV40 large T antigen fusion protein were used as positive controls of protein interaction. (e) Wild-type ATAD3A was cotranslated with 1-250 (lanes 1), 1-250 (lanes 2), or 1-280 (lanes 3) ATAD3A-Myc fragments in rabbit reticulocyte. Total lysates (input) or Myc immunoprecipitates (IP-Myc) were analyzed by SDS-PAGE and autoradiography. (f) Time course cross-linking of purified mitochondria expressing the 1-250-Myc protein with DTSSP. Proteins were resolved by SDS-10.5% PAGE and analyzed by immunoblotting with anti-Myc antibody.

periments demonstrated that the 245-586 ATAD3A-Myc protein behaved, like endogenous wild-type protein, as an integral mitochondrial membrane protein (Fig. 3b). Trypsin sensitivity experiments in hypotonic conditions demonstrated that the membrane-bound 245-586 ATAD3A-Myc protein was protected from protease attack but was digested in the presence of Triton X-100 (Fig. 3c). Hence, the C-terminal ATAD3A domain contains all of the information necessary for mitochondrial targeting, membrane insertion, and the positioning of the C-terminal AAA ATPase domain in a matrix compartment.

To investigate the contribution of the TMS to mitochondrial targeting, we next analyzed the effect of TMS (residues 246 to 264) on the localization of different N-terminal half mutants. We used truncated Δ50 N-terminal mutants because we found that the first 50 amino acids may participate in interactions with the mitochondrial outer membrane (MOM) (see below). When expressed in U373 cells, the Δ50-250 ATAD3A-Myc protein lacking the TMS localized diffusely in the cytoplasm and accumulated on perinuclear structures with no mitochondrial labeling (Fig. 3d). The Δ50-280 ATAD3A-Myc protein with the TMS showed the same immunostaining pattern (Fig.

3e). Further addition of 10 amino acids was sufficient to target the  $\Delta 50$ -290 ATAD3A-Myc protein to mitochondria, where the protein also promoted mitochondrial chain fragmentation (Fig. 3f). We concluded that both the TMS and an adjacent auxiliary import region cooperate for mitochondrial import.

Interaction of ATAD3A N terminus with the mitochondrial outer membrane requires the first 50 amino acids plus functional features provided by transoligomerization. To analyze the mechanism of interaction between ATAD3A N terminus and the MOM, we used the 1-250 ATAD3A-Myc mutant lacking the TMS. When expressed in U373 cells, a large fraction of the 1-250 ATAD3A-Myc-tagged protein colocalized and cosedimented with the mitochondrial fraction (Fig. 4a and b). Indirect immunofluorescence analysis of transfected cells showed that a population of the 1-250 ATAD3A-Myc protein localizes along the mitochondrial tubules (Fig. 4a). Solubility experiments revealed that the 1-250 ATAD3A-Myc protein is peripherally associated with the mitochondrial OM. It was resistant to NaCl extraction but was solubilized by carbonate buffer and 2 M urea (Fig. 4b). Trypsin digestion experiments demonstrated that a 25-kDa fragment harboring the N-ter 1990 GILQUIN ET AL.. Mol., Cell. Biol.

epitope was selectively resistant to proteolysis (\*), whereas the C-terminus Myc tag epitope was digested (Fig. 4c). The same trypsin-resistant 25-kDa fragment was also observed for ATAD3A digestion in the presence of Triton X-100 and NaCl (Fig. 2f). This confirms that, upon interaction with mitochondrial OM, the ATAD3A N terminus can be protected from trypsin digestion. To further localize the OM interaction domain, we deleted the first 50 amino acids and found that this was sufficient to abrogate interactions of the  $\Delta 50$ -250 ATAD3A-Myc mutant protein with the mitochondrial OM (Fig. 3d). The 50 first N-terminal amino acids were nevertheless insufficient for reconstituting a functional mitochondrial OM interaction domain. Indeed, the 1-220 ATAD3A-Myc mutant did not interact or colocalize with mitochondria (Fig. 1c).

We could then demonstrate that oligomerization of the Nterminal domain of ATAD3A is probably required for MOM interaction. As expected from the presence of two coiled-coil domains, yeast two-hybrid experiments confirmed that the ATAD3A N terminus (amino acids 1 to 245) forms oligomers (Fig. 4d). The ATAD3A N terminus can also mediate formation of hetero-oligomers with the full-length ATAD3A cotranslated in rabbit reticulocytes (Fig. 4e). Dimerization requires the full-length coiled-coil domains, as revealed by the lost of heterodimerization of the 1-220 ATAD3A mutant (Fig. 4e, lanes 1). Finally, cross-linking experiments with the hydrophilic cross-linker dithiobis(sulfosuccinimidyl propionate) (DTSSP) confirmed that the 1-250 ATAD3A-Myc protein does associate as a dimer when bound to the mitochondrial OM (Fig. 4f). Together, these results indicate that the N terminus of ATAD3A can physically interact with the mitochondrial OM and that this interaction requires the sequence comprising the first 50 N-terminal amino acids plus specific functional features provided by transoligomerization.

ATAD3A is required for normal cell growth and maintenance of mitochondrial morphology. The high degree of similarity between the Drosophila ATAD3A (dATAD3A) ortholog and human ATAD3A (70%), suggested that the cellular functions of ATAD3A might be conserved between humans and Drosophila. As an initial approach to identifying the cellular function of ATAD3A, we disrupted dAtad3A gene expression in Drosophila melanogaster. To begin a mutational analysis of dATAD3A, we searched different Drosophila databases and identified a piggyBac transposon inserted in the dATAD3A gene designated PBc05441 (42). We confirmed by sequencing the flanking region that this insertion was located in the 5'-untranslated region of the dATAD3A transcription unit, and it will thus be referred to as dATAD3Ac05441. Homozygous mutants showed growth arrest during larval development, indicating that dATAD3A is required for organism growth (Fig. 5a). These results complement a recent study showing that Caenorhabditis elegans ATAD3A is essential for mitochondrial activity and development (22).

We then used the "Flp-out" recombination technique (31, 38) to generate clones of fat body cells expressing a mitochondrial green fluorescent protein (GFP) (32) alone or in combination with an RNAi construct targeting dATAD3A (Fig. 5b and c). Fat body cells are determined during embryogenesis and show an enormous increase in cell size during larval stages without cell division. Recombined fat body cells in which

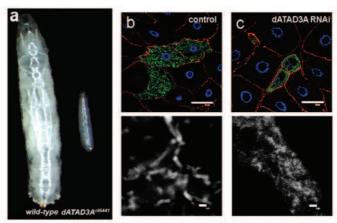


FIG. 5. ATAD3A is required for cell growth in *Drosophila*. (a) Size comparison of wild-type and *dATAD3A*<sup>c05441</sup> homozygous mutant larvae at 120 h of development. After this time point, *dATAD3A*<sup>c05441</sup> homozygotes fail to enter the pupal stage and die. (b and c) Clonal expression of the mitochondrial GFP in fat body of control cells (b) (genotype: y, w, hsFLP; Act5C>CD2>GAL4, UAS-MitoGFP/+), and in cells expressing the dsRNA targeting dATAD3A (c) (genotype: y, w, hsFLP; UAS-dATAD3AIR/+; Act5C>CD2>GAL4, UAS-MitoGFP/+). In panels b and c, fat bodies were stained with phalloidin (red) and Hoechst (blue) and observed under confocal microscopy at low (upper panels; bar, 50 μm) and high (lower panels; bar, 1 μm) resolutions. Mitochondrial GFP is in green (upper panels) or in white (lower panels).

dATAD3A expression was knocked down displayed strong size reduction, demonstrating that dATAD3A is required for cell growth in a cell-autonomous manner. Our genetic analysis is consistent with genomic analysis that identified dATAD3A as a major gene positively regulated by the TOR signaling pathway involved in cell growth (19). The mitochondrial GFP also revealed a more fragmented mitochondrial network in cells expressing dATAD3A RNAi (Fig. 5b and c, lower panels).

ATAD3A regulates steroid biosynthesis at contact sites. To investigate whether the growth phenotype associated with ATAD3A downregulation is linked with changes at contact sites and altered mitochondrial metabolism, we focused on mitochondrial cholesterol metabolism. In steroidogenic tissues, tropic hormones stimulate steroid biosynthesis from cholesterol through the activation of the cyclic AMP or the calcium messenger systems. The rate-limiting step in all steroidogenic pathways is the transfer of cholesterol from the mitochondrial OM to the IM, where the first step of the steroidogenic cascade, namely, the conversion of cholesterol to pregnenolone by the cytochrome P450 side chain cleavage (P450scc), occurs (7, 24, 36, 43). Cholesterol is imported into the mitochondrial IM with the assistance of a transduceosome complex that organizes at the contact sites (reviewed in reference 36). To confirm that ATAD3A functions at contact sites, we investigated its contribution to steroid biosynthesis in the human steroidogenic cell line NCI-H295R, which retains several differentiated functions and is therefore useful for defining the cellular mechanisms regulating steroid production. In NCI-H295R cells only ATAD3A but not ATAD3B is expressed (Fig. 6a). A marked difference in the expression levels of ATAD3A in NCI-H295R and U373 cells also suggests that ATAD3 proteins are differentially regulated between these two human

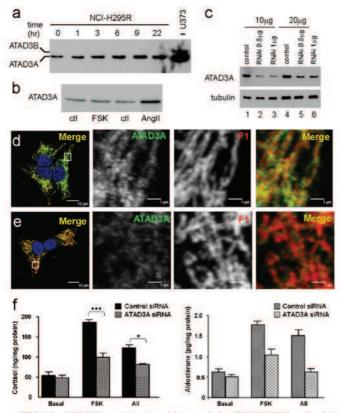


FIG. 6. ATAD3A assists steroidogenesis in NCI-H295R cells. (a) Time course induction of ATAD3A in NCI-H295R cells stimulated with AII (10 nM). In the left lane is U373 cell extract. (b) NCI-H295R cells were not stimulated (ctl) or were stimulated with FSK (10 µM) or AII (10 nM) for 3 h. In panels a and b, total cell extracts (20 µg of protein) were analyzed for ATAD3A content by Western blotting with ATAD3 N-ter antibody. (c) Total cell extract (10 µg of protein or 20 µg of proteins as indicated) of NCI-H295R cells transfected with control siRNA without target (control) or with two concentrations of siRNA directed against human ATAD3A were analyzed by Western blotting for ATAD3A with ATAD3A N-ter antibody. (d and e) NCI-H295R cells transfected with control siRNA (d) or siRNA directed against ATAD3A (e) were analyzed by indirect immunofluorescence with anti-ATAD3A C-ter (green) and anti-ATP synthase F1 (red) antibodies. Bar, 10 µm. In the right panels are high-magnification observations of squared area shown in left panel. Bar, 1 µm. (f) NCI H295R cells transfected with control or ATAD3A siRNA were left unstimulated (basal) or were stimulated with FSK (10 µM) or AII (10 nM). Cortisol (left panel) and aldosterone (right panel) production was measured in the culture medium by RIA and standardized to total cellular protein levels. In left panel, data represent means ± the standard error of the mean (SEM) of three independent experiments performed in duplicate. \* and \*\*\*, significantly different from control siRNA (P < 0.05 and P < 0.001, respectively). One-way analysis of variance with the Bonferroni post hoc test was used. A P value of < 0.05 was considered statistically significant.

cell lines (Fig. 6a). Stimulation with angiotensin II (AII), a Ca<sup>2+</sup>-mobilizing steroidogenic hormone, specifically enhanced ATAD3A level in NCI-H295R cells (Fig. 6a and b). In contrast, FSK, which directly activates the transduceosome complex, has no such effect (Fig. 6b). Similar results were obtained with primary bovine adrenocortical cell cultures stimulated with AII (not shown). These results suggest that ATAD3A could participate in the formation of contact sites modulated by hormonal stimulation for cholesterol import into the IM. A

direct contribution of ATAD3A to cholesterol import was next confirmed by analyses of the effects of short-term ATAD3A downregulation on cortisol and aldosterone production in NCI-H295R cells stimulated with AII or FSK. Western blot analyses showed marked downregulation of ATAD3A protein in cells transfected with hATAD3A siRNA (Fig. 6c). Shortterm ATAD3A downregulation does not induce major changes in mitochondrial network organization (Fig. 6d and e) and did not significantly impact the basal production levels of cortisol and aldosterone in resting cells (Fig. 6f). In contrast, the stimulatory effects of AII and FSK on cortisol and aldosterone syntheses were markedly inhibited (Fig. 6f). Taken together, these data suggest that ATAD3A is required for enhanced channeling of cholesterol for hormone-dependent steroidogenesis. They also strongly support the hypothesis that altered cell growth associated with ATAD3A downregulation could be linked with altered mitochondrial metabolism resulting from changes at contact sites.

ATAD3A controls the mitochondrial network in a manner dependent on the ATP-bound state. Dynamic interactions between the OM and IM also play important roles in regulating mitochondrial fusion and fission processes (5, 34, 45). To further support a role of ATAD3A at contact sites, we thought to analyze the short-term effect of dominant-negative ATAD3A mutants on mitochondrial network organization in U373 cells. To this end, we considered two remarkable features of the AAA ATPase subfamily of proteins, namely, their assembly into functional oligomers and the dependence of the active oligomers on the nucleotide-binding state and the ATPase activity of the AAA domain subunits (1, 12, 35, 37). It was expected that defective ATP-binding ATAD3A mutants or defective ATP hydrolysis mutants could function as dominantnegative proteins by interfering with normal oligomer functions. To test this possibility, we prepared Myc-tagged wildtype ATAD3A and mutant proteins with well-described AAA mutations in the Walker A and Walker B domains that, respectively, do not bind ATP (358K/E WA ATAD3A) or bind ATP but are defective in ATP hydrolysis (413E/Q WB-ATAD3A) (1) (Fig. 1b and c). Coimmunoprecipitation studies confirmed that Myc-tagged ATAD3A constructs are competent to oligomerize with endogenous wild-type ATAD3A (Fig. 7b). Overexpression of these proteins in U373 cells revealed that WA ATAD3A produced immediate fragmentation of the mitochondrial network, whereas overexpression of wild-type ATAD3A (Fig. 7a) or WB mutant (Fig. 7c) produced no such phenotype. Quantitative indirect immunofluorescence analysis with C-ter ATAD3A antibodies demonstrated that a 4-fold expression of WA ATAD3A-Myc over endogenous wild-type protein was sufficient to fragment mitochondrial chains (Fig. 7d). These findings were reproduced with mouse NIH 3T3 cells (data not shown).

Mitochondrial fragmentation induced by dominant-negative ATAD3A mutants depends on the fission machinery. To confirm that the rapid mitochondrion fragmentation phenotypes induced by WA ATAD3A mutants were not a secondary consequence of mitochondrial dysfunction, we first verified that in early transfected cells fragmented mitochondria could still be labeled with the membrane potential-dependent dye MitoTracker Red CMXRos (Fig. 8a). We also ensured that mitochondrial fragmentation did not correlate with leakage of

1992 GILQUIN ET AL. Mol. Cell. Biol.

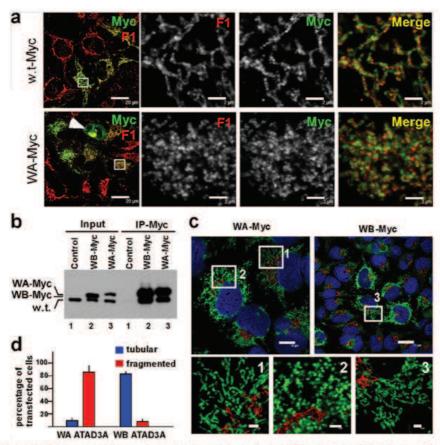


FIG. 7. ATPase-defective ATAD3A mutant disorganizes mitochondrial tubules in U373 cells. (a) U373 cells transfected with plasmids encoding wild-type ATAD3A-Myc or WA ATAD3A-Myc mutant as indicated were double immunostained with anti-Myc antibody (green) and anti-ATP synthase F1 antibody (red) (bar, 20 μm). In the right panels are high-magnification observations of ROI (squared area) shown in left panel (bar, 2 μm). An arrowhead points to a cell that over expresses the WA MiRet-Myc mutant, which induces mitochondrial aggregation. (b) Control and transfected U373 cells with plasmids encoding WA- or WB- ATAD3A-Myc mutants as indicated were lysed and Myc-tagged proteins were immunoprecipitated with anti-Myc antibody. Total lysates (input) and Myc immunoprecipitates (IP-Myc) were analyzed by immunoblotting with anti-ATAD3A C-ter antibody. (c) U373 cells transfected with plasmids encoding WA- or WB-ATAD3A-Myc mutants as indicated were double immunostained with anti-ATAD3A C-ter (green) and anti-cis-Golgi GM130 protein (red) antibodies (upper panels; bar, 10 μm). High-magnification observations of squared areas (1 to 3) are also shown (lower panels; bar, 2 μm). (d) The bar graph shows the relative frequencies of tubular and fragmented mitochondria observed in transfected U373 cells expressing WA- or WB-ATAD3A-Myc mutants. Counts are representative of two independent experiments (200 cells scored per experiment). Only cells that demonstrated 4- to 5-fold expression of transfected proteins over endogenous wild-type protein were counted.

cytochrome c (not shown) and did not affect mtDNA nucleoid core organization (Fig. 8b). We finally showed that the fragmentation phenotype associated with WA ATAD3A mutant expression is linked to an activation of the cell fission machinery (Fig. 8c and d). In mammalian cells, mitochondrial fission is regulated by Drp1, a cytosolic GTPase (40). Transfection of U373 cells with Drp1 siRNA induced a profound decrease in Drp1 protein (Fig. 8c) and inhibited mitochondrial fragmentation induced by WA-ATAD3A overexpression (Fig. 8d). Counting the number of WA-ATAD3A-expressing cells revealed that 60% had fragmented mitochondria, whereas this dropped to less than 10% in cells transfected with Drp1 siRNA. Together, these results suggest that the loss of function of ATAD3A at contact sites between the OM and IM is sensed by the cell fission machinery.

ATP binding regulates interaction of the ATAD3A N terminus with the mitochondrial OM. To investigate the molecular mechanisms associated with loss of function of the WA mu-

tant, we first compared the partitioning of WA and WB mutants with submitochondrial membrane vesicles fractionated by density gradient centrifugation (Fig. 9a). The WB ATAD3A mutant was present in all fractions, whereas the WA mutant concentrated in intermediate and heavy fractions. This suggested that the WA ATAD3A mutant was less prone to interact with the OM, but the protein still localized in the vicinity of contact sites. Because interaction with the OM requires transoligomerization of ATAD3A N terminus (Fig. 4), we compared the susceptibility of the wild-type ATAD3A and WA mutant to the hydrophilic cross-linker DTSSP (Fig. 9b). With control mitochondria, cross-linked ATAD3A oligomers migrated as a single band on SDS-PAGE, with the apparent molecular mass varying between 150 and 300 kDa as a function of the acrylamide concentration. In 6% PAGE cross-linked ATAD3A oligomers migrated in the position of the 150-kDa marker protein (Fig. 9a, left panel). Mass spectrometry analysis of trypsin-digested peptides derived from cross-linked

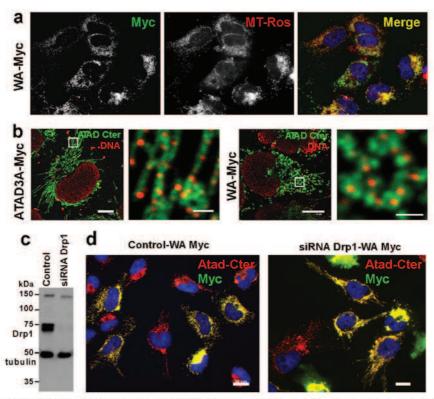


FIG. 8. Mitochondrial fragmentation induced by WA ATAD3A mutant depends on the mitochondrial fission machinery. (a) U373 cells transfected with plasmids encoding WA ATAD3A-Myc for 20 h were labeled with MitoTracker CMXros (100 pM) for 2 h prior to fixation with methanol. Transfected cells were immunostained with anti-Myc antibody (green). (b) U373 cells transfected with plasmids encoding wild-type ATAD3A-Myc or WA ATAD3A-Myc mutant, as indicated, were double immunostained with anti-ATAD3A C-ter antibody (green) and anti-DNA antibody (red) (bar, 10 μm). High-magnification observations of ROI (i.e., the squared area) are shown in the left panels (bar, 2 μm). (c and d) U373 Cells were transfected with scrambled (control) or Drp1 siRNA oligonucleotides. After 72 h, the Drp1 and tubulin content in transfected cells was analyzed by immunoblotting on the same membrane (c). In panel d, transfected cells were further transfected with WA ATAD3A-Myc plasmid and double immunostained with anti-Myc (green) and anti-ATAD3A C-ter (red) antibodies. Bar, 20 μm.

ATAD3A oligomers revealed that they were exclusively composed of ATAD3A peptides, indicating that they are exclusively constituted with ATAD3A molecules (data not shown). Under the same conditions, prohibitin, an oligomeric transmembrane protein of the IM, was not cross-linked with DTSSP (not shown). If purified mitochondria expressing wild-type ATAD3A-Myc are incubated in the presence of DTSSP, the Myc-tagged molecules become cross-linked as homo-oligomers and hetero-oligomers with the endogenous ATAD3A molecules (Fig. 9b, right panel, lanes 1 to 3). Hetero-oligomers (\*) could be identified because they migrated below the homooligomers and reacted with both anti-Myc and anti-ATAD3A C-ter antibodies (not shown). With mitochondria expressing the WA ATAD3A-myc mutant, hetero-oligomers cross-linked with endogenous ATAD3A were not observed at all (Fig. 9b, right panel, lanes 4 to 6). Moreover, the WA mutant protein was less prone to cross-linking by DTSSP, although it spontaneously formed covalent dimers that can be reduced by DTT (results not shown). These results indicate that loss of function by the WA-ATAD3A mutant could be due to decreased transoligomerization of the N-terminal domains.

The interaction of ATAD3A with the MOM requires both transoligomerization of the N terminus and the first 50 amino acids (Fig. 4). To confirm that decreased interaction of the WA mutant with MOM could contribute to the mitochondrial chain

fragmentation phenotype, we analyzed the effect of ectopic expression of the truncated  $\Delta 50$  ATAD3A-Myc mutant on mitochondrial tubular network in U373 cells (Fig. 9c and d). Coimmunoprecipitation studies revealed that the  $\Delta 50$  ATAD3A-Myc mutant supports the formation of a heterocomplex with endogenous wild-type protein (Fig. 9c). Indirect immunofluorescence demonstrated that a 4- to 5-fold expression of  $\Delta 50$  ATAD3A-Myc over endogenous wild-type protein induced fragmentation of the mitochondrial chains, similar to that observed with the WA mutant (Fig. 9d). We concluded that the interaction of ATAD3A N termini with MOM is required for correct mitochondria homeostasis and is regulated by ATP.

#### DISCUSSION

ATAD3A belongs to a newly recognized family of mitochondrial inner membrane AAA<sup>+</sup> ATPase proteins specific to multicellular eukaryotes. Several other mitochondrial AAA<sup>+</sup> ATPases of the inner membrane have already been identified (25, 26). These are ATP-dependent proteases that combine both chaperonelike and proteolytic activities. AAA proteases are characterized by a conserved proteolytic domain that follows the AAA<sup>+</sup> module. This domain is not present in ATAD3A. Thus, ATAD3A is unlikely to function as a mito-

1994 GILQUIN ET AL. MOL. CELL. BIOL.

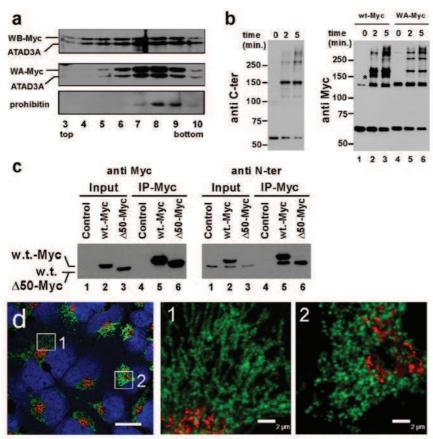


FIG. 9. Interaction of ATAD3A N termini with MOM is implicated in the control of the mitochondrial network. (a) Sucrose-density gradient profile of mitochondrial membrane fragments of cells transfected with WB-ATAD3A or WA-ATAD3A mutants. Fractions from top to bottom were analyzed by immunoblot with anti-ATAD3A C-ter and anti-prohibitin, an oligomeric protein anchored in the IM. (b) Control mitochondria (left panel) or mitochondria obtained from cells transfected with wild-type ATAD3A-Myc (lanes 1 to 3) or WA ATAD3A-Myc mutant (lanes 4 to 6) were left untreated or incubated with DTSSP for 2 min or 5 min as indicated. Mitochondrial proteins were separated on a 6% PAGE and analyzed by immunoblot with anti-C-ter (left panel) or anti-Myc antibodies (right panel). Asterisks indicate position of cross-linked hetero-oligomers with endogenous ATAD3A. (c and d) Truncated Δ50ATAD3A-Myc mutant behaves as dominant negative. (c) Control and transfected U373 cells with plasmids encoding wild-type- or Δ50-ATAD3A-Myc as indicated were lysed and Myc-tagged proteins were immunoprecipitated with Myc antibody. Total lysates (input) and Myc immunoprecipitates (IP-Myc) were analyzed by immunoblot with anti-Myc (left panel) and anti-ATAD3A N-ter (right panel) antibody. Δ50ATAD3A-Myc protein is not recognized by anti-ATAD3A N-ter antibody. (d) U373 cells transfected with plasmids encoding Δ50ATAD3A-Myc mutant were double immunostained with anti-ATAD3A C-ter antibody (green) and anti-GM130 antibody (red). Cells were observed by confocal microscopy at low magnification (bar, 20 μm). High-magnification observations of ROI (squared areas 1 and 2) are representative of a control cell (area 1) and a transfected cell (area 2).

chondrial AAA+ protease. Detail analyses of mitochondrial ATAD3A topology showed that the protein is enriched in regions that may form contact between the IM and the OM and shows a tripartite organization (Fig. 10). The N-terminal domain (residues 1 to 245) is positioned in the IMS and interacts with the OM. A central TMS (residues 246 to 264) spans the IM and position the C-terminal AAA domain within a matrix compartment. Mitochondrial IM targeting information and sorting signals are encoded by the TMS with an adjacent auxiliary import region (comprising residues 280 to 290) (Fig. 3). The mitochondrial import information of ATAD3A show similarities with the mitochondrial IM AAA-ATPase BCS1 protein (14, 41). Although BCS1 and ATAD3A show similarities in their IM anchorage and the matrix localization of their C-terminal AAA ATPase domain, only ATAD3A has an additional N terminus interacting with the inner surface of the OM making this protein unique among the mitochondrial AAA ATPase family members thus far identified. Confocal

microscope analyses revealed punctuate ATAD3A C-ter immunostaining pattern and no overlapping with ATP synthase F1 subunit (Fig. 6d) or with mitochondrial DNA (Fig. 8b). This suggested that ATAD3A C terminus domain may be positioned in a specific matrix subcompartment. The exact submitochondrial localization of the 40 first N-terminal amino acids is not yet clearly resolved, but several observations suggest that these residues could penetrate the OM lipid bilayer. First, only these residues are readily accessible to protease attack in digitonin-treated lysates, suggesting that they are positioned close to the mitochondrial surface. Second, the 50 first amino acids were required to anchor the truncated 1-250 ATAD3A mutant to the OM. Finally, proteolysis studies on mitochondria expressing an EGFP-Nter-ATAD3A fusion protein revealed that the N-terminal EGFP moiety is exposed to the cytosol and highly sensitive to protease attack. Trypsin digestion of the EGFP-ATAD3A fusion protein in isotonic buffer generated a proteolytic product with the mobility and antigenic character-

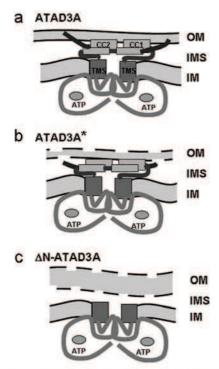


FIG. 10. Model for ATAD3A topology deduced from trypsin digestion experiments. (a) Schematic representation of ATAD3A at contact sites between the OM and IM. ATAD3A is shown as a dimer, but higher oligomers are likely through association of the C termini AAA-ATPase module as ring-shaped oligomer. (b) Schematic representation of ATAD3A\* fragment resulting from mild proteolysis in isotonic buffer plus digitonin. (c) Schematic representation of ΔN-ATAD3A fragment resulting from mild proteolysis in hypotonic swelling condition.

istics of the ATAD3A\* fragment (data not shown). Because deletion of the 50 first amino acids does not interfere with mitochondrial localization of the truncated  $\Delta 50$ -ATAD3A mutants, these residues do not function as a mitochondrial targeting sequence but rather regulate the interaction of ATAD3A with the mitochondrial OM. Further analysis of the Δ50-ATAD3A mutant properties revealed that this truncated mutant behaved as a dominant-negative mutant and induced mitochondrial chain fragmentation, as also observed with the ATP-binding deficient WA mutant. Together, these results suggest that ATAD3A mediates dynamic interactions between the IM and the OM that are regulated by the N terminus and the C terminus AAA ATPase activity. The finding that ATP binding-deficient but not ATP hydrolysis-deficient ATAD3A mutants behave as dominant-negative proteins with respect to mitochondrial function is consistent with a previous study showing that ATP binding is more relevant than ATP hydrolysis for some biological activities of AAA ATPase proteins (37). Given the consensus ring-shaped oligomer conformation conferred by the AAA+ module (29), we propose that the ATAD3A AAA+ domains (amino acids 320 to 586) also associate as ring-shaped oligomers. Two helices (amino acids 268 to 280 and 290 to 310) connect the oligomeric AAA module to the TMS that span the IM (amino acids 244 to 264) and which could potentially organize a porelike structure. The formation of a porelike structure has been proposed as a general mechanism for membrane hexameric AAA+ ATPase (2, 26). The N termini (amino acids 1 to 244) of the ATAD3A complexes are projected into the IMS, where they can transoligomerize in an ATP-bound dependent manner and interact with the OM (Fig. 10). With such a topology, ATAD3A could function both in regulating interactions between the mitochondrial IM an OM and also in mitochondrial import processes. This would explain the high sensitivity of ATAD3A to the hydrophilic cross-linker DTSSP (Fig. 9b). Interactions between the mitochondrial IM and OM control a number of central mitochondrial functions, such as channeling of metabolites, protein transport, coordinated fusion and fission, and mitochondrial DNA inheritance (34). It is thus not surprising that either ATAD3A downregulation or overexpression of ATAD3A dominant-negative mutants promoted diversified cell responses ranging from altered cell growth at the organism and cellular levels (Fig. 5), altered mitochondrial channeling processes (Fig. 6), and mitochondrial fission (Fig. 7 and 8). Two previous studies also reported the interaction of ATAD3A with mitochondrial DNA and possible regulation of mtDNA maintenance (21, 44). Subsequently Bogenhagen group's found that, although both ATAD3A and ATAD3B were present in HeLa cell nucleoid preparation, neither ATAD3 protein was cross-linked with mtDNA in isolated formaldehyde-cross-linked HeLa cell nucleoids, indicating that they are unlikely to bind mtDNA. These researchers concluded that ATAD3A is an example of a protein found in association with nucleoids but not in direct contact with DNA (4). This conclusion is in agreement with our observation that neither the ATAD3A N terminus nor the C terminus localizes with mtDNA (Fig. 8b). It remains nevertheless possible that the ATAD3A C terminus, through interactions with proteins of the IM, contributes to support mtDNA maintenance within nucleoids.

In conclusion, our study has identified for the first time a mitochondrial protein specific to multicellular eukaryotes that connects the mitochondrial inner membrane to the OM. The capacity of ATAD3A to impact on essential mitochondrial functions and organization suggests that this family of proteins possesses unique properties in regulating cellular functions in multicellular organisms.

#### ACKNOWLEDGMENTS

We thank Jonhatan LaMarre (University of Guelph) for critical reading of the manuscript, Didier Grunwald for help with the confocal microscopy, and Nathalie Bertacchi for expert technical assistance. We are grateful to Renald Delanoue, the Bloomington Stock Center, and the Vienna *Drosophila* RNAi Center for the fly strains.

This study was supported by a grant from the Association pour la Recherche sur le Cancer (ARC 4829) (J.B.), the Institut National du Cancer (PL114) (J.B.), and CREST, JST (O.K.).

We have no competing financial interests.

#### REFERENCES

- Babst, M., B. Wendland, E. J. Estepa, and S. D. Emr. 1998. The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function. EMBO J. 17:2982–2993.
- Bieniossek, C., T. Schalch, M. Bumann, M. Meister, R. Meier, and U. Baumann. 2006. The molecular architecture of the metalloprotease FtsH. Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A. 103:3066–3071.
- Bird, I. M., N. A. Hanley, R. A. Word, J. M. Mathis, J. L. McCarthy, J. I. Mason, and W. E. Rainey. 1993. Human NCI-H295 adrenocortical carcinoma cells: a model for angiotensin-II-responsive aldosterone secretion. Endocrinology 133:1555–1561.
- Bogenhagen, D. F., D. Rousseau, and S. Burke. 2008. The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids. J. Biol. Chem. 283:3665–3675.

1996 GILQUIN ET AL. Mol., Cell. Biol.

 Boldogh, I. R., and L. A. Pon. 2007. Mitochondria on the move. Trends Cell Biol. 17:502–510.

- Chen, Y. I., R. E. Moore, H. Y. Ge, M. K. Young, T. D. Lee, and S. W. Stevens. 2007. Proteomic analysis of in vivo-assembled pre-mRNA splicing complexes expands the catalog of participating factors. Nucleic Acids Res. 35:3928– 3944.
- Cherradi, N., M. F. Rossier, M. B. Vallotton, and A. M. Capponi. 1996. Calcium stimulates intramitochondrial cholesterol transfer in bovine adrenal glomerulosa cells. J. Biol. Chem. 271:25971–25975.
- Da Cruz, S., I. Xenarios, J. Langridge, F. Vilbois, P. A. Parone, and J. C. Martinou. 2003. Proteomic analysis of the mouse liver mitochondrial inner membrane. J. Biol. Chem. 278:41566–41571.
- Detmer, S. A., and D. C. Chan. 2007. Functions and dysfunctions of mitochondrial dynamics. Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 8:870–879.
- DeVay, R. M., L. Dominguez-Ramirez, L. L. Lackner, S. Hoppins, H. Stahlberg, and J. Nunnari. 2009. Coassembly of Mgml isoforms requires cardiolipin and mediates mitochondrial inner membrane fusion. J. Cell Biol. 186: 793–803.
- Dietzl, G., D. Chen, F. Schnorrer, K. C. Su, Y. Barinova, M. Fellner, B. Gasser, K. Kinsey, S. Oppel, S. Scheiblauer, A. Couto, V. Marra, K. Keleman, and B. J. Dickson. 2007. A genome-wide transgenic RNAi library for conditional gene inactivation in *Drosophila*. Nature 448:151–156.
- Errico, A., A. Ballabio, and E. I. Rugarli. 2002. Spastin, the protein mutated in autosomal dominant hereditary spastic paraplegia, is involved in microtubule dynamics. Hum. Mol. Genet. 11:153–163.
- Erzberger, J. P., and J. M. Berger. 2006. Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins. Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct. 35:93–114.
- Folsch, H., B. Guiard, W. Neupert, and R. A. Stuart. 1996. Internal targeting signal of the BCS1 protein: a novel mechanism of import into mitochondria. EMBO J. 15:479

  –487.
- Gandre-Babbe, S., and A. M. van der Bliek. 2008. The novel tail-anchored membrane protein Mff controls mitochondrial and peroxisomal fission in mammalian cells. Mol. Biol. Cell 19:2402–2412.
- Geuijen, C. A., N. Bijl, R. C. Smit, F. Cox, M. Throsby, T. J. Visser, M. A. Jongeneelen, A. B. Bakker, A. M. Kruisbeek, J. Goudsmit, and J. de Kruif. 2005. A proteomic approach to tumour target identification using phage display, affinity purification and mass spectrometry. Eur. J. Cancer 41:178–187.
- Grandemange, S., S. Herzig, and J. C. Martinou. 2009. Mitochondrial dynamics and cancer. Semin. Cancer Biol. 19:50–56.
- Griparic, L., N. N. van der Wel, I. J. Orozco, P. J. Peters, and A. M. van der Bliek. 2004. Loss of the intermembrane space protein Mgm1/OPA1 induces swelling and localized constrictions along the lengths of mitochondria. J. Biol. Chem. 279:18792–18798.
- Guertin, D. A., K. V. Guntur, G. W. Bell, C. C. Thoreen, and D. M. Sabatini. 2006. Functional genomics identifies TOR-regulated genes that control growth and division. Curr. Biol. 16:958–970.
- Hackenbrock, C. R., and K. J. Miller. 1975. The distribution of anionic sites on the surfaces of mitochondrial membranes. Visual probing with polycationic ferritin. J. Cell Biol. 65:615–630.
- He, J., C. C. Mao, A. Reyes, H. Sembongi, M. Di Re, C. Granycome, A. B. Clippingdale, I. M. Fearnley, M. Harbour, A. J. Robinson, S. Reichelt, J. N. Spelbrink, J. E. Walker, and I. J. Holt. 2007. The AAA+ protein ATAD3 has displacement loop binding properties and is involved in mitochondrial nucleoid organization. J. Cell Biol. 176:141–146.
- Hoffmann, M., N. Bellance, R. Rossignol, W. J. Koopman, P. H. Willems, E. Mayatepek, O. Bossinger, and F. Distelmaier. 2009. Caenorhabditis elegans ATAD-3 is essential for mitochondrial activity and development. PLoS One 4:e7644.
- Hubstenberger, A., G. Labourdette, J. Baudier, and D. Rousseau. 2008. ATAD 3A and ATAD 3B are distal 1p-located genes differentially expressed in human glioma cell lines and present in vitro anti-oncogenic and chemoresistant properties. Exp. Cell Res. 314:2870–2883.

- Jefcoate, C. 2002. High-flux mitochondrial cholesterol trafficking, a specialized function of the adrenal cortex. J. Clin. Invest. 110:881–890.
- Langer, T. 2000. AAA proteases: cellular machines for degrading membrane proteins. Trends Biochem. Sci. 25:247–251.
- Langer, T., M. Kaser, C. Klanner, and K. Leonhard. 2001. AAA proteases of mitochondria: quality control of membrane proteins and regulatory functions during mitochondrial biogenesis. Biochem. Soc. Trans. 29:431

  –436.
- McBride, H. M., M. Neuspiel, and S. Wasiak. 2006. Mitochondria: more than just a powerhouse. Curr. Biol. 16:R551–R560.
- Mootha, V. K., J. Bunkenborg, J. V. Olsen, M. Hjerrild, J. R. Wisniewski, E. Stahl, M. S. Bolouri, H. N. Ray, S. Sihag, M. Kamal, N. Patterson, E. S. Lander, and M. Mann. 2003. Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria. Cell 115:629

  640.
- Ogura, T., and A. J. Wilkinson. 2001. AAA+ superfamily ATPases: common structure-diverse function. Genes Cells 6:575–597.
- Okamoto, K., and J. M. Shaw. 2005. Mitochondrial morphology and dynamics in yeast and multicellular eukaryotes. Annu. Rev. Genet. 39:503–536.
- Pignoni, F., and S. L. Zipursky. 1997. Induction of *Drosophila* eye development by decapentaplegic. Development 124:271–278.
- Pilling, A. D., D. Horiuchi, C. M. Lively, and W. M. Saxton. 2006. Kinesin-1 and Dynein are the primary motors for fast transport of mitochondria in *Drosophila* motor axons. Mol. Biol. Cell 17:2057–2068.
- Pon, L., T. Moll, D. Vestweber, B. Marshallsay, and G. Schatz. 1989. Protein
  import into mitochondria: ATP-dependent protein translocation activity in a
  submitochondrial fraction enriched in membrane contact sites and specific
  proteins. J. Cell Biol. 109:2603

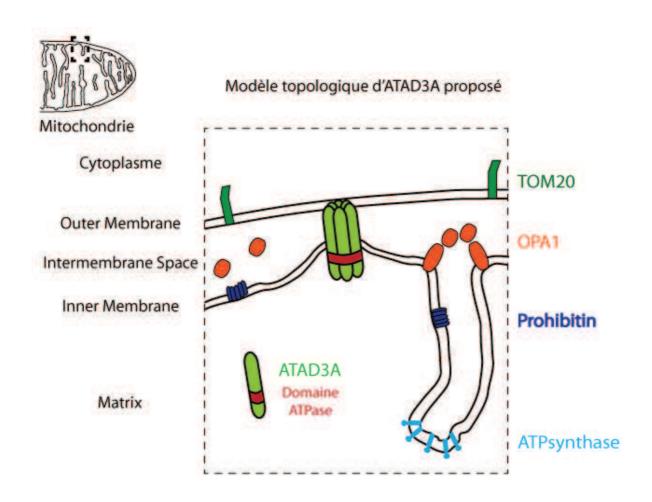
  –2616.
- Reichert, A. S., and W. Neupert. 2002. Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport. Biochim. Biophys. Acta 1592;41

  –49.
- Roll-Mecak, A., and R. D. Vale. 2008. Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin. Nature 451:363–367.
   Rone, M. B., J. Fan, and V. Papadopoulos. 2009. Cholesterol transport in
- Rone, M. B., J. Fan, and V. Papadopoulos. 2009. Cholesterol transport in steroid biosynthesis: role of protein-protein interactions and implications in disease states. Biochim. Biophys. Acta 1791:646–658.
- Rouiller, I., V. M. Butel, M. Latterich, R. A. Milligan, and E. M. Wilson-Kubalek. 2000. A major conformational change in p97 AAA ATPase upon ATP binding. Mol. Cell 6:1485–1490.
- Scott, R. C., O. Schuldiner, and T. P. Neufeld. 2004. Role and regulation of starvation-induced autophagy in the *Drosophila* fat body. Dev. Cell 7:167– 178.
- Shiao, Y. J., B. Balcerzak, and J. E. Vance. 1998. A mitochondrial membrane protein is required for translocation of phosphatidylserine from mitochondria-associated membranes to mitochondria. Biochem. J. 331(Pt. 1):217–223.
- Smirnova, E., L. Griparic, D. L. Shurland, and A. M. van der Bliek. 2001.
   Dynamin-related protein Drp1 is required for mitochondrial division in mammalian cells. Mol. Biol. Cell 12:2245–2256.
- Stan, T., J. Brix, J. Schneider-Mergener, N. Pfanner, W. Neupert, and D. Rapaport. 2003. Mitochondrial protein import: recognition of internal import signals of BCS1 by the TOM complex. Mol. Cell. Biol. 23:2239–2250.
- Thibault, S. T., M. A. Singer, W. Y. Miyazaki, B. Milash, N. A. Dompe, C. M. Singh, R. Buchholz, M. Demsky, R. Fawcett, H. L. Francis-Lang, L. Ryner, L. M. Cheung, A. Chong, C. Erickson, W. W. Fisher, K. Greer, S. R. Hartouni, E. Howie, L. Jakkula, D. Joo, K. Killpack, A. Laufer, J. Mazzotta, R. D. Smith, L. M. Stevens, C. Stuber, L. R. Tan, R. Ventura, A. Woo, I. Zakrajsek, L. Zhao, F. Chen, C. Swimmer, C. Kopczynski, G. Duyk, M. L. Winberg, and J. Margolis. 2004. A complementary transposon tool kit for Drosophila melanogaster using P and piggyBac. Nat. Genet. 36:283–287.
   Thomson, M. 2003. Does cholesterol use the mitochondrial contact site as a
- Thomson, M. 2005. Does cholesterol use the mitochondrial contact site as conduit to the steroidogenic pathway? Bioessays 25:252–258.
- Wang, Y., and D. F. Bogenhagen. 2006. Human mitochondrial DNA nucleoids are linked to protein folding machinery and metabolic enzymes at the mitochondrial inner membrane. J. Biol. Chem. 281:25791–25802.
- Westermann, B. 2008. Molecular machinery of mitochondrial fusion and fission. J. Biol. Chem. 283:13501–13505.

# d. Discussion et résultats complémentaires

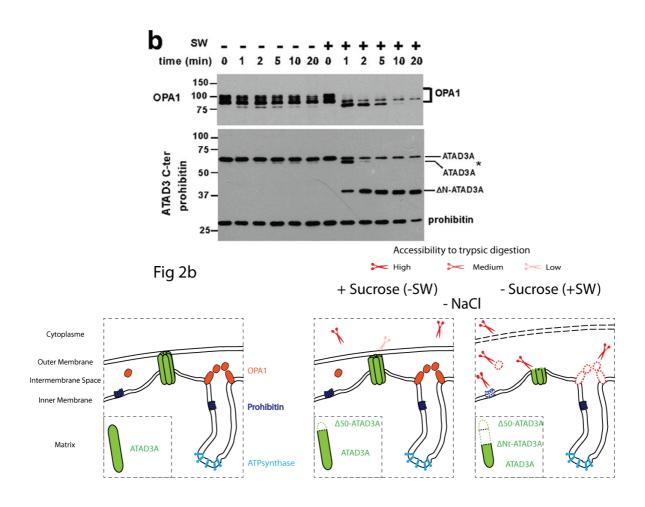
# Étude de la topologie de hATAD3A par digestion trypsique

Les résultats des expériences de digestion trypsique de hATAD3A (Fig. 2.b-h de l'article) sont représentés, ainsi qu'un schéma récapitulatif pour chaque expérience. La localisation des protéines contrôles est représentée dans la partie gauche de chacun des schémas. Voici ci-dessous le modèle topologique de hATAD3A proposé avec la localisation de l'ensemble des protéines de références utilisées. Ce modèle est complété dans la deuxième partie de la thèse qui intègre aussi la discussion sur les études de la topologie et les formes oligomériques de hATAD3A est regroupée avec celle sur hATAD3B.



• Figure 2b : Digestion en présence, ou non, de sucrose, sans NaCl :

En absence de sucrose il y a choc osmotique avec éclatement de la membrane externe (fig 2b). On voit que OPA1 est dégradée uniquement en condition hypotonique et qu'au cours du temps un fragment C-terminale d'ATAD3A résistant à la digestion apparait. A très faible concentration de trypsine, c'est



• Figure 2c : Digestion sans sucrose, sans NaCl avec une faible concentration de trypsine :

A plus faible concentration en trypsine, en condition hypotonique il apparait une bande résistante d'ATAD3A à la digestion reconnue à la fois par l'anticorps N-terminale et C-terminale. Ce fragment correspond à une forme d'ATAD3A ayant perdue les 50 premiers acides aminées (avant l'épitope de l'anticorps N-terminale).

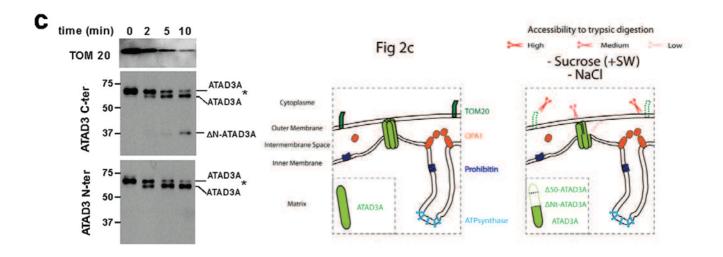
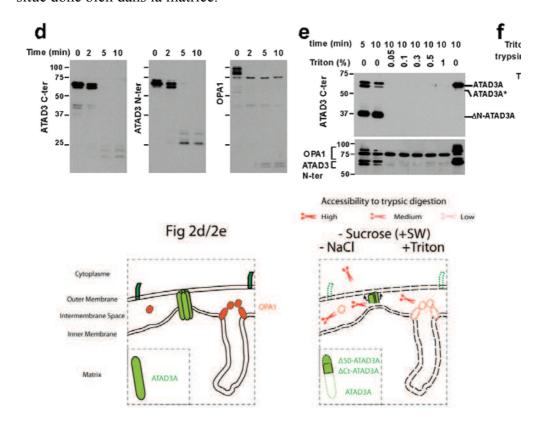
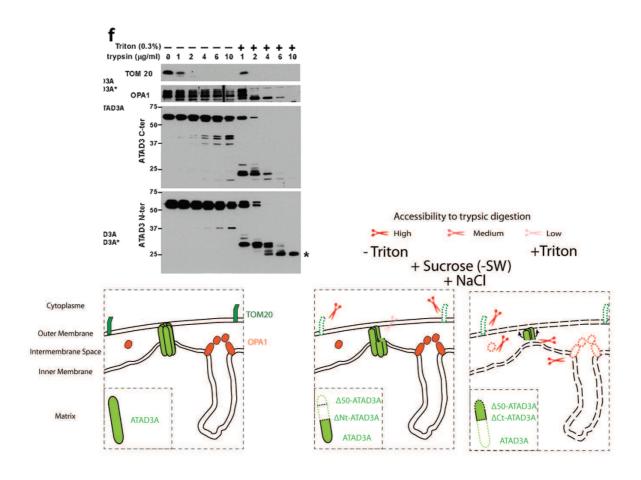


Figure 2d & e : Digestion sans sucrose, sans NaCl et en présence de Triton X-100 : Le détergent Triton X-100 solubilise à la fois la membrane mitochondriale externe et interne. Dans ces conditions et en absence de NaCl, toute la protéine d'ATAD3A (comme le contrôle OPA1) est digérée, même le domaine C-terminale. Ce dernier se situe donc bien dans la matrice.

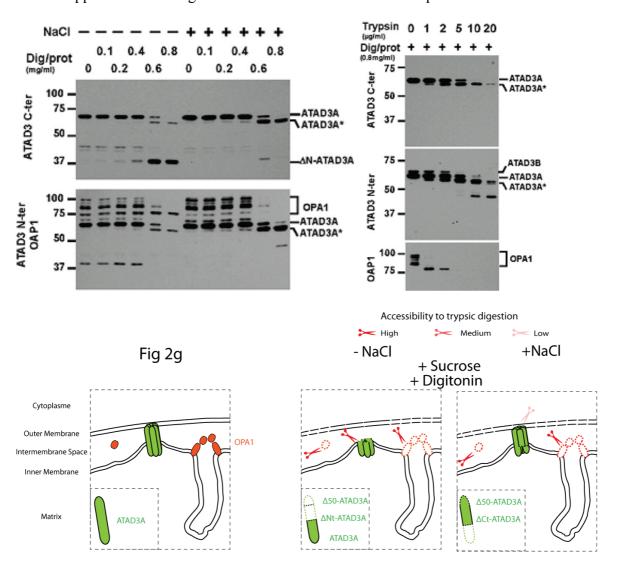


• Figure 2f: Digestion sans sucrose, avec NaCl en présence, ou non, de Triton X-100: En présence de NaCl et de Triton X-100 il apparait temporairement un fragment C-terminale résistant à la digestion et un autre du côté N-terminale, plus résistant à la digestion. Ce résultat met en évidence le caractère hydrophobe de la protéine dont les interactions avec les lipides environnantes peuvent la rendre inaccessible à la digestion.



• Figure 2g/h : Digestion sans sucrose, avec ou sans sel et en présence, ou non, de digitonin :

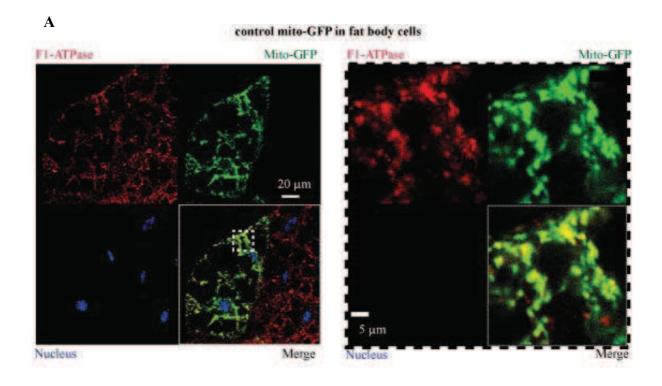
Contrairement au Triton X-100, la digitonine, à faible concentration, ne solubilise que le cholestérol, présent dans la membrane externe mitochondriale. En absence de NaCl on retrouve le fragment résistant du côté C-terminale, mais en présence de NaCl, c'est l'apparition d'un fragment résistant du côté N-terminale qui est observé.



# Étude de dATAD3A chez D. melanogaster:

En diminuant l'expression de dATAD3A, nous avions observé une diminution de la taille de cellules de corps gras de drosophile (Fig.5 de l'article). À l'aide du gène rapporteur mitoGFP, il était aussi apparent que le réseau mitochondrial est pertubé. Ce gène rapporteur code pour une protéine de fusion contenant la préséquence de la sous-unité VIII de la cyotochrome c oxidase couplée à la GFP (Rizzuto, Brini et al. 1995). Le système utilisé permet d'induire l'expression du facteur de transcription GAL4 dans quelques cellules du corps gras, à l'aide du système FLPout (Pignoni and Zipursky 1997; Scott, Schuldiner et al. 2004). GAL4 va reconnaître les UAS (Upstream Activator Sequence) présents en amont du transgène, et, en activer la transcription, dans le cas présent, du siRNA anti-dATAD3A ainsi que du gène rapporteur mitoGFP.

Pour valider l'utilisation du marqueur mitoGFP, j'ai d'abord réalisé une série d'immunomarquages de différentes protéines mitochondriales dans les cellules de corps gras. Comparé aux anticorps anti-HSP60, anti-cytochrome c ou anti-TOM20 testés, l'anticorps anti-F1-ATPase donne le meilleur rapport signal/bruit (résultats non publiés). Dans les cellules exprimant uniquement le gène rapporteur mitoGFP, celle-ci colocalise majoritairement avec l'immunomarquage de la F1-ATPase (Fig 17a). Le réseau mitochondrial des cellules du corps gras de drosophile est plutôt granuleux et possède peu de mitochondries filamentaires.



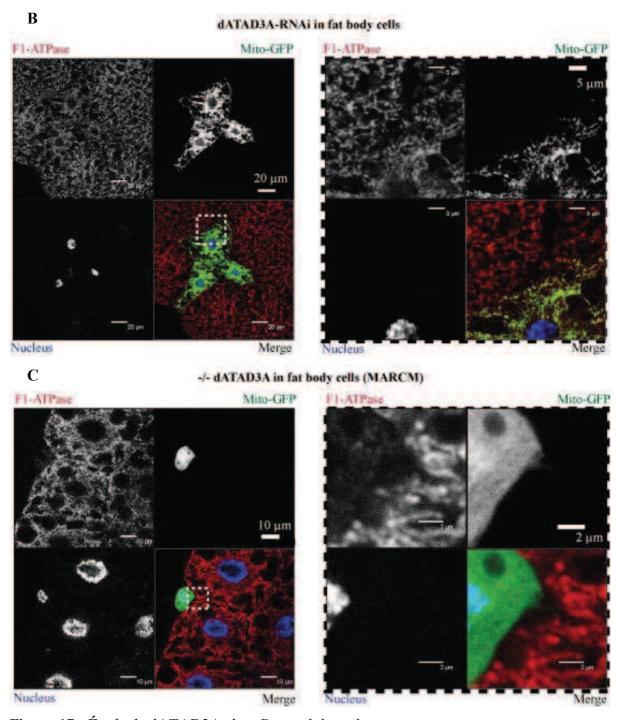


Figure 17 : Étude de dATAD3A chez *Drosophila melanogaster*.

A : La protéine mito-GFP (vert) colocalise avec l'immunomarquage de la sous-unité F1-ATPase (rouge) dans les cellules de corps gras.

B – C : Les effets de l'invalidation par siRNA (B) ou de la suppression de l'expression de dATAD3A (C) sur le réseau mitochondriale de cellules de corps gras sont observés à l'aide du gène rapporteur mito-GFP et de l'immunomarquage de la sous-unité F1-ATPase. L'inhibition de dATAD3A rend le réseau mitochondrial plus fragmenté et l'absence d'expression de la

protéine diminue fortement le nombre de mitochondries détectables. Les génotypes des larves observés sont les suivants :

- SiRNA anti dATAD3A (bor): yw, hsFlP; UAS bor IR/UAS MitoGFP; Flpout/+
- MARCM -/- dATAD3A : cgal4, UAS GFP, FRT82borc/FRT82TubGal80ts

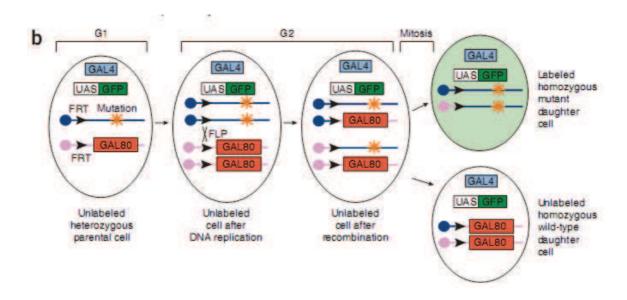
La transcription de l'insert "bor IR" permet la production d'ARN d'interférence anti- ARNM codant pour dATAD3A et la mutation borc correspond à la presence d'un transposon qui inhibe l'éxpression de dATAD3A.

Les cellules exprimant le siRNA anti-dATAD3A présentent un réseau mitochondrial moins développé, avec un marquage ponctué plus réduit et diffus (Fig 17b). Ces cellules exprimant le siRNA sont plus petites que les cellules saines environnantes (Fig 5 de l'article).

Le système FLPout permet d'induire l'expression de SiRNA anti-dATAD3A mais le dosage précis de la quantité restante de la protéine est difficile. En effet, les anticorps anti-Nter et anti-Cter ne reconnaissent pas spécifiquement dATAD3A. Pour éteindre complètement l'expression de dATAD3A, j'ai alors cherché à générer, par recombinaison mitotique, des cellules homozygotes pour une mutation amorphe de dATAD3A. L'insertion du transposon piggyBac en 5'du gène de *datad3a* (mutation *dATAD3A*<sup>c05441</sup>) inhibe complètement la transcription de *datad3a*. Nous avons pu vérifier cela par RT-QPCR réalisée sur des extraits d'ARNm de larves de drosophiles homozygotes pour *dATAD3A*<sup>c05441</sup> (Fig. 19). Pour avoir des cellules homozygotes pour *dATAD3A*<sup>c05441</sup> j'ai alors employé la méthode de MARCM (Mosaic Analysis with a Repressible Cell Marker) sur le modèle de cellules du corps gras (Wu and Luo 2006).

Pour la méthode de MARCM, il est nécessaire de faire subir, aux larves de drosophiles, un choc de température (une heure, 37 °C) au moment de la prolifération des progéniteurs des cellules du corps gras (6h de développement embryonnaire). Dans quelques cellules, ce choc de température va induire l'expression de la flippase flp, grâce au promoteur hs (heatshock). Cette enzyme va alors reconnaître des sites FRT (Flippase Recognition Target) insérés à la base des bras chromosomiques et réaliser une recombinaison entre ces deux sites. Dans le cas présent, la recombinaison a lieu lors de la mitose, entre des sites FRT qui sont en amont de deux éléments : la mutation  $dATAD3A^{c05441}$  et un transgène codant pour la protéine Gal80 (un répresseur de Gal4). On obtient alors deux cellules filles différentes, l'une homozygote pour Gal80, l'autre homozygote pour la mutation  $dATAD3A^{c05441}$ . En absence du répresseur, cette deuxième cellule, invalidée pour dATAD3A, exprime le gène rapporteur mito-GFP, via le système GAL4-UAS. La dissection et l'immunomarquage de la

larve sont réalisés quatre jours après, lorsque celle-ci est au 3<sup>ème</sup> stade larvaire (avant la pupaison) (voir protocole complet en annexe).



**Figure 18 :** Schéma d'explication de la méthode MARCM (Mosaic Analysis with a repressible Cell Marler), (Wu and Luo 2006)

Par croisement entre différentes lignées de drosophiles, les cellules de larves sont hétérozygotes et possèdent un site FRT en amont de Gal80 (inhibiteur de Gal4), et un site FRT en amont du mutant étudié. Suite à un choc de température avant la mitose, l'enzyme flipase est exprimée dans quelques cellules, et va reconnaître et recombiner les sites FRT. Lors de la division, une cellule fille sera homozygote pour Gal80, et l'autre sera homozygote pour la mutation. Sans Gal80, la deuxième cellule fille pourra alors exprimer le gène rapporteur.

À l'instar des cellules de corps gras exprimant le siRNA anti-dATAD3A, les cellules invalidées pour dATAD3A sont beaucoup plus petites que les cellules saines environnantes (Fig. 17). Le marqueur mitoGFP est diffus à travers la cellule invalidée, et l'immunomarquage de la F1-ATPase ne révèle que quelques petits points. D'ailleurs ces particules mitochondriales ne colocalisent pas avec la mitoGFP comme c'est le cas dans les cellules contrôles. Cela peut être dû à un défaut d'importation du mitoGFP ou alors au caractère soluble de la mitoGFP qui pourrait être relargué dans le cytoplasme.

En absence prolongée de dATAD3A, il ne reste donc que quelques mitochondries, ou restes de mitochondries. Les mitochondries inactives, dont l'importation de protéines est

compromise, ne permettent pas à la cellule d'avoir le métabolisme nécessaire pour la croissance cellulaire. Les cellules restent alors avec des petits noyaux et cytoplasmes. De plus, la perte de dATAD3A n'entraîne pas l'apoptose-caspase dépendante dans les cellules de drosophile (marquages capase 3 négatifs, non publiés). Ce résultat est cohérent avec la létalité observée pour les larves homozygotes pour  $dATAD3A^{c05441}$ , qui sont incapables de grandir et survivre sans dATAD3A.

Plusieurs hypothèses peuvent être envisagées pour expliquer le faible nombre de mitochondries en absence de dATAD3A : un défaut dans la biogénèse mitochondriale ou une dégradation plus forte des mitochondries. Cette dégradation (ou recyclage) se fait par mitophagie, avec des autophagosomes qui se forment autour des mitochondries. La formation d'autophagosome peut être suivie grâce au marqueur LC3-GFP qui marque les autophagosomes. Néanmoins, nous n'avons pas pu détecter d'autophagosomes dans les cellules n'exprimant plus dATAD3A (résultats non publiés). La protéine dATAD3A serait donc requise pour le fonctionnement de la biogénèse mitochondriale.

En 2006, *datad3a* a été identifiée comme étant une cible de la voie de signalisation TOR (Target Of Rapamycin) (Guertin, Guntur et al. 2006). Le traitement de cellules S2 de drosophile en culture à la rapamycin, inhibiteur de TOR, induit une forte diminution rapide du niveau d'expression de dATAD3A. La kinase TOR détecte le niveau énergétique de la cellule (carence nutritive) et contrôle l'expression de nombreux gènes impliqués dans la croissance et la prolifération cellulaire. Le gène *dATAD3A* est l'une des rares cibles mitochondriales de TOR mise en évidence par cette étude.

Pour confirmer ce résultat *in vivo* nous avons comparé par RT-QPCR, le niveau d'expression de *datad3a* dans des larves sauvages et des larves mutantes pour TOR. Chez les larves contrôles à 72 heures de développement, on observe un doublement de la quantité d'ARNm codant pour dATAD3A par rapport à 48 heures de développement. Au contraire, en absence de dTOR, il n'y a pas augmentation du niveau d'ARNm de dATAD3A à 72 heures de développement larvaire (Fig. 19). Ce rôle d'effecteur mitochondrial de la voie TOR est en accord avec l'impact de l'inhibition d'ATAD3A (ou de l'expression de mutants dominants négatifs) sur les mitochondries et le réseau mitochondrial, tous deux nécessaires pour la croissance cellulaire.

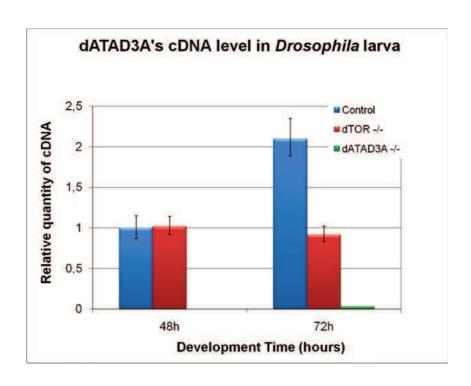


Figure 19 : Quantité d'ARNm codant pour dATAD3A à 48h et 72h de développement larvaire en absence de TOR ou non.

La RT-QPCR est réalisée sur des extraits d'ARNm de larves de drosophiles wildtype (contrôle), dTOR-/- ou dATAD3A-/- à l'aide de primers spécifique pour dATAD3A. En absence de TOR, il n'y a pas élévation de la quantité d'ARNm de dATAD3A à 72 heures de développement larvaire.

L'équipe d'Hoffmann a publié, au cours de cette thèse, un article dans PLoS One décrivant le rôle de c-ATAD3A dans le développement et le fonctionnement mitochondrial, chez *Caenorhabditis elegans* (*C. elegans*) (Hoffmann, Bellance et al. 2009). Chez le nématode, seul le gène *catad3a* est présent, et possède une forte similitude avec l'homologue humain *hatad3a* (>70%). La protéine c-ATAD3A, de 67kDa, est localisée au sein des mitochondries. Son inhibition par siRNA, chez le jeune adulte, semble perturber l'organisation mitochondriale, avec des mitochondries plus fines que dans cellules de nématodes contrôles. Pour autant, la masse mitochondriale, estimée par western blot ciblant NUO-2 (protéine du complexe I), ne varie pas.

Cette perturbation du réseau mitochondrial lors de l'inhibition d'ATAD3A dans les modèles de drosophile et de nématode confirme qu'ATAD3A joue un rôle vital dans l'équilibre métabolique de l'organisme. Avec la forte homologie que possède dATAD3A avec hATAD3A il est probable que les deux protéines conservent les mêmes fonctions mitochondriales.

# II. <u>hATAD3B</u>, marqueur mitochondriale de pluripotence qui est réexprimé dans les cellules cancéreuses

Dans les premières études sur les protéines de la famille ATAD3, certaines expériences dites « spécifiques » étaient réalisées sur des domaines communs à hATAD3A et hATAD3B (Rasin, Gazula et al. 2007). Jusqu'au début de ma thèse, cette deuxième protéine était considérée comme étant spécifique à l'homme et surexprimée dans des carcinomes de la tête et du cou (Gires, Münz et al. 2004). Deux formes de hATAD3B ont été rapportées, l'une de 648 acides aminés l'autre de 606 acides aminés, mais nous n'avons pu observer que la forme la plus longue lors de nos expériences (Schaffrik, Mack et al. 2006). Il est probable que la forme courte de hATAD3B (du côté N-terminal) ne soit exprimée que dans des conditions bien particulières (cancers de la tête et du cou).

Lors de l'étude de la topologie de hATAD3A par digestion trypsique, l'utilisation d'un anticorps reconnaissant à la fois hATAD3A et hATAD3B nous a permis d'obtenir des premiers résultats sur la topologie de hATAD3B (côté N-terminal). Néanmoins, hATAD3B est caractérisé par un domaine C-terminal supplémentaire de 62 acides aminés hautement hydrophobes, dont la fonction et la localisation étaient inconnues.

La deuxième partie de mon projet de thèse s'est donc focalisée sur l'étude de hATAD3B. Cette protéine est spécifique aux hominidés et exprimée dans les cellules pluripotentes humaines (hESC et hiPs) ainsi que dans certaines cellules cancéreuses. Les extraits de lignées et de biopsies testés ont été fournies, respectivement, par Olivier Féraud de l'unité U935-Plateforme cellules souches à Paris et par la banque NeuroBioTec de Lyon via une collaboration avec Jérome Honnnorat. Les résultats obtenues suggèrent que hATAD3B s'incorpore dans les oligomères de hATAD3A mais qu'elle agirait comme le mutant dominant négatif hATAD3A-WalkerA, en influant le réseau mitochondrial.

Les résultats obtenus sont ici présentés sous forme d'article, non publié. Cet article sera complété par des travaux sur hATAD3B dans un modèle de cellule souche embryonnaire, issus d'une collaboration en cours avec Olivier Feraud avec Anne-Lise Bennaceur-Griscelli (U935-Plateforme cellules souches-Institut André Lwoff Villejuif). La discussion sera en français.

# a. Introduction

Les mitochondries sont des organelles dynamiques qui changent de taille, forme et de distribution intracellulaire en fonction des besoins de la cellule (Campello and Scorrano 2010). Ces paramètres sont intimement liés et contrôle des fonctions mitochondriales comme la respiration aérobique, le métabolisme stéroidique, l'homéostasie calcique, la croissance et la différentiation cellulaire. Une régulation fine de l'intégrité, de la dynamique et des fonctions mitochondriales est essentiel pour l'homéostasie dans toutes les cellules, y compris les cellules souches. Des études récentes ont mis en évidence le rôle essentiel des mitochondries dans le contrôle du caractère « souche » des cellules souches embryonnaires, hESC. Dans les hESC, les mitochondries sont fragmentées et regroupées autour du noyau. L'ADN mitochondriale est peu repliqué et en faible quantité (Lonergan, Bavister et al. 2007). Pour répondre aux besoins en énergie, les cellules utilisent le métabolisme anaérobique. Il est considéré qu'une diminution en métabolisme mitochondriale protège les cellules des dommeages mitochondriaux. Alors que les cellules souches embryonnaires perdent leurs pluripotence et se différencient, l'expression de facteurs de transcription et de replication de l'ADN mitochondriales et le nombre de copie d'ADNmt par cellules augmente (St John, Ramalho-Santos et al. 2005). De plus, le réseau mitochondrial est re organisé, passant d'une répartition peri nucléaire fragmentée à une morphologie plus alongée. Il y a aussi une augmentation du métabolisme aérobique. Un métabolisme mitochondriale réduit et une forte glycolyse même en présence d'oxygène (effet Warburg) est aussi une charactéristique des cellules cancéreuses (Hsu and Sabatini 2008). Il est donc probable que les cellules souches et les cellules cancéreuses partagent des méchanismes communs de régultation de l'homéostasie mitochondriale et du métabolisme. Dans ce papier nous décrivons la protéine mitochondriale ATAD3B dont l'expression est spécifique des cellules souches embryonnaires hymaines et qui est re-exprimée dans certaines cellules cancéreuses, dans des tumeurs du cerveau et des adénocarcinomes pulmonaires.

ATAD3B appartient à la famille des ATPase AAA+ ATAD3 de protéines mitochondriales spécifiques aux eukaryotes multicellulaires. Au sein du génome humain, les gènes *hatad3a* et *hatad3b* dont situés en tandem à l'extrémité du chromosome 1p36.33. Il est probable que le gène *hatad3b* est issus de la duplication du gène *hatad3a*. La vaste majorité des gènes dupliqués sont supprimés ou mutés en pseudogènes et ne sont conservés que s'ils

apportent un avantage sélectif à l'organisme. Il est donc probable que la protéine ATAD3B possède des fonctions supplémentaires par rapport à la protéine ATAD3A parentale. Un travail extensif de la topologie et la fonction mitochondriale de hATAD3A démontre cette protéine contrôle les intéractions dynamiques entre la membrane externe et la membrane interne mitochondriale, le métabolisme mitochondriale, la croissance cellulaire et le développement de l'organisme (He, Mao et al. 2007; Gilquin, Taillebourg et al. 2010). Nous montrons ici que dans les cellules souches embryonnaires et les cellules cancéreuses, hATAD3B est un inhibiteur des fonctions hATAD3A. Nos résultats fournissent des informations essentielles sur les changements des mitochondries durant la différentiation mitochondriale.

# b. Résultats

#### atad3b est une protéine mitochondriale spécifique aux hominidae

Le gène atad3b est spécifique aux espèces appartenant à la famille des hominidae qui inclus les chimpanzés, les gorilles et les orang outans, et provient de la duplication de atad3a (Fig. 1a). Dans chaque espèce des grands singes étudiées, les gènes atad3a et atad3b sont en tandem sur le premier chromosome. Il existe deux séquences alternatives d'ADNc codant pour hATAD3A dans les banques de données, Q9NV17-2/ATAD3A et le variant Q9NV17/ATAD3A-2 qui contient un exon supplémentaire. Pour l'instant, seul le transcrit codant pour Q9NV17-2/ATAD3A a été retrouvé comme étant exprimé dans les lignées cellulaires humaines (S1). L'exon supplémentaire de hATAD3A-2 est présent uniquement dans *oatad3b* (orang-outan) et absent des autres *atad3b*. L'orang-outan est le membre le plus distant de la famille des hominidae qui partagent un ancêtre commun éteint il y a 12-16 millions d'années. Il est probable que le gene oatad3b a continue à évoluer, avec la deletion du 3ème éxon, dans la forme humaine, de gorille et de chimpanzee de atad3b (g-,c- et hatad3b). Tous les genes atad3b partagent une mutation commune dans l'équivalent du codon stop d'atad3a ce qui entraîne un domaine C-terminale supplémentaire. Ce domaine Cterminale est une sequence de 62 acides aminées hautement hydrophobes et enrichis avec des residues cystéiques (Fig. 1b). D'autres espèces du règne animal sont décrites comme contenant des genes dit "atad3b" ou "ATPase family, AAA domain containing 3B" dans les banques de données génomiques. Pour autant, les gènes de ces espèces (zebrafish, poulet) seraient plutôt des genes de type atad3a car ils n'ont pas le domaine C-terminale supplémentaire spécifiques aux genes *atad3b*.Quatres anticorps spécifiques ont été mis au point pour reconnaitre le domaine N-terminale conserve de hATAD3A et ATAD3B (N-ter), le domaine C-terminale d'ATAD3A (C-ter) et le domaine supplémentaire C-terminale d'ATAD3B (pAb425; GP-3B) (Fig. 1b). La spécificité de l'anticorps pAb425 a été confirmé par analyse des westerns-blots sur les extraits cellulaires d'H1299 exprimant des formes endogènes et tagués myc de hATAD3A et ATAD3B (Fig. 1c).

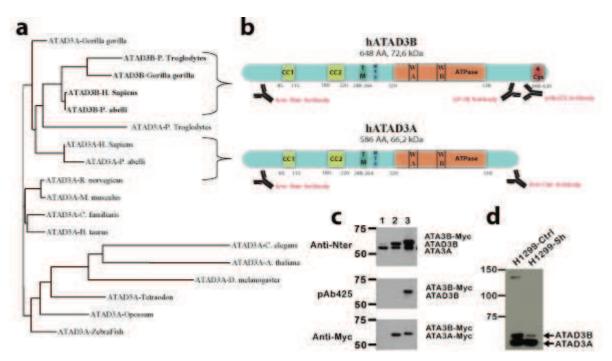


Figure 1: Arbre phylogénétique de *atad3a* et atad3b (a) avec les proteins correspondantes ATAD3A et ATAD3B (b) reconnues par les anticorps spécifiques (c et d).

a: Les groupes suivantes d'espéces ont été étudiées: gorille (*Gorilla gorilla*), chimpanzée (*Pan troglodytes*), Humain (*Homo sapiens*), Orang-outan (*Pongo abelli*), rat (*Rattus norvegicus*), souris (*Mus musculus*), chien (*Canis lupus familiaris*), vache (*Bos taurus*), nématode (*Caenorhabditis elegans*), plante ici Arabidopsis (*Arabidopsis thaliana*), mouche à vinaigre (*Drosophila melanogaster*), poisson (*Tetraodon nigroviridis*), et un marsupial ici l'opossum (*Monodelphis domestica*). L'arbre phylogénétique a été généré à l'aide du programme ClustalW2. b: Les domaines d'intérêts de hATAD3A et hATAD3B sont ici présentés: coil-coil (CC1 & CC2), transmembranaire (TM), ATPase avec les motifs WalkerA (WA) et WalkerB (WB). c: Extraits de H1299 exprimant ATAD3A-Myc (1) ou ATAD3B-Myc (2) ou un vecteur vide (3) sont immunoblotés avec les anticorps anti-Nter pAb425 (specifique à ATAD3B) et anti-Myc. d: Extraits de lignée H1299 stable exrpimant un shRNA anti-ATAD3B ont été immunoblotté avec un anticorps anti-Nter.

#### hATAD3B est une protéine spécifique des cellules souches embryonnaires pluripotentes.

Dans les conditions physiologiques, hATAD3B est présente dans les tissues embryonnaires humaines mais pas dans les tissues différenciées (Hubstenberger, Labourdette et al. 2008). Pour confirmer l'expression de hATAD3B dans les cellules embryonnaires humaines nous avons employés la lignée de cellule souche embryonnaire H9. hATAD3B est

hATAD3B est présent dans les cellules H9 cultivées dans un milieu prolifératif et est rapidement sous régulée lorsque les cellules sont incubées dans un milieu de differentiation (Fig. 2a). L'évolution de l'expression de hATAD3B est semblable à celui du facteur de transcription spécifique des cellules souche Oct-4, et à l'opposé du marqueur de cellules souches mésenchymateuse, la vimentine. Les westerns blots d'extraits cellulaires de cellules mesenchymateuse hMSC dérivées de la lignée cellulaire H9 confirme que hATAD3B n'est pas exprimé dans ces cellules multipotentes. De plus, hATAD3B est re-exprimé dans les cellules souches pluripotentes induuites (hIps) obtenu par la reprogrammation de cellules épithéliales (Fig. 2b). Pris ensemble, ces résultats montrent que hATAD3B est une protéine spécifique des cellules souches embryonnaires et un potentiel biomarqueur associé à la pluripotence.

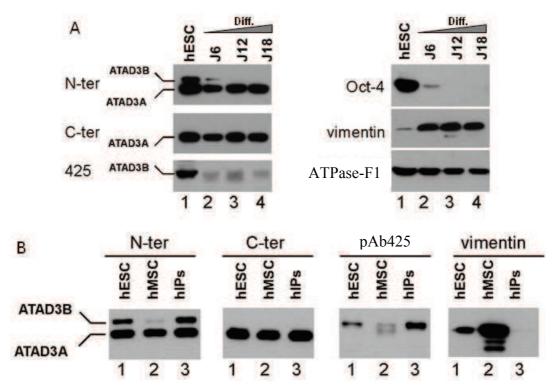


Figure 2: hATAD3B est exprimé dans les cellules pluripotentes.

A: L'analyse en western blot de hESC maintenues dans un milieu prolifératif (1) ou dans un milieu de différentiation durant 6 jours (2), 12 jours (3) ou 18 jours (4) avec les anticorps anti-

ATAD3, N-ter, C-ter et 425, et spécifique des hESC anti OCT-4, des cellules souches mésenchymateuse anti vimentine, et spécifique des mitochondrie, l'anti ATPsyntase F1. **B**: Analyse en western blot de hESC (1), hESC induit à différentier (hMSC, 2), et dans les cellules souches pluripotentes induites (hIps, 3) avec les anticorps anti-ATAD3 N-ter, C-ter et 425 rabbit.

#### hATAD3B est re-exprimé dans les cellules cancéreuses.

Pour confirmer que hATAD3B est un marqueur de glioblastome comme précédement décrit, nous avons étudié l'expression de hATAD3A et hATAD3B dans plusiquers biopsies de gliomes (Fig. 3a). Les résultats confirment que hATAD3B est marqueur positif des glioblastomes, avec un niveau d'expression variable.

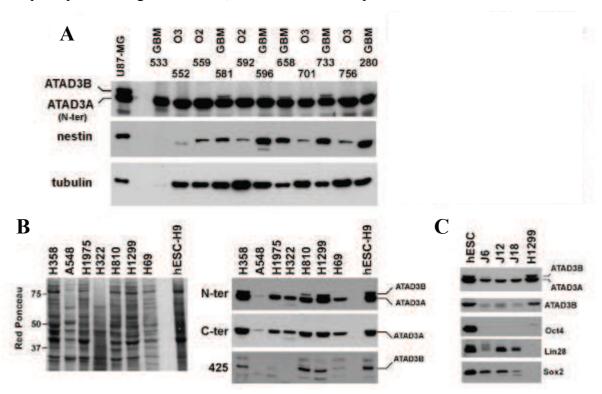


Figure 3: L'expression de hATAD3B dans les biopsies de gliomes, les lignées cellulaires et les adénocarcinomes

**A:** L'analyse en western blot de biopsies de gliomes humaines. Les tumeurs ont été obtenues de la Neurobiotec Bank (CHU-Lyon). GBM indique glioblastome et OLIGO indique oligodendrogliome. La lignée cellulaire U87-MG est utilisé comme contrôle.

**B:** Extrait total cellulaire de 5 adénocarcinome de poumon (H358, H548,H1975,H322,H1299), 1 carcinome neuroendocrine à grande cellule(H810), 1 carcinome à petite cellule (H69) et les cellules souches humaine (hESC-H9) analysé en western blot avec les anticorps ATAD3: N-ter, C-ter et 425.

C: Analyse en western blot de hESC (1), hESC induit à différentier (hMSC, 2), et dans les cellules souches pluripotentes induites (hIps, 3) avec les anticorps anti-ATAD3 N-ter, C-ter et 425 rabbit.

Pour comprendre l'expression de hATAD3B dans les cellules cancéreuses, nous avons testés d'autre lignées derives d'un adénocarcinome de poumon (Fig. 3b). L'expression de hATAD3B n'est pas concomittant avec l'expression des marqueurs de cellules souches Oct-4, Lin28 et Sox2. La protéine hATAD3B n'est donc pas directement un marqueur de cellule de souche.

#### hATAD3B est incorporés dans les oligomères d'ATAD3A.

Les résultats de fractionnement cellulaires et de solubilité différentielle ont montrés que hATAD3A se comporte comme une protéine mitochondriale transmembranaire (Gilquin, Taillebourg et al. 2010). Un premier modèle de topologie de hATAD3A déduit de digestions trypsiques a été publié récemment. Pour connaître la topologie de hATAD3B, nous avons d'abord approfondi les études d'accessibilité des domaines n-terminaux de hATAD3A et de hATAD3B à la digestion trypsique dans différents tampons en comparant à des protéines membranaire mitochondriale (contrôles). Dans un tampon isotonique, les deux domaines Nterminaux de hATAD3A et hATAD3B sont protégés (Gilquin, Taillebourg et al. 2010). Dans un tampon hypotonique, sans sucrose et en absence de sel, le taux de digestion du domaine Nterminale de hATAD3A et de hATAD3B est comparable à celui de OPA1, une protéine de l'espace intermembranaire de la membrane interne, mais bien plus rapide que celui de la prohibitine, une protéine des crêtes mitochondriaes (fig. 4a). Nous avons ensuite comparé la protéolyse de hATAD3B et hATAD3A de mitochondrie traités à la digitonine. La digitonine est un détergent qui, à faible concentration, solubilise le cholestérol et rend la membrane externe poreuse. Aux zones de contactes entre la membrane externe et interne, le taux de cholestérol est faible et la membrane externe est partiellement protégé de la perméabilisation de la digitonine (Gotow, Shibata et al. 2000). En présence de 0,8mg/mL de digitonine/protéine et en absence de sel, le taux de protéolyse des domaines N-terminaux de hATAD3B et hATAD3A est bien plus faible que celui de OPA1 (Fig 4b). Des résultats ont été obtenus en présence de sel. Seul le domaine N-terminale extrême de 40 acides aminées en amont de l'épitope « N-ter » ont été dégéré par la protéase, générant ainsi le fragment hATAD3B\*. Nous avons conclus que le domaine Nterminale de hATAD3B localise bien dans le même environnement que hATAD3A.

Nous avons ensuite compare l'accessibilité à la trypsine du domaine Cterminale de hATAD3A et hATAD3B en utilisant des forms tagués Myc au niveau de ce domaine. Les résultats mettent évidence que les deux mutants tagués Myc on leur domaine C-terminale

partiellement protégé de la digestion en condition hypotonique, en absence de sucrose et de sel (Fig. 4a). Nous en concluons que hATAD3A et hATAD3B ont la même localisation submitochondriale, une conclusion qui est consistente avec la conservation de tous les domaines fonctionnelles de hATAD3A au sein de hATAD3AB (Fig. 1).

En utilisant le cross-linker hydrophobique DSP, et avec la prohibitine entant que protéine contrôle (S2) nous observons que hATAD3B et hATAD3A s'associent entant qu'oligomères (Fig. 4c). Les complexes cross-linkés montrent les même profils de migration éléctrophorétique suggérant que hATAD3A et hATAD3B sont incorporés dans les mêmes hétéro-oligomères.

Les expériences de co-immunoprécipitations confirment que hATAD3B est capable d'étero oligomérizés avec hATAD3A (Fig. 4d). La protéine hATAD3B endogène co-immunoprécipite avec hATAD3A. Comme contrôle, nous avons utilisé une lignée stable d'H1299 exprimant un shRNA ciblant spécifiquement hATAD3B (H1299-Sh). L'inhibition de l'expression de hATAD3B diminue avec la quantité de hATAD3B isolés dans l'immunoprécipitat de hATAD3A. La protéine chaperone HSP60 semble interagir spécifiquement avec hATAD3A, car peu de la protéine était détectable dans les immunoprécipitats de hATAD3B. A partir des résultats d'expériences de digestion trypsique, cross-linking et de co-immunoprécipitation nous proposons un modèle pour les hétéro-oligomères de hATAD3A et hATAD3B.

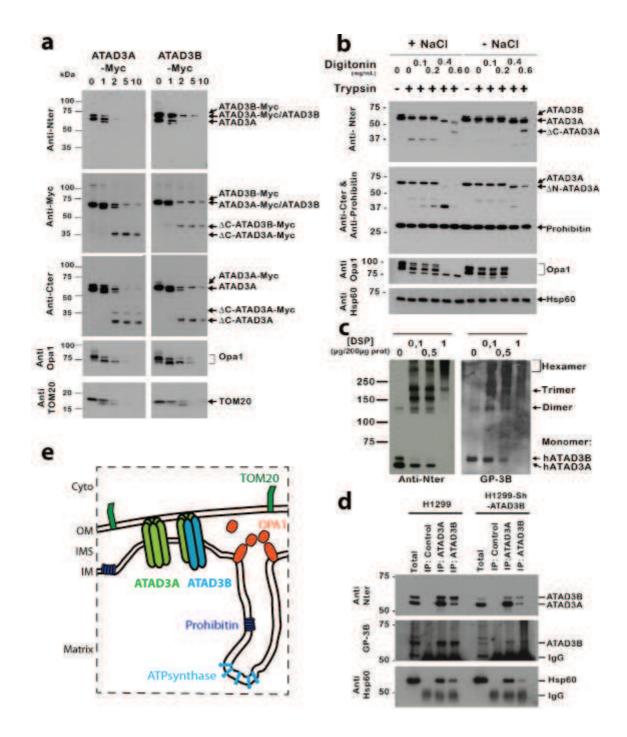


Figure 4: Etudes de la topologie et intéraction de hATAD3A et hATAD3B par digestion trypsique, cross-linking et immunoprecipitation.

A-B: Echantillons digérés ont été analysés par western blot avec des anticorps anti-TOM20, recepteur de la membrane externe, anti-OPA1, une protéine de l'espace intermembranaire, et les protéines de la membrane interne anti-Prohibitine et anti-F1. A: Mitochondria extrait de H1299 transfecté avec hATAD3A-Myc ou hATAD3B-Myc ont été resuspendues dans un tampon hypotonique et digéré jusqu'à 10 minutes.

B: Mitochondria extrait de H1299 transfecté avec hATAD3A-Myc ou hATAD3B-Myc ont été resuspendues dans un tampon isotonique en présence ou non de NaCl. Digestion réalisé en présent d'un gradient de digitonine (0-0,6 mg/mL). C: Expériences de cross-linking ont été réalisé avec le gradient du cross-linker hydrophobique, DSP.

D: Immunoprécipitation de AHNAK (control, non exprimé), hATAD3A ou hATAD3B a été réalisé sur des extraits de H1299 ou de la lignée H1299 stable exprimant un shRNA anti-hATAD3B.

#### L'expression de hATAD3B modifie le réseau mitochondriale dans les cellules H1299.

Pour étudier la fonction mitochondriale de hATAD3B, nous avons utilizes un RNAi spécifique du gène dans les cellules H1299. Ce siRNA cible une séquence en 3' de l'ARNm de hATAD3B mais ne diminue pas le niveau de hATAD3A. L'inhibition de l'expression de hATAD3B ne semble diminuer la viabilité cellulaire ni même la respiration cellulaire. La spécificité du marquage C-terminale de hATAD3B est confirmé par la perte de signale dans les H1299-Sh (Fig.5b) ou dans les cellules H1299 exprimant des SiRNA anti-hATAD3B (resultants non montrés). Les cellules qui possèdent moins de hATAD3B sont caractérisé par un réseau mitochondrial plus filamentaire, suggérant ainsi que l'expression de hATAD3B a un impact sur la forme du réseau mitochondrial.

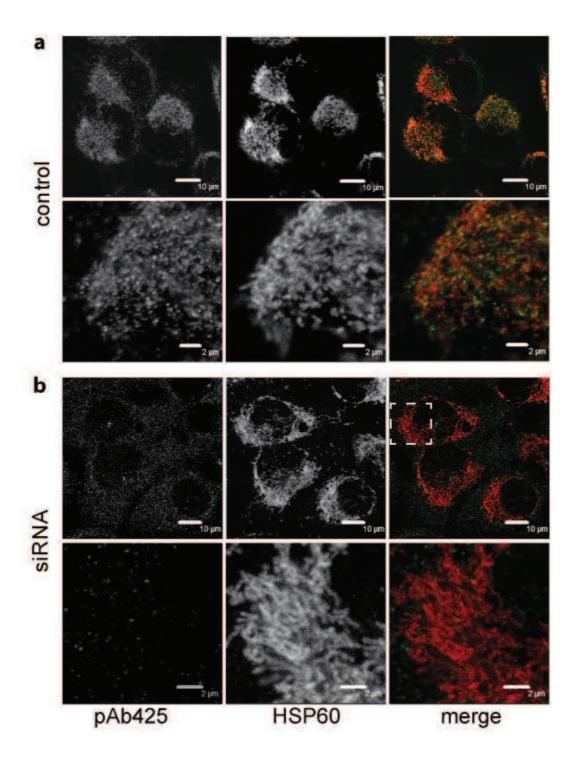


Figure 5: L'expression de hATAD3B change le réseau mitochondrial de cellules en culture.

A: Les cellules H1299 exprimant hATAD3A et hATAD3B endogène sont doublement immunomarqués avec les anticorps anti-hATAD3B (pAb425, vert) et anti-HSP60 (rouge) a basse (top, bar =10  $\mu$ m) ou haute (bottom, bar= 2 $\mu$ m) résolution.

B: Lignée H1299 exprimant le shRNA anti-hATAD3B est immunomarqué comme décrit en A

#### hATAD3B se comporte comme un dominant-négatif de hATAD3A.

Pour confirmer le role de hATAD3B sur la forme du réseau mitochondriale nous avons utilisé les cellules NIH-3T3 qui n'exprime la protéine endogène. Nous avons transfectés de manière stable les cellules avec des plasmides codants pour des formes tagés myc de hATAD3A et hATAD3B (Fig. 1c). Après deux semaines de sélection, les protéines humaines étaient exprimées à des niveaux similaires. Néanmoins, les cellules exprimant hATAD3B-myc montraient un réseau mitochondrial plus fragmenté (Fig. 6a). Ce phénotype de fragmentation mitochondrial spécifique à hATAD3B-myc par rapport à hATAD3A-myc est similaire à celui obtenu par le mutant WA de hATAD3A (Fig. 6b).

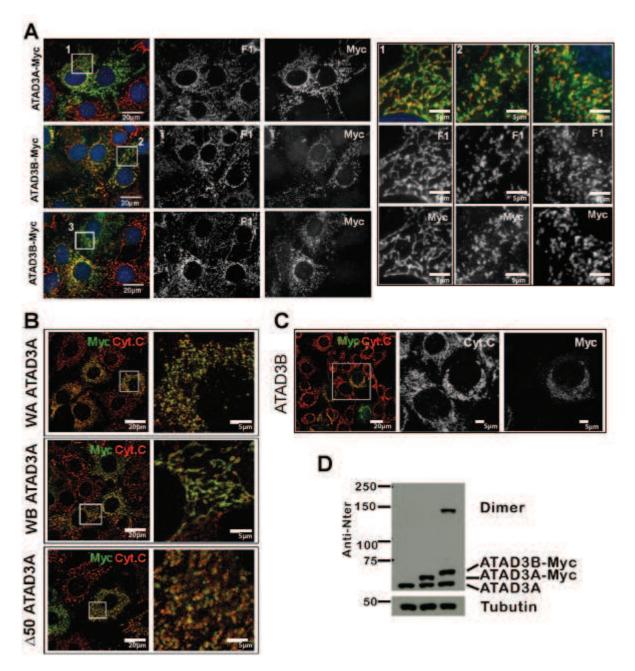


Figure 6: hATAD3B se comporte comme un dominant négatif de hATAD3A sur le réseau mitochondrial de 3T3.

A: Stable 3T3-NIH cells expressing endogenous hATAD3A and either hATAD3A- Myc or hATAD3B-Myc (after a 2 week selection), is double immunostained with anti-F1-ATPase antibody (red) and anti-Myc antibody (green) at low (left, bar =20  $\mu$ m) or high (right, bar = 5  $\mu$ m) magnification.

B: 3T3-NIH cells are transiently transfected with hATAD3A-WalkerA-Myc, hATAD3A-WalkerB-Myc or Delta50-hATAD3A-Myc plasmids and are double immunostained with anticytochrome c antibody (red) and anti-Myc antibody (green) at low (left, bar =  $20 \mu m$ ) or high (right, bar=  $5 \mu m$ ) magnification.

C: 3T3-NIH cells are transiently transfected with hATAD3B-Myc plasmid are double immunostained with anti-cytochrome c antibody (red) and anti-Myc antibody (green) at low (merge, left, bar =  $20 \mu m$ ) or high (right, bar=  $5 \mu m$ ) magnification.

D: Western blot on stable 3T3-NIH cells expressing endogenous hATAD3A (first lane) and either hATAD3A- Myc (second lane) or hATAD3B-Myc (third lane) and immunobloted with anti-Nter (recognizing both hATAD3A and hATAD3B forms) and anti-Tubutlin antibodies.

# hATAD3B et le mutant WA de hATAD3A montrent des changements de conformations similaires au niveau du domaine C-terminale.

Dans une étude précédente nous avons montrés que des changements de conformation du domaine C-terminale chez le mutant WA de hATAD3A favorisait l'oxidation des cystéines Cys515 et Cys570 et la formation de dimères covalents. Il n'y a pas d'autres cystéines de présent dans la protéine hATAD3A. La protéine hATAD3B pouvant aussi former des dimères covalants (Fig. 1d, Fig. 6d), nous avons cherché à comparer la réactivité spécifique des cystéines conservés chez hATAD3A, chez les mutants WA et WB de hATAD3A et la protéine hATAD3B. Comme contrôle nous avons utilisé un mutant de hATAD3B dont les quatre cystéines supplémentaires contenus dans le domaine C-terminale supplémentaire sont mutées pour méthionines. La lignée stable H1299 infectées avec des adénovirus contrôle ou Sh anti hATAD3B ont été transfectés avec les plasmides individuelles hATAD3. La formation covalente de dimères ont été analysé avec l'anticorps anti-N terminale (Fig. 7). Les résultats montrent que seul les mutants WA de hATAD3A, hATAD3B ou le mutant Cys de hATAD3B sont capables de former des dimères covalents. Cela suggère que les changements de conformations caractérise le mutant WA de hATAD3A et hATAD3B au sein de leur domaine C-terminaux. Ces changements de conformation peuvent faciliter l'oxidation des cystèines conserves Cys515 et Cys570 ou inhiber la reduction de ponts disulfiques entre les deux cystéines.

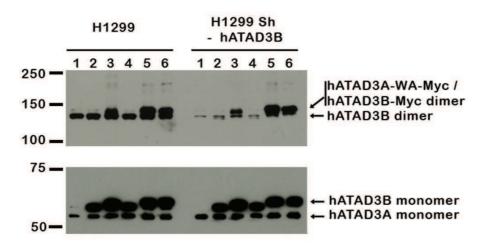


Figure 7: hATAD3B et hATAD3A-WA forme des dimères

Extraits de H1299 exprimer hATAD3A-Myc (2), hATAD3A-WA-Myc (3), hATAD3A-WB-Myc (4), hATAD3B-Myc (5), hATAD3B-4Cys-Myc (6) ou de contrôle (1) ont été immunobloted avec des anti-Nter anticorps. H1299 exprimant de façon stable anti-hATAD3B shRNA a été utilisé comme contrôle (à droite). Le transfert a été surexposé pour révéler les bandes dimère (en haut).

#### **Materials and Methods**

#### **Anticorps**

Affinity-purified polyclonal antibodies to hATAD3B were raised in rabbit, pAb425 against the ETLTSWSLAT peptide, or in guinea-pig, GP-3B, against the TGLCPGPLSPRMSCGGGRPF peptide. The other commercial and created antibodies are described here (Gilquin, Taillebourg et al. 2010).

#### **Tumeurs et cellules humaines**

The human NSCL carcinoma cell line H1299 (CRL-5803) was a donation from Sylvie Gazzeri (E. Brambilla team, IAB, Grenoble). 3T3-NIH cells were purchased from the American Type Cell Cuture Collection. Both cell lines were maintained in Dulbecco modified Eagle Medium (DMEM-Glutamax), supplemented with 10% fetal calf serum, 100 U of penicillin/mL and 100 µg of streptomycin/mL. Tumor samples were obtained from the Neurobiotec Banques (Biological Resources Center of Hospices Civils de Lyon) thanks to a collaboration with J. Honnorat. Pluripotent cell lines(H9, hiPs) were obtained from the Stem-Cell plateform (INSERM U8935, Villejuif, France).

#### Préparation mitochondriale:

Cells grown in 100mm plates were resuspended in 1mL of buffer containing 0.28M sucrose, 1mM EDTA and 10mM Tris-HCl (pH 7.4). Cell suspension was homogenized with 20 passages through a G22 needle. The homogenate was centrifuged at 1,200g for 10 min. The supernatant was subsequently centrifuged at 12,000g for 15min. The pellet contained mitochondria and mitochondrion-associated membranes.

#### Immunoprécipitation:

Total cell lysated in 1mL of immunoprecipitation buffer (50mM Tris pH 8.0, 150mM NaCl, 0,3% Triton X-100, 4mM EGTA and protease inhibitor cocktail) were incubated with anti-Cter (ATAD3A) or pAb425 (ATAD3B) polyclonal antibody, together with protein G-Sepharose (Pharmacia) for 3h of rotation at 4°C. The immunoprecipitates were washed three times in incubation buffer and transferred to a new Eppendorf tube, and the beads were boiled in 1x Laemmli with 20mM DTT. Proteins were separated by SDS-PAGE and analyzed by Western blotting.

#### Expériences de cross-linking:

For cross-linking experiments, mitochondria were extracted from cell culture, and prepared in buffer containing 0.28M sucrose, 1mM EDTA and 20mM HEPES (pH 7.4). Crude mitochondria were incubated at 37°C in the presence of 0- 1  $\mu$ g/( $\mu$ g of protein) of hydrophobic cross-linker DSP. Cross-linking was stopped by the addition of SDS loading buffer without reducing agents. The proteins were resolved on by SDS-PAGE on 7.5% or 12% acrylamide gels.

#### Digestion mitochondriale trypsique:

Mitochondrial pellets were resuspended in either isotonic buffer containing 0.28M sucrose in 20mM HEPES (pH 7.5) or in hypotonic buffer containing 20mM HEPES (pH 7.5), in the absence of presence of 120mM NaCl. Mitochondrial preparations (2mg/mL), were incubated with various amounts of trypsin for various amounts of time at 37°C. For combined trypsin digestion with detergents, Triton X-100 (10 % solution) or digitonin (5mg/mL solution) were added and incubated for 5 min with the mitochondrial preparation prior to trypsin. Digestion was stopped by the addition of a trypsin inhibitor (Pefabloc) and SDS loading buffer containing 4 mM EGTA and 20mM dithiothreitol (DTT), and remaining activate tryptic was heat-deactivated at 95°C for 5min.

#### **Immunocytochimie:**

For immunocytochemical analysis, cells were plated on poly-L-Lysine-coated glass coverslips. H1299 cells were fixed either with methanol (5 min) or 4 % paraformaldehyde in phosphate-buffered saline (PBS) and permeabilized with 0.2 % Triton X-100 for 10 min, washed in Tris-Buffered saline (TBS) and blocked in TBS containing 5 % goat serum for 30 min. After incubation with primary antibodies in goat serum-TBS overnight at 4°C, the cells were washed in TBS and stained with secondary antibodies. Image were obtained with a Leica TCS SP2 confocal microscope. Hoechst, Alexa 488 and cyanine3 were exited and collected at specific wavelengths.

#### Infection par adenovirus et mutant hATAD3B-4cys

Recombinant lentivirus particles expressing GFP or GFP – shRNA anti-hATAD3B were obtained from AMSBIO. A total of4 104cells were plated on polylysine-coated glass coverslips theday prior to infection. Cells were incubated with 15 multiplicity of infection (MOI) viral particles diluted in minimal volume of growth medium for 4 h, then completed with fresh medium, and placed in an incubator overnight. The next day, cells were washed and incubated in fresh medium.

The anti-hATAD3B shRNA targets the sequence : GAGCUGGUGUGUUUAUCUA in UTR 3'mRNA coding for hATAD3B.

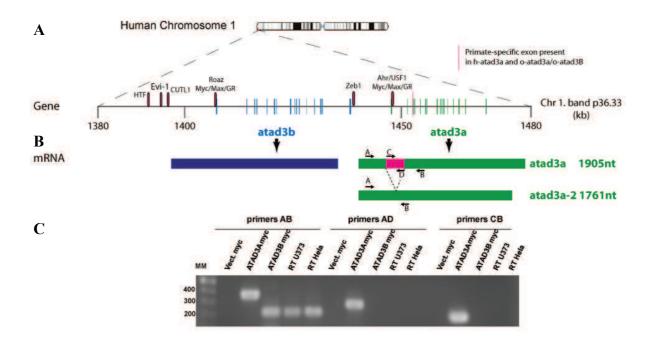
The plasmid containing the sequence for hATAD3B-4Cys in which the four cysteines at the 606, 611, 616 and 624 AA positions were replaced by methionines, was obtained by Eurofins

Medigenomix DmbH. ATAD3A's WalkerA and WalkerB mutants were used as described ((Gilquin, Taillebourg et al. 2010)

#### **Transféctions**

cDNA and siRNA transfections were performed using Lipofectamine 2000 (Invitrogen) according to the manufacterers's protocols in Opti-MEM culture medium.

### c. Données supplémentaires :



# S1 : Représentation schématique de la position des exons de *hatad3a* et *hatad3b* sur le chromosome 1 et les transcripts mRNA par RT-PCR sur *hatad3a*.

A: hatad3a et hatad3b sont situés sur le chromosome 1p36.33. atad3b vraisemblablement née de atad3aduplication. Hypothétique des séquences amplificatrices de liaison sont ici affichés avec leur position relative: Ahr(prolifération cellulaire et la différenciation chez les vertébrés en développement), CUTL1 (régulation du cyclecellulaire), Evi-1 (conservé rôle de développement dans l'embryogenèse), HTF (facteur activateur de la transcription des protéines-2), GR (récepteur glucocorticoïde), Roaz (protéine commutateur dans la coordinationde la différenciation des neurones olfactifs sensoriels). Ces séquences enhancer de liaison ont été dynamité sur la séquence 1p36.33 segment génomique. B: Le serveur de biologie moléculaire a révélé deux ExPASy épissage alternatif transcriptions humaines dérivées du gène Atad3A: Q9NVI7/ATAD3A-

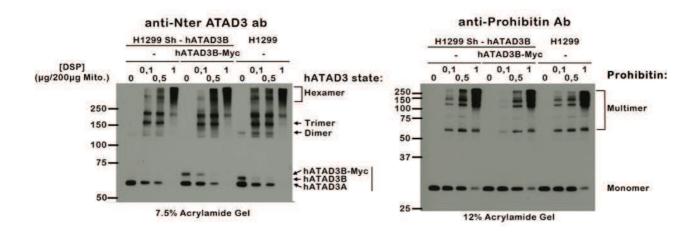
2 (Longueur: 634 AA) et la variante Q9NVI7-

2/ATAD3A (Longueur: 586 AA).Représentation schématique de hATAD3A et hATAD3A-2 transcriptions sont ici affichées. Les amorces utiliséessont localisées dans le rouge et le produit de PCR est représentée par les flèches noires.

C: Caractérisation des hATAD3 transcriptions en U373 humains et des cellules HeLa par RT-PCR a révélé que seulement Q9NVI7-2 (hATAD3A) ARNm est exprimé dans ces deux lignées cellulaires. L'identification des transcriptions en U373 et les cellules HeLa sont déterminés par RT-PCR suivie d'une séparationélectrophorétique des produits. 100 ng d'ADNc pleine vecteurs marqués myc des hATAD3B ou hATAD3A sontutilisés comme témoins positifs. La PCR sur le plasmide seul pcDNA myc est le contrôle négatif. Les réactions d'amplification comprenait 25 cycles de 20 s à 95 ° C, 20 s à 62 ° C et 20 s à 72 ° C. Le hATAD3A ethATAD3A-2 amorces spécifiques:A : CCAAGGACAAATGGAGCAAC,

**B**: GCTCAGGGTCTTCCTCCTCT,

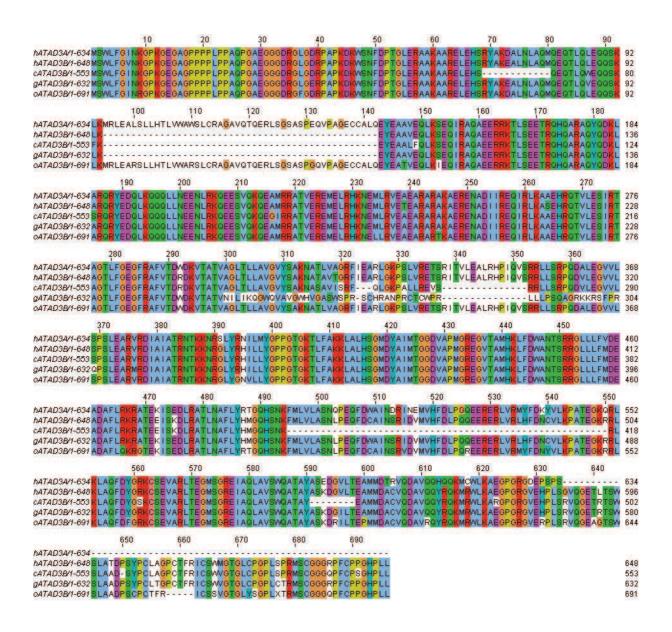
C: GGAAGCCCTGAGCCTGCT, D: GCAGAGCACAGCACTCACC



#### S2: hATAD3B n'inhibe pas l'oligomérisation de hATAD3A's.

Extraits cross-linkés de H1299, H1299 exprimer anti-hATAD3B siRNA (H1299-SH) et H1299-Sh exprimer hATAD3B-Myc ont été immunobloted utilisant des anticorps anti-Nter anticorps, en utilisant prohibitine comme contrôle. DSP, un cross-linker hydrophobe a été utilisé dans cette expérience.

S3: Comparaison des sequences d'amino-acide de ATAD3A humain (hATAD3A) et ATAD3B (hATAD3B), chimpanzée (c-ATAD3B), gorille (hATAD3B), orang-outan (o-ATAD3B).



Specie	Genus	Protein reference (Ensembl/Refseq)	# AA	Genus genome sequencing year
Human	Homo sapiens	ENST00000308647	648	2003
Chimpanzee	Pan troglodytes	ENSPTRG00000000031	553	2004 (in progress)
Gorilla	Gorilla gorilla	ENSGGOG00000004411	646	2008 (in progress, gorGor3)
Orang-utan	Pongo abelli	XP_002811654.1	691	2011 (in progress)

#### d. Discussion

#### ATAD3B hominidés

Le gène *atad3b* avait été précédemment décrit comme étant un paralogue d'*atad3a* spécifique à l'homme (Hubstenberger, Labourdette et al. 2008). Grâce aux séquençages récents des génomes d'autres espèces de grands singes, Hominidae, nous avons pu identifier le gène *atad3b* comme étant présent chez l'orang-outan, le gorille, le chimpanzé et l'homme (Fig. S3). Dans toutes ces espèces, *atad3b* est hautement conservé et positionné, en tandem avec *atad3a*, à l'extrémité du chromosome 1. Le gène d'*atad3b* se distingue principalement par une mutation ponctuelle sur le codon stop du dernier exon d'*atad3a*. La séquence en 3'du codon stop d'*hatad3a* est proche de la séquence supplémentaire intégrée au dernier exon d'*hatad3b*. Cette mutation permet donc la transcription puis la traduction de 62 acides aminés supplémentaires qui sont hautement conservés entre les espèces.

De plus, le gène *hatad3a* se distingue *d'hatad3b* car il possède un troisième exon supplémentaire, mais qui ne serait pas conservé lors de la transcription (résultats S1). Seul l'*oatad3b* de l'orang-outan a conservé intact ce troisième exon (tout comme *oatad3a*). Si, par épissage alternatif, cet exon est conservé lors de la transcription, il coderait pour un domaine coil-coil supplémentaire de 48 acides aminés (simulation Expasy) entre les acides aminés 94 et 143, et qui pourrait apporter des fonctions supplémentaires à la protéine. Nos expériences de RT-PCR sur des extraits de lignées U373 et HeLa n'ont pas détecté la présence d'un ARNm codant pour la forme longue de hATAD3A, QNV17/ATAD3A-2. Il est envisageable que le troisième exon serait un reliquat d'une forme ancestrale d'ATAD3A. Le gène *atad3b* aurait été dupliqué à partir d'*atad3a* il y a 12-16 millions d'années, date estimée du dernier ancêtre commun avec l'orang-outan (Locke, Hillier et al. 2011).

# • hATAD3B est spécifiquement exprimée par des cellules embryonnaires humaines et ré-exprimée par des cellules cancéreuses.

Lors de l'étude de l'expression de hATAD3A dans des lignées humaines à l'aide de l'anticorps anti-Nter (qui reconnaît aussi hATAD3B), la protéine hATAD3B avait été identifiée comme étant exprimée dans des cellules embryonnaires humaines (Hubstenberger, Labourdette et al. 2008). Dans les tissus de cellules différenciées hATAD3B est peu ou pas

exprimée. Pour confirmer et étudier ce profil d'expression, j'ai analysé des extraits de la lignée embryonnaire humaine, H9, fournis par la plateforme cellules souches de l'Institut André Lwoff (Villejuif, France). Cette lignée, dérivée d'un embryon humain, est l'un des modèles de cellules souches embryonnaires les plus utilisés en ce moment.

Dans des conditions prolifératives, la lignée H9 exprime un fort taux de hATAD3B, qui chute rapidement dès lors que la lignée H9 est mise à différencier (rajout de sérum). À l'instar d'Oct4, un marqueur de pluripotence, il ne reste que peu de hATAD3B après 6 jours de différentiation. Au contraire, dans les cellules reprogrammées hiPs, hATAD3B est de nouveau exprimée. La protéine hATAD3B serait alors, dans un cadre sain, un marqueur mitochondrial de pluripotence humaine.

Dans la même publication de 2008, la protéine hATAD3B avait été identifiée comme étant exprimée dans des lignées dérivées de glioblastomes, mais pas dans les lignées d'oligodendrogliomes (Hubstenberger, Labourdette et al. 2008). Avec l'étude de biopsies des deux types de tumeurs, nous confirmons ici que hATAD3B permet de discriminer les glioblastomes des oligodendrogliomes. Des résultats en RT-QPCR sur les biopsies de tumeurs d'oligodendrogliomes, obtenues au laboratoire, suggèrent qu'il y a transcription du gène hatad3b mais que celui-ci n'est pas traduit (non publiés). Il y aurait alors une régulation différentielle de la traduction d'ATAD3A par rapport à ATAD3B. Cette analyse devra être élargie à d'autres lignées, notamment celles de cellules souches embryonnaires, pour pouvoir déterminer les conditions et mécanismes régulant la traduction d'ATAD3A et ATAD3B.

Chez la drosophile, la voie TOR a été montrée comme régulant le niveau d'ARNm d'ATAD3A, mais il faudra déterminer si c'est aussi le cas pour hATAD3B chez l'homme. L'étude des effecteurs ATAD3A et ATAD3B pourra aider à compléter la compréhension du rôle que joue la voie TOR, dans le maintien et la différentiation des cellules souches, qui est, à ce jour, fragmentée (Russel, Fang et al. 2011). Il est important de déterminer les facteurs de transcription communs et spécifiques activés lors de l'expression du gène *atad3a* et *atad3b* (S1 a). L'étude de ces facteurs permettra peut-être de découvrir des nouvelles voies de régulation mises en place dans les cellules souches ou au cours de leurs différentiations.

Dans certaines lignées dérivées d'adénocarcinomes de poumons, hATAD3B est exprimée, fortement dans le cas d'H1299, mais sans qu'il y ait corrélation avec une expression d'Oct-4, Lin28 ou Sox2. Les lignées H1299 ou issues de glioblastomes ont été décrites comme étant des sources de cellules souches cancéreuses (Leung, Fiscus et al. 2010; Bonavia, Inda et al. 2011; Liu, Chen et al. 2011). Selon le modèle hiérarchique, ces cellules posséderaient la capacité de s'auto-répliquer et seraient la source de l'hétérogénéité des

cellules cancéreuses qui composent la tumeur. L'existence et les caractéristiques de ces CSCs font l'objet de nombreux débats, mais il est néanmoins envisageable que hATAD3B soit un marqueur de pluripotence qui est réexprimé dans ces cellules souches cancéreuses. Des études rigoureuses et complémentaires seront nécessaires pour tester cette hypothèse. En effet, certains protocoles « classiques » d'isolation de CSC ne semblent pas être adaptés à certaines lignées (Broadley, Hunn et al. 2011).

Les gènes codant pour hATAD3A et hATAD3B possèdent une localisation chromosomique bien particulière. Situés sur le bras court 1p36.33, les deux gènes sont côte à côte et très proches des télomères. Les télomères sont des complexes nucléoprotéiques situés aux bouts des chromosomes. Elles préservent l'intégrité du chromosome et inhibent les mutations de l'ADN liées à p53. À chaque division cellulaire, les télomères sont raccourcies jusqu'à atteindre une longueur limite. La protéine p53 est alors activée et la cellule rentre en sénescence. Dans les cellules souches, les hIps et la quasi-totalité des cellules cancéreuses, la télomèrase, enzyme responsable de l'élongation des télomères, est activé, les rendant ainsi immortels (Huang, Wang et al. 2011).

La télomèrase est composée d'une sous-unité protéique TERT (TElomerase Reverse Transcriptase) et d'une sous-unité ribonucléique TERC (TElomerase RNA Component). En absence d'une de ces sous-unités, il y a activation de p53 qui va se lier et inhiber PGC-1alpha (Peroxisome proliferator-activated receptor gamma coactivator 1-alpha) et PGC-1beta (Sahin, Colla et al. 2011). Ces deux protéines sont des co-activateurs transcriptionels qui régulent l'expression de gènes impliqués dans le métabolisme et la biogénèse mitochondriale. En absence de télomères, il y a donc inhibition de la biogénèse et des fonctions mitochondriales. De plus, il a été montré qu'en cas de stress oxydatif, hTERT est relocalisé au sein de la matrice mitochondriale (Ahmed, Passos et al. 2008). Le mécanisme exact est encore inconnu, mais lorsqu'elle est surexprimée, la télomèrase protège l'ADNmt contre les ROS, en diminuant leurs productions sans que le métabolisme oxydatif soit impacté (Gordon and Santos 2010). Cette interaction entre les télomères et les mitochondries est à double sens car les cellules possédant un fort taux de ROS et des mitochondries dysfonctionnels possèdent des télomères plus courts (Passos, Saretzki et al. 2007).

Les télomères structurent les terminaisons chromosomiques en systèmes compacts qui peuvent inhiber la transcription de gènes proches des télomères (Kulkarni, Zschenker et al. 2010). Cet effet, appelé TPE (Telomere Position Effect) affecte les gènes à moins de 100 kb des télomères. Or, les gènes hATAD3A et hATAD3B sont situés à 1400-1500 kb de l'extrémité du bras court du chromosome 1 humain. La protéine hATAD3B est exprimée dans

les cellules possédant de longs télomères, mais cela semblerait plus être un concours de circonstances. Pour confirmer cette hypothèse, on pourra étudier l'influence de l'expression de siRNA anti-hTERT dans des cellules, à longues télomères, sur le niveau d'expression de hATAD3B.

#### • Topologie de hATAD3A et de hATAD3B

Afin de déterminer la localisation de la protéine, des immunodétections par microscopie électronique avaient été réalisées à l'aide de l'anticorps C-terminal qui avait été développé au laboratoire. Malheureusement, le marquage n'a pas été suffisamment fort et spécifique pour conclure à une localisation particulière. Pour avoir une meilleure compréhension de la localisation de hATAD3A puis de hATAD3B, j'ai donc réalisé des études de topologie par digestion trypsique avec les mêmes anticorps et, comme repère, des protéines dont la localisation avait été étudiée au préalable.

La protéine TOM20 est une protéine transmembranaire de la membrane externe mitochondriale, découverte en 1989 et étudiée par microscopie électronique (Sollner, Griffiths et al. 1989). Plus récemment, des études ont mis en évidence une répartition particulière et sophistiqué de TOM20 au sein des complexes TOM, et plus globalement au sein du réseau mitochondrial (Sollner, Griffiths et al. 1989; Model, Meisinger et al. 2008). Contrairement à TOM20, la sous-unité F1 du complexe V (ATPsynthase) est rattachée à la membrane interne au plus profond des crêtes, et orientée au sein de la matrice. Cette enzyme, capable d'utiliser le gradient de proton pour générer de l'ATP à partir d'ADP (ou inversement), est l'une des protéines mitochondriales les plus étudiées à ce jour (Surridge 1997; Okazaki and Takada 2011; Uchihashi, Iino et al. 2011).

Afin d'avoir une meilleure précision de la topologie de hATAD3A/hATAD3B, deux autres protéines contrôles ont été incluses dans les expériences: Prohibitin et OPA1. Prohibitin (PHB1) est une protéine qui va former des hétérodimères avec la prohibitin 2. Ce complexe circulaire de 20-25nm est ancré à la surface de la membrane interne par le domaine N-terminal des protéines (Back, Sanz et al. 2002; Tatsuta, Model et al. 2005). Le diamètre des jonctions des crêtes mitochondriales étant proche de 10-40nm, il a été proposé que les prohibitines servent de structure au sommet des crêtes, mais aucune donnée expérimentale n'a encore pu valider cette hypothèse (Nicastro, Frangakis et al. 2000; Sun, Williams et al. 2007; Osman, Merkwirth et al. 2009; Rabl, Soubannier et al. 2009). En absence d'études

complémentaires, la prohibitin est donc représentée dans notre modèle comme un complexe situé à différents endroits de la membrane interne.

Néanmoins, il a été proposé que la prohibitin puisse servir d'échafaudage aux lipides et aux protéines, permettant notamment la maturation d'OPA1. En microscopie électronique, la protéine OPA1 a été détectée dans l'espace inter-membranaire, et proche des crêtes (Olichon, Emorine et al. 2002). Grâce à un épissage alternatif et à une maturation par clivage de la partie transmembranaire, il existe plusieurs isoformes d'OPA1 au sein de la mitochondrie. Comme il a été précédemment décrit, il est nécessaire d'être en forte concentration de détergents pour dégrader la forme longue, ancrée à la membrane interne. Cette accessibilité est sensible à la concentration en sels (NaCl). Nous avons observé qu'en présence de sels, OPA1 est plus rapidement digérée par la trypsine que hATAD3A. Dans le reste des résultats que nous avons obtenus, hATAD3A et OPA1 possèdent des profils de digestion proches.

De la topologie de la protéine hATAD3B, possédant un domaine C-terminal supplémentaire par rapport à hATAD3A, seul le domaine N-terminal commun a été étudié lors de la première partie de la thèse. Cette extension C-terminale possède des acides aminés plutôt hydrophobes, qui, selon l'outil d'analyse informatique ProtScale (Expasy), pourraient former un domaine transmembranaire.

Pour tester cette hypothèse, j'ai poursuivi les expériences de topologie par digestion trypsique, avec des formes fusionnées de hATAD3A et hATAD3B à l'épitope myc en Cterminal. Pour pouvoir les utiliser dans cette étude, j'ai d'abord mis au point la détection en western blot de cette épitope, ainsi que d'un épitope interne, spécifique à hATAD3B. En effet, pour des extraits transférés sur membrane de nitrocellulose et en absence de tween, des anticorps monoclonaux anti-myc reconnaissent moins l'épitope de hATAD3B-Myc que hATAD3A-Myc, à même concentration protéique (contrôlé avec l'anticorps anti-N-terminal). Cette sensibilité de la détection au détergent est la même pour l'épitope interne de hATAD3B. Le remplacement de la membrane de nitrocellulose par une membrane PVDF (Polyfluorure de vinylidène) réduit partiellement la sensibilité de la détection au tween. Les protéines transférées se lient à la membrane par des interactions hydrophobes et les membranes PVDF, de par leur nature, sont plus hydrophobes que la nitrocellulose (Park, Mabuchi et al. 2009). À la surface des membranes de western blot, il est probable que le domaine de hATAD3B, contrairement à celui de hATAD3A, reste dans une conformation partiellement repliée, qui masque les épitopes internes et myc. Pour éviter cela, les analyses en western blot présentées ici ont été réalisées en présence de détergent (Tween).

Pour connaître la localisation du domaine C-terminal hydrophobe de hATAD3B, j'ai réalisé une série de digestions trypsiques, en variant la pression osmotique et les concentrations en sels. Comme montré dans le deuxième article, lorsque la digestion est réalisée en condition osmotique et en absence de sel, pour hATAD3A et hATAD3B, il reste un fragment C-terminal protégé au sein de la matrice. Le domaine C-terminal de hATAD3B est dans un environnement proche de celui de hATAD3A et ne re-traverserait alors pas la membrane interne.

#### • Les complexes hATAD3A-hATAD3B

Les ATPAses AAA + forment des hexamères fonctionnels où des éléments d'une sous-unité complètent la poche de liaison à l'ATP de la sous-unité adjacente. Pour étudier les formes oligomériques de hATAD3A, nous avons réalisé des expériences de « cross-linking » sur des extraits mitochondriaux. Cette technique consiste à relier, par des ponts chimiques, des polymères physiquement proches à l'aide de petites molécules de longueurs variables. La nature du cross-linker permet de cibler les liaisons covalentes contre différents groupes fonctionnels (carboxyle, sulfhydryle, hydroxyle, etc). Dans le cas des amines primaires, présententes dans la lysine (formaldéhydes) ou en N-terminal d'un peptide, le cross-linking peut se faire à l'aide du cross-linker hydrophile, DTSSP (dithiobis [sulfosuccinimidyl propionate]), ou son équivalent hydrophobe, DSP (dithiobis [succinimidylpropionate]). Le DTSSP de part sa nature hydrophile, ne peut pas traverser les membranes, mais à concentration suffisante, il a été rapporté que le DTSSP peut agir dans l'espace intermembranaire aux zones proches des protéines d'imports (Knudten, Thelen et al. 1994).

Dans le premier article de cette thèse, nous avons publié des résultats obtenus qui montrent que hATAD3A peut former des oligomères hexamériques avec le DTSSP. Dans les mêmes conditions, la prohibitin, protéine de la membrane interne, ne forme pas de complexes. Ce résultat confirme le fractionnement submitochondrial qui suggère que hATAD3A est bien présente aux zones de contacts entre la membrane interne et externe, et que le domaine N-terminal est très proche de la membrane externe.

Dans le cas du mutant WalkerA de hATAD3A (358K/E), qui ne peut pas hydrolyser l'ATP, ce dernier est moins sensible au DTSSP. Il forme des hétéro-oligomères qui n'incluent pas le hATAD3A endogène (bande unique de trimères homo-oligomères d'ATAD3A-WAmyc). Néanmoins, avec le DSP (cross-linker membrane permissif), nous avons observé une bande correspondant à des hétero-oligomères de hATAD3A, avec hATAD3A-WA-Myc qui

migre au-dessus de la bande des complexes endogènes de hATAD3A (résultats non publiés). Le mutant WalkerA possède donc un domaine N-terminal moins proche de la membrane externe. De plus, le mutant WalkerA est enrichi dans les fractions submitochondriales lourdes de la membrane interne, contrairement au mutant WalkerB (Fig 9.b). Cette différence d'interaction avec la membrane externe pourrait expliquer l'effet dominant négatif sur les interactions de hATAD3A entre les deux membranes, et son impact sur le réseau mitochondrial. Ces résultats de cross-linking et de fractionnement mettent aussi en évidence l'influence structurelle ou fonctionnelle du domaine ATPase, situé dans la matrice, sur d'autres domaines de la protéine.

Après avoir résolu la topologie de hATAD3B par digestion trypsique, nous avons cherché à déterminer si, comme hATAD3A, cette protéine formait des homo-oligomères ou des hétéro-oligomères. Pour cela, j'ai employé le cross-linker DSP, qui peut traverser les deux membranes mitochondriales, pour ainsi réaliser des ponts chimiques du côté C-terminal de hATAD3A et hATAD3B. Comme constaté sur la figure 4c, l'anticorps spécifique de hATAD3B reconnait des bandes correspondant à des homo- et hétéro-oligomères de hATAD3B avec hATAD3A. La protéine hATAD3B partage avec le mutant hATAD3A-WA une moindre sensibilité au DTSSP, mais nous n'avons pas observé d'homo-oligomères de hATAD3B non reconnus par l'anticorps anti-Cter (spécifique de hATAD3A, résultats non publiés).

La protéine hATAD3B possédant une partie C-terminale supplémentaire hydrophobe, j'ai cherché à savoir si ce domaine pouvait influencer, par inhibition ou stabilisation, les complexes oligomériques de hATAD3A. Pour cela, les expériences de crosslinking de la deuxième figure supplémentaire ont été réalisées sur des extraits d'H1299, exprimant hATAD3A et hATAD3B endogènes, ainsi que sur des extraits d'H1299-Sh (exprimant peu hATAD3B, voir plus loin), exprimant ou non hATAD3B-Myc. Dans ces trois conditions, les profils des bandes d'ATAD3A-ATAD3B sont similaires. La présence de hATAD3B n'aurait alors pas d'influence sur l'oligomérisation de hATAD3A.

Pour confirmer la capacité de hATAD3B à interagir avec hATAD3A, j'ai réalisé des immunoprécipitations contre les deux protéines sur des extraits d'H1299, avec comme contrôle des extraits d'H1299-Sh. En western blot, dans les immunoprécipitats anti-ATAD3A (anti-Cter), il y a un enrichissement de hATAD3B, et vice-versa avec les immunoprécipitats anti-ATAD3B (pAb425). Dans les extraits H1299-Sh, le niveau de hATAD3B détecté par les anticorps N-ter ou GP-3B est diminué. La diminution de l'expression de hATAD3B n'étant

pas totale, de faibles bandes de hATAD3B avec hATAD3A co-immunoprécipités sont détectables.

L'ensemble des données de topologies, de cross-linking et de coimmunoprécipitation nous amène à proposer la coexistence, dans les cellules humaines, d'homo-oligomères de hATAD3A et d'hétéro-oligomères de hATAD3A et hATAD3B (Fig. 7e).

#### • Dimères de hATAD3B et du mutant hATAD3A-WalkerA

Lors de l'expression de hATAD3B (ou hATAD3B-Myc) ou du mutant WalkerA de hATAD3A, nous avons remarqué qu'en western blot une bande correspondant aux dimères de chacune des protéines apparaissait. La protéine hATAD3B formerait des homo-dimères car la bande n'est pas, ou peu, reconnue par l'anticorps anti-Cter. Ces dimères sont résistants aux conditions dénaturantes d'un western blot SDS-PAGE, pour lequel les extraits protéiques sont incubés avec le détergent SDS et chauffés à 95 °C durant 5 minutes. Néanmoins, les dimères sont sensibles à la présence, en concentration suffisante, de composés sulfhydryl comme le Beta-mercaptoéthanol ou le DTT (dithiothréitol). Ces agents permettent de réduire les ponts disulfures entre protéines, pour ne conserver que les formes monomériques de ces dernières. Ces ponts disulfures sont des liaisons covalentes entre groupements thiols oxydés de cystéines. Elles permettent de rigidifier, de manière stable, la structure d'une protéine ou le complexe de plusieurs d'entre elles.

Cette propriété dimérique de hATAD3A-WA et hATAD3B est spécifique car l'expression de hATAD3A ou du mutant WalkerB, dans la lignée H1299-Sh (sans hATAD3B), n'induit pas l'apparition du dimère. De plus, lorsque hATAD3B-Myc est exprimée dans les cellules 3T3 (qui ne contiennent qu'*atad3a*), une bande correspondant au dimère peut être observée en western blot (Fig. 6d).

Entre les protéines hATAD3A et hATAD3B il n'y a qu'une seule cystéine en commun, Cys515. hATAD3A en possède une deuxième, Cys570, et hATAD3B en possède sept autres, Cys461, Cys557, Cys606, Cys611, Cys616, Cys624 et Cys634. Le domaine spécifique de hATAD3B étant riche en cystéines, les algorithmes de prédictions (moteur expasy) estimaient qu'il pouvait former un doigt-zinc avec les cystéines Cys606, Cys611, Cys616 et Cys624. Un domaine zinc forme une petite structure, caractérisée par 4 à 6 cystéines, qui coordonne des ions zinc et qui est capable d'interagir avec un brin d'ADN ou d'ARN.

Afin de déterminer le rôle des quatre cystéines importantes du domaine C-terminal (606, 611, 616 et 624), nous avons fait réaliser des mutations ponctuelles pour les remplacer par des méthionines (PX'Therapeutics). L'expression de ce mutant ne semble pas affecter le réseau mitochondrial ou le niveau d'autres protéines mitochondriales (immunofluorescences ou western blots non publiés). De plus, ce mutant de hATAD3B conserve la capacité à former des dimères stables lorsqu'il est exprimé dans la lignée H1299-Sh. Les quatre cystéines ne semblent pas être impliquées dans la formation de ponts disulfures, même si on ne peut pas exclure leurs participations *in vivo*. À la vue des données, il est donc probable que la Cys515 forme des ponts disulfures et soit sensible aux modifications structurales amenées par le mutant WalkerA ou l'ajout d'un domaine C-terminal supplémentaire. Pour confirmer cette hypothèse il sera nécessaire de muter la Cys515 en méthionine ou en glycine, dans hATAD3A et hATAD3B, et tester, par cross-linking, la capacité de ces mutants à former des oligomères.

Le mutant Walker A de hATAD3A et hATAD3B favorisant la formation de dimères stables, ils pourraient perturber le fonctionnement des hexamères endogènes de hATAD3A, notamment dans l'interaction avec des ligands. Lors d'analyses protéomiques d'immunoprécipitats du domaine C-terminal de hATAD3A, le laboratoire EDyP (CEA-Grenoble/iRTSV) avait identifié une protéine majeure, la chaperone HSP60 (cf conclusion générale). Nous avons confirmé ce résultat par western blot à l'aide de l'anticorps anti-HSP60 (Fig 4d). Néanmoins, il semblerait qu'il y ait moins d'HSP60 qui co-immunoprécipite avec hATAD3B qu'avec hATAD3A. Des expériences complémentaires avec les mutants WalkerA et B, ont montré que les deux co-immunoprécipitent moins d'HSP60 que hATAD3A (non publiés). Cette faible interaction est d'autant plus marquante dans le cas du mutant WalkerA. Cette liaison à HSP60 pourrait être sujette à la présence de ponts disulfures stables impliquant l'acide aminé Cys515. Des expériences complémentaires avec des mutants ponctuels (de la Cys515) et de délétions (ATAD3B delta C-ter) seront nécessaires pour tester cette hypothèse et vérifier si l'interaction avec HSP60 est nécessaire pour le fonctionnement d'ATAD3A.

Il est important de noter qu'hATAD3A ainsi qu'hATAD3B possède un domaine d'interaction avec la S100B, commun avec d'autres cibles de cette protéine (Gilquin, Cannon et al. 2010). Le domaine d'interaction est situé dans hATAD3A proche du domaine transmembranaire, entre les résidus 290 et 310. La protéine S100B permettrait d'éviter la formation d'agrégats lors de la traduction cytoplasmique d'ATAD3A, et de faciliter l'import dans la mitochondrie de cette protéine.

# ATAD3B inhibe la formation d'un réseau mitochondrial et agirait comme un dominant négatif d'ATAD3A

Lors de l'étude d'atad3a chez Drosophila melanogaster, nous avions démontré que la présence de la protéine est nécessaire pour la croissance cellulaire et le développement embryonnaire (1ère partie de la thèse). D'un point de vue évolutif, atad3b n'apparait que plus tard, chez les hominidés, et n'est exprimé que dans certaines cellules, pluripotentes ou cancéreuses. Pour pouvoir l'étudier dans un modèle simple, nous avons basé nos expériences sur une lignée exprimant fortement hATAD3B, H1299. Cette lignée possède une majorité de cellules qui expriment des marqueurs de cellules souches (CD44, Oct4), qui peuvent être utilisées pour générer des cellules souches cancéreuses (Leung, Fiscus et al. 2010). Pour pouvoir générer une lignée d'H1299 n'exprimant plus hATAD3B, j'ai tout d'abord testé plusieurs siRNA anti-ATAD3B, dont les séquences ciblées ont été établies à l'aide de l'outil DSIR (Designer of Small Interfering RNA, CEA-Grenoble/iRTSV/LBIM). Seuls les siRNA ciblant la séquence non traduite en 3'de l'ARN d'atad3b permettent de diminuer l'expression de hATAD3B, sans que le niveau de hATAD3A soit affecté. J'ai ensuite vérifié que les shRNA ciblant les mêmes séquences arrivaient au même résultat, par transfection directe avec le plasmide (transitoire) ou par infection à l'aide d'un lentivirus contenant le plasmide fournit par la société AMSBIO. Cela a permis de créer une lignée stable d'H1299, H1299-Sh, n'exprimant peu ou plus de hATAD3B, avec un lentivirus qui peut être utilisé sur des cellules plus difficiles à transfecter (ex : cellules souches) (Fig. 1.d). L'utilisation d'une lignée stable permet d'avoir des résultats reproductibles pour l'étude d'une protéine qui est très stable. En effet, une inhibition à la cycloheximide (bloquage de la synthèse protéique) de plus de 30 heures ne permet pas de diminuer le niveau de hATAD3B, ni hATAD3A (résultats non publiés).

La lignée H1299-Sh est viable et ne présente pas de différences notables dans la capacité proliférative par rapport à la lignée H1299 (résultats non publiés). De plus, les niveaux de différentes protéines mitochondriales (Opa1, F1 et Hsp60) et l'activité de la cytochrome c oxydase restent similaires. Néanmoins, l'étude par immunofluorescence du réseau mitochondrial (marquage anti-Hsp60 ou anti-F1) montre que les H1299-Sh possèdent un réseau plus développé et filamentaire. Les mitochondries sont moins compactes dans l'espace péri-nucléaire (mitochondrial cloud) et s'étendent plus à travers le cytoplasme. La protéine hATAD3B semble donc être importante pour le développement du réseau mitochondrial.

Dans des cellules 3T3 n'exprimant que la forme endogène hATAD3A, l'expression du mutant WalkerA ou du mutant délété des 50 premiers acides aminés de hATAD3A provoque la fragmentation du réseau mitochondrial (1<sup>ère</sup> partie de la thèse fig 8 et 9d, 2<sup>ème</sup> partie : fig 6). L'expression de hATAD3B génère le même effet, sans qu'il y ait relargage du cytochrome c (les mitochondries sont fragmentées mais non en apoptose). Ces résultats confirment que hATAD3B agit comme un mutant dominant négatif de hATAD3A, et est capable de fissionner le réseau mitochondrial.

# Conclusion générale et perspectives

Le gène *atad3a* est présent dans les eucaryotes multicellulaires et fait partie de la famille des ATPases AAA +. Il code pour une protéine mitochondriale, ATAD3A qui est fortement conservée au cours de l'évolution. Au laboratoire, ATAD3A avait été identifiée comme une cible d'interaction de la protéine S100B (Gilquin, Cannon et al. 2010). Au cours de cette thèse, j'ai pu étudier la fonction d'ATAD3A *in vivo*, la topologie et les formes oligomériques de cette protéine ainsi que la topologie, l'interaction et les fonctions d'hATAD3B.

Chez la drosophile, la présence de dATAD3A est nécessaire pour le développement larvaire. En effet, sans dATAD3A, les larves restent petites et meurent. L'inhibition par siRNA de l'expression de dATAD3A dans des cellules de corps gras provoque une diminution de la taille des cellules avec une perturbation du réseau mitochondrial. Ce résultat est confirmé par la perte complète de l'expression de dATAD3A, qui entraîne une forte baisse du nombre de mitochondries détectables. Dans ces cellules, aucune activation des voies apoptotiques ni dégradation des mitochondries par mitophagie n'ont été détectées. La perte de dATAD3A inhiberait donc la biogénèse mitochondriale et l'homéostasie énergétique de la larve. De plus, la protéine dATAD3A est l'une des cibles mitochondriales de la voie TOR qui détecte et contrôle le niveau énergétique de la cellule. Avec la forte homologie qu'a dATAD3A avec son homologue humain, hATAD3A, il est fort probable que les deux conservent les mêmes fonctions.

La protéine hATAD3A est une protéine transmembranaire de la membrane interne. Elle est composée de deux domaines coil-coils du côté N-terminal, d'un domaine d'adressage à la mitochondrie proche du domaine transmembranaire ainsi que d'un domaine ATPAse du côté C-terminal. Par des études rigoureuses de la topologie de cette protéine par digestion trypsique, j'ai pu montrer que hATAD3A est localisée aux zones de contact entre la membrane externe et la membrane interne. Le domaine N-terminal de la protéine est très proche de la membrane externe alors que le domaine C-terminal contenant le domaine ATPase est lui situé dans la matrice. L'inhibition de l'activité ATPase de hATAD3A par la mutation de la séquence WalkerA provoque la fission du réseau mitochondrial ce qui corrèle avec l'interaction d'ATAD3A avec Drp1 (protéine de fission) décrite par l'équipe de KC Chow (Fang, Chang et al. 2010).

Chez les hominidés, il existe un deuxième membre de la famille ATAD3, le gène *atad3b*, issu de la duplication d'*atad3a* il y a 12-16 millions d'années. Il code pour la protéine ATAD3B qui possède un domaine C-terminal supplémentaire de 62 acides aminés, fortement hydrophobe et enrichie en cystéines. Comme nous avons pu le mettre en évidence, contrairement à hATAD3A, hATAD3B est exprimé dans des contextes bien particuliers. En effet, hATAD3B est un marqueur de pluripotence exprimé par les cellules souches embryonnaire et les iPs. La protéine est aussi réexprimée par certaines cellules cancéreuses.

La topologie d'hATAD3B est similaire à celle de hATAD3A avec un domaine C-terminal matriciel. Au sein des mitochondries, ces deux protéines sont présentes sous forme de monomères, dimères, trimères et hexamères. Les ATPases AAA + sont décrites pour être actives en hexaméres, et en équilibre avec des formes monomériques et dimériques qui, elles, sont inactives (Roll-Mecak and Vale 2008). Le mutant Walker A de hATAD3A et hATAD3B favorisant la formation de dimères stables, ils pourraient alors perturber le fonctionnement des hexamères endogènes d'ATAD3A. De plus, des études sur des domaines coil-coils adjacent au domaine ATPase de la chaperone ClpB ont montré que le premier est nécessaire pour l'héxamérisation et/ou l'activité ATPase (Watanabe, Nakazaki et al. 2009). Le domaine C-terminal d'hATAD3B pourrait aussi influencer l'activité du domaine ATPase des hexamères de hATAD3A. Cette perturbation pourrait alors avoir des répercussions sur les zones de contact entre la membrane interne et externe, et se traduire par un réseau mitochondrial fragmentée.

La protéine hATAD3B pourrait être exprimée dans des situations particulières pour inhiber l'activité des complexes d'hATAD3A. Les cellules pluripotentes ou cancéreuses sont essentiellement glycolytiques avec une activité mitochondriale réduite. Elles possèdent un faible nombre de copies d'ADNmt qui augmente lorsque les cellules se différencient. La différentiation s'accompagne aussi du développement du réseau mitochondriale. Or, dans les cellules exprimant hATAD3B, le réseau mitochondrial est réduit. En inhibant l'activité d'hATAD3A, hATAD3B pourrait alors maintenir le réseau mitochondrial dans un statut « souche » peu développé. L'invalidation de hATAD3B par shRNA dans des lignées embryonnaires humaines par Olivier Feraud va permettre d'étudier cette hypothèse. En absence de hATAD3B dans ces cellules pluripotentes, on devrait alors avoir un réseau mitochondrial plus développé. Il est possible aussi que cette « maturation mitochondriale » entraîne la différentiation de ces cellules souches.

Les protéines ATAD3A et ATAD3B peuvent être, elles aussi, régulées par des modifications post-traductionnelles. Une forme phosphorylée de hATAD3A a été récemment

décrite dans des lignées cancéreuses de poumons et de prostate (Fang, Chang et al. 2010; Huang, Chow et al. 2011). Cette forme de hATAD3A, de 70kDa, serait la cible de la PKC (Protéine Kinase C). Cette modification pourrait aussi modifier l'activité de l'ATPase de hATAD3A ou son interaction avec d'autres ligands.

Contrairement à hATAD3B, la protéine hATAD3A est capable d'interagir avec la protéine chaperone HSP60. Nos expériences de co-immunoprécipitation ont aussi montré que les mutants WalkerA et WalkerB interagissent moins avec HSP60. Cette protéine chaperone est située dans la matrice mitochondriale. Selon les études de son homologue chez la bactérie, groEL, HSP60 aurait une fonction de chaperone qui participerait à l'importation et au bon repliement des protéines mitochondriales. Chez *C. elegans*, la protéine HSP60 a été montrée comme étant impliqué dans la division des nucléoides mitochondriaux lors de la division cellulaire (Kaufman, Kolesar et al. 2003). La mutation d'HSP60 provoque des défauts de transmission de l'ADNmt aux mitochondries de cellules filles. Des expériences d'interactions de HSP60 avec l'ADN avaient donné des résultats contradictoires selon les modèles étudiés (levure ou bactérie).

Comme HSP60, la protéine hATAD3B a été isolée dans un extrait de protéines liées à l'ADN mitochondrial (He, Mao et al. 2007). Cette interaction se ferait par le domaine Nterminale 44-247 AA, commun aux ATAD3s, et sur la boucle D de l'ADNmt. Mais des études de cross-linking ciblant l'ADNmt n'ont pas permis de retrouver hATAD3A ou hATAD3B dans les préparations de nucléo-protéines. De plus, dans nos expériences hATAD3A ne colocalise pas avec l'ADNmt ni du côté N-terminal (résultats de topologie) ni du côté C-terminal (Fig. 8b du 1<sup>er</sup> article de cette thèse). Le modèle proposé serait alors d'un domaine C-terminal d'ATAD3A qui serait en périphériques des nucléoides d'ADNmt. Aux côtés de la prohibitin et HSP60, ATAD3A participerait à la signalisation (ex : voie TOR) régulant l'organisation de ces nucléoides mitochondriaux (Fig. 20) (Bogenhagen, Rousseau et al. 2008). Néanmoins, la fonction de support d'ATAD3A dans ces nucléoides reste encore à déterminer. Il est à noter que hATAD3A et hATAD3B sont très peu solubles, et, pour l'instant, seuls des fragments des protéines ont pu être exprimés et purifiés (He, Mao et al. 2007). Des études plus avancées par cryomicroscopie éléctronique permettront peut-être de fournir plus d'informations sur la structure même des deux protéines et permettre de comprendre l'interaction avec les ligands tels que HSP60.

Dans le cas des hominidés, le modèle d'ATAD3A, en périphérie des nucléoides mitochondriaux, serait à compléter par la présence d'ATAD3B. La protéine hATAD3B agit et interagit comme le mutant dominant négatif WalkerA d'hATAD3A. En perturbant la fonction

de l'héxamère d'hATAD3A, hATAD3B permettrait alors de conserver les mitochondries dans un état proche des mitochondries quiescente de cellules souches. Il serait intéressant notamment d'étudier l'évolution des nucléoides mitochondriaux au cours de la différentiation. Le nombre de particules d'ADNmt est multiplié au cours de la prolifération et de la différentiation, et il faudrait étudier alors l'effet de l'expression d'hATAD3B sur ce nombre.

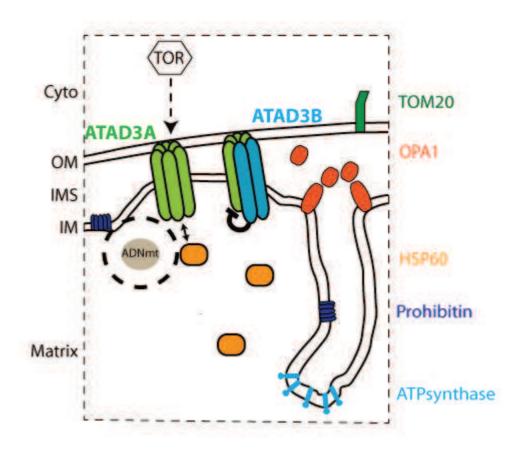


Figure 20 : Schéma de bilan et d'hypothèses sur la localisation, les structures et les fonctions d'ATAD3A et ATAD3B.

La protéine ATAD3A est présente chez les eucaryotes multicellulaires et son paralogue, ATAD3B est présent uniquement chez les hominidés. Les deux protéines sont situées au niveau des zones de contacts entre la membrane externe (OM) et la membrane interne (IM) avec un domaine N-terminal proche de l'OM et un domaine dans la matrice (matrix). La topologie de ces deux protéines a été étudiée à l'aide des protéines de référence TOM20, OPA1, Prohibitin et l'ATPsynthase. Le niveau d'ATAD3A est régulé par la voie TOR, et la protéine est capable d'interagir avec la chaperone HSP60. À l'instar du mutant dominant négatif WalkerA, ATAD3B inhiberait, par la formation de dimères stables, la fonction du

complexe d'ATAD3A. Celui-ci, avec HSP60 et la prohibitin, participerait au support satellite du nucléoide mitochondriale (ADNmt).

Pour pouvoir tester ces modèles de fonctions d'ATAD3A et ATAD3B, l'utilisation des cellules embryonnaires souches ou des hiPs est appropriée. Il serait aussi intéressant de réaliser ces expériences sur les nouveaux modèles de CSC généré *in vitro* (Paranjape, Mandal et al. 2011). À terme, les études complémentaires de la structure et des fonctions des deux protéines, ATAD3A et ATAD3B, permettront d'avoir une meilleure compréhension du rôle que jouent les mitochondries dans l'embryogénèse et la différentiation cellulaire chez l'homme. Si la capacité d'hATAD3B à être un bon marqueur précoce de pluripotence est confirmée, il sera important de l'inclure dans la génération et l'utilisation médicale des hiPs (Seibler, Graziotto et al. 2011). De plus, la protéine hATAD3B devrait pouvoir aider à l'isolation pour étude, le diagnostic et le traitement spécifique de cellules souches cancéreuses au sein de tumeurs. Si l'inhibition de hATAD3B permet de différencier ces cellules souches cancéreuses, elles pourraient devenir alors, à l'instar des autres cellules de tumeurs, sensibles aux chimiothérapies.

### **Annexes**

# Annexe 1 : Protocole de l'étude d'dATAD3A chez *Drosophila melanogaster*

L'étude de l'inhibition partielle (siRNA) ou totale de dATAD3A sur le réseau mitochondrial *in vivo* a été réalisé grâce à l'expression du gène rapporteur mitoGFP et par l'immunomarquage de la sous-unité F1-ATPase.

#### <u>Génotype du croisement :</u>

• MARCM (-/- dATAD3A):

w; FRT82borc/TM6B x cgal4, UASGFP, FRT82 TubGal80ts/SM66B

Ponte de 4h suivit d'un heatshock (incubation des tubes à 37°C) d'une heure.

#### • SiRNA anti-ATAD3A:

ywhsFlP; Flipout MitoGFP x UAS bor IR

Ponte de 8h

#### Protocole d'immunomarquage :

Ponte de 4h suivit d'un heatshock (incubation des tubes à 37°C) d'une heure.

4j1/2 après la ponte :

Fixation PFA 30min,

Perméabilisation au PBS Triton X-100 0,2 % 1 heure

Saturation PBS Triton X-100 0.2 % Sérum Veau Fétal 5 %

Incubation des anticorps primaires sur la nuit à  $4^{\circ}\text{C}$  anti-F1-ATPase au 1/200e dans du PBS

Triton X-100 0,2 % Sérum Veau Fétal 5 %

5 lavages PBS Triton X-100 0,2 % sur la journée

Incubation des anticorps secondaires sur la nuit à 4°C anti-Mouse-Cy3 au 1/500e dans du PBS Triton X-100 0,2 % Sérum Veau Fétal 5 %

5 lavages PBS Triton X-100 0,2 % sur la journée avec le dernier sur la nuit à 4°C

Monter entre lame et lamelle dans du 50 % milieu de montage-50 % PBS,

Rincage avec du 100 % milieu de montage de 5', puis incubation du corps gras avec 100 % milieu de montage frais 1/2h avant de rajouter la lamelle.

### Références

- Ahmed, S., J. F. Passos, et al. (2008). "Telomerase does not counteract telomere shortening but protects mitochondrial function under oxidative stress." <u>Journal of Cell Science</u>: 1046-1053.
- Al-Ejeh, F., C. E. Smart, et al. (2011). "Breast cancer stem cells: treatment resistance and therapeutic opportunities." <u>Carcinogenesis</u> **32**(5): 650-658.
- Albring, M., J. Griffith, et al. (1977). "Association of a protein structure of probable membrane derivation with HeLa cell mitochondrial DNA near its origin of replication." <a href="Proc Natl Acad Sci\_USA\_74">Proc Natl Acad Sci\_USA\_74</a>(4): 1348-1352.
- Altieri, D. C. (2011). "Mitochondrial Compartmentalized Protein Folding and Tumor Cell Survival AbstrAct: HArD-WIrING OF MItOcHONDrIAL." 2: 347 351.
- Ardail, D., J. P. Privat, et al. (1990). "Mitochondrial contact sites. Lipid composition and dynamics." <u>J</u>
  <u>Biol Chem</u> **265**(31): 18797-18802.
- Arismendi-Morillo, G. (2009). "Electron microscopy morphology of the mitochondrial network in human cancer." <u>The international journal of biochemistry & cell biology</u> **41**: 2062-2068.
- Armstrong, L., K. Tilgner, et al. (2010). "Human induced pluripotent stem cell lines show stress defense mechanisms and mitochondrial regulation similar to those of human embryonic stem cells." Stem Cells **28**(4): 661-673.
- Babst, M., B. Wendland, et al. (1998). "The Vps4p AAA ATPase regulates membrane association of a Vps protein complex required for normal endosome function." EMBO J **17**(11): 2982-2993.
- Back, J. W., M. A. Sanz, et al. (2002). "A structure for the yeast prohibitin complex: Structure prediction and evidence from chemical crosslinking and mass spectrometry." <u>Protein Sci</u> **11**(10): 2471-2478.
- Bereiter-Hahn, J. and M. Jendrach (2010). "Mitochondrial dynamics." Int Rev Cell Mol Biol 284: 1-65.
- Blackstone, C. and C. R. Chang (2011). "Mitochondria unite to survive." Nat Cell Biol 13(5): 521-522.
- Bleazard, W., J. M. McCaffery, et al. (1999). "The dynamin-related GTPase Dnm1 regulates mitochondrial fission in yeast." Nat Cell Biol 1(5): 298-304.
- Bogenhagen, D. F., D. Rousseau, et al. (2008). "The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids." J Biol Chem **283**(6): 3665-3675.
- Bogenhagen, D. F., D. Rousseau, et al. (2008). "The layered structure of human mitochondrial DNA nucleoids." <u>The Journal of biological chemistry</u> **283**: 3665-3675.
- Boldogh, I. R. and L. A. Pon (2007). "Mitochondria on the move." Trends Cell Biol 17(10): 502-510.
- Bonavia, R., M. D. Inda, et al. (2011). "Heterogeneity maintenance in glioblastoma: a social network." <u>Cancer Res</u> **71**(12): 4055-4060.
- Broadley, K. W., M. K. Hunn, et al. (2011). "Side population is not necessary or sufficient for a cancer stem cell phenotype in glioblastoma multiforme." <u>Stem Cells</u> **29**(3): 452-461.
- Cairns, R. a., I. S. Harris, et al. (2011). "Regulation of cancer cell metabolism." <u>Nature Reviews Cancer</u> **11**: 85-95.
- Campello, S. and L. Scorrano (2010). "Mitochondrial shape changes: orchestrating cell pathophysiology." <u>EMBO Rep</u> **11**(9): 678-684.
- Cereghetti, G. M. and L. Scorrano (2006). "The many shapes of mitochondrial death." <u>Oncogene</u> **25**(34): 4717-4724.
- Chacinska, A., C. M. Koehler, et al. (2009). "Importing mitochondrial proteins: machineries and mechanisms." <u>Cell</u> **138**: 628-644.
- Chen, H., J. M. McCaffery, et al. (2007). "Mitochondrial fusion protects against neurodegeneration in the cerebellum." <u>Cell</u> **130**(3): 548-562.
- Chin, M. H., M. J. Mason, et al. (2009). "Induced pluripotent stem cells and embryonic stem cells are distinguished by gene expression signatures." <u>Cell Stem Cell</u> **5**(1): 111-123.
- Clevers, H. (2011). "The cancer stem cell: premises, promises and challenges." <u>Nat Med</u> **17**(3): 313-319.

- Darshi, M., V. L. Mendiola, et al. (2011). "ChChd3, an inner mitochondrial membrane protein, is essential for maintaining crista integrity and mitochondrial function." <u>J Biol Chem</u> **286**(4): 2918-2932.
- Davies, K. M., M. Strauss, et al. (2011). "Macromolecular organization of ATP synthase and complex I in whole mitochondria." <a href="Proc Natl Acad Sci U S A">Proc Natl Acad Sci U S A</a>.
- De Vos, K. J. and M. P. Sheetz (2007). "Visualization and quantification of mitochondrial dynamics in living animal cells." <u>Methods Cell Biol</u> **80**: 627-682.
- Delettre, C., G. Lenaers, et al. (2000). "Nuclear gene OPA1, encoding a mitochondrial dynamin-related protein, is mutated in dominant optic atrophy." Nat Genet **26**(2): 207-210.
- Derdak, Z., N. M. Mark, et al. (2008). "The mitochondrial uncoupling protein-2 promotes chemoresistance in cancer cells." <u>Cancer Res</u> **68**(8): 2813-2819.
- Desai, B. N., B. R. Myers, et al. (2002). "FKBP12-rapamycin-associated protein associates with mitochondria and senses osmotic stress via mitochondrial dysfunction." <a href="Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America">Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America</a> **99**: 4319-4324.
- Dunn, C. D., Y. Tamura, et al. (2008). "Mgr3p and Mgr1p are adaptors for the mitochondrial i-AAA protease complex." Mol Biol Cell **19**(12): 5387-5397.
- Emelyanov, V. V. (2003). "Mitochondrial connection to the origin of the eukaryotic cell." <u>Eur J Biochem</u> **270**(8): 1599-1618.
- Erdmann, R., F. F. Wiebel, et al. (1991). "PAS1, a yeast gene required for peroxisome biogenesis, encodes a member of a novel family of putative ATPases." <u>Cell</u> **64**(3): 499-510.
- Erzberger, J. P. and J. M. Berger (2006). "Evolutionary relationships and structural mechanisms of AAA+ proteins." <u>Annual review of biophysics and biomolecular structure</u> **35**: 93-114.
- Falkenberg, M., N.-G. Larsson, et al. (2007). "DNA replication and transcription in mammalian mitochondria." <u>Annual review of biochemistry</u> **76**: 679-699.
- Fang, H. Y., C. L. Chang, et al. (2010). "ATPase family AAA domain-containing 3A is a novel antiapoptotic factor in lung adenocarcinoma cells." <u>J Cell Sci</u> **123**(Pt 7): 1171-1180.
- Fehrenbacher, K. L., H. C. Yang, et al. (2004). "Live cell imaging of mitochondrial movement along actin cables in budding yeast." <u>Curr Biol</u> **14**(22): 1996-2004.
- Fraser, F., C. G. Corstorphine, et al. (1997). "Topology of carnitine palmitoyltransferase I in the mitochondrial outer membrane." <u>Biochem J</u> **323** ( **Pt 3**): 711-718.
- Frey, T. G. and C. A. Mannella (2000). "The internal structure of mitochondria." <u>Trends Biochem Sci</u> **25**(7): 319-324.
- Frickey, T. and A. N. Lupas (2004). "Phylogenetic analysis of AAA proteins." <u>Journal of Structural</u> Biology **146**: 2-10.
- Friedman, J. R., L. Lackner, et al. (2011). "ER Tubules Mark Sites of Mitochondrial Division." <u>Science</u>. Fuchs, E. and V. Horsley (2011). "Ferreting out stem cells from their niches." <u>Nature Cell Biology</u> **13**: 513-518.
- Geissler, A., T. Krimmer, et al. (2000). "Membrane potential-driven protein import into mitochondria.

  The sorting sequence of cytochrome b(2) modulates the deltapsi-dependence of translocation of the matrix-targeting sequence." Mol Biol Cell **11**(11): 3977-3991.
- Gilkerson, R. W., J. M. Selker, et al. (2003). "The cristal membrane of mitochondria is the principal site of oxidative phosphorylation." <u>FEBS Lett</u> **546**(2-3): 355-358.
- Gilquin, B., B. R. Cannon, et al. (2010). "The calcium-dependent interaction between S100B and the mitochondrial AAA ATPase ATAD3A and the role of this complex in the cytoplasmic processing of ATAD3A." <u>Molecular and cellular biology</u> **30**: 2724-2736.
- Gilquin, B., E. Taillebourg, et al. (2010). "The AAA + ATPase ATAD3A Controls Mitochondrial Dynamics at the Interface of the Inner and Outer Membranes The AAA & ATPase ATAD3A Controls Mitochondrial Dynamics at the Interface of the Inner and Outer Membranes".
- Gires, O., M. Munz, et al. (2004). "Profile identification of disease-associated humoral antigens using AMIDA, a novel proteomics-based technology." <u>Cell Mol Life Sci</u> **61**(10): 1198-1207.
- Gogvadze, V., S. Orrenius, et al. (2008). "Mitochondria in cancer cells: what is so special about them?" <u>Trends in cell biology</u> **18**: 165-173.

- Gordon, D. M. and J. H. Santos (2010). "The Emerging Role of Telomerase Reverse Transcriptase in Mitochondrial DNA Metabolism." **2010**.
- Gotow, T., M. Shibata, et al. (2000). "Selective localization of Bcl-2 to the inner mitochondrial and smooth endoplasmic reticulum membranes in mammalian cells." <u>Cell Death Differ</u> **7**(7): 666-674.
- Guertin, D. A., K. V. Guntur, et al. (2006). "Functional genomics identifies TOR-regulated genes that control growth and division." <u>Curr Biol</u> **16**(10): 958-970.
- Gurtubay, J. I., F. M. Goñi, et al. (1980). "Triton X-100 solubilization of mitochondrial inner and outer membranes." Journal of bioenergetics and biomembranes **12**: 47-70.
- Hackenbrock, C. R. (1968). "Chemical and physical fixation of isolated mitochondria in low-energy and high-energy states." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **61**(2): 598-605.
- Hamanaka, R. B. and N. S. Chandel (2010). "Mitochondrial reactive oxygen species regulate cellular signaling and dictate biological outcomes." Trends in biochemical sciences: 1-9.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2000). "The hallmarks of cancer." Cell 100(1): 57-70.
- Hanahan, D. and R. A. Weinberg (2011). "Hallmarks of cancer: the next generation." <u>Cell</u> **144**(5): 646-674.
- Hanson, P. I. and S. W. Whiteheart (2005). "AAA+ proteins: have engine, will work." <u>Nature reviews.</u> <u>Molecular cell biology</u> **6**: 519-529.
- Hartl, F. U. and M. Hayer-hartl (2009). "Converging concepts of protein folding in vitro and in vivo." Nature Structural & Molecular Biology **16**: 574-581.
- He, J., C. C. Mao, et al. (2007). "The AAA+ protein ATAD3 has displacement loop binding properties and is involved in mitochondrial nucleoid organization." <u>J Cell Biol</u> **176**(2): 141-146.
- Hoffmann, M., N. Bellance, et al. (2009). "C. elegans ATAD-3 is essential for mitochondrial activity and development." PloS one **4**: e7644.
- Hsu, P. P. and D. M. Sabatini (2008). "Cancer cell metabolism: Warburg and beyond." <u>Cell</u> **134**(5): 703-707.
- Hu, S., A. Balakrishnan, et al. (2011). "(13)C-Pyruvate Imaging Reveals Alterations in Glycolysis that Precede c-Myc-Induced Tumor Formation and Regression." Cell Metab **14**(1): 131-142.
- Huang, J., F. Wang, et al. (2011). "Association of telomere length with authentic pluripotency of ES/iPS cells." Cell Res **21**(5): 779-792.
- Huang, K. H., K. C. Chow, et al. (2011). "ATPase family AAA domain containing 3A is an anti-apoptotic factor and a secretion regulator of PSA in prostate cancer." Int J Mol Med **28**(1): 9-15.
- Hubstenberger, A., G. Labourdette, et al. (2008). "ATAD 3A and ATAD 3B are distal 1p-located genes differentially expressed in human glioma cell lines and present in vitro anti-oncogenic and chemoresistant properties." <a href="Exp Cell Res">Exp Cell Res</a> **314**(15): 2870-2883.
- Kang, S. G., J. Ortega, et al. (2002). "Functional proteolytic complexes of the human mitochondrial ATP-dependent protease, hClpXP." J Biol Chem **277**(23): 21095-21102.
- Kaufman, B. A., J. E. Kolesar, et al. (2003). "A function for the mitochondrial chaperonin Hsp60 in the structure and transmission of mitochondrial DNA nucleoids in Saccharomyces cerevisiae." <u>J Cell Biol</u> **163**(3): 457-461.
- Knudten, A. F., J. J. Thelen, et al. (1994). "Purification, Characterization, and Submitochondrial Localization of the 32-Kilodalton NADH Dehydrogenase from Maize." <u>Plant Physiol</u> **106**(3): 1115-1122.
- Koshiba, T., S. A. Detmer, et al. (2004). "Structural basis of mitochondrial tethering by mitofusin complexes." <u>Science</u> **305**(5685): 858-862.
- Kukat, C., C. A. Wurm, et al. (2011). "Super-resolution microscopy reveals that mammalian mitochondrial nucleoids have a uniform size and frequently contain a single copy of mtDNA." <u>Proc Natl Acad Sci U S A</u> **108**(33): 13534-13539.
- Kulkarni, A., O. Zschenker, et al. (2010). "Effect of telomere proximity on telomere position effect, chromosome healing, and sensitivity to DNA double-strand breaks in a human tumor cell line." Mol Cell Biol **30**(3): 578-589.

- Kuwana, T., M. R. Mackey, et al. (2002). "Bid, Bax, and lipids cooperate to form supramolecular openings in the outer mitochondrial membrane." <u>Cell</u> **111**(3): 331-342.
- Kuylenstierna, B., D. G. Nicholls, et al. (1970). "Effect of trypsin on mitochondrial and microsomal enzymes." <u>Eur J Biochem</u> **12**(3): 419-426.
- Kuznetsov, A. V., M. Hermann, et al. (2009). "The cell-type specificity of mitochondrial dynamics." <u>Int</u> <u>J Biochem Cell Biol</u> **41**(10): 1928-1939.
- Lane, N. (2005). "Power, sex, suicide Mitochondria and the meaning of life." Oxford University Press.
- Lee, S., S. Augustin, et al. (2011). "Electron cryomicroscopy structure of a membrane-anchored mitochondrial AAA protease." J Biol Chem **286**(6): 4404-4411.
- Lenaers, G., P. Reynier, et al. (2009). "OPA1 functions in mitochondria and dysfunctions in optic nerve." Int J Biochem Cell Biol **41**(10): 1866-1874.
- Leung, E. L., R. R. Fiscus, et al. (2010). "Non-small cell lung cancer cells expressing CD44 are enriched for stem cell-like properties." PloS one **5**(11): e14062.
- Liu, H.-g., C. Chen, et al. (2011). "Cancer stem cell subsets and their relationships." <u>Journal of Translational Medicine</u> **9**: 50.
- Liu, X. and D. Weaver (2009). "dynamics." EMBO Journal 28: 3074-3089.
- Locke, D. P., L. W. Hillier, et al. (2011). "Comparative and demographic analysis of orang-utan genomes." Nature **469**: 529-533.
- Logan, D. C. (2006). "The mitochondrial compartment." <u>Journal of experimental botany</u> **57**: 1225-1243.
- Lonergan, T., B. Bavister, et al. (2007). "Mitochondria in stem cells." Mitochondrion 7(5): 289-296.
- Lonergan, T., C. Brenner, et al. (2006). "Differentiation-related changes in mitochondrial properties as indicators of stem cell competence." J Cell Physiol 208(1): 149-153.
- Malka, F., O. Guillery, et al. (2005). "Separate fusion of outer and inner mitochondrial membranes." <u>EMBO Rep</u> **6**(9): 853-859.
- Mandal, S., A. G. Lindgren, et al. (2011). "Mitochondrial function controls proliferation and early differentiation potential of embryonic stem cells." <u>Stem cells (Dayton, Ohio)</u> **29**: 486-495.
- Mannella, C. A. (2006). "Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1763**(5-6): 542-548.
- Mannella, C. a. (2006). "Structure and dynamics of the mitochondrial inner membrane cristae." <u>Biochimica et biophysica acta</u> **1763**: 542-548.
- Mannella, C. A., M. Marko, et al. (1994). "The internal compartmentation of rat-liver mitochondria: tomographic study using the high-voltage transmission electron microscope." <u>Microsc Res</u> Tech **27**(4): 278-283.
- Mears, J. A., L. L. Lackner, et al. (2011). "Conformational changes in Dnm1 support a contractile mechanism for mitochondrial fission." Nat Struct Mol Biol 18(1): 20-26.
- Meeusen, S., J. M. McCaffery, et al. (2004). "Mitochondrial fusion intermediates revealed in vitro." Science **305**(5691): 1747-1752.
- Model, K., C. Meisinger, et al. (2008). "Cryo-electron microscopy structure of a yeast mitochondrial preprotein translocase." J Mol Biol 383(5): 1049-1057.
- Mohyeldin, A., T. Garzon-Muvdi, et al. (2010). "Oxygen in stem cell biology: a critical component of the stem cell niche." <u>Cell Stem Cell</u> **7**(2): 150-161.
- Mootha, V. K., J. Bunkenborg, et al. (2003). "Integrated analysis of protein composition, tissue diversity, and gene regulation in mouse mitochondria." <u>Cell</u> **115**: 629-640.
- Nekrasova, O. E., M. G. Mendez, et al. (2011). "Vimentin intermediate filaments modulate the motility of mitochondria." <u>Mol Biol Cell</u> **22**(13): 2282-2289.
- Neupert, W. and J. M. Herrmann (2007). "Translocation of proteins into mitochondria." <u>Annual review of biochemistry</u> **76**: 723-749.
- Newmeyer, D. D. and S. Ferguson-Miller (2003). "Mitochondria: releasing power for life and unleashing the machineries of death." <u>Cell</u> **112**(4): 481-490.
- Nicastro, D., A. S. Frangakis, et al. (2000). "Cryo-electron tomography of neurospora mitochondria." <u>J</u> <u>Struct Biol</u> **129**(1): 48-56.

- Ohba, M. and G. Schatz (1987). "Disruption of the outer membrane restores protein import to trypsin-treated yeast mitochondria." <u>EMBO J</u> **6**(7): 2117-2122.
- Okazaki, K. and S. Takada (2011). "Structural comparison of F1-ATPase: interplay among enzyme structures, catalysis, and rotations." <u>Structure</u> **19**(4): 588-598.
- Olichon, A., L. Baricault, et al. (2003). "Loss of OPA1 perturbates the mitochondrial inner membrane structure and integrity, leading to cytochrome c release and apoptosis." <u>J Biol Chem</u> **278**(10): 7743-7746.
- Olichon, A., L. J. Emorine, et al. (2002). "The human dynamin-related protein OPA1 is anchored to the mitochondrial inner membrane facing the inter-membrane space." <u>FEBS Lett</u> **523**(1-3): 171-176.
- Osman, C., C. Merkwirth, et al. (2009). "Prohibitins and the functional compartmentalization of mitochondrial membranes." <u>J Cell Sci</u> **122**(Pt 21): 3823-3830.
- Pan, J., Q. Zhang, et al. (2010). "26S proteasome activity is down-regulated in lung cancer stem-like cells propagated in vitro." <u>PloS one</u> **5**(10): e13298.
- Paranjape, A. N., T. Mandal, et al. (2011). "Introduction of SV40ER and hTERT into mammospheres generates breast cancer cells with stem cell properties." <u>Oncogene</u>.
- Park, J., M. Mabuchi, et al. (2009). "Visualization of unstained protein bands on PVDF." <u>Methods Mol Biol</u> **536**: 527-531.
- Passos, J. F., G. Saretzki, et al. (2007). "Mitochondrial dysfunction accounts for the stochastic heterogeneity in telomere-dependent senescence." PLoS Biol **5**(5): e110.
- Patel, S. and M. Latterich (1998). "The AAA team: related ATPases with diverse functions." <u>Trends</u> <u>Cell Biol</u> **8**(2): 65-71.
- Perier, F., C. M. Radeke, et al. (1995). "Expression of a putative ATPase suppresses the growth defect of a yeast potassium transport mutant: identification of a mammalian member of the Clp/HSP104 family." <u>Gene</u> **152**(2): 157-163.
- Perkins, G., C. Renken, et al. (1997). "Electron tomography of neuronal mitochondria: three-dimensional structure and organization of cristae and membrane contacts." <u>J Struct Biol</u> **119**(3): 260-272.
- Perkins, G. A. and T. G. Frey (2000). "Recent structural insight into mitochondria gained by microscopy." <u>Micron</u> **31**(1): 97-111.
- Perkins, G. A., M. G. Sun, et al. (2009). "Chapter 2 Correlated light and electron microscopy/electron tomography of mitochondria in situ." <u>Methods Enzymol</u> **456**: 29-52.
- Perry, A. J., K. a. Rimmer, et al. (2008). "Structure, topology and function of the translocase of the outer membrane of mitochondria." <u>Plant physiology and biochemistry: PPB / Société</u> française de physiologie végétale **46**: 265-274.
- Pignoni, F. and S. L. Zipursky (1997). "Induction of Drosophila eye development by decapentaplegic." <u>Development</u> **124**(2): 271-278.
- Pon, L., T. Moll, et al. (1989). "Protein import into mitochondria: ATP-dependent protein translocation activity in a submitochondrial fraction enriched in membrane contact sites and specific proteins." J Cell Biol 109(6 Pt 1): 2603-2616.
- Prigione, A., B. Fauler, et al. (2010). "The senescence-related mitochondrial/oxidative stress pathway is repressed in human induced pluripotent stem cells." <u>Stem Cells</u> **28**(4): 721-733.
- Prigione, A., B. Lichtner, et al. (2011). "Human Induced Pluripotent Stem Cells Harbor Homoplasmic and Heteroplasmic Mitochondrial DNA Mutations While Maintaining Human Embryonic Stem Cell-like Metabolic Reprogramming." <u>Stem Cells</u> **29**(9): 1338-1348.
- Rabl, R., V. Soubannier, et al. (2009). "Formation of cristae and crista junctions in mitochondria depends on antagonism between Fcj1 and Su e/g." J Cell Biol **185**(6): 1047-1063.
- Rasin, M. R., V. R. Gazula, et al. (2007). "Numb and Numbl are required for maintenance of cadherin-based adhesion and polarity of neural progenitors." <u>Nat Neurosci</u> **10**(7): 819-827.
- Rehling, P., N. Pfanner, et al. (2003). "Insertion of Hydrophobic Membrane Proteins into the Inner Mitochondrial Membrane—A Guided Tour." <u>Journal of Molecular Biology</u> **326**: 639-657.

- Reichert, A. S. and W. Neupert (2002). "Contact sites between the outer and inner membrane of mitochondria-role in protein transport." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1592**(1): 41-49.
- Rey, M., P. Man, et al. (2010). "Conformational dynamics of the bovine mitochondrial ADP/ATP carrier isoform 1 revealed by hydrogen/deuterium exchange coupled to mass spectrometry." <u>J Biol Chem</u> **285**(45): 34981-34990.
- Reya, T., S. J. Morrison, et al. (2001). "Stem cells, cancer, and cancer stem cells." <u>Nature</u> **414**(6859): 105-111.
- Rikhy, R., S. Kamat, et al. (2007). "Mutations in dynamin-related protein result in gross changes in mitochondrial morphology and affect synaptic vesicle recycling at the Drosophila neuromuscular junction." Genes Brain Behav 6(1): 42-53.
- Rojo, M., F. Legros, et al. (2002). "Membrane topology and mitochondrial targeting of mitofusins, ubiquitous mammalian homologs of the transmembrane GTPase Fzo." <u>Journal of cell science</u> **115**: 1663-1674.
- Roll-Mecak, A. and R. D. Vale (2008). "Structural basis of microtubule severing by the hereditary spastic paraplegia protein spastin." <u>Nature</u> **451**(7176): 363-367.
- Sahin, E., S. Colla, et al. (2011). "Telomere dysfunction induces metabolic and mitochondrial compromise." <u>Nature</u>: 1-7.
- Samudio, I., M. Fiegl, et al. (2009). "Mitochondrial uncoupling and the Warburg effect: molecular basis for the reprogramming of cancer cell metabolism." <u>Cancer research</u> **69**: 2163-2166.
- Saretzki, G., T. Walter, et al. (2008). "Downregulation of multiple stress defense mechanisms during differentiation of human embryonic stem cells." <u>Stem Cells</u> **26**(2): 455-464.
- Schaffrik, M., B. Mack, et al. (2006). "Molecular characterization of the tumor-associated antigen AAA-TOB3." Cellular and molecular life sciences: CMLS **63**: 2162-2174.
- Schleiff, E. and T. Becker (2010). "Common ground for protein translocation: access control for mitochondria and chloroplasts." <u>Nature reviews. Molecular cell biology</u> **12**: 48-59.
- Schug, Z. T. and E. Gottlieb (2009). "Biochimica et Biophysica Acta Cardiolipin acts as a mitochondrial signalling platform to launch apoptosis." <u>BBA Biomembranes</u> **1788**: 2022-2031.
- Scott, R. C., O. Schuldiner, et al. (2004). "Role and regulation of starvation-induced autophagy in the Drosophila fat body." <u>Dev Cell</u> **7**(2): 167-178.
- Seibler, P., J. Graziotto, et al. (2011). "Mitochondrial Parkin recruitment is impaired in neurons derived from mutant PINK1 induced pluripotent stem cells." J Neurosci **31**(16): 5970-5976.
- Sollner, T., G. Griffiths, et al. (1989). "MOM19, an import receptor for mitochondrial precursor proteins." Cell **59**(6): 1061-1070.
- Spelbrink, J. N. (2010). "Functional organization of mammalian mitochondrial DNA in nucleoids: history, recent developments, and future challenges." <a href="IUBMB life">IUBMB life</a> 62(1): 19-32.
- St John, J. C., J. Ramalho-Santos, et al. (2005). "The expression of mitochondrial DNA transcription factors during early cardiomyocyte in vitro differentiation from human embryonic stem cells." <u>Cloning Stem Cells</u> **7**(3): 141-153.
- Stojanovski, D., J. M. Müller, et al. (2008). "The MIA system for protein import into the mitochondrial intermembrane space." <u>Biochimica et biophysica acta</u> **1783**: 610-617.
- Sun, M. G., J. Williams, et al. (2007). "Correlated three-dimensional light and electron microscopy reveals transformation of mitochondria during apoptosis." <u>Nat Cell Biol</u> **9**(9): 1057-1065.
- Surridge, C. (1997). "Nobel prizes honour biologists' work on protein energy converters." <u>Nature</u> **389**(6653): 771.
- Szklarczyk, R. and M. A. Huynen (2010). "Mosaic origin of the mitochondrial proteome." <u>Proteomics</u> **10**(22): 4012-4024.
- Takahashi, K., K. Tanabe, et al. (2007). "Induction of pluripotent stem cells from adult human fibroblasts by defined factors." <u>Cell</u> **131**(5): 861-872.
- Tamai, M., A. Yamashita, et al. (2011). "Mitochondrial development of the in vitro hepatic organogenesis model with simultaneous cardiac mesoderm differentiation from murine induced pluripotent stem cells." J Biosci Bioeng.

- Tatsuta, T., K. Model, et al. (2005). "Formation of membrane-bound ring complexes by prohibitins in mitochondria." Mol Biol Cell **16**(1): 248-259.
- Tennant, D. a., R. V. Durán, et al. (2009). "Metabolic transformation in cancer." <u>Carcinogenesis</u> **30**: 1269-1280.
- Truscott, K. N., B. R. Lowth, et al. (2010). "`SE REVIEW / SYNTHE Diverse functions of mitochondrial AAA + proteins: protein activation, disaggregation, and degradation 1." Cell 108: 97-108.
- Tucker, P. a. and L. Sallai (2007). "The AAA+ superfamily--a myriad of motions." <u>Current opinion in</u> structural biology **17**: 641-652.
- Twig, G., A. Elorza, et al. (2008). "Fission and selective fusion govern mitochondrial segregation and elimination by autophagy." <u>EMBO J</u> **27**(2): 433-446.
- Uchihashi, T., R. Iino, et al. (2011). "High-speed atomic force microscopy reveals rotary catalysis of rotorless F-ATPase." <u>Science</u> **333**(6043): 755-758.
- van Geest, M. and J. S. Lolkema (2000). "Membrane topology and insertion of membrane proteins: search for topogenic signals." <u>Microbiol Mol Biol Rev</u> **64**(1): 13-33.
- Vander Heiden, M. G., L. C. Cantley, et al. (2009). "Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation." <u>Science</u> **324**(5930): 1029-1033.
- Varum, S., A. S. Rodrigues, et al. (2011). "Energy metabolism in human pluripotent stem cells and their differentiated counterparts." <u>PloS one</u> **6**(6): e20914.
- Vendelin, M., N. Beraud, et al. (2005). "Mitochondrial regular arrangement in muscle cells: a "crystal-like" pattern." <u>Am J Physiol Cell Physiol</u> **288**(3): C757-767.
- Vogel, F., C. Bornhovd, et al. (2006). "Dynamic subcompartmentalization of the mitochondrial inner membrane." <u>J Cell Biol</u> **175**(2): 237-247.
- von Heijne, G. (2006). "Membrane-protein topology." Nat Rev Mol Cell Biol 7(12): 909-918.
- Wagner, K. M., M. Ruegg, et al. (2009). "Targeting and function of the mitochondrial fission factor GDAP1 are dependent on its tail-anchor." <u>PloS one</u> **4**(4): e5160.
- Wallace, D. C. (2005). "A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine." <u>Annu Rev Genet</u> **39**: 359-407.
- Wang, K. and D. J. Klionsky (2011). "Mitochondria removal by autophagy." Autophagy 7(3): 297-300.
- Warburg, O., F. Wind, et al. (1927). "The Metabolism of Tumors in the Body." <u>J Gen Physiol</u> **8**(6): 519-530.
- Watanabe, Y. H., Y. Nakazaki, et al. (2009). "Stability of the two wings of the coiled-coil domain of ClpB chaperone is critical for its disaggregation activity." <u>Biochem J</u> **421**(1): 71-77.
- West, A. P., G. S. Shadel, et al. (2011). "Mitochondria in innate immune responses." <u>Nat Rev Immunol</u> **11**(6): 389-402.
- Westermann, B. (2010). "Mitochondrial fusion and fission in cell life and death." <u>Nat Rev Mol Cell Biol</u> **11**(12): 872-884.
- White, S. R. and B. Lauring (2007). "AAA+ ATPases: achieving diversity of function with conserved machinery." <u>Traffic (Copenhagen, Denmark)</u> **8**: 1657-1667.
- Wu, J. S. and L. Luo (2006). "A protocol for mosaic analysis with a repressible cell marker (MARCM) in Drosophila." Nat Protoc 1(6): 2583-2589.
- Yamashita, Y. M. (2010). "Cell adhesion in regulation of asymmetric stem cell division." <u>Curr Opin Cell Biol</u> **22**(5): 605-610.
- Yang, G., Q. Li, et al. (2009). "Proteomic, functional and motif-based analysis of C-terminal Src kinase-interacting proteins." <u>Proteomics</u> **9**: 4944-4961.
- Ye, X. Q., Q. Li, et al. (2011). "Mitochondrial and energy metabolism-related properties as novel indicators of lung cancer stem cells." Int J Cancer 129(4): 820-831.
- Youle, R. J. and D. P. Narendra (2011). "Mechanisms of mitophagy." Nat Rev Mol Cell Biol 12(1): 9-14.
- Yu, J., M. A. Vodyanik, et al. (2007). "Induced pluripotent stem cell lines derived from human somatic cells." <u>Science</u> **318**(5858): 1917-1920.
- Zhao, J., T. Liu, et al. (2011). "Human MIEF1 recruits Drp1 to mitochondrial outer membranes and promotes mitochondrial fusion rather than fission." <u>EMBO J</u> **30**(14): 2762-2778.

Zick, M., R. Rabl, et al. (2009). "Cristae formation-linking ultrastructure and function of mitochondria." <u>Biochim Biophys Acta</u> **1793**(1): 5-19.

#### Résumé

ATAD3A est une protéine de la famille des AAA-ATPase (ATPases Associés à diverse Activités cellulaires) spécifique des eucaryotes multicellulaires (1). Au laboratoire, la protéine ATAD3A avait été identifiée comme étant une cible spécifique d'interaction calcium-dépendante de la protéine S100B. Chez les hominidés, il existe un deuxième membre de la famille ATAD3, la protéine mitochondriale ATAD3B.

L'objectif de ma thèse a été de résoudre la topologie mitochondriale d'ATAD3A et d'ATAD3B et d'étudier leurs fonctions et interactions. Nous avons montré que ces deux protéines sont ancrées dans la membrane interne des mitochondries aux zones de contact avec la membrane externe et qu'elles forment des complexes hexamèriques. Nous avons ensuite mise en évidence l'expression spécifique de hATAD3B dans les cellules embryonnaires humaines et sa réexpression dans les iPS et certaines lignées cancéreuses. Des expériences complémentaires ont été réalisées à l'aide de l'invalidation et de l'expression de mutants dominants-négatifs dans la lignée de cancer de poumon, H1299. Nos résultats suggèrent que hATAD3B interagit et forme des hétéro-oligomères avec hATAD3A. hATAD3B sembleraient alors agir entant que dominant-négatif de hATAD3A.

Afin de mieux comprendre la fonction d'ATAD3A *in vivo*, nous avons développé des modèles chez la Drosophile dont les études démontrent qu'ATAD3A est requis pour la croissance cellulaire et le développement de l'organisme.

(1): Gilquin et al. The AAA+ ATPase ATAD3A controls mitochondrial dynamics at the interface of the inner and outer membranes. (Mol Cell Biol. 2010 Apr;30(8):1984-96)

ATAD3A is part of a novel family of mitochondrial AAA+ ATPase (ATPases Associated to diverse cellular Activities) specific to the multicellular eukaryotes (1). In the laboratory, we have identified ATAD3A as a specific target for the Ca2+/Zn2+-binding S100B protein. In the Hominidae, there is a second member of the ATAD3 family, the mitochondrial protein ATAD3B.

The aim of my thesis was to solve the mitochondrial topology of ATAD3A and ATAD3B and to study their functions and interactions. We have shown that these two proteins are anchored in the inner mitochondrial membrane at the contact sites with the external membrane and that they form hexameric complexes. We have then shown that ATAD3B is specifically expressed in the human embryonic stem cells and is re-expressed in iPs (induced Pluripotent stem cell) and certain cancer cell lines. Complimentary studies were done using the down regulation of hATAD3B by shRNA and expression of dominant-negative hATAD3A mutants in the human lung cancer cell line, H1299. Our results suggest that hATAD3B interacts and forms hetero-oligomers with hATAD3A. hATAD3B seems to behave like a dominant negative of hATAD3A.

To have a better understanding of the function of ATAD3A *in vivo*, we developed models in Drosophila with which results show that ATAD3A is required for cell growth and organism development.

(1): Gilquin et al. The AAA+ ATPase ATAD3A controls mitochondrial dynamics at the interface of the inner and outer membranes. (Mol Cell Biol. 2010 Apr;30(8):1984-96)