



**HAL**  
open science

# Importance de la protéase mitochondriale Lon dans le maintien de l'homéostasie protéique et de la fonction mitochondriale

Marie-Paule Hamon

► **To cite this version:**

Marie-Paule Hamon. Importance de la protéase mitochondriale Lon dans le maintien de l'homéostasie protéique et de la fonction mitochondriale. Biologie cellulaire. Sorbonne Université, 2018. Français. NNT : 2018SORUS241 . tel-02476337

**HAL Id: tel-02476337**

**<https://theses.hal.science/tel-02476337>**

Submitted on 12 Feb 2020

**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.

## Sorbonne Université

Ecole doctorale Complexité du vivant- ED515

*UMR 8256 UPMC-CNRS, ERL INSERM U1164*

*Adaptation biologique et vieillissement*

*Equipe "Vieillesse cellulaire intégrée et inflammation"*

### **Importance de la protéase mitochondriale Lon dans le maintien de l'homéostasie protéique et de la fonction mitochondriale**

Par Marie-Paule HAMON

Thèse de doctorat de Biologie du vieillissement

Dirigée par Bertrand FRIGUET

Présentée et soutenue publiquement le 12 septembre 2018

Devant un jury composé de :

SERRADAS-PACHECOT Patricia, Professeur,

BECHET Daniel, Directeur de recherche,

BENARD Giovanni, Chargé de recherche,

BULTEAU Anne-Laure, Chargé de recherche,

SERRE Valérie, Professeur,

FRIGUET Bertrand, Professeur,

président du jury

rapporteur

rapporteur

examineur

examineur

directeur de thèse

# Sommaire

<b>Sommaire</b> .....	<b>1</b>
<b>Abréviations</b> .....	<b>3</b>
<b>Objectifs</b> .....	<b>6</b>
<b>Introduction</b> .....	<b>7</b>
<b>I- Histoire d'O<sub>2</sub></b> .....	<b>8</b>
<b>II- Structure et fonctions des mitochondries</b> .....	<b>8</b>
<b>A) Structure des mitochondries</b> .....	<b>8</b>
1) Quatre compartiments mitochondriaux.....	8
2) Génome et protéome mitochondriaux.....	10
3) Importation des protéines dans la mitochondrie .....	12
4) Dynamique mitochondriale.....	14
<b>B) Fonctions des mitochondries</b> .....	<b>16</b>
1) Métabolisme énergétique .....	16
2) Autres fonctions mitochondriales .....	18
<b>III- La mitochondrie dans le stress oxydant</b> .....	<b>19</b>
<b>A) De l'homéostasie au stress</b> .....	<b>19</b>
<b>B) Stress et eustress oxydants dans la mitochondrie</b> .....	<b>20</b>
1) Chaîne respiratoire et production d'espèces réactives de l'oxygène .....	22
2) Les sources d'espèces réactives de l'oxygène dans la mitochondrie.....	25
3) La double vie des espèces réactives de l'oxygène .....	26
4) Les espèces réactives de l'oxygène dans la signalisation redox mitochondriale.....	28
5) Les espèces réactives de l'oxygène dans les dommages aux biomolécules .....	31
<b>IV- Défenses antioxydantes : l'arsenal mitochondrial</b> .....	<b>34</b>
<b>A) Détoxification, réparation, dégradation</b> .....	<b>35</b>
1) Détoxification .....	35
2) Réparation .....	36

3) Dégradation.....	38
4) Et aussi.....	41
<b>V- La protéase Lon.....</b>	<b>43</b>
<b>A) Structure et fonctions.....</b>	<b>43</b>
1) Structure et mode opératoire de la protéase Lon .....	43
2) Une protéine de stress .....	46
<b>B) Lon et la dysfonction mitochondriale .....</b>	<b>47</b>
<b>Résultats.....</b>	<b>50</b>
<b>I- Publication 1 .....</b>	<b>51</b>
<b>II-Publication 2.....</b>	<b>65</b>
<b>III-Résultats supplémentaires .....</b>	<b>107</b>
<b>Conclusions et perspectives .....</b>	<b>119</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>129</b>
<b>I- Annexe 1 : une approche shRNA inductible pour moduler l'expression de Lon .....</b>	<b>130</b>
<b>II-Annexe 2 : Préparation des fractions enrichies en mitochondries .....</b>	<b>135</b>
<b>II-Annexe 3 : publication 3.....</b>	<b>138</b>
<b>Bibliographie générale.....</b>	<b>150</b>

# Abréviations

Acétyl-CoA : acétyl coenzyme A

AGE : advanced glycation end product

ATPase : adénosine triphosphate synthase

BN-PAGE : blue native polyacrylamide gel electrophoresis

CT-L : chymotrypsine-like

2D DIGE : 2-Dimensional Differential in-Gel Electrophoresis

2-DG : 2-deoxy-D-glucose

DRP1 : dynamin-related protein 1

ECAR : extracellular acidification rate

ERO : espèce réactive de l'oxygène

ETF-QOR : electron transferring flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase

FAD : flavine adénine dinucléotide

FADH<sub>2</sub> : flavine adénine dinucléotide réduit

FOXO : Forkhead box O

GPx : glutathion peroxydase

Grx : glutaredoxine

GSH : glutathion réduit

GSSG : glutathion oxydé

HIF-1 : Hypoxia-Inducible Factor 1

HNE : hydroxynonéal

Hsp : heat shock protein

HtrA2 : high temperature requirement protein A2

IPG : immobilized pH gradient

JNK : Jun-N-terminal kinase

MAPK : mitogen-activated protein kinase

MDA : malondialdéhyde

MIA : mitochondrial intermembrane space assembly

MIM : mitochondrial import complex

MFN 1 et 2 : mitofusines 1 et 2

MPP : mitochondrial processing peptidase

Msr : méthionine sulfoxyde réductase

MST1 : mammalian STE20-like protein kinase 1

NAD : nicotinamide adénine nucléotide

NADH : nicotinamide adénine nucléotide réduit

NADP : nicotinamide adénine nucléotide phosphate

NOX4 : NADPH oxydase 4

NRF2 : nuclear factor erythroid-derived 2-related factor

NHS : N-hydroxysuccinimide

OCR : oxygen consumption rate

OMMAD : Outer Mitochondrial Membrane Associated Dégradation

OPA1 : optic atrophy 1

OXA : oxidase assembly

PA : peptidylglutamyl-peptide hydrolase

PAM : presequence translocase-associated motor

PARL : presenilins-associated rhomboid-like protein

PCR : polymerase chain reaction

PGC-1 $\alpha$  : peroxisome proliferator activated receptor gamma coactivator 1 $\alpha$

PINK1 : PTEN-induced putative kinase 1

Prx : peroxyredoxine

SAM : sorting and assembly machinery

shRNA : short hairpin RNA

siRNA : small interfering RNA

SOD : superoxyde dismutase

StAR : steroidogenic acute regulatory protein

Succinate-CoA : succinate coenzyme A

tBH : tert-butyl hydroperoxide

TFAM : transcription factor A, mitochondrial

TIM : translocase of the inner mitochondrial membrane

TOM : translocase of the outer membrane

TR : thioredoxine réductase

Trx : thioredoxine

UPR : unfolded protein response

# Objectifs

D'un point de vue étymologique, la protéolyse désigne l'hydrolyse des protéines. Considéré sous l'angle de la biologie ce processus embrasse une série de régulations vitales pour la cellule puisque de la protéolyse dépendent notamment le renouvellement du protéome, les transformations conférant aux protéines leur forme active, le contrôle des niveaux de protéines et, par là, le fonctionnement des voies de signalisation dans lesquelles elles interviennent.

Activité enzymatique, la protéolyse est l'œuvre des protéases. Seules deux de ces enzymes ont pour l'instant été répertoriées au sein de la matrice mitochondriale. L'une d'elles, la protéase Lon, s'est fait une spécialité de la dégradation des protéines oxydées mais ses capacités lui ont délégué d'autres terrains d'action. Compte tenu de l'implication déterminante de la mitochondrie dans le vieillissement et maintes pathologies, il nous a paru intéressant de préciser le rôle de Lon dans l'homéostasie protéique et la fonction de la mitochondrie.

A partir de cellules HeLa permettant l'induction d'une sous expression de Lon, l'objectif de cette thèse a été d'étudier les effets d'un déficit en Lon. Deux aspects ont été privilégiés : la mise en évidence d'un stress oxydant puisque Lon est une protéine de réponse au stress particulièrement dédiée à la lutte contre l'accumulation des protéines oxydées et la caractérisation d'une dysfonction mitochondriale sous la forme d'une altération du métabolisme énergétique. Le premier objectif a permis de constater une modification significative du statut oxydatif de la mitochondrie s'accompagnant d'une mobilisation de certains acteurs du contrôle qualité mitochondrial. Quant au métabolisme énergétique, il souffre bien d'une déplétion en Lon. Cette étude a par ailleurs abouti à l'identification d'un certain nombre de protéines dont l'expression ou le niveau d'oxydation est modifiée lorsque Lon est sous exprimée. Ces résultats sont susceptibles d'orienter les recherches sur la protéase Lon dans de nouvelles directions telles que la recherche d'un lien avec la composition de la chaîne respiratoire ou la signalisation rétrograde ainsi que les effets d'une surexpression de Lon ou d'une sous expression touchant conjointement Lon et ClpP, l'autre protéase de la matrice mitochondriale.



# **Introduction**

## **I- Histoire d'O<sub>2</sub>**

L'histoire de la mitochondrie commence des milliards d'années plus tôt, dans les eaux de surface des océans, lorsqu'une bactérie élu domicile dans un proto-eucaryote. Bien des mystères planent encore sur les premiers instants de la mitochondrie. Toutefois l'origine de la bactérie dont elle provient et de la cellule qu'elle a investie fait aujourd'hui l'objet d'un certain consensus : le premier serait une alphaprotéobactérie et la seconde une archée, apparentée, selon certains auteurs, au super-embranchement des asgard. Toujours est-il que l'un et l'autre y trouvèrent à ce point leur compte que cet arrangement dure toujours (Roger, Munoz-Gomez, and Kamikawa 2017; Thrash et al. 2011; Zachar and Szathmary 2017).

Au cœur de cette théorie de l'endosymbiose, l'oxygène. Dans un environnement où celui-ci allait peu à peu devenir l'élément le plus abondant, l'endosymbiote savait en tirer profit, son hôte s'en accommodait jusqu'alors moins bien. Depuis les relations entre ces deux organismes ont considérablement évolué. Les liens n'ont cessé de se resserrer entre ces deux organismes devenus depuis une cellule eucaryote et une mitochondrie. L'on classe même cette dernière parmi les acquis qui ont rendu possibles les formes de vie complexes (Lane and Martin 2010).

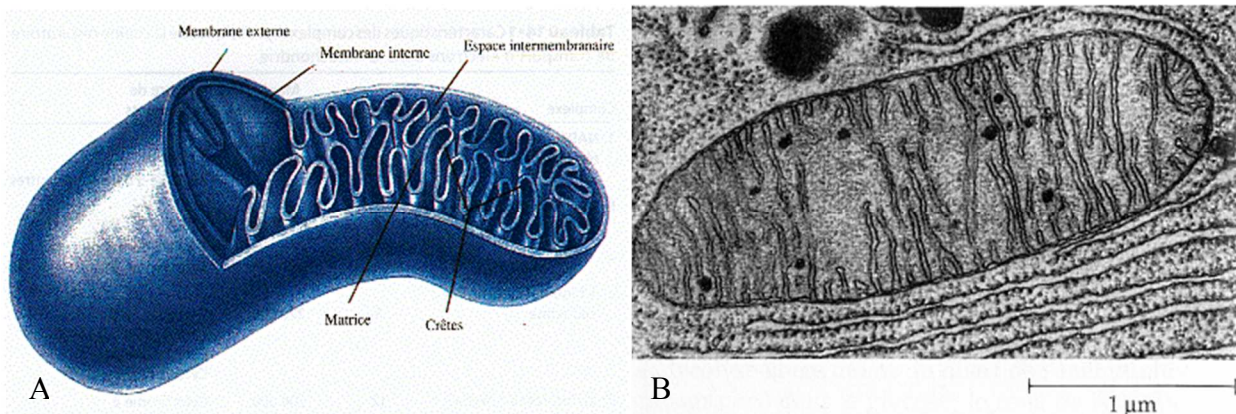
## **II- Structure et fonctions des mitochondries**

### **A) Structure des mitochondries**

#### 1) Quatre compartiments mitochondriaux

La mitochondrie fait partie de la panoplie de la cellule eucaryote au même titre qu'un certain nombre d'autres organelles. L'on ne peut toutefois affirmer que la cellule eucaryote ne peut se passer de ses services sous quelque forme que ce soit, notamment depuis la récente découverte d'un eucaryote totalement dépourvu de mitochondries, l'oxymonade *Monocercomonoides sp.* (Karnkowska et al. 2016) . A l'exception des globules rouges, tous les types cellulaires contiennent des mitochondries, en quantités variant généralement de 1000 à 3000 selon les catégories de cellules, de forme est elle aussi variable, souvent globulaire ou filamenteuse.

Localisée dans le cytoplasme, principalement dans les zones de forte consommation énergétique, la mitochondrie est pourvue d'une double membrane : une membrane externe uniforme et continue, une membrane interne formant des crêtes lui permettant d'accroître sa surface de façon sensible. Ces crêtes sont ainsi plus nombreuses dans les tissus à forte activité respiratoire. Ces deux membranes délimitent deux sous-compartiments : l'espace intermembranaire entre les deux membranes et la matrice délimitée par la membrane interne (Figure 1).



**Figure 1 : structure de la mitochondrie.** A) Schéma de la structure d'une mitochondrie (Source : "Principes de Biochimie" Horton *et al.* (1994) Ed. DeBoeck Universités). B) section longitudinale d'une mitochondrie de pancréas de chauve-souris vue au microscope électronique (Source : <https://icm-institute.org/fr/actualite/nouvel-espoir-parkinson-et-maladie-neurodegeneratives/> ; Mitochondrie – organelle des cellules – centrales énergétiques des cellules © INSERM/Torpiér, Gérard).

Bicouche lipidique de 5 à 7 nm d'épaisseur, la membrane externe a une composition assez proche de celle de la membrane plasmique. Elle est constituée pour 50 à 60% de protéines et 40 à 50 % de lipides, principalement des phospholipides insaturés et peu de cholestérol. Elle est riche en porines ce qui la rend perméable aux ions et molécules de masse moléculaire inférieure à 10 kDa.

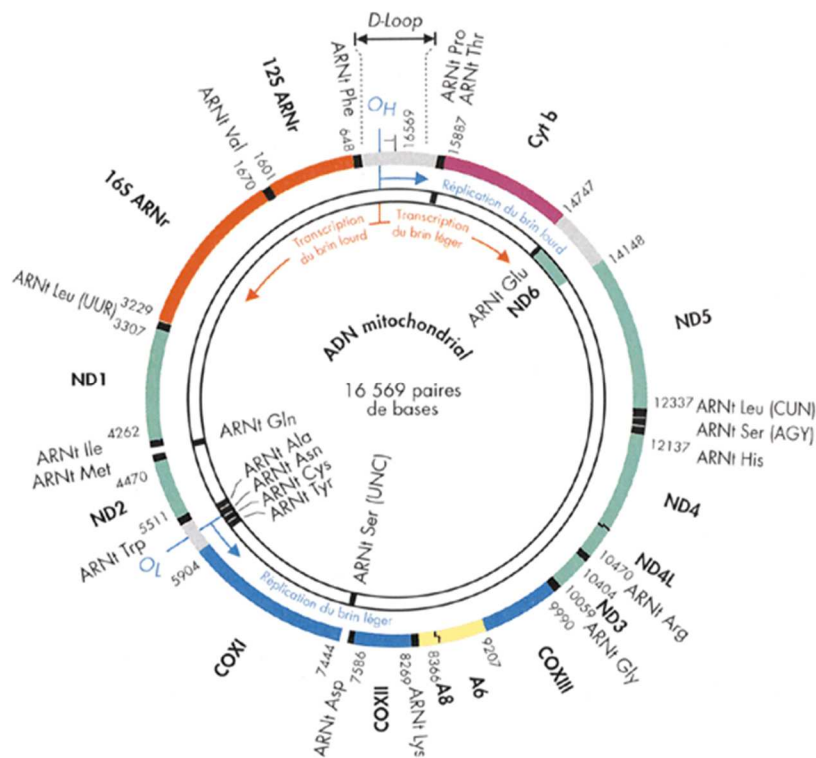
Cette perméabilité aux petites molécules, parmi lesquelles les protons, vaut à l'espace inter-membranaire de présenter un pH équivalent à celui du cytosol. En serré entre les membranes mitochondriales externe et interne, cet espace, bien que très étroit, remplit diverses fonctions essentielles à l'accomplissement de différents processus tels que le transport de protéines, électrons et ions métalliques, l'assemblage de protéines de la membrane interne, la respiration cellulaire, le métabolisme énergétique ou encore l'apoptose.

L'organisation de la membrane interne est très différente de celle de la membrane externe. Constituée pour 80% de protéines et 20% de lipides, elle est pauvre en cholestérol mais

riche en cardiolipine (diphosphatidyl-glycerol). Son protéome comprend notamment des protéines de transport et les complexes protéiques enzymatiques des phosphorylations oxydatives. Sa composition lipidique la rend très imperméable et son franchissement nécessite un transport actif.

Cette différence de perméabilité entre les deux membranes se traduit par une concentration en protons plus basse - donc un pH plus élevé - dans la matrice mitochondriale que dans l'espace inter-membranaire et le cytosol. La matrice renferme un contenu relativement dense, à savoir le génome mitochondrial, des ARN messagers et de transfert, des mitorobosomes, des granules de phosphate de calcium, des cations Ca<sup>+2</sup> et Mg<sup>+2</sup>, de nombreux systèmes enzymatiques,...

## 2) Génome et protéome mitochondriaux



**Figure 2 : structure de l'ADN mitochondrial (d'après P. Rustin, A. Rötig. 1995. Mécanismes moléculaires des cytopathies mitochondriales. Med Therap 1 : 435-447).** D-loop : boucle de déplacement. OH, OL : origines de réplication des brins lourd et léger ; ND1, ND2, ND3, ND4, ND5, ND6 : NADH déshydrogénase 1-6 (complexe 1) ; cyt b : cytochrome b (complexe III) ; COX I, COX II, COX III : cytochrome c oxydase I à III (complexe IV) ; A6, A8, ATPase 8 (complexe V). Les traits noirs représentent les 22 ARN de transfert

La mitochondrie possède son propre génome hérité de son origine endosymbiotique. Ce double brin d'ADN circulaire est composé de 16 569 paires de bases chez l'homme. Il est localisé dans la matrice mitochondriale où sa présence en plusieurs copies induit une situation

d'hétéroplasmie, hétéroplasmie à laquelle se superpose un grand polymorphisme.

Pourquoi la mitochondrie a-t-elle conservé son propre génome ? Parmi les différentes hypothèses susceptibles d'expliquer cette particularité, deux semblent aujourd'hui se détacher du lot. L'une repose sur l'intérêt d'une co-localisation du gène et de son produit dans le cadre de la régulation redox (co-location for redox regulation (CoRR) hypothesis). Selon cette hypothèse, la modulation de l'expression de gènes codant des composants de la chaîne respiratoire doit, pour être efficace, répondre à une perception in situ des variations de l'état redox (Allen 2015) . La seconde explication en vue actuellement se fonde sur le fait que les protéines codées par le génome mitochondrial sont généralement d'imposantes structures hydrophobes à domaines transmembranaires qui sont souvent déroutées vers le réticulum endoplasmique lorsqu'elles transitent par le cytosol (Bjorkholm et al. 2017).

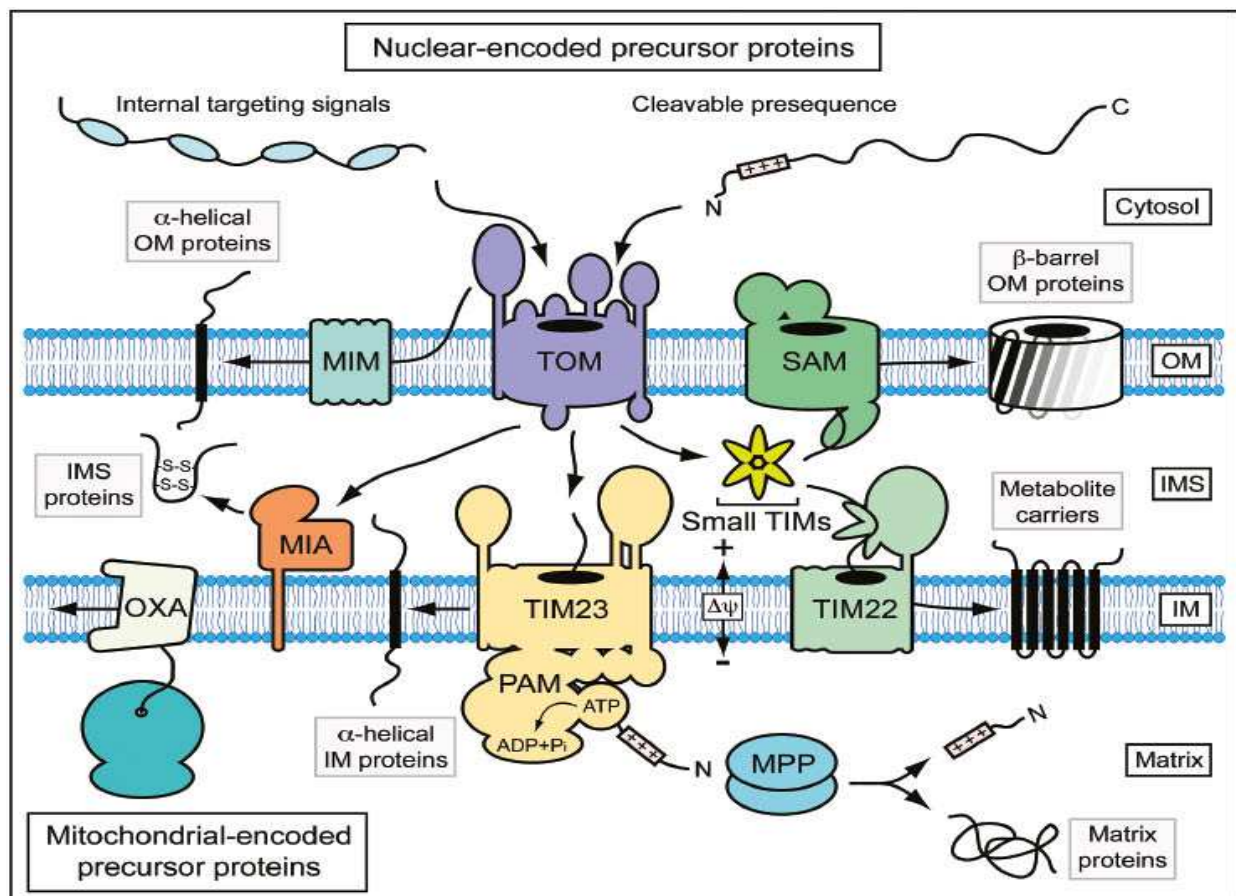
L'ADN mitochondrial des mammifères est codant sur toute sa longueur excepté au niveau d'une séquence, la boucle D, qui renferme les origines de réplication des chaînes lourde et légère ainsi que les deux promoteurs de transcription de ce génome. Chez l'homme, celui-ci contient 37 gènes codant 13 chaînes polypeptidiques, 22 ARNt et les ARNr 12S et 16S des ribosomes mitochondriaux (Figure 2).

Le code génétique utilisé par la mitochondrie est différent de celui qui préside à la traduction des gènes nucléaires (Boos, Wollin, and Herrmann 2016). Comparée à la synthèse protéique cytoplasmique, la machinerie de traduction mitochondriale a recours à un nombre d'ARN de transfert beaucoup plus restreint. En compensation, ceux-ci sont capables de déchiffrer plus de codons. Pour l'exemple, l'ARNt<sup>Met</sup> qui, canoniquement, reconnaît le codon AUG, se lie aussi au codon AUA dans la mitochondrie des mammifères ainsi qu'au codon AUU dans le cas particulier du codon d'initiation de la sous-unité ND2 de la NADH déshydrogénase. Il en résulte un contenu en méthionines plus important dans les protéines mitochondriales que dans le reste de la cellule. Il s'agirait là d'une stratégie antioxydante de la mitochondrie exploitant les aptitudes des méthionines à l'oxydation puis à être réduites par un système dédié à cette opération (Bender A 2008).

Cependant, la part du protéome mitochondrial codé par le génome mitochondrial est très minoritaire puisque, chez l'homme, on estime qu'il est à l'origine de moins de 1% des 1000 à 1500 protéines différentes recensées dans la mitochondrie. Les quelque 99% restants sont le fait du génome nucléaire. Environ 6% des protéines mitochondriales sont localisées dans la

membrane externe, à peu près autant dans l'espace inter-membranaire, 21% dans la membrane interne et donc environ les deux tiers dans la matrice (Distler, Kerner, and Hoppel 2008). Cette prépondérance du génome nucléaire dans la synthèse des protéines mitochondriales nécessite donc l'intervention d'un système de transport entre le cytoplasme et la mitochondrie.

### 3) Importation des protéines dans la mitochondrie



**Figure 3: importation des protéines en provenance du cytoplasme dans la mitochondrie (d'après Straub et al. 2016).** Les protéines en provenance du cytosol empruntent le canal TOM (translocase of the outer membrane). Divers complexes procèdent ensuite au tri des précurseurs et à leur transformation en protéines matures selon leur destination : membrane externe (OM), espace inter-membranaire (IMS), membrane interne (IM) ou matrice. Ces complexes sont notamment : MIA (mitochondrial IMS assembly), TIM23 et TIM22 (translocases of the inner membrane), PAM (presequence translocase-associated motor), MPP (mitochondrial processing peptidase), SAM (sorting and assembly machinery), MIM (mitochondrial import complex) et la translocase OXA (oxidase assembly).

La grande majorité des protéines mitochondriales voient ainsi le jour dans le cytosol sous la forme de précurseurs dotés d'un signal d'adressage vers la mitochondrie. Ces séquences signal sont de différentes natures, le plus souvent une préséquence clivable en N-ter, parfois une séquence interne non clivable. Il existe différentes voies de translocation dans la mitochondrie (Straub et al. 2016), (Dudek, Rehling, and van der Laan 2013).

Quelle que soit leur destination finale dans le compartiment mitochondrial, les protéines importées doivent d'abord intégrer la membrane externe (Figure 3). La plupart le font via le canal Tom40 de la translocase TOM (translocase of the outer membrane) dont les récepteurs reconnaissent les séquences d'adressage à la mitochondrie.

Les protéines destinées à la matrice sont ensuite dirigées vers TIM23 (translocase of the inner mitochondrial membrane). Elles perdent alors leur préséquence sous l'action de la peptidase MPP puis sont transférées dans la matrice avec le concours de la translocase PAM. Ce transport mobilise des protéines chaperonnes ainsi que deux sources d'énergie, l'ATP et la différence de potentiel de part et d'autre de la membrane interne.

Des précurseurs contenant une séquence hydrophobe d'arrêt de transfert empruntent eux aussi le canal TIM23 d'où ils sont latéralement libérés dans la membrane interne. Non clivables, les précurseurs des protéines de transport des métabolites ancrées dans cette même membrane, sont eux d'abord pris en charge par le complexe Tim9-Tim10 (small TIMs) dans l'espace inter-membranaire, à la sortie de TOM. Ces protéines sont ensuite insérées par la translocase TIM22 sous l'action du seul potentiel de membrane. La translocase OXA (oxidase assembly) a elle aussi un rôle central dans la biogénèse de la membrane interne. En charge de l'intégration des composants de la chaîne respiratoire codés par le génome mitochondrial, elle intervient également dans l'import de nombreuses protéines à domaines transmembranaires codées par l'ADN nucléaire. Pour cette seconde mission, OXA coopère avec le module TIM23-PAM (Stiller et al. 2016).

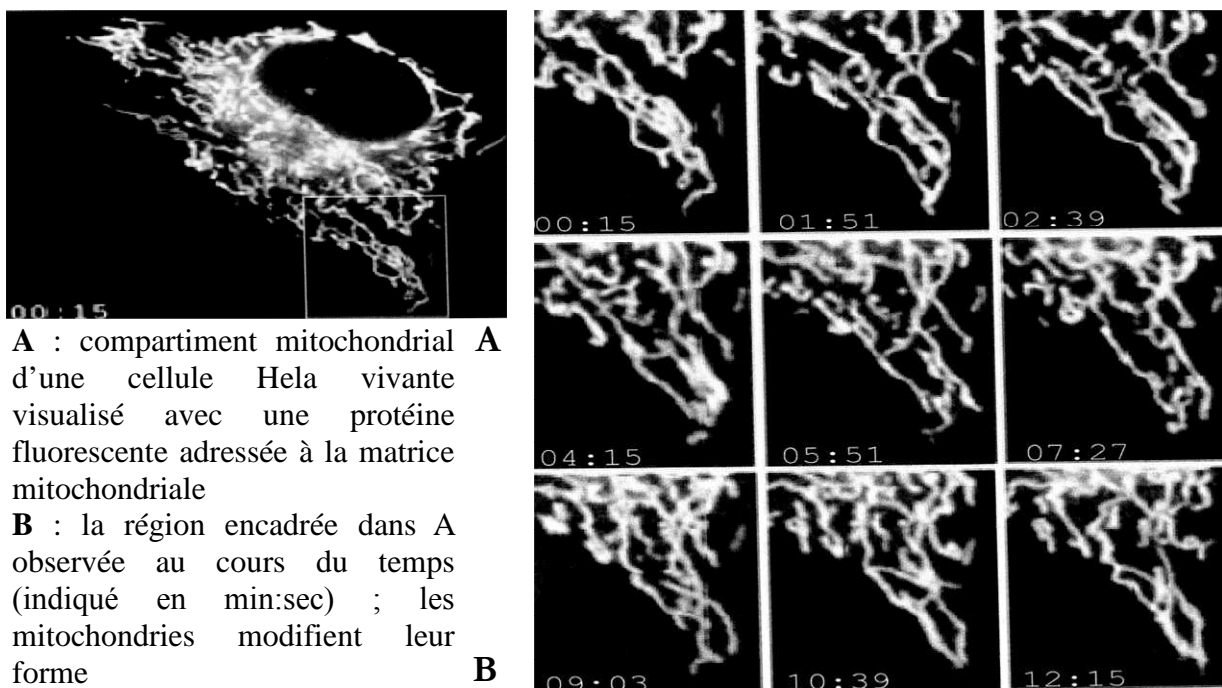
De nombreuses protéines de l'espace inter-membranaire doivent leur localisation à des motifs cystéine caractéristiques. Après leur passage par le canal TOM, ces protéines sont adressées à la machinerie MIA (Mitochondria Intermembrane space Assembly) qui assure l'oxydation de ces motifs cystéine via l'oxydoréductase Mia40. S'en suit la formation de ponts disulfure et l'acquisition d'une conformation qui garantit la séquestration de ces protéines dans l'espace inter-membranaire (Koch and Schmid 2014).

Les précurseurs des protéines en tonneau  $\beta$  de la membrane externe gagnent d'abord l'espace inter-membranaire via TOM puis leur destination finale par l'intermédiaire des complexes Tim9-Tim10 et SAM (sorting and assembly machinery). La membrane externe renferme également des protéines membranaires à segments transmembranaires en hélice  $\alpha$ . Une partie d'entre elles est insérée par le complexe MIM (mitochondrial import complex) sans

passer par TOM qui peut toutefois intervenir dans la reconnaissance des précurseurs de ces protéines (Wenz et al. 2014). Il semble que certaines protéines, en particulier des précurseurs portant une ancre en C-ter, intègrent la membrane interne sans l'intercession d'un dispositif d'importation (Dudek, Rehling, and van der Laan 2013).

#### 4) Dynamique mitochondriale

Les mitochondries sont des organelles très dynamiques dont la morphologie, la distribution et l'activité peuvent être régulées par des phénomènes de fusion et de fission. Les mitochondries peuvent ainsi revêtir des formes variées allant d'un réseau de longs tubules interconnectés à un ensemble de petites sphères individuelles, d'où leur nom issu de deux mots grecs : mitos (filament) et chondros (granule) (Malka F 2004). La morphologie du réseau mitochondrial varie selon le type tissulaire. Dans le foie, les mitochondries apparaissent comme des organelles individuelles arrondies. Dans les fibroblastes, 80% des mitochondries sont sous forme filamenteuse, 5 à 6% sous forme intermédiaire et le reste est fragmenté.

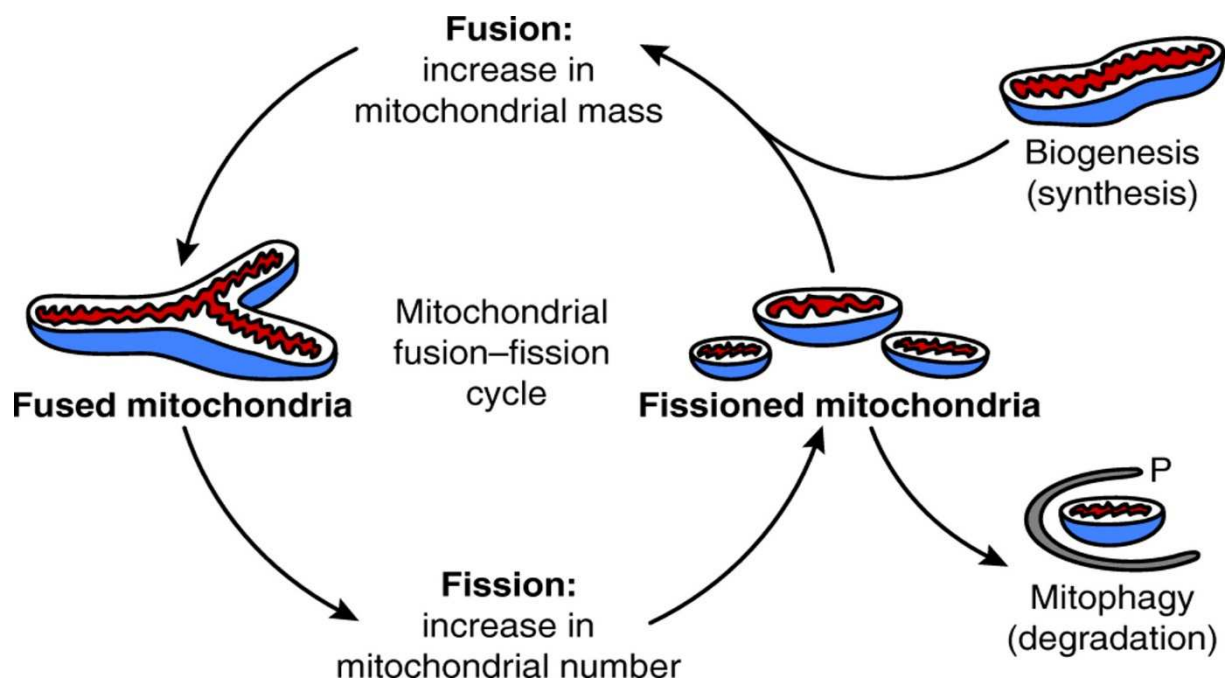


**Figure 4 : dynamique du compartiment mitochondrial (d'après Malka et al., 2004)**

Les méthodes d'analyse in vivo, avec des marqueurs fluorescents des mitochondries, ont montré que les variations de la morphologie mitochondriale sont constantes dans les cellules vivantes (Figure 4). Ces changements reposent sur le mouvement des mitochondries mais aussi sur des phénomènes de fusion et de fission membranaires.



Chez l'homme les principaux acteurs de cette dynamique mitochondriale sont les GTPases DRP1 pour la fission, OPA1, Mitofusines 1 et 2 (MFN1 et 2) pour la fusion (Thornton et al. 2017), (Meyer, Leuthner, and Luz 2017), (Gottlieb and Bernstein 2016). En régulant la morphologie du compartiment mitochondrial, ces mécanismes de fusion-fission influencent le nombre, la distribution subcellulaire et la fonction des mitochondries. Leur contribution à l'homéostasie mitochondriale et à la réponse au stress est cruciale. Les mouvements de fission sont nécessaires à la division cellulaire, la biogénèse mitochondriale et participent du contrôle qualité dans la mitochondrie. Les épisodes de fusion permettent d'accroître la production d'énergie et de brasser le contenu mitochondrial.



**Figure 5 : fusion, fission, biogénèse et dégradation mitochondriales (d'après Seo et al. 2010).** La dynamique mitochondriale est rythmée par des phénomènes de fusion et fission contribuant au maintien de l'homéostasie. Les mitochondries dysfonctionnelles sont éliminées par mitophagie et la population mitochondriale est renouvelée par biogénèse.

La masse et les effectifs mitochondriaux sont régulés par cette dynamique puisque son intervention est indispensable à la biogénèse des mitochondries et à leur dégradation par mitophagie (Figure 5). La biogénèse mitochondriale dépend à la fois de la fission de mitochondries existantes et d'un programme de transcription et traduction principalement régulé par trois facteurs de transcription : PGC-1 $\alpha$  et NRF-2 au niveau nucléaire, TFAM au niveau mitochondrial (Thornton et al. 2017), (Gottlieb and Bernstein 2016). Destinée à débarrasser la cellule des mitochondries endommagées, la mitophagie est elle aussi amorcée par des mouvements de fission. Le relai est pris par la kinase mitochondriale PINK1 qui s'accumule dans les mitochondries dysfonctionnelles et recrute l'ubiquitine ligase Parkin. Le

processus se poursuit par la séquestration de la mitochondrie dans un autophagosome et sa dégradation par la voie lysosomale (Meyer, Leuthner, and Luz 2017).

## B) Fonctions des mitochondries

### 1) Métabolisme énergétique

Les missions de la mitochondrie sont multiples mais s'il en est une qui s'impose comme "la" fonction mitochondriale c'est bien celle de centrale énergétique de la cellule. C'est dans la mitochondrie qu'ont rendez-vous deux voies métaboliques majeures, la glycolyse et la phosphorylation oxydative. Brièvement la première exerce dans le cytosol où elle se charge de l'oxydation du glucose en pyruvate. Ce dernier pénètre ensuite dans la matrice mitochondriale où, en conditions aérobies, il est transformé en acétyl-CoA avant que son oxydation complète soit effectuée par le cycle de Krebs. Il en résulte une production de NADH, H<sup>+</sup> et/ou FADH<sub>2</sub> qui seront à leur tour oxydés par la chaîne respiratoire.

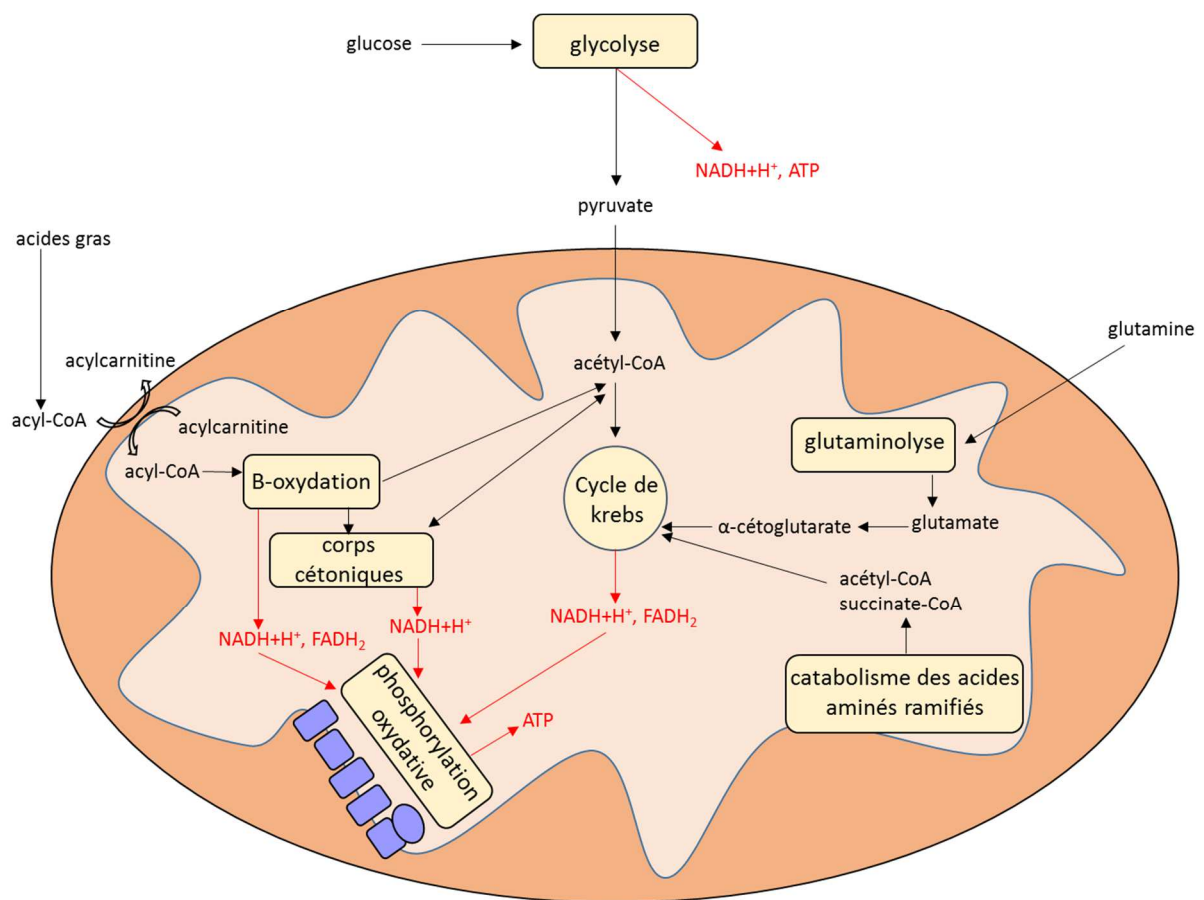


Figure 6 : voies du métabolisme énergétique impliquant la mitochondrie

Bilan : une molécule de glucose fournit 2 ATP via la glycolyse dans le cytoplasme et 38 ATP au terme de la phosphorylation oxydative dans la mitochondrie. L'on comprend dès lors l'importance de ce qui se joue dans le secret de la matrice mitochondriale d'autant que celle-ci abrite d'autres sources d'énergie plus ou moins actives selon les tissus (Demine et al. 2014), à savoir (Figure 6)

- la  $\beta$ -oxydation : dans le cytosol, les acides gras sont convertis en acyl-CoA ; importé dans la mitochondrie par la carnitine-acylcarnitine translocase, celui-ci subit une oxydation qui contribue au ravitaillement du cycle de Krebs en acétyl-CoA et de la chaîne respiratoire en NADH et FADH<sub>2</sub> (Houten et al. 2016)

- la glutaminolyse : la glutamine importée dans la mitochondrie est transformée en glutamate par la glutaminase ; la déamination du glutamate aboutit à la formation d' $\alpha$ -cétoglutarate que le cycle de Krebs va pouvoir utiliser (Altman, Stine, and Dang 2016)

- le catabolisme des acides aminés ramifiés : outre la dégradation de la glutamine, la mitochondrie est aussi impliquée dans le catabolisme de l'isoleucine, la leucine et la valine ; leur transformation, soit en acétyl-CoA soit en succinate-CoA, alimente également le cycle de Krebs (Zhang et al. 2017)

- le métabolisme des corps cétoniques peut aussi être ajouté à cette liste de sources d'énergie : issus de la  $\beta$ -oxydation, ils peuvent être dégradés en acétyl-CoA par la mitochondrie, une transformation qui libère du NADH (Grabacka et al. 2016)

Le métabolisme énergétique participe des multiples fluctuations qui accompagnent les divers événements de la vie de la cellule et que la mitochondrie relaie bien souvent compte tenu de sa position stratégique dans la production d'énergie. Principalement dépendante de la phosphorylation oxydative mitochondriale en conditions normales, la cellule différenciée se met à privilégier la glycolyse lorsqu'elle entre en prolifération sous l'influence d'un processus cancéreux. C'est ce que l'on appelle l'effet Warburg (de Alteriis et al. 2018). Bien que les raisons de cette politique énergétique ne soient toujours pas clairement élucidées, il est évident que ce choix est particulièrement bénéfique à la prolifération cellulaire. La cellule sénescence en culture adopte la même tactique (Wiley and Campisi 2016). Certes elle ne prolifère pas mais elle grossit et il s'agirait pour elle, comme pour la cellule cancéreuse, de favoriser la glycolyse pour sa capacité à procurer les précurseurs nécessaires pour satisfaire une forte demande en

protéines, lipides et autres composants de la cellule. La mitochondrie peut même être à l'origine du changement de métabolisme énergétique constaté dans la cellule en sénescence puisqu'une dysfonction mitochondriale peut induire un phénotype sécrétoire associé à la sénescence (Wiley et al. 2016). Quant au stress oxydant issu d'une dysfonction mitochondriale, il en résulte une reprogrammation métabolique qui se traduit par une activité accrue de la glycolyse anaérobie. Cette réorientation peut également être assimilée à une stratégie de défense anti oxydante via la production de NADPH par le segment oxydatif de la voie des pentoses phosphates (Wu, Wu, and Wei 2014).

## 2) Autres fonctions mitochondriales

Les compétences de la mitochondrie ne se limitent pas au métabolisme énergétique. Ses états de service témoignent de fonctions variées, plus ou moins développées selon les lignées eucaryotes et les tissus d'un même organisme (Sack 2011), parmi lesquelles :

- l'apoptose : l'une des voies de l'apoptose passe par la mitochondrie ; cette voie mitochondriale, encore appelée voie intrinsèque, est stimulée par des événements menaçant l'homéostasie cellulaire ; s'en suit une activation de la BH3-only protéine qui va et inhiber l'action du facteur anti-apoptotique Bcl-2 et activer les pro-apoptiques Bax et Bak au niveau de la membrane mitochondriale externe dont l'étanchéité est alors altérée ; la sortie du cytochrome c dans le cytosol déclenche alors une cascade apoptotique caspase-dépendante (Lomonosova and Chinnadurai 2008), (Wang and Youle 2009). Il existe aussi une mort cellulaire caspase-indépendante impliquant la mitochondrie (Tait and Green 2008).

- l'homéostasie calcique : la mitochondrie est un pilier de la gestion des stocks de calcium et de la signalisation calcique ; équipée pour collecter et relâcher les ions  $Ca^{2+}$ , elle utilise cette ressource pour intervenir dans la régulation de divers processus mitochondriaux et cellulaires tels que le métabolisme énergétique, la croissance, la prolifération, la différenciation et la mort cellulaires, la libération des neurotransmetteurs, la dynamique mitochondriale,... (Bravo-Sagua et al. 2017), (Arduino and Perocchi 2018)

- la stéroïdogénèse : la contribution de la mitochondrie à la stéroïdogénèse est importante ; la synthèse des hormones stéroïdes est assurée dans différents tissus à partir du cholestérol ; celui-ci est importé dans la mitochondrie par le transporteur StAR (steroidogenic acute regulatory protein) ; il est alors transformé en prégnénolone sous l'action de l'enzyme

P450sc<sub>c</sub> ; la prégnénolone est ensuite exportée de la mitochondrie, les étapes finales de la stéroïdogénèse se déroulant hors du compartiment mitochondrial (Miller 2013), (Papadopoulos and Miller 2012)

Pour en terminer avec le savoir-faire de la mitochondrie, on peut également citer sa contribution à la signalisation redox (cf infra), à la synthèse des phospholipides, des cytochromes et des centres fer-soufre, au cycle de l'urée, à l'homéostasie ionique, des lipides, glucides et protéines ainsi qu'à la thermogénèse.

### **III- La mitochondrie dans le stress oxydant**

#### **A) De l'homéostasie au stress**

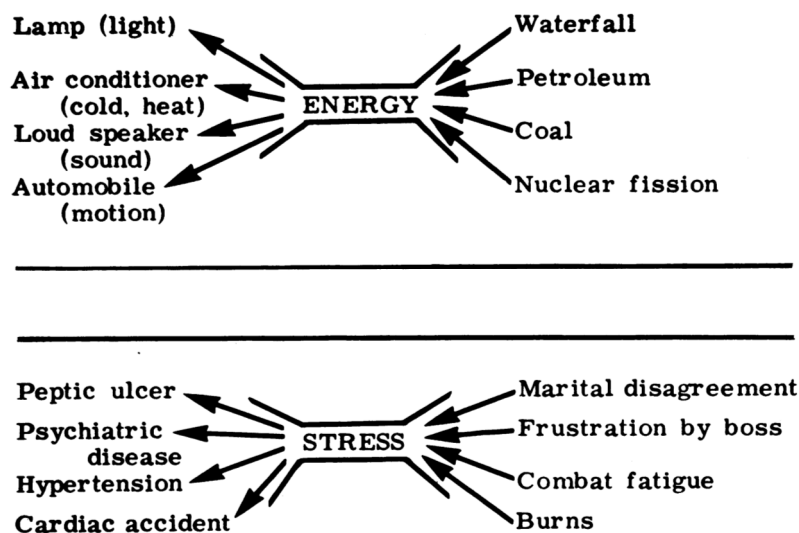
La notion de stress est liée à celle d'homéostasie en ce sens que le premier naît d'une situation qui vient perturber la seconde. L'homéostasie découle du concept de milieu intérieur décrit au XIX<sup>ème</sup> siècle par le célèbre physiologiste français Claude Bernard (Cooper 2008). Selon lui, "*chez les êtres vivants élevés, il y a au moins deux milieux à considérer*" : le milieu intérieur "*dans lequel vivent les éléments des tissus*", et le milieu extérieur "*dans lequel est placé l'organisme*".

Considérant qu'il existe différentes formes de vie selon "*le mode des relations entre l'être vivant et les conditions cosmiques ambiantes*", Claude Bernard attribue "*aux animaux les plus élevés en organisation*" une "*forme de vie constante ou libre*" en ce sens que leur vie "*s'écoule d'un cours constant et indifférent en apparence aux... changements des conditions matérielles qui entourent l'animal. Les organes, les appareils, les tissus fonctionnent d'une manière sensiblement égale... Il en est ainsi parce qu'en réalité le milieu intérieur qui enveloppe les organes, les tissus, les éléments des tissus, ne change pas... La fixité du milieu intérieur est la condition de la vie libre, indépendante : le mécanisme qui la permet est celui qui assure dans le milieu intérieur le maintien de toutes les conditions nécessaires à la vie des éléments... La fixité du milieu suppose un perfectionnement de l'organisme tel que les variations externes soient à chaque instant compensées et équilibrées*" (Bernard 1865), (Bernard 1878).

Cette fixité du milieu, c'est l'homéostasie telle que la définira dans les années 1920 le physiologiste américain Walter Cannon. Puisque c'est à lui que l'on doit ce terme, laissons-le

s'en expliquer : "les réactions physiologiques coordonnées qui assurent la plupart des états d'équilibre dans le corps sont si complexes et si particulières aux organismes vivants qu'il a été suggéré (Cannon, 1926) d'employer une désignation spécifique pour ces états, l'homéostasie" (Cannon 1929). Quant à la justification étymologique de ce terme qui assemble deux mots d'origine grecque, Cannon précise qu'il a choisi stasis ("immobilisme, état d'inertie") pour évoquer la constance et homeo ("semblable") pour nuancer cette invariabilité.

L'homéostasie impose donc à une série de paramètres le respect de valeurs qui peuvent toutefois varier à l'intérieur d'un intervalle. Des valeurs en dehors de cet intervalle génèrent un stress auquel l'organisme doit répondre pour restaurer l'homéostasie (Goldstein and Kopin 2007). C'est à Hans Selye, médecin d'origine hongroise, que l'on doit la popularisation du concept de stress dans les années 1950. Selon lui le stress est la réponse non spécifique du corps à une demande. Pour lui sont non spécifiques les réponses identiques apportées à des stimuli différents (figure 7) (Selye 1976).



**Figure 7 : le stress selon Hans Selye (d'après Selye et al. 1976).** "Chaque résultat (à gauche) est spécifique, chaque agent causal (à droite) est spécifique. Toutefois, il n'y a là que des résultats non spécifiques du fait qu'ils doivent tous en passer par une voie commune. Aucune connexion directe n'est possible entre un résultat et une cause."

Depuis la notion de stress a évolué. La version moderne le considère comme une menace à l'homéostasie détectée consciemment ou non et assortie d'une réponse dont le degré de spécificité dépend entre autres du défi particulier posé à l'homéostasie ainsi que de la perception par l'organisme et du facteur de stress et de sa capacité à y faire face (Goldstein and Kopin 2007).

## B) Stress et eustress oxydants dans la mitochondrie

Qu'elles soient internes à la cellule où le fruit de facteurs environnementaux, les catégories de stress ne manquent pas que ce soit le froid, la chaleur, l'exercice, la privation de

nourriture, l'hypoxie ou l'anoxie, les toxines, les métaux lourds, le stress mécanique, le sel, l'alcool, le stress osmotique,... (Davies 2016). Toutefois s'il est un type de stress auquel la mitochondrie est particulièrement exposée c'est le stress oxydant.

Le concept de stress oxydant a été introduit dans la recherche en biologie il y a un peu plus de 30 ans comme un déséquilibre de la balance pro-oxydants-antioxydants en faveur des premiers (Sies, Berndt, and Jones 2017). Depuis, les limites de cette définition ont peu à peu émergé. Des conclusions peu convaincantes quant aux bénéfices du recours à des thérapies à base d'antioxydants, le constat de systèmes redox fonctionnant sur des pools en déséquilibre et la prise de conscience de l'importance du rôle des voies de signalisation redox ont amené à considérer désormais le stress oxydant comme une perturbation de la signalisation et du contrôle redox (Jones 2006), (Sies 2015)

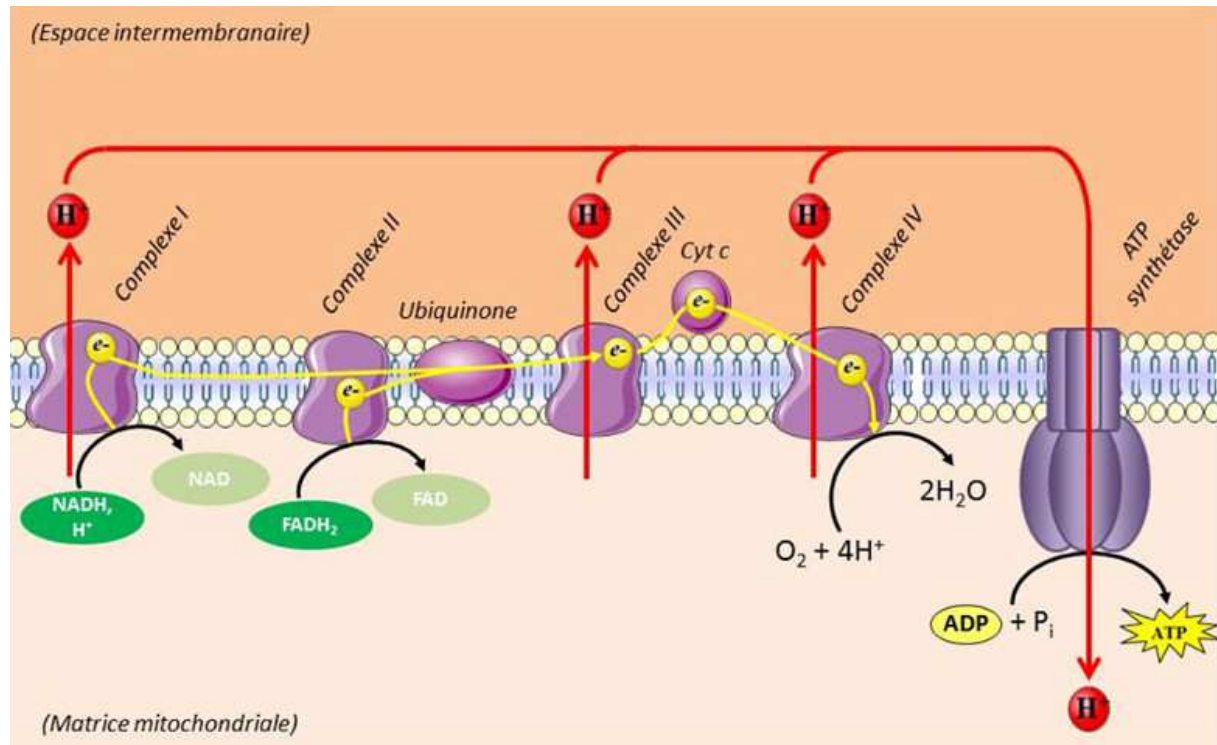
radicaux libres	Espèces non radicalaires
$O_2^{\cdot -}$ anion superoxyde	$H_2O_2$ peroxyde d'hydrogène
$HO_2^{\cdot}$ radical hydroperoxyde	ROOH hydroperoxyde
$OH^{\cdot}$ radical hydroxyle	HOBr acide hypobromeux
$RO_2^{\cdot}$ radical peroxyde	HOCl acide hypochloreux
$RO^{\cdot}$ radical alkoxyde	$O_3$ ozone
$CO_3^{\cdot -}$ anion carbonate	$^1O_2$ oxygène singulet
$CO_2^{\cdot -}$ dioxyde de carbone	ONOO <sup>-</sup> anion peroxydinitrite
$O_2^{\cdot -}$ anion oxygène singulet	ONOOH acide peroxydinitrique
	$O_2NOO^{\cdot -}$ anion peroxydinitrate
	ONOCOO <sub>2</sub> <sup>-</sup> anion
	HOOCO <sub>2</sub> <sup>-</sup> anion

**Tableau 1 : nomenclature des principales espèces réactives de l'oxygène (d'après Halliwell et al. 2008)**

Une évolution qui a débouché sur l'entrée en scène de la notion d'eustress oxydant. Comme l'indique le préfixe "eu", que la langue grecque utilise pour signifier bien ou bon, l'eustress oxydant désigne une production d'agents oxydants dans des proportions compatibles avec une signalisation redox contrôlée et donc de nature à préserver l'homéostasie. Par opposition, le stress oxydant qualifie une formation d'agents oxydants ayant atteint un niveau dépassant les capacités de réponse de la cellule, provoquant ainsi une perturbation de la signalisation redox et des dommages à l'origine d'états pathologiques (Go and Jones 2017), (Roy et al. 2017).

Les espèces réactives de l'oxygène (ERO) figurent parmi les protagonistes majeurs du versant redox de la vie de la cellule, qu'elles soient les docteurs Jekyll de l'eustress oxydant ou les misters Hyde du stress oxydant. On peut les classer en deux catégories : les radicaux libres qui possèdent au moins un électron non apparié sur leur couche périphérique et les espèces non radicalaires qui sont dépourvues de ces électrons célibataires (Tableau 1).

### 1) Chaîne respiratoire et production d'espèces réactives de l'oxygène



**Figure 8 : schéma de la chaîne respiratoire** (source: <http://encyclopedie-energie.org/articles/conversion-de-l'energie-chimique-des-plantes-en-energie-musculaire> ; De Leiris J, Boucher F, Tanguy S ,2015). Complexe I : NADH-coenzyme Q réductase ; complexe II : succinate-coenzyme Q réductase ; complexe III : coenzyme Q-cytochrome c réductase ; complexe IV : cytochrome c oxydase.

Grande pourvoyeuse d'espèces réactives de l'oxygène, la mitochondrie doit cette réputation au fonctionnement de la chaîne respiratoire.

Localisée dans la membrane interne mitochondriale, la chaîne respiratoire est constituée de quatre complexes (Figure 8) :

- complexe I à activité NADH-coenzyme Q oxidoréductase : il récupère les électrons du NADH qu'il oxyde en  $\text{NAD}^+$ , réduit l'ubiquinone en ubiquinol et permet le transport de 4 protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire.



- complexe II à activité succinate-coenzyme Q oxidoréductase : il récupère les électrons du FADH<sub>2</sub> qu'il oxyde en FAD, réduit aussi l'ubiquinone en ubiquinol mais n'assure pas le transport de protons ; il exécute également une des réactions du cycle de Krebs, à savoir l'oxydation du succinate en fumarate

- complexe III à activité coenzyme Q-cytochrome c oxidoréductase : il transfère les électrons de l'ubiquinol au cytochrome c et permet le transport de 4 protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire

- complexe IV à activité cytochrome c oxydase : il permet le transport de 2 protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire et utilise quatre électrons pour réduire complètement en eau une molécule de dioxygène selon la réaction  $O_2 + 4 e^- + 4 H^+ \rightarrow 2 H_2O$

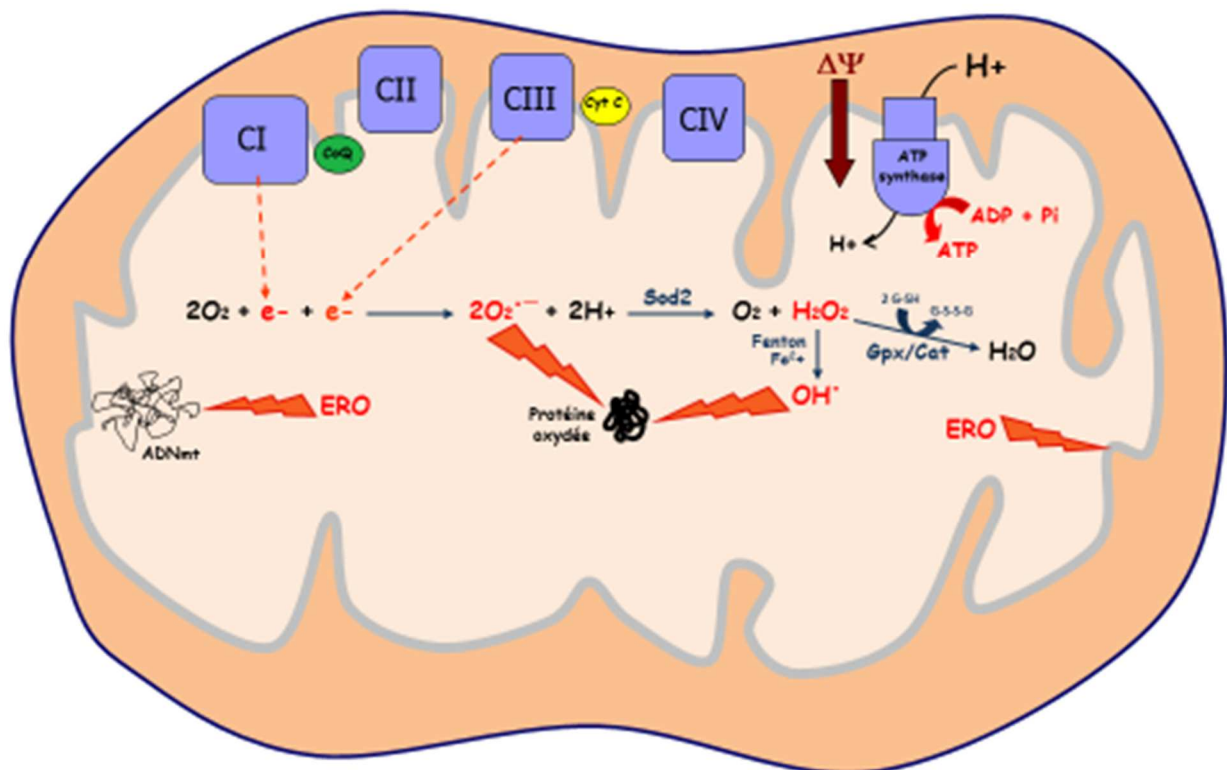
Le transfert des électrons issus du NADH et du FADH<sub>2</sub> entre ces différents complexes est assuré par deux transporteurs mobiles : le coenzyme Q (ou ubiquinone) entre les complexes I ou II d'une part et le complexe III d'autre part, le cytochrome c entre les complexes III et IV. Il existe également un flux reverse d'électrons au travers du complexe I. Sur mitochondries isolées, lorsque le succinate est le seul substrat énergétique de la chaîne respiratoire, ce flux reverse d'électrons permet la réduction du NAD en NADH. Les facteurs contrôlant ce mécanisme sont la force protomotrice, le rapport NADH/NAD et le statut d'oxydoréduction des quinones (Batandier et al. 2006).

La chaîne respiratoire ré-oxyde ainsi les molécules de coenzymes qui ont été réduites lors des différentes réactions d'oxydation subies par les substrats métaboliques dans le cytosol et dans la matrice mitochondriale. Le transfert d'électrons consécutif à cette chaîne de réactions d'oxydoréduction s'accompagne d'une accumulation de protons dans l'espace inter-membranaire à l'origine d'un gradient électrochimique de part et d'autre de la membrane mitochondriale interne. Le passage de protons de l'espace intermembranaire vers la matrice, à travers le canal à protons de l'ATP synthétase (complexe V), permet la dissipation de ce gradient et la catalyse de la réaction de synthèse d'ATP à partir d'ADP et de phosphate inorganique (P<sub>i</sub>).

La circulation d'électrons au long de la chaîne respiratoire s'accompagne donc d'un pompage de protons de la matrice vers l'espace inter-membranaire. Le gradient de pH et le potentiel membranaire qui en résultent constituent une force protomotrice utilisée par l'ATP

synthétase pour phosphoryler l'ADP en ATP. La chaîne respiratoire est donc le siège d'une série de phosphorylations oxydatives couplant l'oxydation du NADH et du FADH<sub>2</sub> à la phosphorylation de l'ADP. Selon la théorie chimio-osmotique formulée par Peter Mitchell en 1961, le gradient de concentration de protons créé à travers la membrane sert de réservoir d'énergie libre pour la synthèse d'ATP (Mitchell 1961).

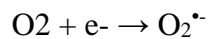
Cependant, une partie de l'oxygène parvenant à la mitochondrie n'est pas totalement réduite en eau par la phosphorylation oxydative. La formation d'ERO résultant de cette réduction incomplète vaut à la mitochondrie de se classer en tête des sources d'ERO dans la cellule.



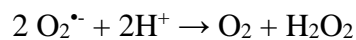
**Figure 9 : formation des espèces réactives de l'oxygène dans la mitochondrie.** Des anions superoxydes se forment suite à la réaction de dioxygène avec des électrons célibataires circulant dans la chaîne respiratoire. Une réaction de dismutation catalysée par la Sod2 aboutit ensuite à la formation de peroxyde d'hydrogène dont la décomposition via une réaction de Fenton peut générer le radical hydroxyle OH<sup>•</sup> (Sod2 : superoxyde dismutase 2 ; Gpx : glutathion peroxydase ; Cat : catalase).

Comment se produisent ces réductions incomplètes de l'oxygène (Figure 9) ? Les électrons issus des substrats réduits par les complexes I, II et autres déshydrogénases entrent par paires dans la chaîne respiratoire. Toutefois, certains sites de cette chaîne, comme les centres fer-soufre, les flavines ou les quinones, n'acceptent les électrons qu'un par un. Ces électrons célibataires sont alors susceptibles de réagir directement avec l'oxygène plutôt que de

continuer leur parcours dans la chaîne respiratoire en direction du complexe IV. Cette réduction monoélectrique du dioxygène aboutit à la formation d'anions superoxydes selon la réaction :



Deux anions superoxydes peuvent ensuite former du peroxyde d'hydrogène par un processus de dismutation catalysé par une superoxyde dismutase, la Mn-Sod2 en l'occurrence puisqu'il s'agit de l'isoforme de superoxyde dismutase présente dans la mitochondrie. On obtient la réaction :



Enfin, l'oxydation du fer ferrique par le peroxyde d'hydrogène génère le radical hydroxyle  $\text{OH}^{\bullet}$  via la réaction de Fenton :



## 2) Les sources d'espèces réactives de l'oxygène dans la mitochondrie

Les différents complexes assurant la phosphorylation oxydative n'ont pas tous la même responsabilité dans la production des ERO. Têtes de liste au banc des accusés : les complexes I et III (Chen et al. 2003), (Lambert and Brand 2009).

Les centres redox du complexe I sont constitués d'une flavine mononucléotide, de nombreux centres fer-soufre et d'un site de fixation de l'ubiquinone. Ce complexe peut engendrer des ERO, semble-t-il exclusivement dans la matrice mitochondriale, dans deux modes de fonctionnement : en flux classique et en flux reverse d'électrons, ce dernier étant particulièrement générateur d'anions superoxydes. En flux classique, la production d'anions superoxydes par le complexe I est liée au ratio  $\text{NADH}/\text{NAD}^+$ . Plus ce ratio est élevé et plus il génère d'anions superoxydes (Hirst 2013), (Lambert and Brand 2009).

En ce qui concerne le complexe III, son principal site de production d'anions superoxydes est apparemment le centre de fixation de l'ubiquinone  $\text{Q}_0$ . Situé près de la face externe de la membrane mitochondriale interne, il fixe préférentiellement la semiquinone résultant de la réduction de l'ubiquinone par capture d'un seul électron. Cette forme intermédiaire entre l'ubiquinone, forme oxydée du coenzyme Q, et l'ubiquinol, forme complètement réduite du coenzyme Q, est génératrice de radicaux libres (Bleier and Drose

2013). On considère que les anions superoxydes issus du complexe III rejoignent pour moitié la matrice mitochondriale, l'autre moitié investissant l'espace intermembranaire.

Bien que pourvus d'une solide réputation de faiseurs d'ERO, les complexes I et III n'ont pas le monopole de cette production au sein de la chaîne respiratoire. Le complexe II contribue lui aussi à la formation d'anions superoxydes et de peroxyde d'hydrogène, en flux classique comme en flux reverse d'électrons. Peu élevée en conditions normales, la production d'ERO de cette unité peut atteindre des niveaux importants dans certaines circonstances (Quinlan et al. 2012).

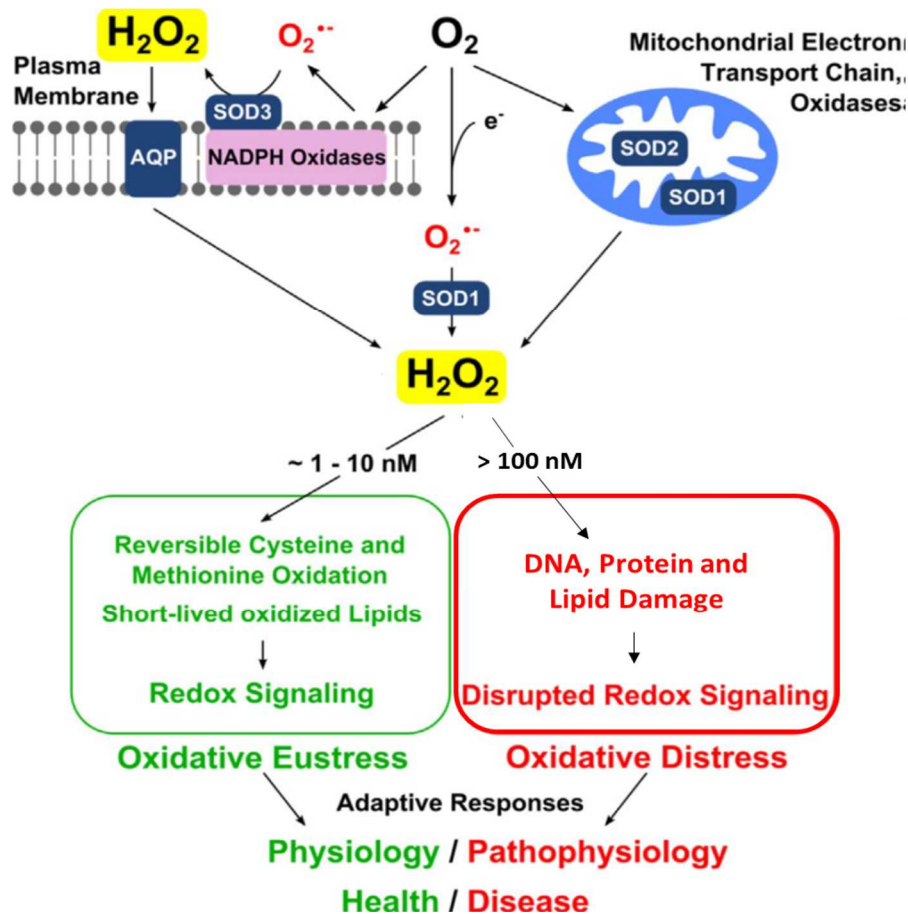
Enfin, d'autres sites mitochondriaux apportent leur lot d'ERO parmi lesquels les complexes 2-oxoacide déshydrogénase, la glycérophosphate déshydrogénase mitochondriale, le système ETF/ETF-QOR impliqué dans la  $\beta$ -oxydation des acides gras, la dihydroorotate déshydrogénase (Murphy 2009), (Brand 2016), (Wong et al. 2017), l'oxydase NADPH NOX4 (Skonieczna et al. 2017) ou encore les monoamine oxydases implantées dans la membrane externe (Edmondson 2014).

Les quantités d'ERO produites ne dépendent pas seulement des divers sites qui les produisent. Elles varient également avec les tissus et les substrats du métabolisme. Dans le cerveau, le cœur, le rein et le muscle squelettique du rat, environ 0,1 à 0,2% de l'oxygène consommé par la chaîne respiratoire est à l'origine des fuites d'électrons impliquées dans la production d'ERO. Dans le foie, ce chiffre atteint les 2% (Tahara, Navarete, and Kowaltowski 2009). Quant au substrat qui génère généralement les taux les plus élevés d'anion superoxyde, c'est le succinate (Lambert and Brand 2009). Un effet qui s'explique notamment par le flux reverse d'électrons impulsé par le succinate dans le complexe I.

### 3) La double vie des espèces réactives de l'oxygène

La production mitochondriale d'ERO consiste donc essentiellement en anion superoxyde, peroxyde d'hydrogène et radical hydroxyle. Des propriétés différentes leur valent toutefois d'exercer des rôles différents. Si l'anion superoxyde se trouve en première ligne des ERO produites dans la mitochondrie, c'est au peroxyde d'hydrogène que revient la tête d'affiche dans la signalisation redox, le radical hydroxyle se distinguant quant à lui par son agressivité (Gardès-Abert 2003).

Bien que doté d'une durée de vie l'autorisant à atteindre ses cibles bien au-delà de son lieu de formation, l'anion superoxyde n'est pas le plus redoutable des oxydants, du moins de façon directe. D'une part, il a peu de cibles biologiques privilégiées. D'autre part, sa charge électrique négative l'empêche de franchir les membranes. C'est plutôt indirectement, en étant à l'origine de la formation d'autres radicaux libres ou d'espèces non radicalaires, qu'il déploie son activité pro-oxydante (Gardès-Abert 2003).



**Figure 10 : le peroxyde d'hydrogène dans l'eustress et le stress oxydant (d'après Sies 2016).** Les sources endogènes de  $H_2O_2$  comprennent notamment la mitochondrie, les NADPH oxydases ainsi que d'autres oxydases liées ou non à des membranes. Le peroxyde d'hydrogène peut franchir les membranes en empruntant des aquaporines (AQP) appelées peroxiporines. Son action au sein de la cellule relève ensuite soit de l'eustress oxydant (en vert) à des concentrations de l'ordre de 10 nM soit du stress oxydant (en rouge) à des concentrations dépassant les 100 nM. (SOD : superoxyde dismutase).

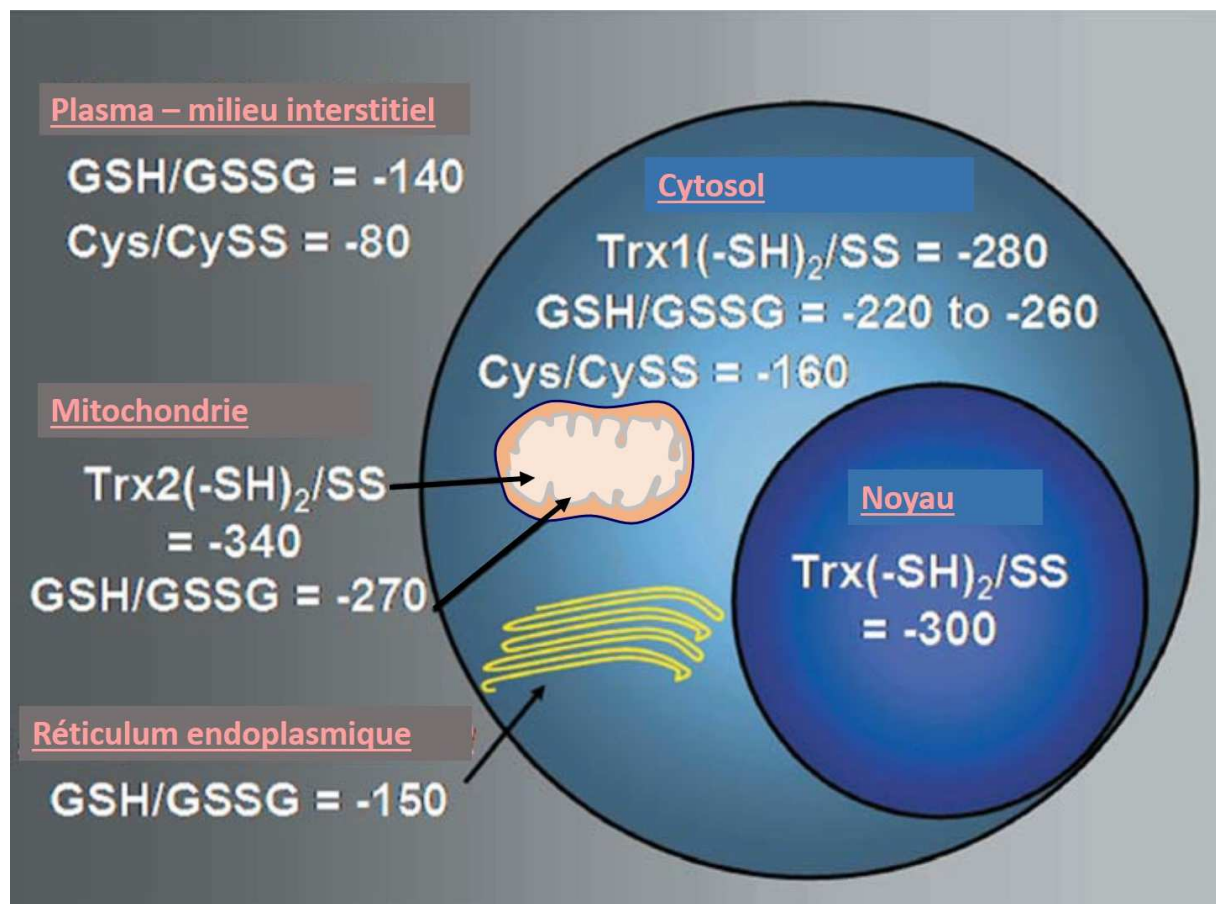
La formation de  $H_2O_2$  résulte soit de la dismutation de l'anion superoxyde soit de la réduction à deux électrons de l'oxygène ( $O_2$ ). Stable et extrêmement réactif, il possède un fort pouvoir oxydant. Sa durée de vie relativement longue et sa neutralité électrique lui permettent de traverser les membranes biologiques et de migrer dans les divers compartiments de la cellule.

Autant de propriétés qui lui confèrent un important rôle de second messenger dans la signalisation cellulaire (Forman 2008).

Une grande partie de la toxicité du peroxyde d'hydrogène lui vient de sa capacité à générer le radical hydroxyle. Puissant oxydant, ce dernier est néanmoins très instable, d'où une durée de vie et une capacité à diffuser très réduites.

Au cours des dernières décennies, la mise en lumière de l'importance des phénomènes redox dans les mécanismes cellulaires essentiels à la vie a redoré le blason des ERO. Ces facteurs de troubles à l'origine des dommages générés par le stress oxydant avaient en fait une double vie. Produits à des niveaux physiologiques, ils sont aussi capables du meilleur, à savoir concourir au moyen de la signalisation redox à l'eustress oxydant nécessaire au maintien de l'homéostasie de la cellule (Go and Jones 2017) (Figure 10).

#### 4) Les espèces réactives de l'oxygène dans la signalisation redox mitochondriale



**Figure 11 : potentiels d'équilibre redox (en mV) des couples Trx(-SH)<sub>2</sub>/Trx-SS, GSH)/GSSG et Cys/CySS dans différents compartiments intra et extracellulaires (d'après Hansen et al. 2005).** En répertoriant ces compartiments du plus réducteur au plus oxydant, on obtient le classement suivant : mitochondrie, noyau, cytoplasme, réticulum endoplasmique, milieu extracellulaire.

La signalisation redox désigne les processus utilisant les ERO (ainsi que d'autres espèces radicalaires) comme messagers afin d'obtenir une réponse d'un système biologique. Cette réponse repose sur des réactions d'oxydoréduction impliquant des macromolécules contenant des éléments oxydables tels que les résidus cystéine et méthionine des protéines. A l'aune du nombre des publications qui lui sont consacrées et de l'avis de leurs auteurs, c'est le peroxyde d'hydrogène qui s'avère l'ERO la plus influente en matière de signalisation redox. Une emprise qui découle des propriétés évoquées ci-dessus et des aptitudes de celui-ci à réagir avec les thiols des protéines.

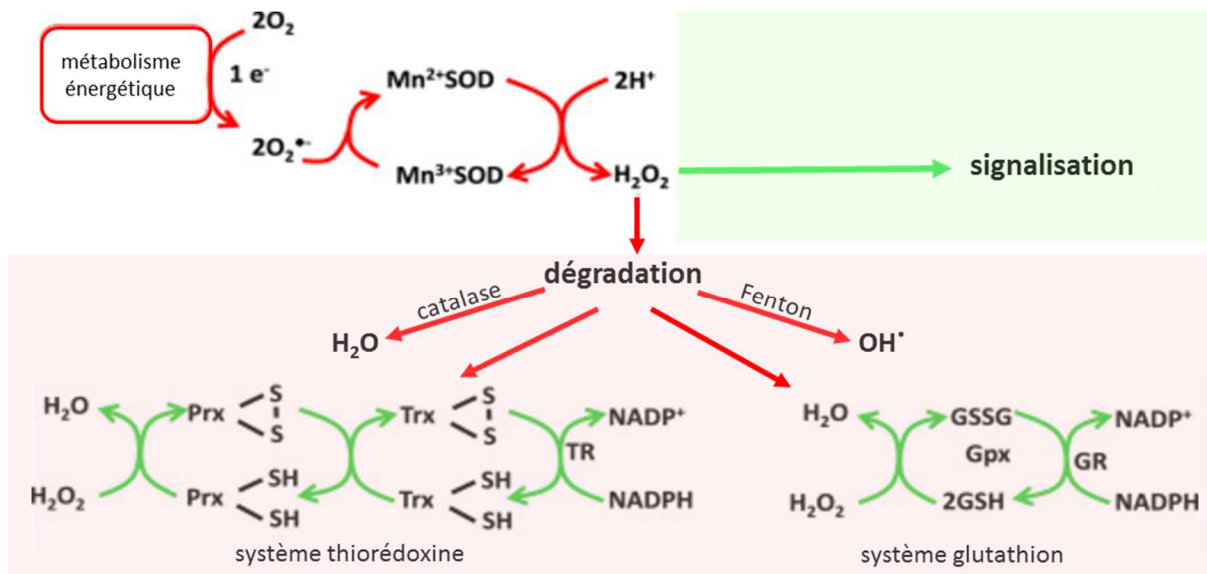
Le couple redox thiol/disulfure est un relai primordial de la signalisation redox. Les tandems thioredoxine réduite ( $\text{Trx}-(\text{SH})_2$ /thioredoxine oxydée ( $\text{Trx}-\text{SS}$ ), glutathion ( $\text{GSH}$ )/glutathion disulfure ( $\text{GSSG}$ ) et cystéine ( $\text{Cys}$ )/cystine ( $\text{CySS}$ ) y occupent donc une place centrale. Ces couples fonctionnent dans un contexte de déséquilibre thermodynamique puisque chacun d'eux affiche des potentiels redox différents à l'intérieur d'un même compartiment cellulaire (Figure 11). Chacun d'eux exerce donc un contrôle qui lui est propre sur les différents flux redox traversant un même compartiment. De plus, le potentiel d'équilibre redox d'un même couple variant d'un compartiment à l'autre, le rôle régulateur d'un couple redox varie avec sa localisation dans la cellule (Kemp, Go, and Jones 2008).

A l'examen des potentiels des différents couples redox, la mitochondrie s'avère être un milieu particulièrement réducteur. Ses composants sont donc fortement sensibles à l'oxydation et c'est dans ce compartiment que l'on observe l'activité de transfert d'électrons la plus intense.

Dans des conditions physiologiques, donc compatibles avec un contexte d'eustress oxydant, les quantités de  $\text{H}_2\text{O}_2$  générées par les sources d'ERO sont maintenues à des niveaux permettant au peroxyde d'hydrogène de jouer un rôle de molécule signal. Ces niveaux dépendent et des cadences de production d'ERO et de l'activité des systèmes antioxydants éliminant  $\text{H}_2\text{O}_2$ , soit, dans la mitochondrie, la catalase ainsi que les systèmes glutathion et thioredoxine (Aon et al. 2012) (Figure 12).

La fonction de molécule signal de  $\text{H}_2\text{O}_2$  consiste à oxyder les thiols des résidus cystéines des protéines. Les protéines ainsi modifiées vont alors réagir avec diverses molécules. Néanmoins, le peroxyde d'hydrogène réagissant beaucoup plus lentement avec une grande partie des thiols des protéines qu'avec la peroxyredoxine et la glutathion peroxydase, on peut considérer qu'il exerce son activité de signal redox de deux façons : par une action directe sur

les protéines et de manière indirecte en modulant l'action des systèmes antioxydants eux aussi impliqués dans l'oxydation des protéines (Gergondey et al. 2017), (Mailloux and Treberg 2016), (Winterbourn 2015). C'est ainsi que la modulation du niveau de glutathionylation de certains sites de la chaîne respiratoire constitue une des voies de régulation redox du métabolisme énergétique mitochondrial (Mailloux et al. 2014).



**Figure 12 : gestion du peroxyde d'hydrogène dans la mitochondrie (d'après Mailloux et al. 2015).** Une partie du peroxyde d'hydrogène généré dans la mitochondrie va servir à la signalisation en réagissant avec un certain nombre de molécules. Une autre partie est éliminée dans la mitochondrie par différents moyens : par une réaction de Fenton, sous l'action de la catalase ou par les systèmes glutathion et thiorédoxine. Dans le cycle redox du glutathion, une molécule de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est réduite en deux molécules d'eau pendant que deux molécules de glutathion réduit (GSH) sont oxydées en GSSG dans une réaction qui peut être catalysée par la glutathion peroxydase (Gpx) ; le glutathion oxydé est ensuite réduit sous l'action de la glutathion réductase (GR). Dans le cycle redox de la thiorédoxine, les composés dithiol de la thiorédoxine (Trx) sont réduits par l'apport d'électrons provenant du NADPH sous l'action de la thiorédoxine réductase (TR) ; la thiorédoxine est également un donneur d'électrons pour la peroxyrédoxine (Prx) dont les deux fonctions thiol peuvent former un pont disulfure ; cette seconde boucle d'oxydo-réduction permet la régénération de la peroxyrédoxine après qu'elle ait réduit H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> en eau.

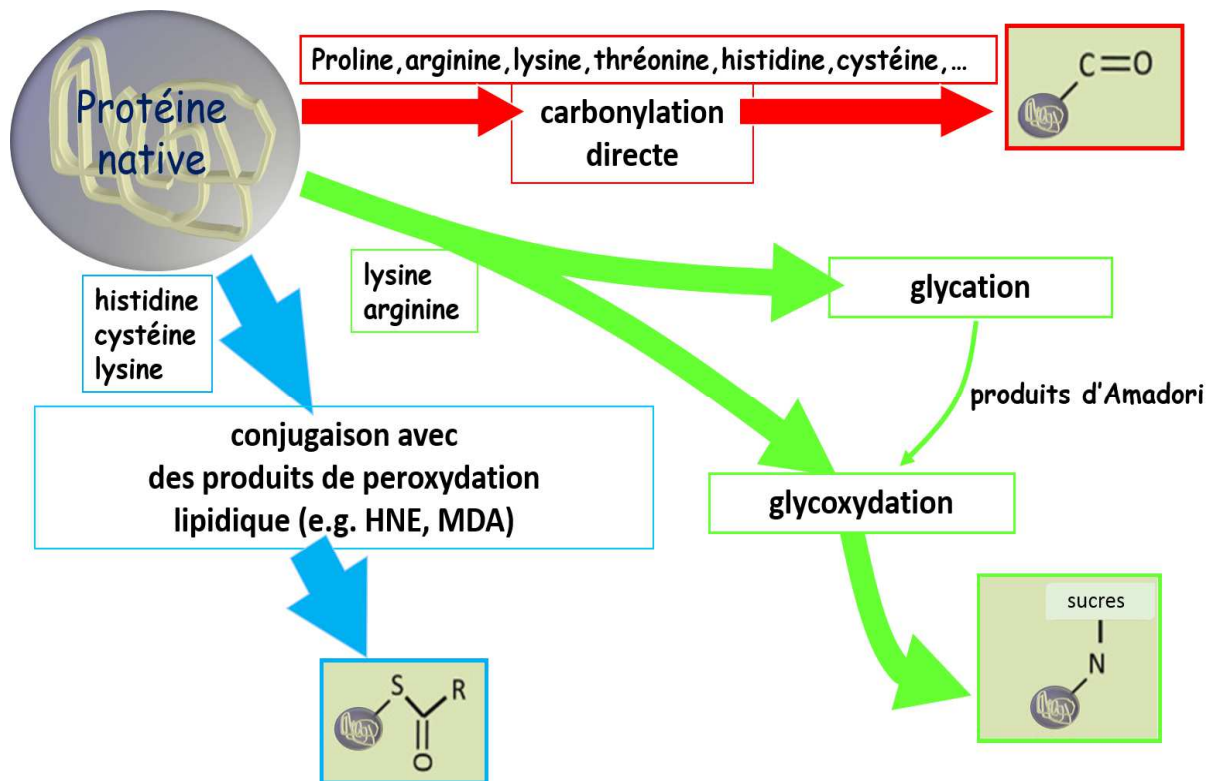
Beaucoup de processus biologiques fondamentaux étant pourvus d'une composante redox, la signalisation redox intervient dans de nombreux mécanismes de la vie de la cellule et ses incidences physiologiques touchent des domaines tout aussi variés. Au niveau de la mitochondrie, figurent au nombre des cibles de cette régulation l'apoptose, la mitophagie, la dynamique et la biogénèse mitochondriales, la respiration, la réponse à l'hypoxie,... (Handy and Loscalzo 2012).

Enfin, si la littérature accorde un rôle prépondérant au peroxyde d'hydrogène dans la signalisation cellulaire, l'action de l'anion superoxyde ne doit pas pour autant être négligée.



Capable de modifier l'activité enzymatique de tyrosine et sérine/thréonine kinases telles que les MAPK,  $O_2^{\cdot -}$  est à l'origine d'une activation de facteurs de transcription initiant l'expression de gènes "redox-sensibles". C'est ainsi que l'anion superoxyde se retrouve impliqué dans des processus tels que l'apoptose, la croissance, la prolifération et la différenciation cellulaires, l'adhésion des monocytes aux cellules endothéliales ou encore l'agrégation des plaquettes (Gardès-Abert 2003), (Buetler 2004).

#### 5) Les espèces réactives de l'oxygène dans les dommages aux biomolécules



**Figure 13 : principales modifications oxydatives irréversibles des protéines.** Caractéristiques des conditions de stress oxydant, les modifications oxydatives irréversibles des protéines sont notamment provoquées par des réactions de carboxylation. Cette formation de groupements carbonyles peut être engendrée par une oxydation directe d'acides aminés touchant plus particulièrement les prolines, les arginines, les lysines, les thréonines, les histidines et les cystéines, par conjugaison avec des produits issus de la peroxydation lipidique ciblant les histidines, les cystéines et les lysines, par glycoxydation de protéines ayant préalablement fait l'objet d'une glycation survenant majoritairement sur des lysines et des arginines.

Les modifications opérées par les ERO sur les biomolécules peuvent aussi atteindre des niveaux qui, débordant les capacités de réponse de la cellule, induisent des dommages installant un stress oxydant. Un phénomène auquel la mitochondrie est particulièrement exposée compte tenu de sa situation stratégique dans la production des ERO. L'accumulation de ces lésions

oxydatives est impliquée dans un nombre important de pathologies ainsi que dans le vieillissement (Bulteau, Szweda, and Friguet 2006).

Les ERO exercent une action oxydante prégnante sur les protéines, les lipides et les acides nucléiques. Certaines des modifications qu'elles opèrent sont réversibles, d'autres sont définitives. Particulièrement redoutables et caractéristiques du stress oxydant, les dommages irréversibles infligés aux protéines se manifestent essentiellement par l'ajout de groupements carbonyles, soit par oxydation directe d'acides aminés, soit par conjugaison avec des produits de peroxydation lipidique tels le 4-hydroxynonanal (HNE), soit par une glycoxydation générant des AGE (Le Boulch et al. 2018), (Bakala et al. 2003) (Figure 13).

La carbonylation des protéines est le résultat d'un processus au cours duquel des aldéhydes ou des cétones sont introduites par oxydation. Elle se produit sur la chaîne polypeptidique ou les chaînes latérales nucléophiles ou redox sensibles des acides aminés. En raison de leur constitution certains acides aminés y sont plus sensibles que d'autres. C'est le cas de la proline, l'arginine, la lysine, la thréonine, l'histidine et la cystéine. (Wong et al. 2012), (Cattaruzza and Hecker 2008).

Autre facteur de carbonylation des protéines, la peroxydation lipidique désigne une oxydation des lipides polyinsaturés selon un processus radicalaire de réactions en chaîne (Hauck and Bernlohr 2016). Il en résulte dans un premier temps une vaste gamme de produits oxydés, parmi lesquels les hydroperoxydes lipidiques qui vont ensuite donner naissance à divers aldéhydes tels que les HNE (4-hydroxyl-2-nonéanal) et MDA (malondialdéhyde). Les perturbations engendrées par la peroxydation lipidique ne se limitent pas aux membranes dont elles altèrent la fluidité et au sein desquelles elles inactivent des récepteurs et des enzymes (Michel et al. 2008). Les aldéhydes issus de ce mécanisme oxydant sont des produits stables capables d'attaquer des cibles relativement éloignées de leur lieu de formation, au nombre desquelles les protéines sur lesquelles ils vont former des adduits au terme d'une addition de Michael. Particulièrement délétères, ces adduits carbonylés se forment sur les histidines, les cystéines et les lysines.

Enfin la carbonylation des protéines peut être le fait d'une glycoxydation survenant sur une protéine ayant préalablement subi une glycation (Vistoli et al. 2013). Cette cascade d'événements commence par un processus de glycation, c'est-à-dire la formation d'une base de Schiff par interaction entre l'aldéhyde d'un glucose et la fonction amine libre d'un acide aminé,

généralement une lysine ou une arginine. Jusque-là le processus est réversible. Cependant, s'il se poursuit, la base de Schiff fait l'objet d'un réarrangement d'Amadori qui stabilise la condensation du résidu osidique sur la chaîne protéique. Ces produits d'Amadori peuvent ensuite être la cible de réactions de glycoxydation responsables de la formation de composés carbonylés réactifs, notamment des aldéhydes tels le méthylglyoxal, puis de la constitution de produits de glycation avancés, les fameux AGE. Fameux et redoutables si l'on en juge par la liste des méfaits qu'on leur attribue dès lors qu'ils s'accumulent, à commencer par diverses dysfonctions cellulaires pour terminer par de nombreuses pathologies (complications diabétiques, maladies cardiovasculaires, neurodégénératives, inflammatoires,...) (Byun et al. 2017).

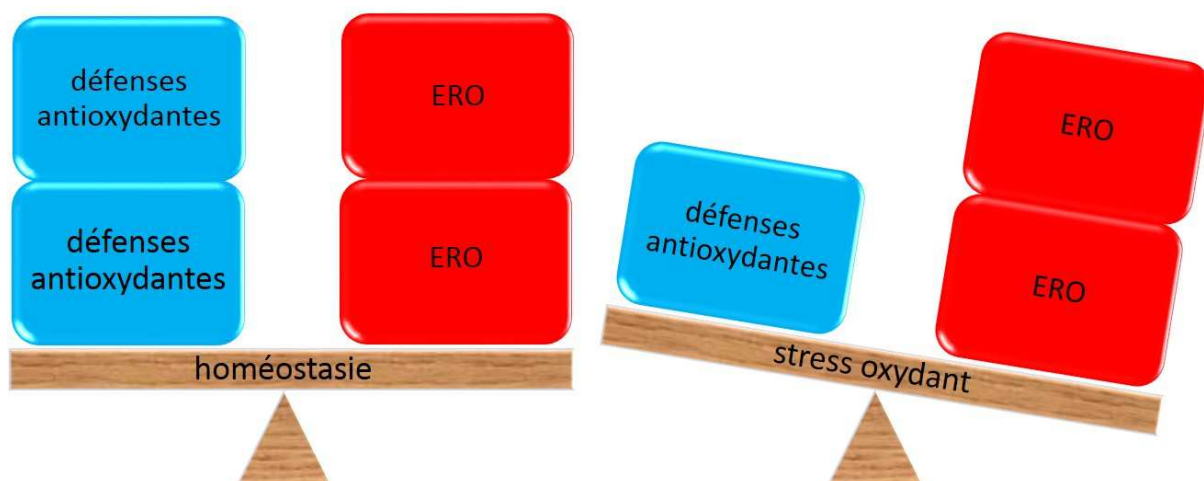
Coupable d'adjonction de groupes généralement réactifs, la carbonylation exerce un double effet sur les protéines : des altérations de leurs propriétés se répercutant sur leur fonction et un adressage vers des systèmes de protéolyse qui vont assurer leur dégradation. Néanmoins, l'apparition des protéines carbonylées peut atteindre des niveaux dépassant les capacités de réaction des protéases chargées de les éliminer. L'accumulation de protéines endommagées résultant de cette situation est un phénomène observé au cours de multiples stress oxydants, lors du vieillissement et dans de nombreuses pathologies. A tel point que la carbonylation peut être considérée comme un marqueur de choix du stress oxydant.

Au niveau de la mitochondrie le duo stress oxydant-dysfonction mitochondriale a déjà largement fait ses preuves (Islam 2017). Les impacts du stress oxydant sont toutefois pour une part modulés par les caractéristiques de chaque compartiment mitochondrial. L'environnement redox est effectivement différent selon que l'on se trouve dans la matrice ou l'espace intermembranaire, les deux compartiments aqueux de la mitochondrie. La matrice est dotée de systèmes glutathion et thioredoxyne conservant les résidus cystéines à l'état réduit en conditions d'équilibre. En revanche, l'espace intermembranaire abrite une machinerie, le complexe MIA (Mitochondria Intermembrane space Assembly), spécialisée dans l'introduction de ponts disulfures. Une grande partie des protéines importées dans la mitochondrie sont prises en charge par MIA. Certaines de leurs cystéines sont alors oxydées par l'oxydoréductase Mia40, ce qui leur attribue une conformation assurant leur séquestration dans l'espace intermembranaire (cf § Importation des protéines dans la mitochondrie). Néanmoins beaucoup de protéines résidant dans ce compartiment contiennent des résidus cystéines réduits. Il semblerait donc que, dans cet espace, ce ne soit pas l'environnement apparemment oxydant qui

soit en cause dans l'oxydation des protéines. Celle-ci serait plutôt due à la conformation des protéines, à savoir la présence de sites de fixation à Mia40 (Peleh et al. 2014).

Par ailleurs, la modulation des effets de la carbonylation en fonction du compartiment mitochondrial où elle se commet s'explique aussi par le fait que, dans la matrice, elle affecte non seulement le fonctionnement des protéines mais également celui de l'ADN mitochondrial. De même, dans la membrane interne se trouvent des phospholipides polyinsaturés et donc particulièrement susceptibles de peroxydation lipidique sous l'action des ERO (Lambert and Brand 2009). Selon qu'elles soient émises côté matrice de la membrane interne, à l'intérieur de cette membrane interne où côté espace intermembranaire de la membrane interne, les ERO auront donc vraisemblablement des effets physiologiques et pathologiques différents.

#### IV- Défenses antioxydantes : l'arsenal mitochondrial



**Figure 14 : la balance redox.** La production des ERO est étroitement contrôlée par les systèmes antioxydants dans le but de maintenir l'homéostasie cellulaire. L'équilibre de ce système dépend donc des niveaux d'expression et/ou d'activité de ces deux protagonistes. Que la balance redox vienne à pencher du côté des ERO et le stress oxydant s'installe.

Face aux ERO les systèmes de défense antioxydants constituent le second acteur clé de la sphère redox (Figure 14). Pour que la balance redox bascule de l'homéostasie vers le stress oxydant, il ne suffit pas que le niveau des ERO s'élève. Il faut aussi que les défenses antioxydantes soient défaillantes. Pour en arriver là dans la mitochondrie, il faut faire tomber un certain nombre de résistances. Face à l'oxydation des protéines, ce compartiment de la cellule ne manque effectivement pas de pare-feu (Hamon, Bulteau, and Friguet 2015).

## A) Détoxification, réparation, dégradation

### 1) Détoxification

La première ligne de défense contre les attaques oxydantes est constituée d'un réseau de dispositifs de détoxification enzymatiques et non enzymatiques (Friguet, Bulteau, and Petropoulos 2008), (Andreyev 2005). A ce niveau-là il s'agit d'intervenir directement sur les ERO afin de les neutraliser. Parmi les systèmes de détoxification recensés dans la mitochondrie, on peut ainsi citer:

- la superoxyde dismutase à manganèse (Mn-SOD) : localisée dans la matrice mitochondriale, elle s'attaque à la première ligne d'ERO produites par la chaîne respiratoire, à savoir l'anion superoxyde qu'elle transforme en peroxyde d'hydrogène (Azadmanesh and Borgstahl 2018).

- la catalase : en charge de l'élimination du peroxyde d'hydrogène qu'elle transforme en eau et dioxygène, elle est cependant surtout présente dans les peroxysomes d'un certain nombre de tissus ; plus rare dans le compartiment mitochondrial, elle a été notamment repérée dans les mitochondries des cellules cardiaques (Liao et al. 2017)

- l'α-tocopherol : en piégeant les radicaux libres dans les membranes mitochondriales, cette forme liposoluble de vitamine E contribue notamment à contrer la peroxydation lipidique (Lauridsen and Jensen 2012)

- le cytochrome c et l'ubiquinol : bien que ce ne soit pas leur vocation première, ces deux composantes de la chaîne respiratoire exercent une action antioxydante ; réduit par la chaîne respiratoire, le cytochrome c peut aussi l'être par l'anion superoxyde dans une réaction libérant du dioxygène ; il est ensuite régénéré par son accepteur d'électrons naturel, la cytochrome c oxydase ; l'ubiquinol (QH<sub>2</sub>) fait également œuvre antioxydante, spécialement contre la peroxydation lipidique (Cervellati and Greco 2016)

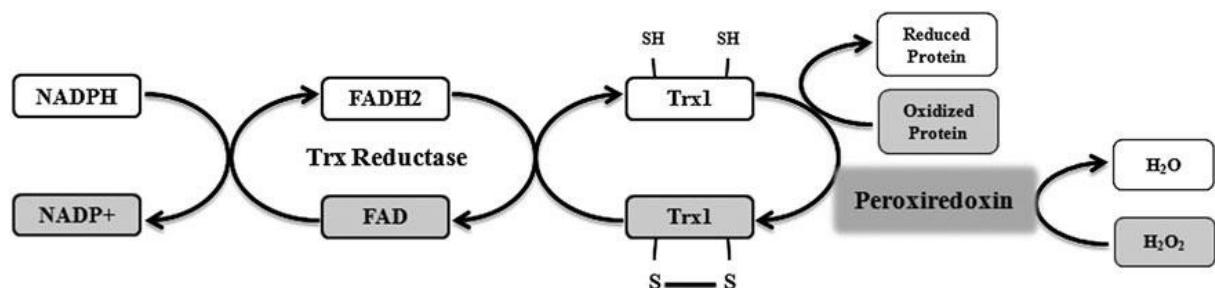
- la phospholipide hydroperoxyde glutathion peroxydase GPx4 : cette sélénoenzyme est particulièrement impliquée dans la lutte contre la peroxydation lipidique dans les membranes ; son rôle dans l'élimination des peroxydes lipidiques semble toutefois restreint par une expression détectée dans un nombre limité de tissus (Conrad et al. 2007)

- la glutathion peroxydase GPx1 : autre isoforme de glutathion peroxydase active dans la mitochondrie, Gpx1 opère dans la matrice où elle neutralise le peroxyde d'hydrogène ; pour cela cette sélénoprotéine utilise le glutathion comme source d'équivalents réducteurs (Handy et al. 2009).

- le système glutathion : relai de la signalisation redox mitochondriale (cf § Les espèces réactives de l'oxygène dans la signalisation redox mitochondriale), le système glutathion a recours au NADH, à la glutathion réductase et au glutathion réduit (GSH) pour réduire également le peroxyde d'hydrogène (Figure 12) ; s'il existe des glutathion réductases et peroxydases mitochondriales, en revanche, la mitochondrie est dépourvue des enzymes nécessaires à la synthèse du GSH qu'elle doit donc importer (Hansen, Go, and Jones 2006)

- les peroxyredoxines Prx3 et 5 : également capables de réduire les peroxydes, les peroxyredoxines fonctionnent en couplage avec les thioredoxines, les secondes transférant des électrons aux premières (Figure 15) ; deux formes de peroxyredoxines ont été identifiées dans la mitochondrie, Prx3, dont la mitochondrie a l'exclusivité, et Prx5 que l'on retrouve dans le cytoplasme et les peroxysomes (Detienne et al. 2018)

## 2) Réparation



**Figure 15 : cycle redox du système thioredoxine (d'après Mahmood et al. 2013).** Les composés dithiol de la thioredoxine (Trx) sont réduits par l'apport d'électrons provenant du NADPH sous l'action de la thioredoxine réductase (TrxR). La thioredoxine réduite réduit à son tour les protéines oxydées porteuses de ponts disulfures par l'intermédiaire de réactions d'échanges thiol/disulfure. NADPH, TrxR et Trs forment ainsi ce que l'on appelle le système thioredoxine qui permet parallèlement de piéger les ERO par l'entremise de la peroxyredoxine. H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> est réduit en eau simultanément à l'oxydation de la peroxyredoxine qui est ensuite réduite par la thioredoxine oxydée.

Autre ligne de défense contre le stress oxydant, la réparation des protéines oxydées se résume dans la mitochondrie à une réduction catalysée de certains produits d'oxydation apparus sur les acides aminés soufrés, autrement dit les cystéines et les méthionines. Les cystéines oxydées (ponts disulfures, acides sulféniques et sulfoniques) sont prises en charge par le système

thioredoxine, les glutaredoxines et les sulfiredoxines, les méthionines sulfoxydes réductases se chargeant des méthionines oxydées. Voici un tour d'horizon de ce dispositif :

- le système thioredoxine-thioredoxine réductase (Figure 15) : dans la mitochondrie ce système est composé de la thioredoxine 2 (Trx2) et de son pendant réductase TR2. Dans des cellules HeLa cette paire a démontré une plus grande rapidité de réaction à l'oxydation que le duo TR1/Trx1 opérant dans le cytosol et le noyau (Kim et al. 2004). Comparé aux diverses fonctions exercées par Trx1, le rôle de Trx2 apparaît plus centré sur l'élimination des ERO par l'intermédiaire des deux formes de peroxyredoxine exprimées dans la mitochondrie, Prx3 et Prx5 (Hansen, Go, and Jones 2006)

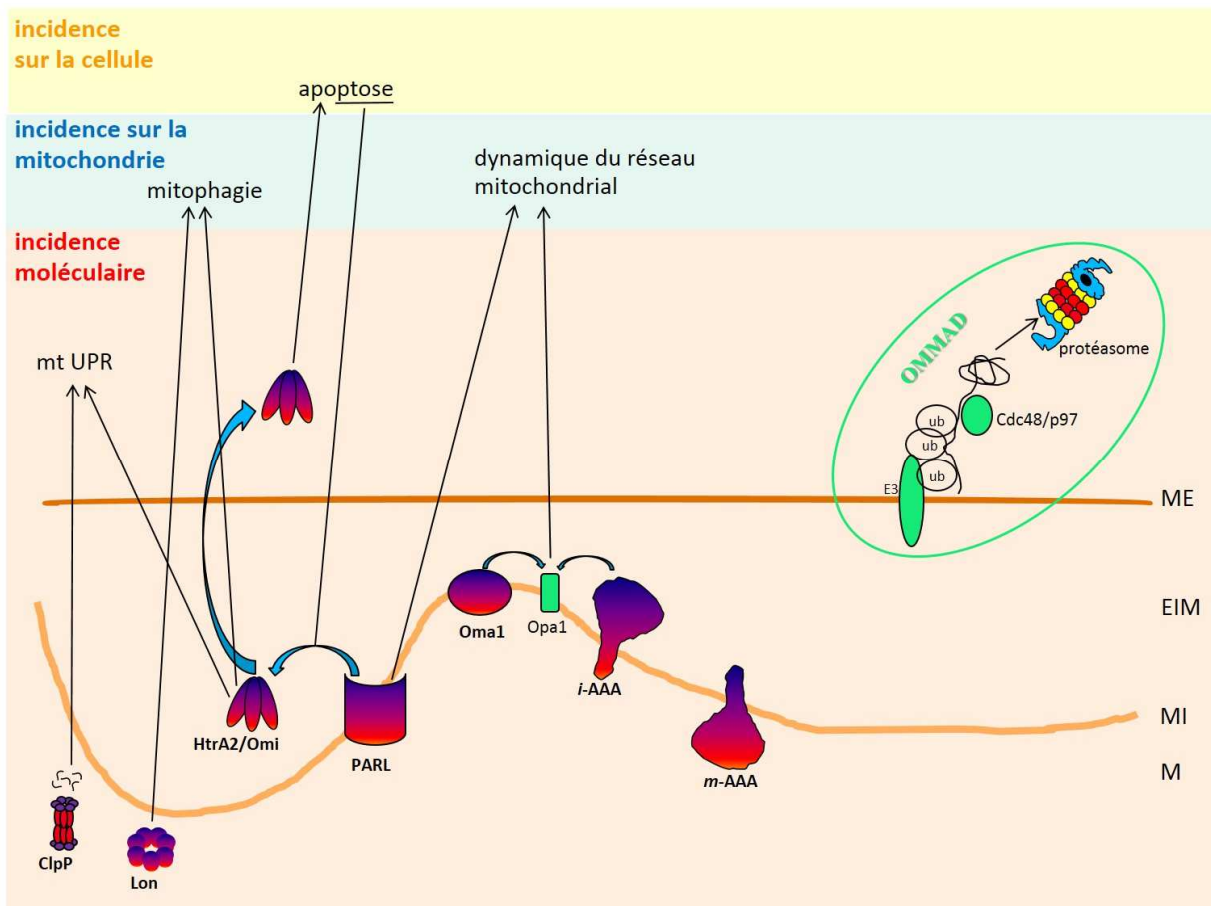
- la glutaredoxine Grx2 : les glutaredoxines sont des petites oxydoréductases dont le fonctionnement dépend du glutathion qui assure leur réduction après qu'elles aient été oxydées par leurs substrats ; cependant, Grx2, l'isoforme présente dans la mitochondrie, peut également accepter des électrons en provenance de la thioredoxine réductase 2; Grx2 catalyse l'oxydation réversible et la glutathionylation de protéines membranaires mitochondriales et semble jouer un rôle central dans la régulation redox du glutathion (Ren et al. 2017), (Hansen, Go, and Jones 2006)

- les sulfiredoxines : les réactions d'oxydoréduction dans lesquelles les peroxyredoxines sont impliquées donnent parfois lieu à des hyperoxydations de ces dernières en acide sulfinique, une transformation réversible sous l'action des sulfiredoxines ; l'importation dans la mitochondrie de ces oxydoréductases requiert l'intervention de la chaperone Hsp90 ; les niveaux de sulfoxiredoxines dans la mitochondrie contribuent donc au contrôle de l'activité des peroxyredoxines mitochondriales et de la libération de peroxyde d'hydrogène (Kil et al. 2015)

- les méthionines sulfoxydes réductases (Msr) : deux systèmes majeurs de Msr, les Msr A et B, réduisent en méthionine les méthionines sulfoxides (MetSO) apparues sous l'effet de l'oxydation des protéines ; les MetSO existent sous les deux formes S et R et chacun des deux systèmes MsrA et B est spécifique de l'un ou l'autre de ces deux diastéréoisomères ; les Msr utilisent généralement le pouvoir réducteur fourni par des oxydoréductases à thiol de type thioredoxine pour régénérer leur activité ; MsrB1 peut être réduite par les glutaredoxines moyennant une étape de glutathionylation ; deux catégories de Msr cohabitent dans la mitochondrie, la MsrA et la version MsrB2 des 3 isoformes de MsrB recensées chez les eucaryotes (Weissbach, Resnick, and Brot 2005), (Tarrago et al. 2009)

Le terme de réparation utilisé pour désigner l'action de ces systèmes peut néanmoins sembler quelque peu réducteur. Réparer suggère qu'un dommage a préalablement été commis. Or les oxydations qu'il s'agit ici de corriger ne sont pas forcément nuisibles. Elles peuvent s'avérer momentanément utiles à des voies de signalisation (Hoshi 2001), (Wani, Nagata, and Murray 2014).

### 3) Dégradation



**Figure 16 : les protéases mitochondriales impliquées dans le contrôle qualité des protéines.** En raison de leurs activités protéolytique et/ou de chaperone, certaines protéases mitochondriales sont impliquées dans un ou plusieurs processus de contrôle qualité. En conditions de stress HtrA2/Omi migre dans le cytosol où elle intervient dans l'apoptose. En revanche, l'interaction de PARL avec HtrA2/Omi protège de l'apoptose. Oma1 et *i*-AAA modulent la dynamique du réseau mitochondrial par l'intermédiaire de la GTPase Opa1 impliquée dans les mécanismes de fusion mitochondriale. (AAA : ATPase associated with diverse cellular activities ; Clp : caseinolytic protease ; EMI : espace intermembranaire ; M : matrice ; ME : membrane externe ; MI : membrane interne ; OMMAD : outer mitochondrial membrane associated degradation ; PARL : presenilin-associated rhomboid-like protease ; mtUPR : mitochondrial unfolded protein response).



Enfin, quand les dommages résultant de l'oxydation sont irréversibles, la dégradation par protéolyse constitue une stratégie de choix pour éviter l'accumulation de protéines endommagées. Cette élimination est assurée par diverses protéases. Réparties entre les différents compartiments mitochondriaux, elles assurent des fonctions distinctes dont les répercussions dépassent l'espace intra mitochondrial (Figure 16). Sont ainsi répertoriées :

- dans la membrane externe : bien qu'aucune protéase n'ait été jusqu'ici identifiée dans ce compartiment, il n'est pas pour autant exempt de protéolyse ; il bénéficie effectivement des services du protéasome par l'intermédiaire du système OMMAD (outer mitochondrial membrane associated degradation) situé sur la face cytosolique de la membrane externe ; OMMAD est notamment constitué d'ubiquitines ligases E3 et de l'ATPase Cdc48/p97 qui se lie aux protéines ubiquitinylées pour les transporter vers le protéasome ; celui-ci assure également la dégradation de protéines provenant d'autres compartiments mitochondriaux et transférées jusqu'à la membrane externe (Baker 2014) ; des perturbations dans la dégradation sous ubiquitinylation des protéines mitochondriales de levure ou de mammifères ont été associées à un stress oxydant, une défaillance mitochondriale et une longévité diminuée (Heo et al. 2010)

- dans l'espace intermembranaire : HtrA2/Omi et Atp23. HtrA2/Omi est une sérine protéase impliquée dans l'apoptose lorsqu'elle est relâchée dans le cytosol ; elle a vraisemblablement aussi une fonction de chaperone dans la mitochondrie ; une régulation de l'ubiquitine ligase E3 Mulan par HtrA2/Omi a été montrée chez la souris de même qu'une intensification de la mitophagie lorsque Mulan s'accumule sous l'effet d'une sous expression de HtrA2/Omi (Ambivero et al. 2014) ; une fonction mitochondriale perturbée et un vieillissement prématuré ont été remarqués chez la souris en absence de HtrA2/Omi fonctionnelle (Goo, Rhim, and Kang 2014). Quant à Atp23, chez la levure, elle a démontré une double activité de protéase et de chaperone impliquée dans la biogénèse de l'ATP synthase ; Atp23 intervient aussi dans le métabolisme des phospholipides puisqu'elle dégrade UPS1, une protéine contribuant à la régulation des niveaux mitochondriaux de phosphatidylethanolamine et de cardiolipine (Teixeira and Glaser 2013)

- dans la membrane interne : *i*-AAA, *m*-AAA, Oma1 et PARL. Piliers du contrôle qualité dans la membrane interne, *i*-AAA et *m*-AAA dressent leur domaine catalytique respectivement vers l'espace intermembranaire et la matrice ; leurs activités dépassent le cadre de la protéolyse puisqu'elles s'emploient également dans la biogénèse de certaines protéines, la régulation de la

traduction du génome mitochondrial et le métabolisme des lipides (Gerdes, Tatsuta, and Langer 2012), (Nolden et al. 2005), (Potting et al. 2010) ; des anomalies de ces deux protéases sont associées à la progression de pathologies neurodégénératives (Luce 2010) et, chez *P. anserina*, des délétions du gène codant *i*-AAA ont induit un effet sur le vieillissement dépendant de la température (Weil et al. 2011). *i*-AAA s'associe par ailleurs à Oma1 pour moduler la dynamique mitochondriale au moyen d'un conditionnement protéolytique de la GTPase Opa1 (Baker 2014). Dans la levure, Oma1 joue un rôle important dans la réponse au stress en préservant la fonction mitochondriale en conjonction avec d'autres acteurs du contrôle qualité ; Oma1 joue un rôle critique dans la survie de la levure en empêchant l'accumulation d'ERO (Bohovych et al. 2014). PARL aussi intervient dans la dynamique mitochondriale ainsi que dans l'apoptose ; chez la souris cette protéase peut protéger de l'apoptose via une interaction avec HtrA2 (Chao et al. 2008) ; une sous expression de PARL semble être impliquée dans le vieillissement et le diabète de type 2 (Civitarese et al. 2010)

- dans la matrice : Lon et ClpP. Les protéases Clp constituent une famille de peptidases actives sous la forme de complexes comprenant une sous-unité protéolytique – ClpP ou ClpQ selon les espèces - prise en sandwich entre deux anneaux de sous-unités chaperones ; ClpP peut être considérée comme une protéine de stress puisque elle est induite en conditions de stress ; elle a démontré une capacité à réduire l'oxydation des protéines (Fredriksson et al. 2005); son implication la plus documentée dans le contrôle qualité mitochondrial provient de son rôle dans la réponse UPR mitochondriale ; une fonction qui la place au cœur de la maintenance des fonctions mitochondriales et des processus impliquées dans le vieillissement et diverses pathologies ; un phénotype de vieillissement et une survie diminuée ont été observées chez des souris privées de ClpP (Gispert et al. 2013) ; Lon sera largement abordée plus loin, dans un section qui lui est spécialement consacrée

L'apport des systèmes protéolytiques dans la maintenance de la fonction mitochondriale ne se limite pas à l'enlèvement des protéines endommagées. La régulation de certains processus essentiels au maintien de l'homéostasie mitochondriale lui doit aussi beaucoup (Patron, Sprenger, and Langer 2018). Pour l'exemple, la dynamique du réseau mitochondrial ne peut faire l'économie des transformations post-traductionnelles que certaines protéases mitochondriales administrent aux GTPases impliquées dans les mouvements de fusion et de fission des mitochondries (Ali and McStay 2018).

#### 4) Et aussi...

La mitochondrie est pourvue d'une large palette en matière de contrôle qualité et sa gestion du stress oxydant peut aussi emprunter diverses voies qui ne sont pas nécessairement dédiées à cette cause. Le recours aux chaperones et à la réponse UPR (Unfolded Protein Response) mitochondriale est l'une de ces voies (Baqri et al. 2014). Cette contribution des chaperones au contrôle qualité mitochondrial peut entre autres prendre la forme d'une collaboration avec des protéases (Voos 2009). Certaines protéases telles ClpP et HtrA2/Omi déploient du reste une activité de chaperone (Hamon, Bulteau, and Friguet 2015). Outre la protéolyse, l'éviction des protéines oxydées peut également se faire via un transport vésiculaire de la mitochondrie vers les lysosomes (Sugiura et al. 2014).

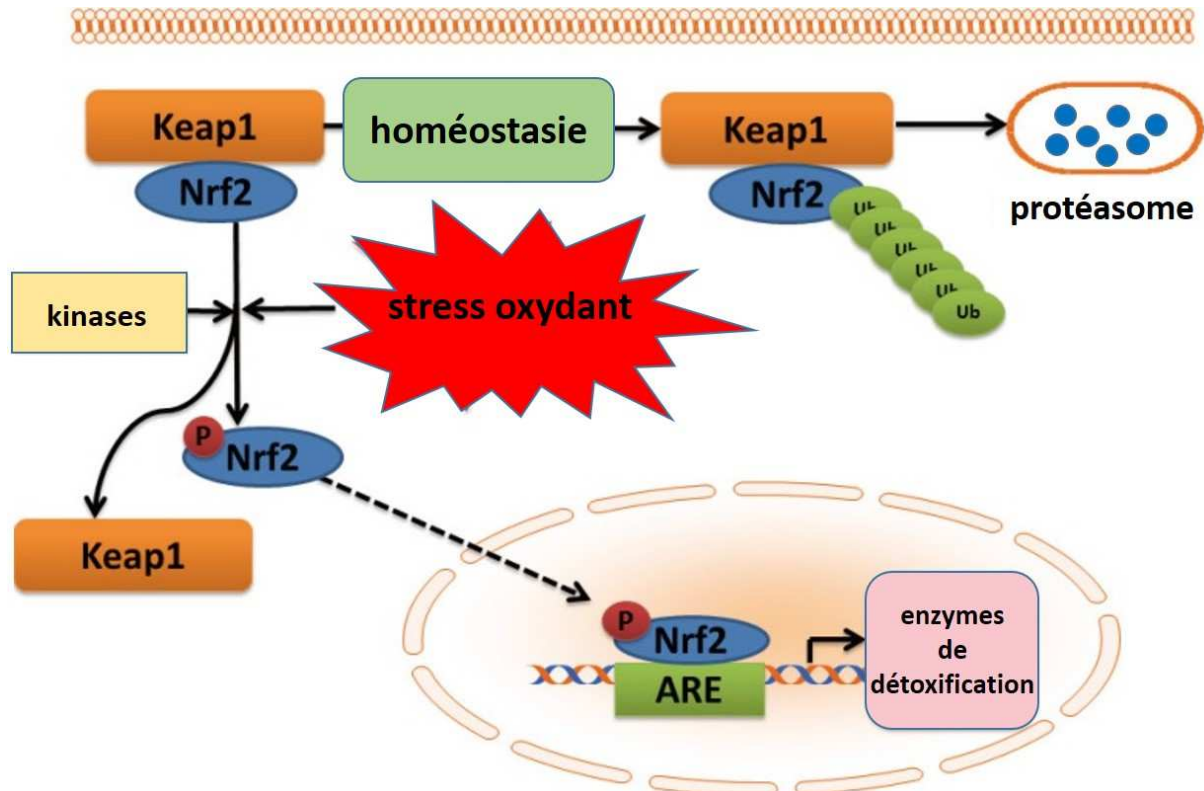
Autre solution, éliminer les mitochondries en difficulté. Quand le stress oxydant a atteint un niveau de nature à engendrer une dysfonction mitochondriale, les mitochondries défaillantes peuvent être détruites par mitophagie. La fragmentation du réseau mitochondrial offre un autre moyen d'écartier les mitochondries déficientes, en les séparant des autres mitochondries dans un premier temps avant, éventuellement, de les évacuer par mitoptose (Hammerling and Gustafsson 2014).

La conformation des protéines mitochondriales peut aussi être considérée comme une stratégie mitochondriale antioxydante. Il apparaît effectivement que le protéome mitochondrial contient moins de motifs sujets à l'oxydation que les protéines non mitochondriales. Une particularité peut être due à la pression de sélection compte tenu des niveaux élevés d'ERO produits dans la mitochondrie (Bonham-Carter, Pedersen, and Bastola 2014).

Enfin, la mitochondrie entretient avec le noyau une communication constante désignée sous le nom de signalisation rétrograde et constituant un moyen de réponse au stress. En cas de dysfonction mitochondriale, les signaux envoyés dans le cytoplasme activent des voies déclenchant la transcription de gènes nucléaires impliqués dans le maintien de l'homéostasie mitochondriale (Hill and Van Remmen 2014).

Face au stress oxydant, la réponse rétrograde majeure passe par le facteur de transcription Nrf2 (Nuclear factor erythroid-derived 2-related factor) (Figure 17). Enclenchée par une augmentation des niveaux intracellulaires d'ERO, cette réponse aboutit à la transcription d'un certain nombre d'enzymes de détoxification, parmi lesquelles divers acteurs

des systèmes glutathion et thioredoxine, la catalase et la superoxyde dismutase. Nrf2 serait ainsi un interlocuteur privilégié de la mitochondrie et son influence sur la biogénèse mitochondriale et la phosphorylation oxydative a été démontrée (Itoh 2015).



**Figure 17 : activation de la voie Nrf2 par les ERO (d'après Chen et al.).** En conditions d'homéostasie, Keap1 (kelch-like ECH-associated protein 1) se lie à Nrf2 et active son ubiquitinylation. Nrf2 ubiquitinylé est alors dégradé par le protéasome. En conditions de stress oxydant, l'élévation des niveaux d'ERO entraîne la séparation de Keap1 et Nrf2 et la phosphorylation de Nrf2 par des kinases. Nrf2 phosphorylé gagne alors le noyau où il se fixe à des séquences ARE (Antioxydant Response Element) présentes sur des gènes codant des protéines de détoxification.

Les facteurs de transcription FOXO (Forkhead box O) constituent également un moyen de réponse au stress oxydant. L'accumulation d'ERO induit une phosphorylation de FOXO3 par les kinases JNK (Jun-N-terminal kinase) et MST1 (mammalian STE20-like protein kinase). FOXO3 phosphorylé intègre le noyau où il va induire la transcription d'enzymes telles que la catalase, la superoxyde dismutase, les isoformes mitochondriales de la thioredoxine et de la thioredoxine réductase, ou encore les peroxiredoxines Prx3 et 5. A l'image de Nrf2, FOXO3 intervient dans la fonction mitochondriale, notamment dans la dynamique mitochondriale, la mitophagie, l'apoptose et la réponse UPR mitochondriale. A côté de son rôle pro détoxification, FOXO3 peut également réduire la production d'ERO au moyen d'un ralentissement de l'activité respiratoire (Kim and Koh 2017)

## V- La protéase Lon

La protéase Lon a fait l'objet d'une revue écrite dans le cadre de ces travaux de doctorat. Insérée en annexe, cette revue détaille la structure et le fonctionnement de Lon ainsi que son implication dans le contrôle qualité mitochondrial, avec la bibliographie afférente. Le contenu de cette publication sera donc seulement résumé ci-après, enrichi des informations sur Lon parues depuis.

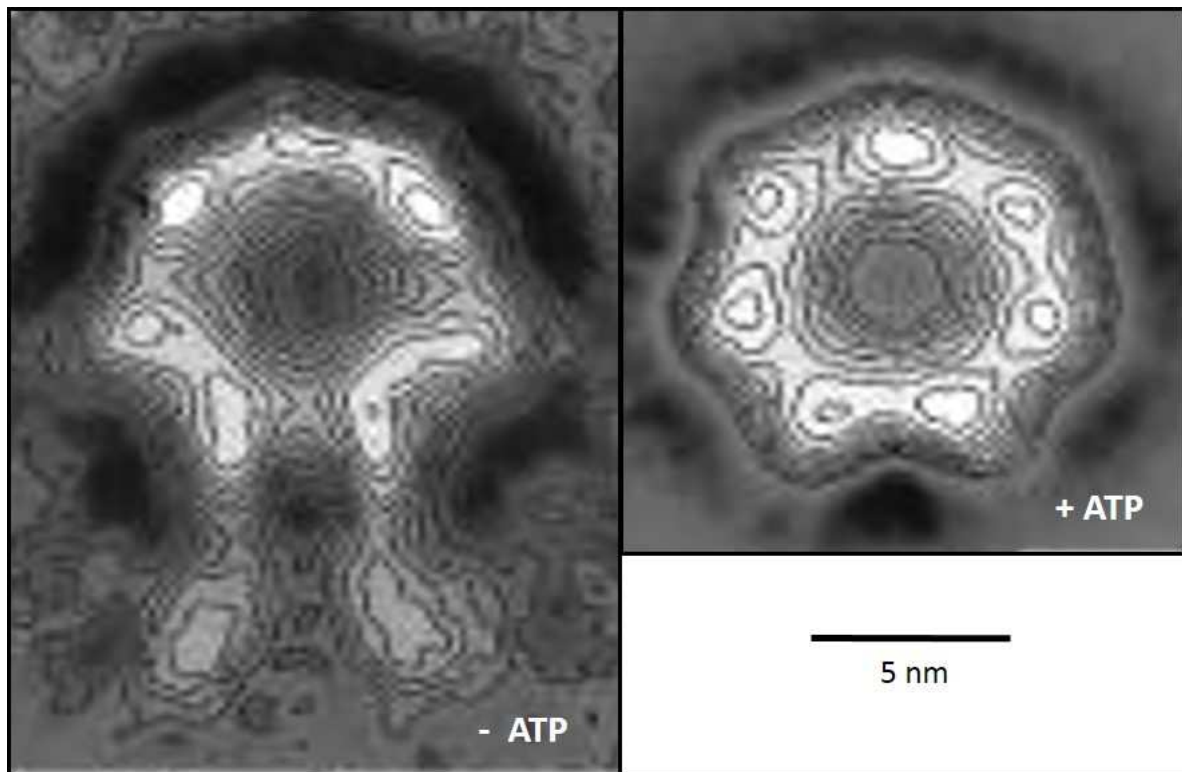
### A) Structure et fonctions

#### 1) Structure et mode opératoire de la protéase Lon

Première protéase ATP-dépendante identifiée, Lon est une protéase à sérine présente chez les bactéries, les archées, dans les mitochondries des cellules eucaryotes et dans les chloroplastes des cellules des algues et des plantes. Codée par un gène nucléaire, elle est active sous la forme d'un anneau homo-oligomérique composé d'un nombre d'unités variable selon les espèces, le plus souvent six ou sept chaînes polypeptidiques (Figure 18).

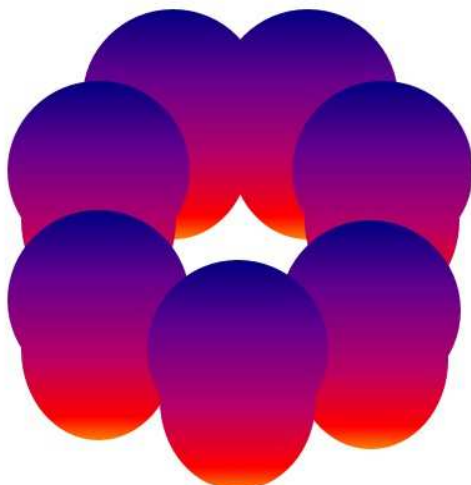
Chaque polypeptide de Lon comporte au moins deux domaines, un domaine protéolytique et un domaine AAA+ de liaison et d'hydrolyse de l'ATP. Le domaine protéolytique porte une dyade catalytique sérine-lysine. Chez l'homme cette sérine nucléophile est la S<sub>855</sub> et c'est la lysine K<sub>898</sub> qui assure le rôle de catalyseur acide-base en déprotonant le groupe hydroxyle de cette S<sub>855</sub>.

Les protéases Lon se répartissent en deux familles. Les protéases Lon A, présentes principalement chez les bactéries et dans les cellules eucaryotes, sont caractérisées entre autres par une constitution monomérique déclinée en trois parties (Figure 19). Aux deux domaines évoqués ci-dessus s'ajoute effectivement en N-ter un grand domaine d'interaction avec les substrats d'environ 300 acides aminés. Essentiellement identifiées chez les archées, Lon B n'a pas de séquence d'interaction avec les substrats en N-ter mais dispose d'une région transmembranaire insérée dans le domaine AAA+ qui permet l'orientation de son pore central vers la face interne de la membrane cellulaire. L'on trouve aussi Lon B dans certaines bactéries abritant les deux catégories de protéase Lon.

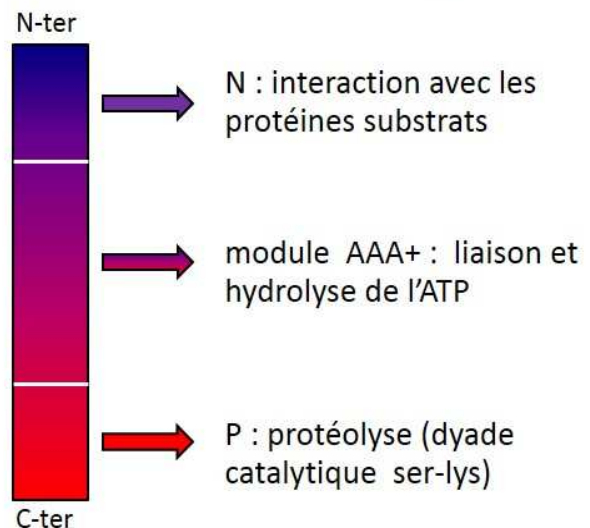


**Figure 18 : structure de la protéase Pim1/Lon de *S. cerevisiae* observée en cryo-microscopie électronique (d'après Stahlberg et al., 1999).** La protéase Lon a une structure en anneau. L'hydrolyse de l'ATP induit un changement de conformation de Lon : l'anneau dissymétrique présentant deux protrusions adjacentes en absence d'ATP devient symétrique en présence d'ATP. Ces variations de forme suggèrent que des modifications de conformation sont nécessaires au dépliement et à la translocation des substrats vers le site actif de Lon.

### structure oligomérique

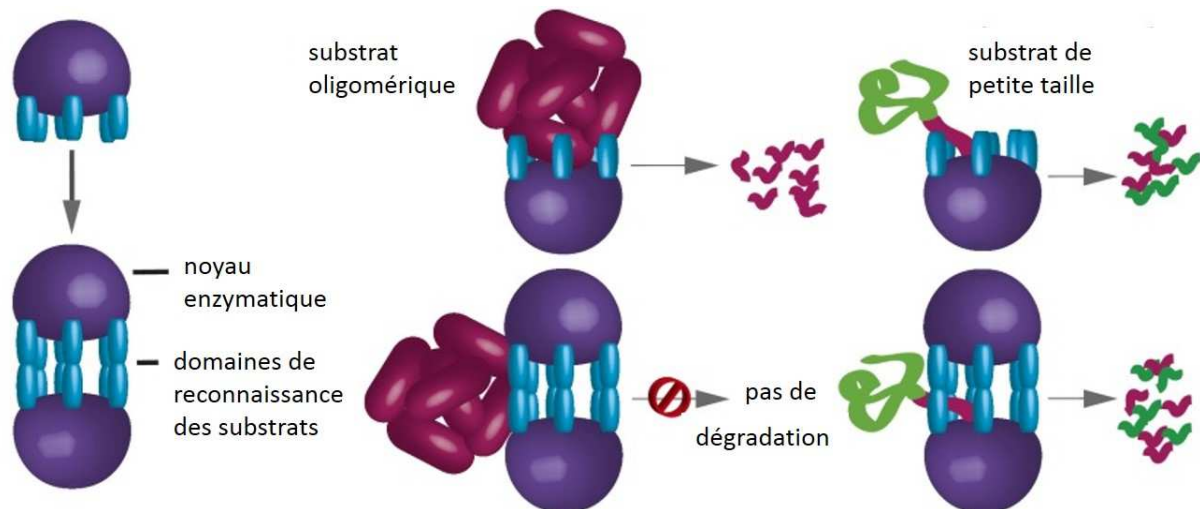


### structure monomérique



**Figure 19 : schéma des structures oligomérique et monomérique des protéases Lon A.** Chaque monomère de Lon porte les trois domaines nécessaires à son fonctionnement : de N-ter vers C-ter, un domaine d'interaction avec les substrats, un module de liaison et d'hydrolyse de l'ATP, un domaine protéolytique.

La séquence N-ter de Lon A joue un rôle important dans l'association avec les substrats. Des variants de Lon affectés de délétions dans cette région ont démontré une incapacité à se lier avec leurs substrats tandis que leur activité ATPase est maintenue. Aucun signal d'adressage vers la dégradation n'ayant été identifié dans la mitochondrie, c'est la perte de structure secondaire des protéines substrats qui serait reconnue par Lon. Elle interagit ainsi avec des séquences hydrophobes normalement enfouies au cœur des protéines et rarement exposées en surface. Les protéines mal repliées ne sont toutefois pas les seules proies de Lon puisque celle-ci dégrade également des protéines natives régulatrices porteuses d'un signal de dégradation à leur extrémité N ou C-ter. C'est le cas de la protéine Sula d'*E. coli* qui arbore un tel signal de dégradation en C-ter. Cette séquence d'adressage est modérément hydrophobe et se termine par une tyrosine suivie d'une histidine, deux résidus particulièrement sensibles en matière de liaison à Lon. L'adjonction à une protéine modèle des vingt derniers résidus de l'extrémité C-ter de Sula s'est d'ailleurs révélée suffisante pour induire une dégradation par Lon. Une fois reconnues, les protéines cibles de Lon sont dépliées si nécessaire puis transférées de façon ATP-dépendante dans le pore central de la protéase, direction la chambre protéolytique que la fixation de l'ATP au module AAA+ aura rendue active.



**Figure 20 : rôle potentiel des hexamères et "dodécamères" de Lon dans la dégradation des protéines (d'après Vieux et al., 2013).** L'association de deux hexamères de Lon au niveau des domaines de reconnaissance des substrats aboutit à la formation d'un "dodécamère". Les domaines N-ter forment alors une sorte de portail empêchant l'accès des protéines de grande taille.

L'extrémité N-ter de Lon ne sert pas uniquement à la reconnaissance des substrats. Elle régule aussi l'activité de la protéase. En effet la fixation du substrat à ce domaine enclenche une réponse modulable qui ne se traduit pas automatiquement par une dégradation et qui mobilise les deux autres domaines du monomère Lon avec des intensités variables. L'activité

de Lon peut aussi être contrôlée par ses substrats (Gur 2009), par des modifications post-traductionnelles (Zhou 2018) ou par ses propres structures quaternaires. Chez *E. coli*, deux hexamères de Lon peuvent interagir au niveau de leur domaine N-ter formant ainsi un "dodécamère" muni en son centre d'une sorte de portail qui semble limiter l'accès à la dégradation aux protéines de petite taille (Figure 20).

Quant aux inhibiteurs de Lon, aucun de ceux décrits jusqu'ici ne sont spécifiques même si quelques molécules ont révélé des résultats prometteurs.

## 2) Une protéine de stress

Postée dans la matrice mitochondriale, donc dans un environnement particulièrement exposé aux dommages engendrés par les ERO, la protéase Lon est considérée comme la première ligne de défense contre l'accumulation des protéines oxydées. Une fonction qui la place au cœur des processus impliqués dans le vieillissement et un certain nombre de pathologies.

L'investissement de Lon dans l'élimination des protéines oxydées a été maintes fois observé. Bayot et al. (2010) ont ainsi identifié des protéines telles que Hsp60 ou Sod2 montrant un niveau d'oxydation accru chez des levures sous exprimant Lon. Une fois endommagées, les enzymes dotées de groupes prosthétiques sensibles à l'oxydation font partie des cibles privilégiées par Lon. De plus, que ce soit dans le foie de rats âgés, dans la levure ou dans des cellules HeLa, une accumulation de cellules carbonylées a été remarquée concomitamment avec une baisse de l'activité de Lon.

L'apport de Lon dans le contrôle qualité de la mitochondrie déborde du cadre de la dégradation des protéines modifiées. La protéase intervient également auprès de l'ADN mitochondrial et des protéines mal repliées. Chez la levure, Lon dégrade ces dernières en coopération avec des chaperones ou lorsque celles-ci sont défailtantes. Toujours chez la levure mais aussi chez les mammifères et les bactéries, Lon peut empêcher l'accumulation de protéines mal repliées grâce à une activité de chaperone indépendante de sa fonction protéolytique. Cette activité de chaperone l'amène par ailleurs à prendre part à l'assemblage des complexes de la chaîne respiratoire (Rep 1996). Quant à l'ADN mitochondrial, Lon a la capacité de s'y lier sur des séquences spécifiques. Dans les cellules de mammifères en culture, il s'agit préférentiellement de la région contrôle contenant les origines de réplication ainsi que les



promoteurs des brins lourd et léger. Lon interfère de plus avec certaines composantes du nucléoïde, à savoir la polymérase  $\gamma$ A, l'hélicase Twinkle et le facteur de transcription TFAM qu'elle dégrade, ce qui suggère qu'elle est impliquée dans la maintenance et la régulation de la réplication et de la transcription du génome mitochondrial. La perte de Lon se traduit d'ailleurs par des délétions et une altération de l'expression des gènes mitochondriaux de la levure.

Autant de constats qui permettent d'accorder à Lon une fonction de protéine de stress. D'autant que des sites de fixation de facteurs de transcription tels que HIF-1 (Hypoxia-Inducible Factor 1) ou Nrf 2 ont été détectés sur le promoteur de Lon (Pinti et al. 2011). Cette vocation, Lon n'en a pas seulement donné la preuve face à un stress oxydant. Elle a également démontré qu'elle est capable de répondre à un choc thermique ou à une carence en sérum (Ngo and Davies 2009).

## **B) Lon et la dysfonction mitochondriale**

Acteur clé du contrôle qualité mitochondrial, la protéase Lon occupe un poste stratégique dans le maintien de l'homéostasie de la matrice mitochondriale et, de là, dans la fonction et l'intégrité structurale de la mitochondrie. D'où les perturbations enregistrées au niveau de la morphologie et la fonction mitochondriales dans des fibroblastes de poumon appauvris en Lon, perturbations accompagnées d'une activation de l'apoptose. A l'inverse une hausse des niveaux de Lon a été associée à une fonction mitochondriale conservée et une survie cellulaire améliorée dans des cellules de patients souffrant de rhabdomyosarcome exposées à différents stress. De même, une stimulation de la biogénèse mitochondriale a été observée en même temps qu'une plus forte expression de Lon chez des rats atteints d'hyperthyroïdie ou d'un hépatome de Zadjela.

L'on comprend une bonne partie de ce que la mitochondrie doit à Lon à l'inventaire de ses cibles identifiées à ce jour. Cette liste regroupe plusieurs fleurons des divers compartiments de la vie des mitochondries. L'on peut ainsi citer PINK1 dans le domaine de la mitophagie, (Thomas et al. 2014), l'aconitase mitochondriale et la pyruvate déshydrogénase kinase 4 (PDK4) dans le métabolisme énergétique (Bota and Davies 2002), (Crewe et al. 2017), TFAM dans la réplication et la transcription de l'ADN mitochondrial (Lu et al. 2013), ou encore les sulfiredoxines importées dans la mitochondrie dans le cadre de la signalisation redox (Kil, 2015).

Cette contribution de Lon à l'homéostasie mitochondriale lui vaut une part de responsabilité significative dans la dysfonction mitochondriale, en général et, en particulier, dans la longévité et le vieillissement. La durée de vie répllicative est diminuée chez la levure subissant une déficience en Lon (Erjavec, 2013). A l'inverse, une surexpression de Lon a allongé la durée de vie en bonne santé de *P. anserina* (Luce, Osiewicz 2009). Par ailleurs, les mutations du génome mitochondrial s'accumulant avec le temps, le rôle de maintenance que Lon exerce sur l'ADN mitochondrial constitue lui aussi un moyen d'agir sur les effets du vieillissement.

De plus, une baisse d'expression et/ou d'activité de Lon a été notée chez la souris (Bota, Davies 2002). Comme si cela ne suffisait pas, les effets néfastes que le temps inflige à Lon sont exacerbés par l'amplification d'un stress oxydant chronique. Ngo et al. (2013) se prononcent à ce sujet pour une régulation de Lon en deux phases, à savoir une intensification de son action sous l'effet d'un stress transitoire suivie par un affaiblissement lorsque ce stress devient chronique. De plus, dans un modèle murin d'insuffisance cardiaque, Lon a démontré une propension aux modifications oxydatives amoindrissant sa capacité protéolytique. Les propriétés de Lon varient toutefois d'un tissu à l'autre. Une augmentation des niveaux de Lon liée à l'âge a ainsi été détectée dans des cœurs de rat en même temps qu'une activité inchangée laissant supposer une accumulation de protéases Lon inactives. Enfin, une sous expression de Lon a induit des anomalies morphologiques sur des mitochondries de fibroblastes pulmonaires humains ainsi qu'une stimulation de la mitophagie dans des cellules HeLa. Une augmentation des niveaux de PINK1-Parkin dirigeant la mitochondrie vers la mitophagie a d'ailleurs été démontrée chez la drosophile déficiente en Lon.

Revers de la médaille, le bénéfice que l'homéostasie mitochondriale tire de la présence de Lon semble profiter aussi à la stratégie proliférative de la cellule cancéreuse. En effet, sans Lon, cette dernière semble se porter moins bien. En témoigne la moindre susceptibilité à développer des tumeurs décelée chez des souris hétérozygotes pour Lon et le phénotype de sénescence observé dans des cellules murines de mélanome sous exprimant Lon (Quiros et al. 2014).

Pour conclure, deux pathologies attribuées chez l'homme à des mutations de Lon attestent du lien étroit qui unit cette protéase à la fonction mitochondriale. Des mutations de Lon ont été récemment décelées chez un enfant présentant une acidose lactique congénitale, une faiblesse musculaire et des anomalies observées en IRM (Imagerie par Résonance

Magnétique) suggérant un syndrome de Leigh (Peter et al. 2018). Le tableau clinique de ce bébé décédé à l'âge de 7 mois rassemblait donc les signes d'une pathologie mitochondriale. Une biopsie musculaire a d'ailleurs révélé d'importantes déficiences de la phosphorylation oxydative ainsi qu'une sévère déplétion de l'ADN mitochondrial.

Quatre mutations de Lon ont été trouvées chez dix personnes souffrant du syndrome Cudas (Strauss et al. 2015). Les lignées cellulaires lymphoblastoïdes générées à partir de ces patients ont notamment révélé des anomalies de la morphologie mitochondriale, des inclusions intra mitochondriales denses aux électrons, des agrégats de sous-unités 2 du complexe IV de la chaîne respiratoire et une capacité de réserve respiratoire diminuée. Le tout aboutissant à une homéostasie protéique et une fonction mitochondriales altérées.

Les manifestations caractéristiques de la maladie sont des troubles psychomoteurs, une cataracte, une dentition anormale, un retard d'éruption dentaire, des malformations auriculaires, une surdité neurosensorielle, une petite taille avec une dysplasie épiphysaire marquée et un phénotype facial peu commun caractérisé par une ptôse palpébrale, des yeux bridés et des narines antéversées. Certains de ces signes cliniques sont retrouvés dans d'autres maladies mitochondriales mais ce n'est pas le cas de tous. Ces derniers troubles pourraient provenir de processus dépendant de l'activité de Lon et étendant son influence au-delà de la mitochondrie. Ils rappellent en tous cas, si besoin était, que la protéase Lon est encore loin d'avoir livré tous ses secrets. Un nouveau champ d'action n'a-t-il pas été récemment ajouté à son répertoire, à savoir les microdomaines membranaires inter-organites formés entre le réticulum endoplasmique et les mitochondries (Polo et al. 2017).

# Résultats

## **Publication 1**

### Effect of Lon protease knockdown on mitochondrial function in HeLa cells

Aurélien Bayot, Monique Gareil, Laurent Chavatte, Marie-Paule Hamon, Caroline L'Hermitte-Stead, Florian Beaumatin, Muriel Priault, Pierre Rustin, Anne Lombès, Bertrand Friguet, Anne-Laure Bulteau

## **Introduction**

Principal producteur d'énergie de la cellule eucaryote, la mitochondrie est également une source majeure d'espèces réactives de l'oxygène (ERO) et une cible privilégiée des dommages oxydatifs infligés aux protéines. Les processus responsables d'une augmentation des niveaux d'ERO et de protéines oxydées sont facteurs d'altérations du fonctionnement de la chaîne respiratoire, de la dynamique, de la biogénèse et de l'autophagie mitochondriales. Autant de perturbations qui placent la mitochondrie au cœur des mécanismes impliqués dans diverses pathologies et dans le vieillissement tant celui-ci paie un lourd tribut à l'accumulation de protéines endommagées et aux déficiences des systèmes de maintenance des protéines (Hamon, Bulteau, and Friguet 2015), (Murphy 2016), (Cedikova 2016).

En charge de l'élimination des protéines endommagées au sein de la matrice mitochondriale, la protéase Lon est un acteur clé du contrôle qualité des protéines mitochondriales. Plus particulièrement impliquée dans l'élimination des protéines oxydées et la maintenance de l'ADN mitochondrial, elle joue à ce titre un rôle prépondérant dans le maintien des fonctions mitochondriales et, de là, dans un certain nombre de pathologies ainsi que dans les processus liés au vieillissement (Bota and Davies 2016). Lon peut elle aussi être victime du vieillissement puisqu'elle a démontré des déficiences liées à l'âge, déficiences s'accompagnant d'une accumulation de protéines modifiées sous l'effet d'une oxydation (Delaval, Perichon, and Friguet 2004) ainsi que d'une baisse de la durée de vie répliquative chez la levure (Erjavec et al. 2013).

Les études présentées dans cette publication ont été menées dans le but de préciser le rôle de Lon dans le maintien de la fonction mitochondriale. Elles ont été réalisées sur des cellules HeLa transfectées de manière à obtenir une sous expression stable de Lon en induisant l'expression d'un shRNA anti-Lon.

## **Résultats**

Les résultats obtenus ont montré des variations phénotypiques modérées dans les cellules HeLa sous exprimant Lon.

Une déficience de Lon ne modifie pas la viabilité de ces cellules. Que ce soit au niveau de la transcription ou à celui de la traduction, une sous-expression de Lon ne s'accompagne pas non plus d'une augmentation des niveaux d'expression mesurés sur un certain nombre de

protagonistes des différents secteurs du contrôle qualité mitochondrial, à savoir la protéolyse, la détoxification, la réparation et le chaperonnage des protéines. L'on remarque cependant une augmentation de l'activité protéolytique dans la matrice mitochondriale des cellules déplétées en Lon alors que, dans cette condition, l'activité du protéasome baisse légèrement. Autres acteurs du contrôle qualité dans la mitochondrie, puisqu'ils peuvent éliminer les mitochondries endommagées (Meyer, Leuthner, and Luz 2017), (Redmann et al. 2018), la dynamique du réseau mitochondrial et le flux autophagique n'apparaissent pas affectés par une déficience de Lon.

Lon intervenant dans la composition de la chaîne respiratoire (Sepuri et al. 2017), on pouvait s'attendre à un impact de sa raréfaction sur la fonction respiratoire. Les différentes explorations de cette fonction effectuées dans le cadre de ces travaux n'ont rien révélé de tel. Concernant le métabolisme énergétique, nous avons noté une hausse des niveaux d'aconitase mitochondriale en absence de Lon. Un résultat en accord avec les travaux de Bota et al. (Bota, Ngo, and Davies 2005), même si ce n'est pas le cas de leurs observations sur l'effet d'une sous expression de Lon en matière de survie cellulaire.

La mitochondrie se plaçant en tête des producteurs d'ERO dans la cellule et Lon ayant démontré des aptitudes à réguler cette production d'ERO (Kuo et al. 2015), cette étude s'est donc penchée sur les variations redox susceptibles d'assortir une sous expression de Lon. Une légère augmentation des niveaux d'ERO et de carbonylation des protéines a ainsi été notée sans impact sur l'expression des diverses enzymes antioxydantes analysées.

## **Discussion**

Sous exprimer la protéase Lon dans des cellules HeLa n'induit pas de réponse marquée au stress protéotoxique dans la mitochondrie. Le maintien de la viabilité cellulaire n'est donc pas dû à une riposte des systèmes de contrôle qualité. Cette absence de réaction semble indiquer que la carence en Lon générée ici n'engendre ni menace pour l'homéostasie protéique mitochondriale ni une surcharge en protéines défectueuses suffisante pour recruter la réponse mitochondriale aux protéines mal repliées, un processus notamment orchestré par ClpXP (Al-Furoukh et al. 2015). Quant à l'intensification de l'activité protéolytique observée dans la matrice, elle peut être due à l'activation d'autres protéases telles ClpP ou *m*-AAA. Elle peut aussi être le fait des niveaux de Lon qui persistent malgré le silencing appliqué pour cette étude.

La sous expression de Lon peut néanmoins installer un certain de niveau de stress. En témoigne la baisse d'activité du protéasome qui peut être la conséquence d'un stress oxydant (Ding 2015) et nuire à la fonction mitochondriale (Bragoszewski, Turek, and Chacinska 2017). Certes les effets d'un silencing de Lon sur la fonction respiratoire mitochondriale ne permettent pas ici de conclure à une dysfonction mitochondriale importante. Toutefois, l'augmentation des niveaux d'aconitase constatée en absence de Lon peut correspondre à une accumulation d'aconitase mitochondriale oxydée donc inactive et de nature à perturber la fonction mitochondriale (Quiros 2018).

La hausse des niveaux d'ERO et de protéines oxydées ne semble pas non plus atteindre un degré suffisant pour déclencher une dysfonction mitochondriale. L'on n'observe pas là le niveau de stress oxydant relevé chez la levure privée des services de Lon, ce qui peut s'expliquer par une compensation provenant de l'activité accrue d'autres protéases comme Clp, absente chez *S. cerevisiae* (Erjavec et al. 2013).

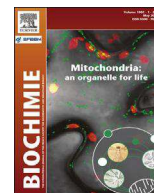
En conclusion, les cellules HeLa n'apparaissent pas aussi affectées par une déplétion en Lon que d'autres types cellulaires tels que les cellules hépatiques SK-HEP-1 ou les fibroblastes pulmonaires humains (Bota, Ngo, and Davies 2005), (Lee et al. 2011). Les effets d'un déclin de Lon sont donc dépendants des espèces et/ou des types cellulaires. Différents facteurs peuvent expliquer ces disparités, tels le niveau de compensation procuré par d'autres protéases ou par les effectifs persistants de Lon. Il n'en reste pas moins qu'une défaillance de Lon a montré ici une influence sur le statut oxydatif de la cellule invitant à poursuivre les investigations sur le rôle de cette protéase mitochondriale.





Contents lists available at ScienceDirect

Biochimie

journal homepage: [www.elsevier.com/locate/biochi](http://www.elsevier.com/locate/biochi)

Research paper

## Effect of Lon protease knockdown on mitochondrial function in HeLa cells



Aurélien Bayot<sup>a,d</sup>, Monique Gareil<sup>a</sup>, Laurent Chavatte<sup>b,1</sup>, Marie-Paule Hamon<sup>a</sup>,  
Caroline L'Hermitte-Stead<sup>e</sup>, Florian Beaumatin<sup>c</sup>, Muriel Priault<sup>c</sup>, Pierre Rustin<sup>d</sup>,  
Anne Lombès<sup>e</sup>, Bertrand Friguet<sup>a,\*</sup>, Anne-Laure Bulteau<sup>a,1</sup>

<sup>a</sup>UR4 – Vieillesse, Stress, Inflammation, Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, Université Pierre et Marie Curie, 4 Place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France

<sup>b</sup>Centre de recherche de Gif-sur-Yvette, FRC 3115, Centre de Génétique Moléculaire, CNRS, UPR3404, 91198 Gif-sur-Yvette Cedex, France

<sup>c</sup>Institut de Biochimie et Génétique Cellulaires, UMR 5095, CNRS, Université Bordeaux 2, France

<sup>d</sup>Inserm, Hôpital Robert Debré, 75019 Paris, France

<sup>e</sup>Inserm, Institut Cochin, 75014 Paris, France

### ARTICLE INFO

#### Article history:

Received 23 July 2013

Accepted 4 December 2013

Available online 17 December 2013

#### Keywords:

Lon protease

Mitochondria

HeLa cells

Protein oxidation

Cellular redox status

### ABSTRACT

ATP-dependent proteases are currently emerging as key regulators of mitochondrial functions. Among these proteolytic systems, Lon protease is involved in the control of selective protein turnover in the mitochondrial matrix. In the absence of Lon, yeast cells have been shown to accumulate electron-dense inclusion bodies in the matrix space, to lose integrity of mitochondrial genome and to be respiratory deficient. In order to address the role of Lon in mitochondrial functionality in human cells, we have set up a HeLa cell line stably transfected with a vector expressing a shRNA under the control of a promoter which is inducible with doxycycline. We have demonstrated that reduction of Lon protease results in a mild phenotype in this cell line in contrast with what have been observed in other cell types such as WI-38 fibroblasts. Nevertheless, deficiency in Lon protease led to an increase in ROS production and to an accumulation of carbonylated protein in the mitochondria. Our study suggests that Lon protease has a wide variety of targets and is likely to play different roles depending of the cell type.

© 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.

### 1. Introduction

Mitochondria are a major source of intracellular reactive oxygen species (ROS), the production of which increases with ageing and cancer. The deleterious effects of ROS may be responsible for the impairment of mitochondrial function observed during various pathophysiological states associated with oxidative stress, ageing and cancer. These organelles are also targets of oxidative damage (oxidation on mtDNA, lipids, proteins) [1]. An important factor for

protein maintenance in the presence of oxidative stress is the enzymatic removal of oxidative modifications and/or protein degradation. Two soluble ATP-dependent proteases, Lon and ClpXP, are found in the matrix of mammalian mitochondria. Lon is a homo-oligomeric complex whereas ClpXP is a hetero-oligomeric complex. This hetero-oligomer of ClpXP is comprised of two subunits: ClpP, the proteolytic component, and ClpX, the ATPase component [2]. Currently, information regarding the role and the identity of specific protein substrates for each of the ATP-dependent proteases is limited [3–7]. The Lon protease is especially efficient in the recognition and proteolysis of misfolded and damaged protein structures [8]. Reduced Lon activity has been associated with insufficient degradation and accumulation of oxidized protein, impaired mitochondrial function and cell death in WI-38 fibroblasts [9]. The Lon protease has been reported to exhibit an age-related impairment in skeletal muscle, liver and heart that was associated with a buildup of oxidatively modified protein [10,11]. Age-dependent increases in the levels of oxidatively modified protein may therefore be due, in part, to decreased clearance of damaged protein by proteases such as Lon. Lon

*Abbreviations:* ROS, reactive oxygen species; MTT, 3,4,5-dimethylthiazol-2-yl-2,5-diphenyltetrazoliumbromide; COX, cytochrome c oxidase; VO<sub>2</sub>, oxygen consumption rate; FCCP, carbonyl cyanide-trifluoromethoxy phenylhydrazone; CCCP, carbonyl cyanide-chloro phenylhydrazone; HBSS, Hank's buffered salt solution.

\* Corresponding author. Laboratoire de Biologie Cellulaire du Vieillesse – UR4 – Vieillesse, Stress, Inflammation, Université Pierre et Marie Curie – Paris 6, case courrier 256, 4 Place Jussieu, 75252 Paris Cedex 05, France. Tel.: +33 1 44 27 32 05; fax: +33 1 44 27 51 40.

E-mail address: [bertrand.friguet@snv.jussieu.fr](mailto:bertrand.friguet@snv.jussieu.fr) (B. Friguet).

<sup>1</sup> Present address: Laboratoire de Chimie Analytique Bio-Inorganique et Environnement, CNRS/UPPA, UMR5254, 64053 Pau Cedex, France.

0300-9084/\$ – see front matter © 2013 Elsevier Masson SAS. All rights reserved.  
<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.12.005>

protease expression is enhanced in mammalian cells exposed to stresses such as heat shock, oxidative stress, endoplasmic reticulum stress and hypoxia while transient overexpression of Lon protease partially prevents mitochondrial dysfunction [12–15]. In addition to its proteolytic activity, mammalian Lon has also been shown to display chaperone properties and to specifically bind sequences of human mitochondrial DNA and RNA, as well as to interact with mitochondrial DNA polymerase  $\gamma$ , the twinkie helicase and to degrade TFAM [16,17]. Therefore, Lon may participate in replication/transcription of mtDNA. Lon is emerging as an important player in the mitochondria by operating in protein quality control and stress response pathways. The effects of its down regulation have been preferentially evaluated in *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae* and *Drosophila melanogaster* [18–20]. Few studies investigated the effects of Lon down-regulation in human cells [9,16,21–23]. We have recently shown that Lon activity declines in old yeast and that Lon deficiency shortens the replicative life span of yeast mother cells [24]. This accelerated ageing of cells disrupted for Lon is accompanied by elevated cytosolic levels of oxidized and aggregated proteins, as well as reduced proteasome activity. In order to address the role of Lon in mitochondrial functionality in human cells, we have set up a HeLa cell line stably transfected with a vector expressing a shRNA under the control of a promoter, which is inducible by Doxycycline. We demonstrated that reduction of Lon protease results in a mild phenotype. Indeed, we have found no change in respiration, as well as in the enzymatic activities of the electron transport system complexes in cell disrupted for Lon. No changes in mitochondrial dynamics and no increase of mitophagy were observed. Although down regulation of Lon protease is not associated with a severe phenotype in HeLa cells, we have found that Lon deficiency leads to an increase ROS production and an increased level of oxidatively modified protein.

## 2. Material and methods

### 2.1. Materials and cells

All reagents were of the highest purity and purchased from (Sigma–Aldrich, St. Louis, MO, USA) unless otherwise stated. HeLa T-Rex™ cells were transfected (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) with a 68-base Lon-specific oligonucleotide (5'-gatctccgtctcgtcggcagcctttcaagagaaggctggcgagacgaacttttggaaagctt-3') annealed to its complementary sequence pENTR/H1/T0+ (Block it-Invitrogen) and inserted into pENTR/H1/T0+ (Block it-Invitrogen) as previously reported [25]. Clones of HeLa-tet-on-shLon cells were selected in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) 1 g/L glucose supplemented with 10% fetal bovine serum, 50  $\mu$ g/ml uridine (Invitrogen), 5  $\mu$ g/ml blasticidin (Invitrogen), and 200  $\mu$ g/ml zeocin (Invitrogen) and cultured in the presence or absence of 2  $\mu$ g/ml Doxycycline.

### 2.2. Cell viability analysis

Cell viability analysis was performed by MTT assay. Cells were stained with MTT reagent (5 mg/mL). After 2 h incubation with MTT reagent, the crystals were dissolved with DMSO. Two hundred microliters of the final solutions were analysed at 562 nm on a spectrophotometer (Fluostar Galaxy; bMG, Stuttgart, Germany).

### 2.3. RNA isolation and real-time quantitative PCR analysis

Total RNA from cultured cells was extracted using a NucleoSpin® RNA II kit (Macherey Nagel, Düren, Germany). A reverse transcription was performed on 3  $\mu$ g of total RNA using a SuperScript®

III First-Strand Synthesis System (Invitrogen). PCRs were performed on a LightCycler® 480 Real-Time PCR system (Roche Applied Science, Mannheim, Germany) at the technical platform of the IFR 83 at Université Pierre et Marie Curie-Paris 6. Each reaction was carried out in 10  $\mu$ l with 2  $\mu$ l of cDNA (equivalent to 10 ng of reverse transcribed RNA), 500 nM primer concentration, and 1X LightCycler® 480 SYBR Green I master mix (Roche Applied Science). Serial dilutions of cDNA (40–2 ng) were used to generate a quantitative PCR standard curve. To normalise gene expression, ACTB was used as a reference gene and was amplified with GCTAC-GAGCTGCCTGACG as forward primer and GGCTGGAAGAGTGCTCA as reverse primer. The LightCycler protocol was as follows: 5 min of 95 °C hot start enzyme activation; 45 cycles of 95 °C denaturation for 10 s, 60 °C annealing for 10 s, and 72 °C elongation for 10 s; and melting at 95 °C for 10 s, 65 °C for 60 s, and then heating to 97 °C. Water was used as the template for negative control amplifications included with each PCR run. All reactions were performed in triplicate. Data were analysed using Roche LightCycler® 480 Software, and CP was calculated by the second derivative maximum method. The amount of the target gene mRNA was examined and normalised to the ACTB gene mRNA. The relative expression ratio of a target gene was calculated as described [26], based on real-time PCR efficiencies. Primers pairs are listed in Table 1 and were designed using Probe Finder software (available on-line from Roche Applied Science).

### 2.4. Morphological analyses

For immunofluorescent labelling of the mitochondrial compartment, cells were plated at subconfluence on glass coverslips at least 72 h before their rapid wash in warm PBS followed by fixation in 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde. Mitochondrial compartment was visualized using polyclonal antibodies against cytochrome c oxidase subunit 2 (anti-COX2) [27]. Coverslips were mounted in Mowiol containing 0.15  $\mu$ g/mL DAPI. Fluorescent images were acquired as previously described [28].

### 2.5. mtROS assay

mtROS production was determined using MitoSOX Red mitochondrial superoxide indicator (Invitrogen), which is selectively targeted to the mitochondria and is fluorescent upon ROS oxidation. MitoSOX was used according to the manufacturer's protocol and published literature [29]. Briefly, cells were incubated with MitoSOX (5  $\mu$ M) in cell culture media. Cells were then pretreated or not with inhibitors (2.5  $\mu$ g/mL antimycin) as indicated. Fluorescence intensity was recorded immediately after the addition of the probe (t0), and then during a kinetic measurement of 15 min. Fluorescent signal emitted from the oxidized MitoSOX™ Red reagent was detected by flow cytometry (BD Accuri™ C6, BD Biosciences, CA, USA). Rate of superoxide production during the kinetic measurement was quantified by plotting the fluorescent values with time and by calculating the slope of the fitted curve.

### 2.6. Isolation of mitochondria and preparation of protein extracts

Cells were harvested and resuspended in MST buffer (210 mM mannitol, 70 mM sucrose, 5 mM Tris–HCl, pH 7.5). All the subsequent steps were carried out at 4 °C. Cells were homogenized using a dounce. Unbroken cells were removed by centrifugation at 1000 g for 5 min and supernatants were centrifuged (14,000 g, 10 min, 4 °C). Mitochondria pellets were resuspended with MST. Protein content was determined using the Bradford method (Bio-Rad, Marnes la coquette, France). Submitochondrial fractionation and

**Table 1**  
Analysis of the expression level of genes of interest. The expression level of genes of interest was determined in control and HeLa cells depleted for Lon by quantitative PCR experiments, as described in [Material and methods](#). For each gene, the relative expression (Lon depleted cells/control) was determined by calculating the ratio between the expression level from Lon depleted cells and control cells at day 10 after doxycycline induction. Sequences of primers used are depicted: the first is the forward and the second is the reverse.

Genes	Primers (5'–3')	Expression level in non induced cells	Expression level in induced cells	Average ratio induced/non induced
LON	TCATGGTGGAGGTAGAGAACG TCACGATCTCTGCAGTCAGG	0.86 ± 0.03	0.08 ± 0.00	0.09
HSP70	CCCTCTTCGCCATCTCCT GCCCCTCATCAACACAGAGAAG	0.59 ± 0.03	0.65 ± 0.04	1.10
HSP60	GTGAAAAAGGAATCATTGACC GTAGTTAACAGAGAGGCCACACC	0.90 ± 0.10	0.88 ± 0.08	0.98
HSP90	GCAGGGCAACACCTCTACA TTCTCAGGCATCAGTAGCC	0.56 ± 0.03	0.78 ± 0.11	1.39
CLPP	GGCCAAGCCACAGACATT AGAGCTGCTTCTTGAGCTTCAT	0.72 ± 0.04	0.73 ± 0.04	1.01
CLPX	GGTGCTTCAATGGTTAGACAG GATGGTGTCCAAATCCAAGA	0.98 ± 0.06	0.85 ± 0.10	0.87
AFG	TCATCTCCGACCCTAAAAC ATGCCAGTTTTCTTGCCAAT	1.16 ± 0.07	1.04 ± 0.09	0.90
HTRA2	GGGCAGTGCTGTTGTTGT CATCTGCGATGAAGTTGACTGA	0.88 ± 0.05	0.89 ± 0.08	1.01
PHB1	GTGGCTCGCTTGTATGCT GCTCGCTCTGTAAGGTCGTC	1.03 ± 0.05	0.94 ± 0.05	0.91
PHB2	GATGCTTGGAAGCACTGA GTGATGTGGCGATCGTCT	0.79 ± 0.06	0.65 ± 0.06	0.82
ACO2	CAGTGGGACAGGAAGGACAT TCCTGTTGTAGGAGGTGACGA	0.84 ± 0.06	0.84 ± 0.06	1.00
OPA1	CCGTAGCCCTGAGACCATA CACCTGGTAAGTCAACAAGCAC	0.75 ± 0.15	0.72 ± 0.05	0.96
MFN1	AGATTTTCAAGAGGATATTGTATTCG TTCTAGGGCCAAAATCG	0.92 ± 0.17	1.24 ± 0.06	1.35
MFN2	GCTCTGGGACAAAGTTCTGC GGCCATCTGTGCCCTCTA	0.82 ± 0.05	0.59 ± 0.03	0.72
MSRA	AAACTGGCCATGCAGAAGTC TTGAGCAGTTCTCAAAACTCA	0.88 ± 0.04	0.68 ± 0.09	0.77
MSRB	GGGAGGCAGGGTCTCTTG CTGCTCCGGGTTAGTTTCT	1.05 ± 0.13	0.84 ± 0.05	0.80
GPX1	CCCTCTCTTCGCCTTCTCT CAACATCGTTGCGACACAC	0.97 ± 0.12	0.72 ± 0.07	0.74
SOD2	GCAAGGAACAACAGGCCTTA GTAGTAAGCGTGCTCCACAC	0.62 ± 0.02	0.69 ± 0.03	1.11
CAT	TTTAACGCCATTGCCACAG AATGTCATGACCTGGATGTAATAA	0.81 ± 0.07	0.60 ± 0.03	0.74
OMA1	CATTGTAGGCAGGGCATAA CAAACCAAGGAATAGCTTCCA	0.76 ± 0.12	0.79 ± 0.04	1.04
GPX4	CACCAAGTTCCTCATCGACA GGGCAGTCCCTCTCTATCA	0.63 ± 0.05	0.63 ± 0.05	1.00

matrix preparation were carried out as previously described [30], by hypotonic shock followed by sonication (1 min, 3 times) in 10 mM HEPES buffer (without EDTA; pH 7.2) and centrifugation (100,000 g, 60 min, 4 °C).

### 2.7. Enzymatic activities and high resolution respirometry

The activity of respiratory complexes II, III, IV, combined II + III, and citrate synthase were analysed as described [31]. High resolution respirometry was performed on intact cells diluted in culture medium with 1 g/L glucose as described [32]. Subsequent sequential additions were: 0.5 µg/mL oligomycin to measure residual respiration (resting VO<sub>2</sub>), 7.5 µM CCCP doses up to maximal respiration rate, and finally 1 mM KCN to evaluate non-respiratory oxygen consumption.

### 2.8. Measurement of mitochondrial proteolytic activity

Proteolytic activity was assayed as the rate of fluorescein isothiocyanate (FITC)–casein (Sigma, Saint-Quentin-Fallavier, France) degradation. Matrix protein were incubated in the assay buffer containing 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM DTT and 50 mM Tris, pH 7.9, in the

presence of 8 mM ATP. Proteolysis of FITC–casein (5 µg) was then performed at 37 °C. At indicated times, a 20 µL aliquot was removed and proteins were precipitated with 10% TCA (w/v). The mixture was then centrifuged at 15,000 g for 30 min at 4 °C. The supernatant containing the peptide fragments was neutralized by addition of 100 µL of 100 mM potassium borate, pH 10. The level of peptide fragments was determined by fluorimetric analysis ( $\lambda_{em} = 515$  nm and  $\lambda_{exc} = 495$  nm). Proteolytic activity was linear for 90 min under these conditions.

### 2.9. 20S proteasome peptidase activity

Peptidase activities of the proteasome were assayed with fluorogenic peptides. Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-amidomethylcoumarin (LLVY-AMC) was used for the chymotrypsin-like activity as previously described [30]. The mixture, containing 20 µg of cytosolic total protein in 25 mM Tris, pH 7.5, was incubated at 37 °C with the appropriate peptide substrate (25 µM LLVY-AMC) in a final volume of 200 µL. Enzymatic kinetics were monitored in a temperature-controlled microplate fluorimetric reader (Fluostar Galaxy; BMG, Stuttgart, Germany). Excitation/emission wavelengths were 350 nm/440 nm for aminomethylcoumarin.

### 2.10. Western blotting

Antibodies were anti-COX2, anti-MFN1, anti-MFN2 prepared in the group of Anne Lombès, France [27,28]; anti-aconitase as previously described [33]; anti-Hsp70 and Hsp60, anti respiratory chain complexes (cocktail OXPHOS) from Invitrogen; anti-70 kD, anti-OPA1 and DRP1 from (BD Biosciences), anti Lon, Clp, HNE and AGE prepared in the group of Bertrand Friguet [34]; and anti- $\alpha$  tubulin and actine from Sigma–Aldrich.

For western blotting proteins were separated by 12% SDS-PAGE and electrotransferred onto a Hybond nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA). Primary antibodies were visualized using peroxidase-conjugated secondary antibodies from Bio-Rad (Hertfordshire, UK). Quantification of western blot signals was performed using GeneSnap from Syngene application.

### 2.11. Detection of carbonylated proteins

Carbonylated proteins were detected and analysed after the derivatization of protein carbonyl groups with 2,4-dinitrophenyl hydrazine (DNPH) (Protein Oxidation Detection Kit, OxyBlot™, Millipore). Derivatized samples were incubated in Laemmli sample buffer for 5 min at 100 °C, resolved by SDS-PAGE in a 4–20% acrylamide gel and electrotransferred onto a Hybond nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech). The primary antibody for western blotting was raised against dinitrophenylhydrazine.

### 2.12. Autophagy assay by long-lived protein degradation

The degradation of radioactive L-[14C]valine-labelled long-lived proteins was measured as follows: cells were incubated for 24 h in complete medium with 0.1  $\mu$ Ci L-[14C]valine to label total proteins. Radioactivity was further pre-chased for 1 h in complete medium in the presence of an excess of L-valine (10 mM) to remove the contribution of short-lived protein degradation. Finally, cells were incubated for 6 h either in complete medium or in Hank's Buffered Salts Solution (HBSS) (autophagy was induced by amino acids and serum starvation in Hank's Buffered Salts Solution buffered with 2.2 g/L NaHCO<sub>3</sub>) in the presence or in the absence of bafilomycin-A1 and with an excess of L-valine. Supernatants were collected and free amino acids precipitated with 80% trichloroacetic acid (TCA), while proteins in adherent cells were precipitated with 10% TCA. Radioactivity was quantified in a scintillation liquid analyser Tri-carb 2100TR (Packard). Proteolysis is expressed as the percentage of free radioactivity released in the supernatant relative to the total radioactivity.

### 2.13. Statistical analyses

Quantitative data were expressed as median with bars showing the range from 10 to 90 percentiles unless specifically indicated. All values are expressed as the mean  $\pm$  SEM. Differences in means between 2 groups were analysed using 2-tailed Student's *t* test or, when data were not normally distributed, with a nonparametric Mann–Whitney *U* test. The threshold for significance was set at  $p = 0.05$ .

## 3. Results and discussion

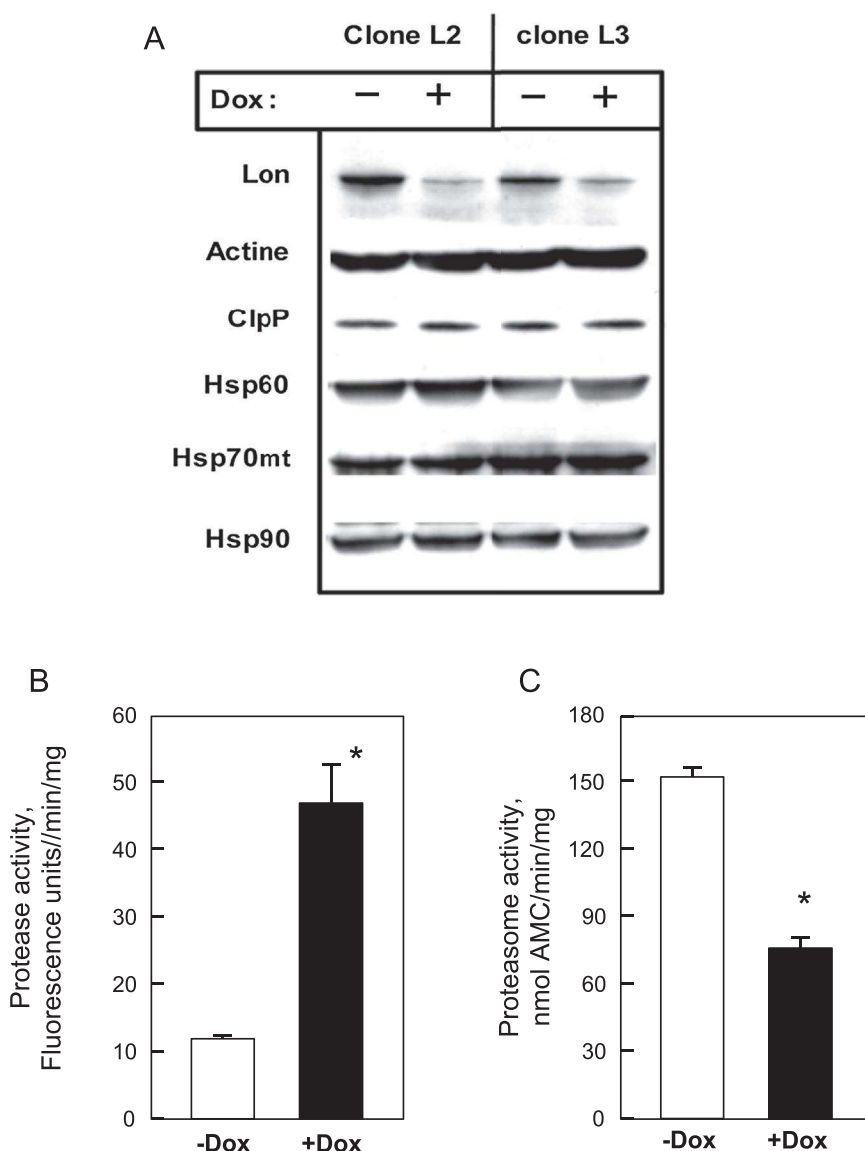
### 3.1. Lon deficiency does not induce a mitochondrial proteotoxic stress response in HeLa cells

To investigate whether a decline in Lon protease expression affected mitochondrial function in HeLa cells, one specific shRNA

was transfected into HeLa T-REx™ cells and after 10 days of induction with doxycycline the degree of Lon reduction (90% of extinction) was measured by RT-PCR and Western blot analysis in two selected clones (Fig. 1 and Table 1). For the rest of the study we have chosen to work on the clone L2. The silencing of Lon did not alter cell viability as measured by MTT assay (data not shown). We reasoned that the ability of Lon-depleted cells to maintain cell viability might be related to adaptative changes in the composition of the mitochondrial protein control systems. To investigate this, we measured mRNA levels of the genes encoding the mitochondrial proteases Clp, HtrA (inner membrane protease), AFG3L2 (m-AAA protease) and mitochondrial chaperones Hsp60, 70 and prohibitins (Scaffold proteins). Prior studies have shown that disruption of mitochondrial protein homeostasis and misfolding of mitochondrial protein can induce the transcription of selected nuclear genes encoding mitochondrial chaperones and proteases [35]. We found that the mRNA levels of all these genes were similar in Lon-depleted cells and control cell lines (Table 1). Moreover we confirmed these observations by western blot analysis (Fig. 1A). We found no evidence of increased transcription of genes encoding mitochondrial chaperones in Lon knockdown cells indicating that the level of protein misfolding is insufficient to activate the mitochondrial unfolded protein response [36]. Not much is known to date about the substrate specificity of the ClpP complex. It has been shown that ClpP is able to degrade a folding-impaired variant of a mitochondrial enzyme medium-chain acyl-CoA dehydrogenase [37]. This observation indicated a role of ClpP in protection against proteotoxic stress, similar to the Lon protease. However, the functional relationship between the two proteases existing in mammalian matrix mitochondria, Lon and ClpP, remains to be clarified. We next examined the fate of ATP-stimulated casein degradation activity of mitochondrial matrix that is a measure of both Lon and Clp proteolytic activities. We observed a 3 fold increase of this activity (Fig. 1B) in cells depleted in Lon protease and no change in basal casein degradation in the absence of ATP (Fig. S1) suggesting an activation of the other mitochondrial matrix ATP-dependent protease Clp, without an induction of its expression (Fig. 1A). In addition to Clp, mitochondrial membrane-associated proteases of the AAA family such as m-AAA and the remaining Lon protease could be also involved in the increase in ATP-stimulated proteolytic activity. We also observed a mild decrease in proteasome activity in cells depleted for Lon protease (Fig. 1C), which is in agreement with what we have previously observed in yeast depleted for Lon [24]. It is well established that proteasome dysfunction can be a consequence of oxidative stress and that proteasome inhibition induces mitochondrial dysfunction [38]. This creates a complex picture, in which several pathways are interconnected [39]. The dual role of Lon may be critical for protein maintenance and mitochondrial protein degradation to prevent impairment of the 20S proteasome. This observation highlights the interdependency between cytosolic and mitochondrial protein degradation systems.

### 3.2. Lon depleted HeLa cells show no significant alteration of mitochondrial activities

Lon protease is a multitasking protein [3,17,40,41]. Aside from its proteolytic activity it exhibits chaperon-like functions and is necessary for the assembly of the electron transport chain complexes [40–42]. We expected that respiratory function would be strongly affected by Lon deficiency. Therefore, we undertook integrated OXPHOS evaluation using spectrophotometric assays and high-resolution respirometry (Table 2 and Fig. 2). Analyses of intact cells respiration using Oroboros technology did not show any differences between control and Lon-depleted cells. HeLa cells



**Fig. 1.** Proteotoxic stress response in Lon depleted cells. Panel A: Western blot analysis of matrix proteases and chaperones of 2 selected clones L2 and L3 in whole cell homogenates from Lon depleted cells (+DOX) and control cells (-DOX) at 10 days after doxycycline induction. Panel B: Mitochondrial proteolytic activity was measured as the rate of degradation of FITC-casein in the presence of 8.0 mM ATP. White bars: control cells, black bars: Lon depleted cells. Values represent the mean  $\pm$  SEM for 3 separate experiments. Panel C: Proteasome activity was measured in the cytosolic fraction from control cells (white bars) and Lon depleted cells (black bars). Chymotrypsin-like activities of proteasome present in the cytoplasmic milieu were evaluated using the fluorogenic peptides LLVY-MCA. The specific inhibitor MG-132 (20  $\mu$ M) was used to ensure that measured activities were due to the proteasome. Values represent the mean S.D. *p* values (*t* test) for Lon depleted cells versus control cells are: \**p* < 0.05.

disrupted for Lon displayed no changes in the routine oxygen consumption rate (Basal  $VO_2$ ) compared to control cells grown in the presence of glucose only (Table 2). The non-coupled respiration (Resting  $VO_2$ ) induced by the addition of oligomycin and the maximal respiration (Maximal  $VO_2$ ) induced by FCCP was not different between both conditions. It has been reported that Lon deficiency in WI-38 fibroblasts leads to impaired respiration [9]. To address the apparent discrepancy among OXPHOS alterations previously reported, we analysed the steady-state amount of several OXPHOS subunits using Western blot analysis of cell homogenates (Fig. 2). We did not detect any changes in the abundance of many components of the respiratory chain or any defects in the activities of the complexes measured by spectrophotometric assays (Table 2). We also detected an increase in mitochondrial aconitase expression suggesting that it is also a substrate on Lon in HeLa cells. However, our data are not in accordance with Bota et al. [9] showing that Lon deficiency triggers apoptosis due to

mitochondrial dysfunction. We postulate that different cells used in the experiments and the degree of Lon expression may explain this discrepancy. We have established the Lon knockdown cells over a period of 10 days in order to get less than 10% of the endogenous protease and the cells grow for at least 1 month. In human fibroblast, depletion of Lon over 4 days resulted in apoptotic cell death [9] whereas Lon knockdown in human carcinoma allows survival for at least two weeks and *Drosophila* Schneider cells disrupted for Lon can grow for at least 6 months [18,25]. Our data suggest that variation in cell viability as a result of Lon depletion may exhibit various cellular tolerances. In *Arabidopsis thaliana* the absence of Lon protease results in a small growth phenotype but the mutants are able to develop to maturity and no effects on the respiratory activity was observed suggesting that the role of Lon is partially redundant within the protease network of mitochondria [7]. Our data are still very different from what we and others observed in yeast. Loss of Lon in yeast is reported to contribute to significant

**Table 2**

Mitochondrial activities in Lon depleted cells. Spectrophotometric assays: activities are expressed as nanomoles per minute and milligram protein in the cell homogenates; complex II = succinate ubiquinone oxido-reductase; complex III = antimycin sensitive ubiquinol cytochrome c oxido-reductase; complex IV = cytochrome c oxidase; complex II + III = succinate cytochrome c oxido-reductase. High resolution respirometry on intact cells in their culture medium; basal VO<sub>2</sub> (minus cyanide insensitive VO<sub>2</sub>) and resting VO<sub>2</sub> (VO<sub>2</sub> in the presence of 1 µg/mL oligomycin minus cyanide insensitive VO<sub>2</sub>); maximal VO<sub>2</sub> (highest VO<sub>2</sub> obtained after graded additions of CCCP minus cyanide insensitive VO<sub>2</sub>). Results (nmol O<sub>2</sub>/mL) expressed as mean ± standard deviation; the number of independent measurements data is indicated between brackets for each investigation.

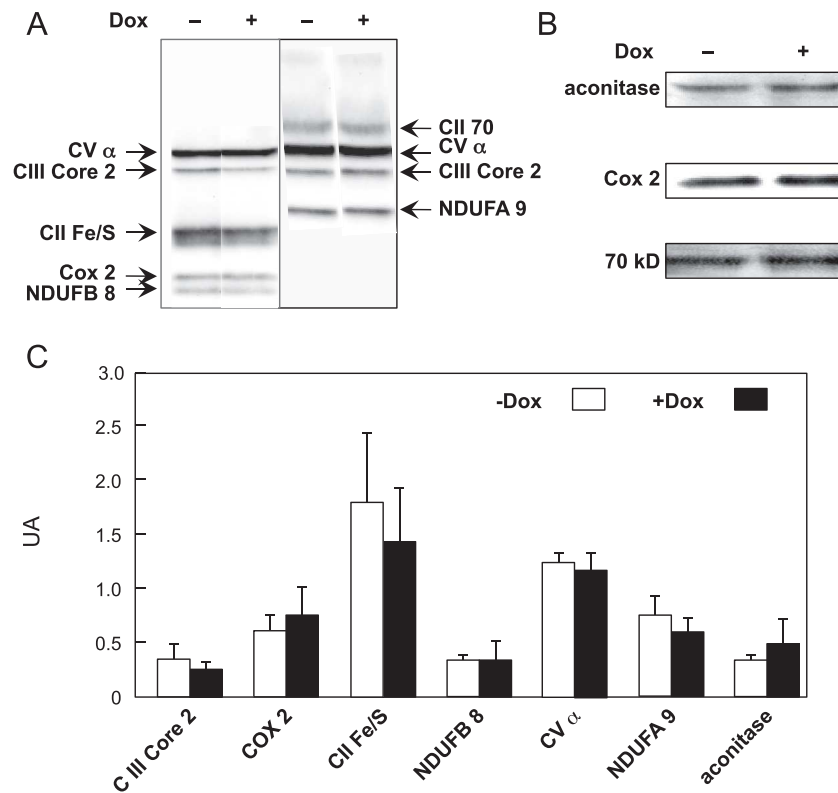
	Control	Lon depleted cells
Spectrophotometry	(n = 4)	(n = 4)
Complex II	41.0 ± 5.0	34.5 ± 7.5
Complex II + III	41.5 ± 4.0	33.5 ± 0.5
Complex III	60 ± 7	59 ± 2
Complex IV	85 ± 7	77 ± 6
Citrate synthase	129 ± 2	136 ± 3
Intact cells	(n = 3)	(n = 3)
Basal VO <sub>2</sub>	35 ± 8	33 ± 3
Resting VO <sub>2</sub>	14 ± 4	13 ± 2
Maximal VO <sub>2</sub>	82 ± 7	85 ± 5

overall respiratory defects by affecting the expression and abundance of several elements of the cytochrome c oxidase complex and cytochrome b/c1 and ATP synthase [3,4,41,43–45]. These observations may be explained by the fact that yeast has no Clp protease to compensate its functions and hence Clp may be implicated in the respiratory chain complexes quality control in Lon-depleted HeLa cells.

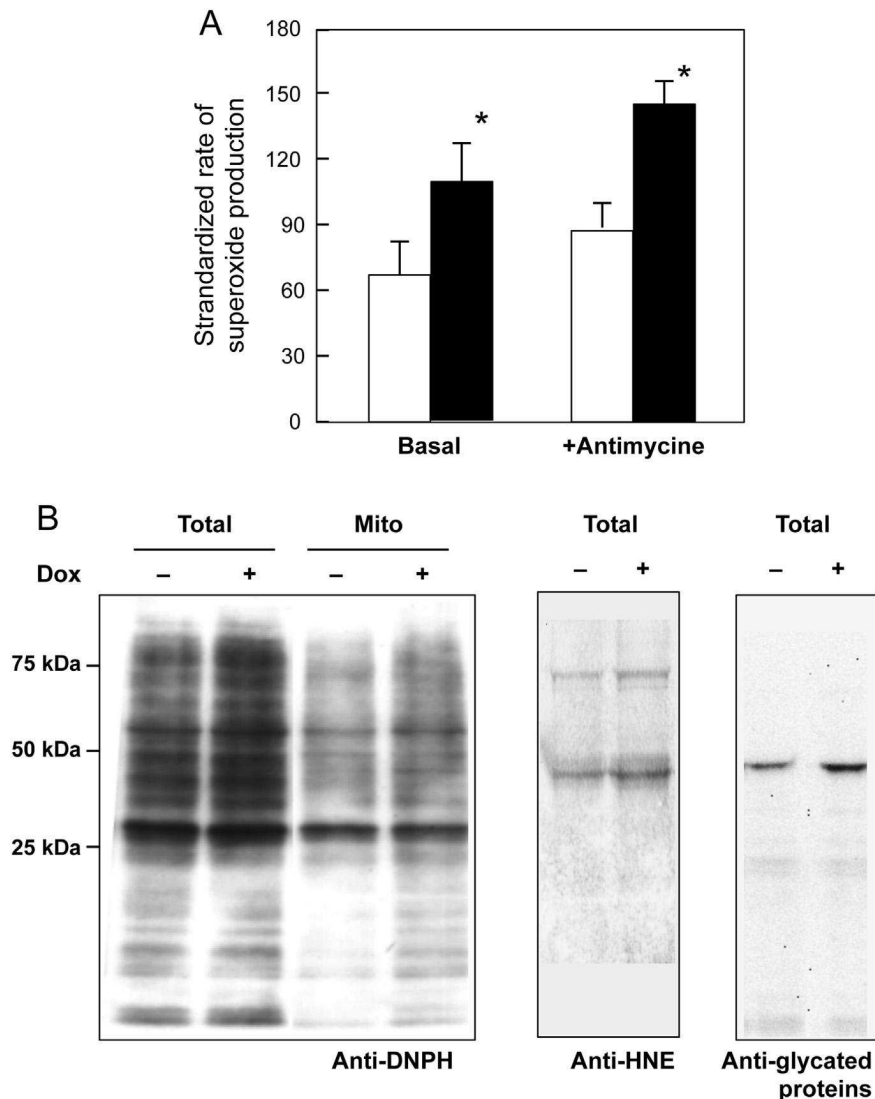
**3.3. Lon depleted HeLa cells show an increase in mitochondrial ROS production**

Mitochondria are major sources for the generation of ROS and mitochondrial dysfunction leads to an increase in ROS production [46]. Lon regulates ROS generation of hypoxic cells by degrading COX4-1 [13]. We thus decided to measure mitochondrial ROS production using MitoSOXred. Depletion of Lon resulted in a slight increase of ROS production by the mitochondria (Fig. 3A). This increased level of ROS production did not induce the expression of mitochondrial antioxidant enzymes such as GPx4; Sod2, methionine sulfoxide reductase A or catalase (Table 1). Our results are in line with previous studies showing that Lon deficiency in liver and muscle as well as in Schneider cells from Drosophila causes an increase in ROS production [18,23,47]. The question arises how Lon disruption will cause a slight increase in ROS without any defect in electron transport chain. At this moment with have no clear answer for this question. We had to measure the mitochondria respiratory complexes activity on purified mitochondria so we cannot rule out that we have isolated only mitochondria that were functional.

Excessive ROS production can damage mitochondrial proteins [1]. As previously reported in many cell lines, deletion of Lon in HeLa cells leads to an increase in oxidatively modified proteins (Fig. 3B) but not in an increase in protein modified by the lipid peroxidation product 4-HNE or advanced glycated end products (AGEs) indicating that Lon is involved in the degradation of carbonylated proteins [14,22]. However deletion of Lon in HeLa cells did not induce a heightened oxidative stress in the mitochondria as compared to the yeast mutant confirming the compensation by



**Fig. 2.** Steady-state of mitochondrial OXPHOS proteins in Lon-depleted HeLa cells. Panel A: representative western blot analysis of complex V α-subunit, complex III core1 subunit, complex I NDUFA9 and NDUFB8 subunit, complex IV COX2 subunits and complex II Rieske and 70kD proteins and aconitase (Panel B) in whole cell homogenates from Lon depleted and control cells. Panel C: quantitative analysis obtained in at least 3 independent experiments performed on whole cell homogenates from Lon depleted and control cells using normalisation to CII 70kD protein and to an identical control sample loaded in each gel. Control values in white bars and Lon depleted cells in black bars are shown as mean and standard deviation.



**Fig. 3.** Increased ROS production and carbonylated protein in Lon-depleted cells. Panel A: Superoxide production measured using MitoSox fluorescent intensity levels in control (white bars) and in Lon depleted cells (black bars). Rate of superoxide production were measured in culture cell media alone or in the presence of 2.5  $\mu\text{g}/\text{mL}$  antimycin. Values represent the mean S.D.  $p$  values ( $t$  test) for Lon depleted cells versus control cells are: \* $p < 0.05$ . Panel B: Detection of oxidatively modified proteins. Mitochondrial (M) or total cell extracts (T) were prepared from control (-DOX) or Lon depleted (+DOX) cells after 10 days of induction with doxycycline. To detect carbonylated proteins, the extracts (5  $\mu\text{g}$  of protein per lane) were treated with 2,4 dinitrophenylhydrazine to derivatize protein carbonyls and then evaluated by SDS-PAGE using polyclonal antibodies to 2,4-dinitrophenyl moiety. Modification of protein by HNE or AGE was detected by Western blot using an anti-HNE or anti-AGE antibody.

others proteases such as Clp [3,24]. It is tempting to speculate that, although decreased Lon protease level are compatible with well-functioning mitochondria in HeLa cells, this shortage in protein quality control may be overwhelming in case of a heat shock stress or treatment of the cells by  $\text{H}_2\text{O}_2$ .

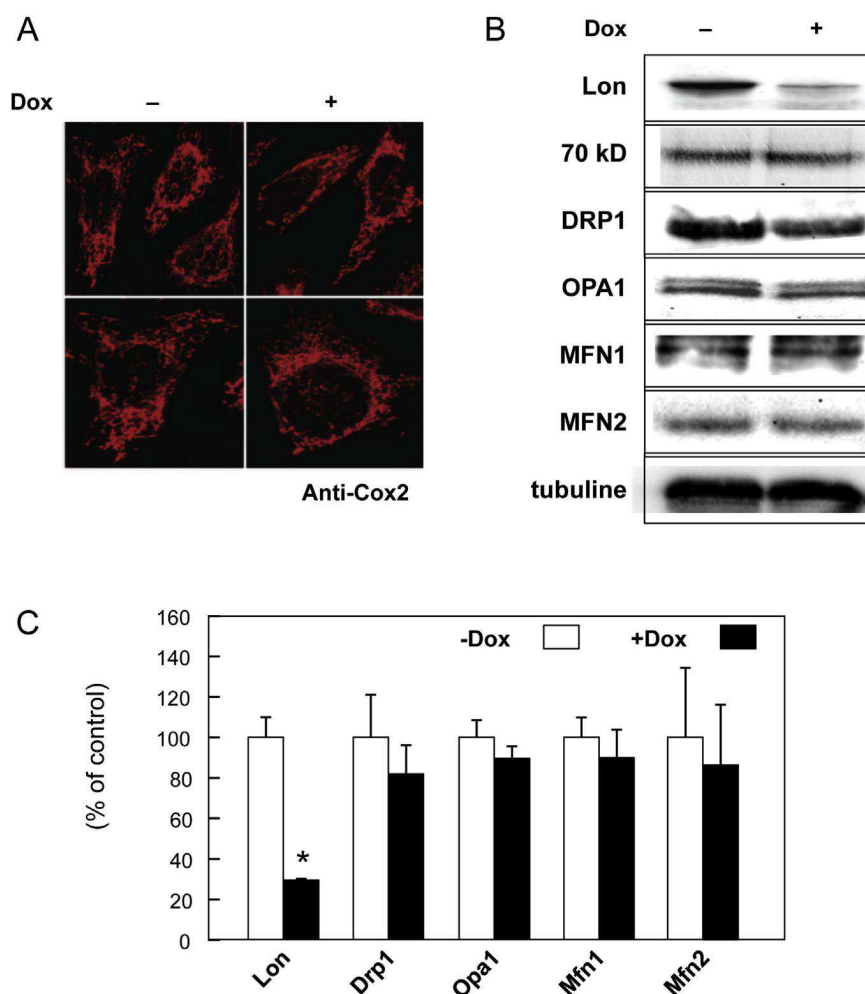
#### 3.4. Lon depleted HeLa cells show no alterations in mitochondrial dynamics

Mitochondrial fusion is generally accepted to play an effective role in quality control. Mixing the content of impaired mitochondria with fully functional ones can result in dilution of damage and a functional organelle [48]. Fission is thought to be an important component for separating parts of an existing mitochondrion that are severely damaged or contain high amounts of damaged (e.g. aggregated proteins) components and it is a prerequisite for triggering mitophagy. To get an integrated evaluation of the Lon knockdown defect in HeLa cells, we analysed the mitochondrial

morphology by immunocytochemistry using an antibody against COX2. As shown in Fig. 4A Lon depleted cells present a tubular network with a filamentous appearance as for control cells. Western Blot analysis and RTPCR-analysis of the main proteins involved in mitochondrial dynamics show normal amount for MFN1 and MFN2, OPA1 and DRP1 (Fig. 4B and Table 1).

#### 3.5. Lon depleted HeLa cells show no increased autophagy

Autophagy has been implicated in the elimination of damaged mitochondria. Mitophagy is a form of selective autophagy, in which severely impaired mitochondria are degraded [49]. Because cells depleted for Lon produced slightly more ROS and high levels of carbonylated proteins, we further tested whether Lon depletion conditions induced non-selective autophagy. To this end, we induced bulk autophagy by starvation, a condition known to increase the autophagic flux [50]. The cells were treated as above either in the presence (+Baf/Inh) or absence (-Baf/Inh) of

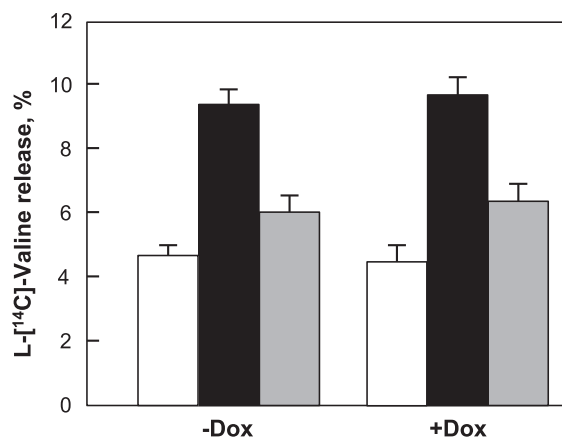


**Fig. 4.** Cells deficient in Lon protease present a normal mitochondrial morphology. Panel A: Representative images of the anti-COX2 labelled mitochondrial compartment in control (–DOX) and Lon depleted cells (+DOX). Panel B: Representative Western blot of the amount of MFN1, MFN2, OPA1 and DRP1, the four main proteins involved in mitochondrial morphology, and of tubulin and complex II 70kD, used as loading controls, Control (–DOX) and Lon depleted cells (+DOX). Panel C: quantitative analysis obtained in at least 3 independent experiments performed on whole cell homogenates from Lon depleted (black bars) and control cells (white bars) using normalisation to tubulin and to an identical control sample loaded in each gel (CII 70kD). Control cells values (white bars) and Lon depleted cells values (black bars) are shown as mean and standard deviation. \**p* < 0.05 versus controls.

lysosomal inhibitors. As shown in Fig. 5, deficiency in Lon does neither increase nor block the autophagic flux, hence we quantified the degradation of long-lived proteins by a pulse-chase experiment after starvation. As previously reported for yeast, deletion of Lon protease did not induce a detectable increase in bulk protein degradation [24].

### 3.6. Conclusion

In this study, we have shown that HeLa cells depleted for the mitochondrial Lon protease exhibit only a mild phenotype in contrast with other cell types that were previously analysed for the effects of Lon depletion [9,21,23]. Indeed, our data showed that cancer cells, i.e. the well known uterine adenocarcinoma HeLa cells, are not susceptible in the same way to Lon depletion as compared, for instance, to human fibroblasts and liver cell lines [9,23]. Hence, several factors have been tackled that may explain the discrepancy observed between cell types for their sensibility to Lon depletion. Thus, the effects of Lon depletion seem to be species- and/or cell type-specific [9,10,14–16,21,23,25]. Interestingly, the depletion of mitochondrial Lon in HeLa cells may be compensated, at least partially, by the other ATP-dependent mitochondrial proteases



**Fig. 5.** Lon deficiency does not trigger autophagy in HeLa cells. Quantification of protein turnover by measuring the degradation and release of L-[14C]-valine derived from long-lived proteins. Pulse-labelled control or Lon depleted HeLa cells were either left untreated (white bars), starved (HBSS, black bars), or treated with bafilomycin (grey bars), each for 4 h. The results of three independent experiments are shown as mean percentage of free radioactive valine.



such as the Clp or the m-AAA proteases. Alternatively, the residual Lon protease activity in knockdown cells may be sufficient to degrade its primary protein targets. However, although down regulation of Lon protease is not associated with a severe phenotype, we found that Lon deficiency leads to an increase in mitochondrial ROS production and a concomitant accumulation of oxidatively modified proteins. The identifications of the main oxidized protein substrates of human Lon protease, as we have previously reported in yeast, are currently on their way [3].

#### Author contributions

ALB, A.B, A.L and B.F designed and performed most of the experiments, analysed the data. M.G, M.P.H, L.C, P.R, C.LH performed some of the experiments and participated to the experimental design. F.B and M.P participated in mitophagy experiments. ALB and B.F co-wrote the manuscript.

#### Conflict of interest statement

The authors declare no conflict of interest.

#### Acknowledgements

The authors are very thankful to the EU-funded projects PRO-TEOMAGE (no. 518230), under FP7 and FP6, as well as to the COST Action CM1001. We would like to thank Dr. Emmanuelle Leblanc, LVMH Recherche, Saint Jean de Braye, France, for her expert advice and help with the confocal experiments.

#### Appendix A. Supplementary data

Supplementary data related to this article can be found at <http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2013.12.005>.

#### References

- [1] B. Friguet, A.L. Bulteau, I. Petropoulos, Mitochondrial protein quality control: implications in ageing, *Biotechnol. J.* 3 (2008) 757–764.
- [2] W. Voos, Mitochondrial protein homeostasis: the cooperative roles of chaperones and proteases, *Res. Microbiol.* 160 (2009) 718–725.
- [3] A. Bayot, M. Gareil, A. Rogowska-Wrzesinska, P. Roepstorff, B. Friguet, A.L. Bulteau, Identification of novel oxidized protein substrates and physiological partners of the mitochondrial ATP-dependent Lon-like protease Pim1, *J. Biol. Chem.* 285 (2010) 11445–11457.
- [4] T. Major, B. von Janowsky, T. Ruppert, A. Mogk, W. Voos, Proteomic analysis of mitochondrial protein turnover: identification of novel substrate proteins of the matrix protease pim1, *Mol. Cell. Biol.* 26 (2006) 762–776.
- [5] T. Bender, C. Leidhold, T. Ruppert, S. Franken, W. Voos, The role of protein quality control in mitochondrial protein homeostasis under oxidative stress, *Proteomics* 10 (2010) 1426–1443.
- [6] T. Bender, I. Lewrenz, S. Franken, C. Baitzel, W. Voos, Mitochondrial enzymes are protected from stress-induced aggregation by mitochondrial chaperones and the Pim1/LON protease, *Mol. Biol. Cell.* 22 (2011) 541–554.
- [7] C. Solheim, L. Li, P. Hatzopoulos, A.H. Millar, Loss of Lon1 in Arabidopsis changes the mitochondrial proteome leading to altered metabolite profiles and growth retardation without an accumulation of oxidative damage, *Plant Physiol.* 160 (2012) 1187–1203.
- [8] I. Lee, C.K. Suzuki, Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease – lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates, *Biochim. Biophys. Acta* 1784 (2008) 727–735.
- [9] D.A. Bota, J.K. Ngo, K.J. Davies, Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death, *Free Radic. Biol. Med.* 38 (2005) 665–677.
- [10] D.A. Bota, H. Van Remmen, K.J. Davies, Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress, *FEBS Lett.* 532 (2002) 103–106.
- [11] E. Delaval, M. Perichon, B. Friguet, Age-related impairment of mitochondrial matrix aconitase and ATP-stimulated protease in rat liver and heart, *Eur. J. Biochem.* 271 (2004) 4559–4564.
- [12] R. Fukuda, H. Zhang, J.W. Kim, L. Shimoda, C.V. Dang, G.L. Semenza, HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells, *Cell* 129 (2007) 111–122.
- [13] O. Hori, F. Ichinoda, T. Tamatani, A. Yamaguchi, N. Sato, K. Ozawa, Y. Kitao, M. Miyazaki, H.P. Harding, D. Ron, M. Tohyama, M. Stern, D. S. Ogawa, Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria: enhanced expression of Lon protease, *J. Cell. Biol.* 157 (2002) 1151–1160.
- [14] J.K. Ngo, K.J. Davies, Importance of the Lon protease in mitochondrial maintenance and the significance of declining Lon in aging, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 1119 (2007) 78–87.
- [15] J.K. Ngo, K.J. Davies, Mitochondrial Lon protease is a human stress protein, *Free Radic. Biol. Med.* 46 (2009) 1042–1048.
- [16] B. Lu, J. Lee, X. Nie, M. Li, Y.I. Morozov, S. Venkatesh, D.F. Bogenhagen, D. Temiakov, C.K. Suzuki, Phosphorylation of human TFAM in mitochondria impairs DNA binding and promotes degradation by the AAA+ Lon protease, *Mol. Cell* 49 (2013) 121–132.
- [17] S. Venkatesh, J. Lee, K. Singh, I. Lee, C.K. Suzuki, Multitasking in the mitochondrion by the ATP-dependent Lon protease, *Biochim. Biophys. Acta* 1823 (2012) 56–66.
- [18] Y. Matsushima, Y. Goto, L.S. Kaguni, Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM), *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 107 (2010) 18410–18415.
- [19] C.K. Suzuki, K. Suda, N. Wang, G. Schatz, Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration, *Science* 264 (1994) 273–276.
- [20] L. Van Melderen, A. Aertsen, Regulation and quality control by Lon-dependent proteolysis, *Res. Microbiol.* 160 (2009) 645–651.
- [21] S.H. Bernstein, S. Venkatesh, M. Li, J. Lee, B. Lu, S.P. Hilchey, K.M. Morse, H.M. Metcalfe, J. Skalska, M. Andreeff, P.S. Brookes, C.K. Suzuki, The mitochondrial ATP-dependent Lon protease: a novel target in lymphoma death mediated by the synthetic triterpenoid CDDO and its derivatives, *Blood* 119 (2012) 3321–3329.
- [22] D.A. Bota, K.J. Davies, Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism, *Nat. Cell. Biol.* 4 (2002) 674–680.
- [23] H.J. Lee, K. Chung, H. Lee, K. Lee, J.H. Lim, J. Song, Downregulation of mitochondrial Lon protease impairs mitochondrial function and causes hepatic insulin resistance in human liver SK-HEP-1 cells, *Diabetologia* 54 (2011) 1437–1446.
- [24] N. Erjavec, A. Bayot, M. Gareil, N. Camougrand, T. Nystrom, B. Friguet, A.L. Bulteau, Deletion of the mitochondrial Pim1/Lon protease in yeast results in accelerated aging and impairment of the proteasome, *Free Radic. Biol. Med.* 56 (2013) 9–16.
- [25] B. Lu, S. Yadav, P.G. Shah, T. Liu, B. Tian, S. Puksza, N. Villaluna, E. Kutejova, C.S. Newlon, J.H. Santos, C.K. Suzuki, Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance, *J. Biol. Chem.* 282 (2007) 17363–17374.
- [26] M.W. Pfaffl, A new mathematical model for relative quantification in real-time RT-PCR, *Nucleic Acids Res.* 29 (2001) e45.
- [27] C. Barthelemy, H.O. de Baulny, A. Lombes, D-loop mutations in mitochondrial DNA: link with mitochondrial DNA depletion? *Hum. Genet.* 110 (2002) 479–487.
- [28] F. Legros, A. Lombes, P. Frachon, M. Rojo, Mitochondrial fusion in human cells is efficient, requires the inner membrane potential, and is mediated by mitofusins, *Mol. Biol. Cell.* 13 (2002) 4343–4354.
- [29] K.M. Robinson, M.S. Janes, J.S. Beckman, The selective detection of mitochondrial superoxide by live cell imaging, *Nat. Protoc.* 3 (2008) 941–947.
- [30] A.L. Bulteau, A. Dancis, M. Gareil, J.J. Montagne, J.M. Camadro, E. Lesuisse, Oxidative stress and protease dysfunction in the yeast model of Friedreich ataxia, *Free Radic. Biol. Med.* 42 (2007) 1561–1570.
- [31] F. Medja, S. Allouche, P. Frachon, C. Jardel, M. Malgat, B. Mousson de Camaret, A. Slama, J. Lunardi, J.P. Mazat, A. Lombes, Development and implementation of standardized respiratory chain spectrophotometric assays for clinical diagnosis, *Mitochondrion* 9 (2009) 331–339.
- [32] E. Hutter, K. Renner, G. Pfister, P. Stockli, P. Jansen-Durr, E. Gnaiger, Senescence-associated changes in respiration and oxidative phosphorylation in primary human fibroblasts, *Biochem. J.* 380 (2004) 919–928.
- [33] A.L. Bulteau, M. Ikeda-Saito, L.I. Szweda, Redox-dependent modulation of aconitase activity in intact mitochondria, *Biochemistry* 42 (2003) 14846–14855.
- [34] E.K. Ahmed, A. Rogowska-Wrzesinska, P. Roepstorff, A.L. Bulteau, B. Friguet, Protein modification and replicative senescence of WI-38 human embryonic fibroblasts, *Aging Cell* 9 (2010) 252–272.
- [35] C.M. Haynes, K. Petrova, C. Benedetti, Y. Yang, D. Ron, ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in *C. elegans*, *Dev. Cell* 13 (2007) 467–480.
- [36] C.M. Haynes, Y. Yang, S.P. Blais, T.A. Neubert, D. Ron, The matrix peptide exporter HAF-1 signals a mitochondrial UPR by activating the transcription factor ZC376.7 in *C. elegans*, *Mol. Cell* 37 (2010) 529–540.
- [37] J. Hansen, N. Gregersen, P. Bross, Differential degradation of variant medium-chain acyl-CoA dehydrogenase by the protein quality control proteases Lon and ClpXP, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 333 (2005) 1160–1170.
- [38] D. Germain, Ubiquitin-dependent and -independent mitochondrial protein quality controls: implications in ageing and neurodegenerative diseases, *Mol. Microbiol.* 70 (2008) 1334–1341.
- [39] P.G. Sullivan, N.B. Dragicevic, J.H. Deng, Y. Bai, E. Dimayuga, Q. Ding, Q. Chen, A.J. Bruce-Keller, J.N. Keller, Proteasome inhibition alters neural mitochondrial homeostasis and mitochondria turnover, *J. Biol. Chem.* 279 (2004) 20699–20707.

- [40] C.K. Suzuki, M. Rep, J.M. van Dijl, K. Suda, L.A. Grivell, G. Schatz, ATP-dependent proteases that also chaperone protein biogenesis, *Trends Biochem. Sci.* 22 (1997) 118–123.
- [41] C.K. Suzuki, K. Suda, N. Wang, G. Schatz, Requirement for the yeast gene LON in intramitochondrial proteolysis and maintenance of respiration, *Science* 264 (1994) 891.
- [42] A. Bayot, N. Basse, I. Lee, M. Gareil, B. Pirotte, A.L. Bulteau, B. Friguet, M. Reboud-Ravaux, Towards the control of intracellular protein turnover: mitochondrial Lon protease inhibitors versus proteasome inhibitors, *Biochimie* 90 (2008) 260–269.
- [43] J.M. van Dijl, E. Kutejova, K. Suda, D. Perecko, G. Schatz, C.K. Suzuki, The ATPase and protease domains of yeast mitochondrial Lon: roles in proteolysis and respiration-dependent growth, *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 95 (1998) 10584–10589.
- [44] L. van Dyck, W. Neupert, T. Langer, The ATP-dependent PIM1 protease is required for the expression of intron-containing genes in mitochondria, *Genes Dev.* 12 (1998) 1515–1524.
- [45] L. Van Dyck, D.A. Pearce, F. Sherman, PIM1 encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*, *J. Biol. Chem.* 269 (1994) 238–242.
- [46] M.P. Murphy, Modulating mitochondrial intracellular location as a redox signal, *Sci. Signaling* 5 (2012) pe39.
- [47] A.I. Padrao, T. Carvalho, R. Vitorino, R.M. Alves, A. Caseiro, J.A. Duarte, R. Ferreira, F. Amado, Impaired protein quality control system underlies mitochondrial dysfunction in skeletal muscle of streptozotocin-induced diabetic rats, *Biochim. Biophys. Acta* 1822 (2012) 1189–1197.
- [48] R.J. Youle, A.M. van der Bliek, Mitochondrial fission, fusion, and stress, *Science* 337 (2013) 1062–1065.
- [49] S. Vidoni, C. Zanna, M. Rugolo, E. Sarzi, G. Lenaers, Why mitochondria must fuse to maintain their genome integrity, *Antioxid. Redox. Signal.* 19 (2013) 379–388.
- [50] D.J. Klionsky, F.C. Abdalla, Guidelines for the use and interpretation of assays for monitoring autophagy, *Autophagy* 8 (2012) 445–544.

## **Publication 2**

Lon protease deficiency results in oxidative stress,  
alteration of energy metabolism  
and mitochondrial dysfunction

Marie-Paule Hamon, Rachel Gergondey, Aurore L'Honoré, Bertrand Friguet

## **Introduction**

Les fonctions assurées par la mitochondrie sont multiples. Parmi elles, et non la moindre, la production d'ATP par la chaîne respiratoire lui a valu la qualification de centrale énergétique de la cellule. Ce rôle vital, ajouté à d'autres activités telles que la régulation des flux de calcium dans la cellule, la synthèse de l'hème et des phospholipides,...amène la mitochondrie à exercer une influence déterminante sur le fonctionnement de la cellule. C'est ainsi qu'elle intervient dans la croissance, la différenciation, la mort et le contrôle du cycle cellulaires. Maillon de diverses voies de signalisation, elle se retrouve au centre d'une bonne partie des stress qui agitent la vie de la cellule (Javadov and Kuznetsov 2013). Compartiment particulièrement exposé au stress, elle est aussi facteur de troubles, une dysfonction mitochondriale pouvant menacer l'équilibre de tout un organisme (Barbour and Turner 2014).

Parce qu'elle se charge d'éliminer les protéines oxydées dans un environnement pavé d'ERO, parce qu'elle déploie aussi une activité de chaperone limitant l'accumulation de protéines mal repliées, parce qu'elle est induite en conditions de stress, parce qu'elle intervient dans la maintenance de l'ADN, enfin parce qu'elle et ClpP constituent les seules forces de protéolyse pour l'instant repérées dans la matrice mitochondriale, la protéase Lon fait partie des piliers sur lesquels repose le fonctionnement de la mitochondrie. Il n'est donc pas étonnant d'identifier des altérations de son fonctionnement dans certaines pathologies ainsi que dans le vieillissement (Bota and Davies 2016). Récemment identifiés, les premiers malades atteints de mutations de Lon présentent d'ailleurs des troubles sévères (Strauss et al. 2015), (Peter et al. 2018).

Afin d'approfondir les résultats que nous avons obtenus sur des cellules HeLa porteuses d'un shRNA anti-Lon (Bayot et al. 2014), nous avons poursuivi nos recherches en misant plus particulièrement sur les propriétés de protéine de stress affichées par Lon. A partir du même modèle, nous avons donc adopté une stratégie visant à exacerber les aptitudes de cette protéase à répondre au stress dans le but de mieux cerner les répercussions de son absence et sur la mitochondrie et sur la cellule.

## **Résultats**

Pour commencer, un stress oxydant (au tert-butyl hydroperoxide – tBH) et trois stress métaboliques (au galactose, au 2-deoxy-D-glucose (2-DG) et à l'oligomycine) ont été appliqués. Le stress oxydant a confirmé les aptitudes de Lon à éliminer les protéines

carbonylées. Parmi les stress métaboliques, l'un a plus particulièrement retenu notre attention, celui au galactose qui induit un pic d'oxydation des protéines, que ce soit avec ou sans Lon. Il nous était alors permis de penser que, connu pour réduire la production d'ATP par la glycolyse, le galactose avait stimulé la chaîne respiratoire et donc la production mitochondriale d'ERO. Certes cette dernière s'est bien révélée en hausse sous galactose mais l'on verra plus loin que le recours au galactose n'a pas activé la chaîne respiratoire. Par ailleurs, que ce soit sous glucose ou sous galactose, l'absence de Lon se traduit par une production d'ERO mitochondriales accrue et une intensification des niveaux de protéines carbonylées dans les fractions mitochondriales.

Ces fluctuations du statut oxydatif pouvaient-elles s'expliquer par une modulation de la masse mitochondriale sous l'effet du niveau d'expression de Lon et/ou du milieu de culture cellulaire ? Si la masse mitochondriale s'est effectivement avérée plus importante sous galactose, c'est bien l'absence de Lon qui fait monter les indicateurs d'oxydation puisque, comparées aux cellules contrôles (avec Lon), les cellules mutantes (sans Lon) voient leur masse mitochondriale ou inchangée sous glucose ou baisser sous galactose. Quant aux modifications de la morphologie du compartiment mitochondrial associées à une sous expression de Lon, c'est sous galactose que l'on a obtenu la tendance à la fragmentation la plus marquée entre cellules contrôles et mutantes. D'où la décision de poursuivre cette étude avec deux milieux de culture, l'un supplémenté en glucose, l'autre en galactose.

Il s'est alors avéré que le galactose entravait la prolifération cellulaire et que ce phénotype était aggravé par une défaillance de Lon. En revanche, c'est indifféremment des conditions de culture que les niveaux d'ATP baissent chez les mutants. Quant à une réaction d'autres acteurs du contrôle qualité, l'on note une augmentation des niveaux d'expression de la protéase mitochondriale ClpP sous galactose, augmentation amplifiée chez le mutant, alors que c'est seulement la déficience en Lon qui est associée à une expression amplifiée de MsrB2.

Afin d'explorer plus avant les modifications affectant l'expression du protéome en absence de Lon, nous avons effectué une expérience de 2D DIGE qui a abouti à l'identification d'un certain nombre de protéines sur ou sous exprimées chez les mutants. Nous avons alors remarqué que deux domaines étaient particulièrement concernés par ces variations du protéome, le métabolisme énergétique ainsi que la réponse au stress et le contrôle qualité des protéines. Corroborant ces résultats, des mesures de l'activité de la chaîne respiratoire et de la glycolyse ont montré un métabolisme énergétique diminué chez les mutants. Il s'est également avéré que

et la chaîne respiratoire et la glycolyse étaient moins actives lorsque le galactose remplace le glucose.

## **Discussion**

Cette étude a tout d'abord confirmé l'importance de Lon sur le statut oxydatif de la mitochondrie et de la cellule. Sans cette protéase, les niveaux d'ERO et de carbonylation augmentent. Constatée dans différentes conditions de stress, cette réaction atteste également des capacités de Lon à répondre à des situations de nature à perturber l'homéostasie protéique. Si d'autres acteurs du contrôle qualité semblent eux aussi réagir à une sous-expression de Lon et/ou à un changement des conditions de culture, aucun n'apparaît en mesure de se substituer entièrement à Lon en matière de régulation redox.

L'augmentation des niveaux d'indicateurs de stress oxydants observée sans Lon est-elle liée à une dysfonction mitochondriale ? Les différents résultats obtenus au cours de ces travaux vont dans ce sens. Tout d'abord, le réseau mitochondrial des cellules privées de Lon présente un aspect plus fragmenté. Cette fragmentation constitue l'un des outils du contrôle qualité mitochondrial. Il permet d'isoler les éléments défectueux du reste de la population mitochondriale (Youle and van der Bliek 2012). La diminution des niveaux d'ATP enregistrée chez les mutants peut également indiquer des altérations de la fonction mitochondriale comme c'est le cas dans le vieillissement (Chistiakov 2014). Quant à la baisse de prolifération cellulaire particulièrement ressentie par les mutants sous galactose, elle peut s'expliquer par un supplément de stress puisque ces cellules doivent simultanément faire face à une privation de Lon et une supplémentation en galactose. La surexpression de ClpP et de MsrB2 chez le mutant sous galactose va d'ailleurs dans le sens d'un stress protéotoxique plus important dans cette condition.

Les variations du protéome mises en évidence par 2D DIGE plaident aussi pour l'installation d'un stress face à une déficience en Lon puisqu'une bonne partie des protéines montrant une expression modifiée interviennent dans la réponse au stress et le contrôle qualité, en condition glucose comme en condition galactose. On remarque notamment une surexpression de la protéase mitochondriale HtrA2 susceptible d'être activée par un stress oxydant (Krick 2008). Le métabolisme énergétique est l'autre secteur arrivant en tête des domaines concernés par ces variations du protéome, là aussi quelles que soient les conditions de culture. Ce résultat permet également de conclure à une dysfonction mitochondriale associée

à une sous expression de Lon puisque notre étude démontre une baisse de l'activité de la chaîne respiratoire chez les mutants. Ils doivent de même faire face à une moindre productivité de la glycolyse. Quant au remplacement du glucose par le galactose si, comme escompté, il est associé une diminution d'activité de la glycolyse, il ne suscite pas la compensation espérée de la part de la chaîne respiratoire puisque la respiration mitochondriale s'avère ici particulièrement diminuée sous galactose.

En conclusion, une sous expression induit ici une série d'effets en accord avec une dysfonction mitochondriale survenant dans un contexte de stress oxydant. Cette dysfonction se manifeste de façon particulièrement significative par un métabolisme énergétique affaibli. Par ailleurs l'impact d'une déficience en Lon s'avère dépendant des conditions de culture (glucose ou galactose), ce qui souligne l'importance de cette protéase dans la réponse au stress et le maintien de l'homéostasie mitochondriale.

**Lon protease deficiency results in oxidative stress, alteration of energy metabolism  
and mitochondrial dysfunction**

Marie-Paule Hamon, Rachel Gergondey, Aurore L'Honoré, Bertrand Friguet\*

Sorbonne Université, CNRS, INSERM, Institut de Biologie Paris-Seine, Biological Adaptation  
and Ageing, B2A-IBPS, F-75005 Paris, France

\*Corresponding author:

Bertrand Friguet

Sorbonne Université, CNRS, INSERM, Institut de Biologie Paris-Seine, Biological adaptation  
and Ageing, B2A-IBPS, F-75005 Paris, France

Telephone: +33(0)144273702

E-mail: [bertrand.friguet@sorbonne-universite.fr](mailto:bertrand.friguet@sorbonne-universite.fr)



## **Abstract**

The ATP-dependent Lon protease is located in the mitochondrial matrix and oxidized proteins are among its primary targets for their degradation. Impairment of mitochondrial morphology and function together with apoptosis were observed in lung fibroblasts depleted for Lon expression while accumulation of carbonylated mitochondrial proteins has been reported for yeast and HeLa cells with Lon deficiency. In addition, age-related mitochondrial dysfunction has been associated with an impairment of Lon expression. Using a HeLa cell line stably transfected with an inducible shRNA directed against Lon, we have previously observed that Lon depletion results in a mild phenotype characterized by an increase of both production of reactive oxygen species and level of oxidized proteins (Bayot et al., 2014, *Biochimie*, 100: 38-47). In this study using the same cell line, we now show that Lon knockdown leads to alteration of mitochondrial mass and morphology, and to modification of the expression of a number of proteins involved in protein quality control, stress response and regulation of energy metabolism. We show that such effects are correlated with decreased proliferation and can be modulated by culture conditions in galactose versus glucose containing medium.

## **Key words**

Lon protease  
protein oxidation  
HeLa cells  
oxidative stress  
proteomics  
mitochondrial dysfunction  
energy metabolism

**Running title:** Lon protease deficiency and mitochondrial dysfunction

## Highlights

- Lon protease knockdown in HeLa cells promotes oxidative stress and protein oxidation
- Lon deficiency affects mitochondrial mass and morphology and cell proliferation
- Lon depletion impacts on stress response and energy metabolism protein expression
- Lon protease depletion decreases cell energy metabolic activity and ATP production

## Abbreviations

Cholamidopropyl)dimethylammonio]-1-propanesulfonate hydrate; ClpP, Clp protease proteolytic subunit; Cox2, cytochrome c oxidase subunit 2; DAPI, 4',6-diamidino-2-phenylindole; DIGE, Differential Gel Electrophoresis; DMEM, Dulbecco's Modified Eagle Medium; DTT, Dithiothreitol; ECAR, extracellular acidification rate; EdU, 5-éthynyl-2'-déoxyuridine; Foxo3, Forkhead box protein O3; HEPES, 4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazineethanesulfonic acid; Msrb2, Methionine-R-sulfoxide reductase B2; Nrf2, Nuclear factor erythroid 2-related factor 2; OCR, oxygen consumption rate; OXPHOS, *oxidative phosphorylation*; PBS, phosphate buffer saline; PCA, principal component analysis; ROS, reactive oxygen species; shRNA, short hairpin RNA; tBH, tert-Butyl-Hydroperoxide; TCA, tricarboxylic acid *cycle*; *TNF* tumor necrosis factor

## Acknowledgments

The authors wish to acknowledge Laurence Petit, Philippe Chaffey and Anne-Laure Bulteau for their help and advice concerning the flow cytometry, 2D-DIGE experiments and the implementation of this study, respectively. The authors also thank the 3P5 proteomics facility, Université Paris Descartes, Sorbonne Paris Cité for the work performed for the proteomic and protein identification analyses.

## **Introduction**

Mitochondrial functions are various such as aerobic energy metabolism, regulation of intracellular calcium homeostasis, phospholipids and heme synthesis, contribution to cell growth and differentiation, cell cycle control and cell death. This broad repertoire includes ATP production by the respiratory chain for which mitochondria is often referred to as powerhouse of the cell, a role that also makes it the main provider of reactive oxygen species (ROS) in the cell due to incomplete reduction of O<sub>2</sub> by the respiratory chain [1]. Although critical as signaling molecules when they are present at physiological levels [2], ROS can have detrimental effects when their generation exceeds the antioxidant defense capacities, an imbalance that leads to oxidative injury involved in numerous diseases and in the ageing process. Due to their close proximity with the respiratory chain, mitochondrial proteins are highly susceptible to oxidative damage. To counteract the deleterious effects of accumulation of damaged and misfolded proteins, mitochondria are equipped with quality control systems such as the Lon protease. known to be a key player in managing oxidized proteins degradation [3] [4] [5].

First ATP-dependent protease to be identified, Lon is located in the mitochondrial matrix. It is active in form of homo-oligomeric ring complex. Each of its polypeptide chains contains both an AAA+ domain and a protease domain with a Ser-Lys catalytic dyad. Up to now, only another protease has been identified in the mitochondrial matrix, ClpP protease. If ClpP is particularly involved in the mitochondrial unfolded protein response, Lon is very active in oxidized proteins degradation. Enzymes prone to oxidative damage are among its primary targets for degradation [5]. Proteins showing increased oxidation level have been detected in yeast depleted for PIM1/Lon as well as accumulation of carbonylated proteins in mitochondria of yeast and HeLa cells with Lon deficiency [3], [6].

Due to its contribution to the mitochondrial quality control, Lon has a critical role in the maintenance of mitochondrial matrix protein homeostasis and hence in mitochondrial

functional and structural integrity [7]. Thus, it is not surprising that impairment of mitochondrial morphology and function and activation of apoptosis were observed in lung fibroblasts with Lon depletion [8]. Moreover, mitochondrial dysfunction noted in aged tissues has been associated with an age-associated impairment of the Lon protease [9]. The quality control activities of Lon are not only restricted to modified protein degradation. They are also mediated through Lon action on misfolded proteins and mitochondrial DNA [4]. Therefore it may be expected that mitochondrial dysfunction in response to Lon down-regulation impairs several mitochondrial activities with an impact on cellular functions.

Using a HeLa cell line stably transfected with a vector expressing a shRNA under the control of a promoter which is inducible by doxycycline, we have previously observed that reduction of Lon results in a mild phenotype characterized by an increased production of reactive oxygen species and an increased level of oxidatively modified proteins. In this study using the same HeLa cell line, we have further investigated the effects of Lon depletion on protein and redox homeostasis and mitochondrial function in different metabolic conditions and stress situations. Here we show that Lon knockdown in HeLa cells does induce oxidative stress and promote the occurrence of protein oxidation but also affects mitochondrial mass and morphology, slows down cell proliferation, modifies the expression of a number of proteins involved in protein quality control and stress response as well as energy metabolism, that are impacting on cell function, maintenance and energy production. Interestingly, most of these effects, that are indicative of mitochondrial dysfunction, are modulated depending on the cells metabolic conditions, i. e. when they are grown in galactose versus glucose containing medium.

## **Material and methods**

### ***Materials and cells***

All reagents were purchased from Sigma (Sigma Aldrich, St. Louis, MO, USA) unless otherwise stated. HeLa T-Rex cells were transfected as previously reported [25] with a 68-base Lon-specific oligonucleotide (50-gatctccgttcgtctcgcgccagccttttcaagagaaaggctgggcgagacgaacttttgaaagctt-30) annealed to its complementary sequence pENTR/H1/T0p (Block it-Invitrogen) and inserted into pENTR/H1/T0p (Block it-Invitrogen). For the glucose containing medium condition, clones of HeLa-tet-on-shLon cells were cultivated in Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM, Gibco Life Technologies, Carlsbad, CA, USA) with 5mM glucose. For the galactose containing medium condition, clones of HeLa-tet-on-shLon cells were cultivated in DMEM (Gibco Life Technologies) with 5mM galactose and 1mM pyruvate. Both media were supplemented with 10% fetal bovine serum, 5 mg/ml blasticidin (Invitrogen), 200 mg/ml zeocin (Invitrogen), with (Dox+) or without (Dox-) 2 µg/ ml Doxycycline.

### ***Preparation of mitochondrial fractions***

For mitochondria purification, cells were harvested and resuspended in HEPES-sucrose buffer (Hepes 10mM sucrose 250mM, pH 7.4). All the subsequent steps were carried out at 4° C. Cells were homogenized and then passed through a 22G needle. Membranes and nuclear fractions were removed by centrifugation at 1000 g for 5 min and supernatants were centrifuged (11000 g, 10 min, 4°C). Mitochondrial fraction present in the pellets was immediately used for protein extraction or frozen.

### ***Protein extracts***

For whole cell extracts, cells were harvested and lysed in Cell Lytic M (Sigma Aldrich C2978) according to the manufacturer's instructions.

Protein content of whole cell and mitochondrial fractions were determined using the Bradford protein assay (Bio-Rad, Marnes la Coquette, France), with bovine serum albumine as a standard.

### ***Detection of carbonylated proteins***

Carbonylated proteins were detected and analyzed after labeling of protein carbonyl groups with CF647DI hydrazide (Biotium, Fremont, CA, USA) for 45 min at room temperature under medium agitation. Labeled samples were resolved by SDS-PAGE in Any-KD precast gels (Bio-Rad). After three washes in 7% acetic acid/10% ethanol, gels were scanned with Ettan DIGE Imager (GE Healthcare, Saclay, France).

### ***Mitochondrial morphological analysis***

For immunofluorescent labeling of the mitochondrial compartment, cells were plated at subconfluence on glass coverslips in different conditions: 2.5 days in DMEM + 5mM glucose, 1.5 day in DMEM + 1mM pyruvate and 5mM galactose, 20 hours in DMEM + 1mM pyruvate and 10mM déoxyglucose, 20 hours in DMEM + 5mM glucose with 1µg/ml oligomycin, 3 hours in DMEM + 5mM glucose with 250µM tert-Butyl-hydroperoxide. After fixation (4% paraformaldehyde, 0.1% glutaraldehyde), the mitochondrial compartment was visualized by immunofluorescence using polyclonal antibody directed against cytochrome c oxidase subunit 2 (Anti-MTCO2 Abcam ab91317) and then anti-rabbit IgG (H+L) secondary antibody Alexa Fluor® 568. The coverslips were mounted in Fluoroshield mounting medium (Sigma) containing 0.15µg/mL DAPI. Fluorescent images were acquired using Zeiss microscope (Zeiss, Jena, Germany) and processed with Motic Images Advance 3.2. Quantitative analysis of

mitochondrial morphology (area and perimeter) was performed according to the protocol described by Koopman et al [12] using ImageJ software. 30 individual cells were analyzed per cover slip and the aspect ratio (AR), that represents mitochondrial elongation, was calculated for each condition.

### ***Mitochondrial ROS and mitochondrial mass evaluation with flow cytometry***

Mitochondrial superoxide anion production and mitochondrial mass were monitored using MitoSOX™ Red 5µM and MitoTracker™ Red CMXRos 200nM respectively (Molecular probes, Courtaboeuf, France) as previously described [11]. Cell fluorescence was quantified by flow cytometry using MACSQuant VYB (MitoSOX™ Red) and MACSQuant X (MitoTracker™ Red CMXRos).

### ***Proliferation Assay***

Cell proliferation was quantified by EdU incorporation (10 µM for 15 min in cell culture media). For EdU detection, the Click-iT EdU Cell Assay kit (Invitrogen) was used following the manufacturer's instructions.

### ***Cellular ATP assay***

Cellular ATP levels were determined using CellTiter-Glo® Luminescent Assay (Promega, Madison, WI, USA) according to the manufacturer's instructions.

### ***Western blotting***

Proteins were separated by SDS-PAGE using Biorad Any-KD precast gels and electro-transferred onto Hybond nitrocellulose membrane (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA). Primary antibodies used were anti-CLPP (Abcam ab124822), anti-MSRB2 (Abcam

ab101513), anti-FKHRH-144 (Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX, USA, sc-11351), anti-NRF2 (Santa Cruz Biotechnology, sc-365949), and anti Lon prepared as previously described [57]. After overnight incubation at 4°C in PBST/milk 5% or PBST/Sea block Blocking buffer (37527 Thermo Fisher Scientific, Courtaboeuf, France ), primary antibodies were detected using peroxidase-conjugated secondary antibodies (Bio-Rad) or Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Cross-Adsorbed Secondary Antibody, Dy Light 800 (Invitrogen). Quantification of western blot signals was performed using the ImageJ software.

### ***2D DIGE proteomic analysis***

Frozen mitochondria pellets were resuspended and homogenized in lysis buffer (8M urea, 2M thiourea, 4% CHAPS, 60mM DTT). Then the protein extracts were clarified by ultracentrifugation at 100000g for 1 h at 4°C. Samples were treated with the 2D Clean-Up kit (GE Healthcare) according to the manufacturer's instructions. The resulting dry pellets were resuspended in lysis buffer (8M urea, 2M thiourea and 4% CHAPS) and adjusted to pH 8.5 with 1.5M Tris-base. After lysates clarification by centrifugation at 20 000g for 15 min at 4°C, protein concentrations of the supernatants were determined by the Bradford method, and were in the range of 6–10µg/µL.

For 2D DIGE experiment, protein labelling with CyDyes<sup>TM</sup>Fluor minimal dyes (GE Healthcare) and 2D-electrophoresis were done as previously described [58] using 50µg mitochondrial extracts.

Image analysis, relative quantification, statistical evaluation and PCA (Principal Component Analysis) were carried out using DeCyder<sup>TM</sup> 2D software (GE Healthcare, version 7.2). The fold change (FC) and Student's t-test p-values were calculated across pairwise comparisons (glucose Dox- vs glucose Dox+; galactose Dox- vs galactose Dox+) and considered significant



for p values < 0.05 and FC  $\geq$ 1.3 or  $\leq$ 1.3. Spots of interest were identified for protein content by mass spectrometry.

### ***Mass spectrometry***

In-gel digestion was carried out with trypsin, according to previously published procedure with minor modifications [59]: samples were destained twice with a mixture of 100mM ammonium bicarbonate (ABC) and 50 % (vol/vol) acetonitrile (ACN) for 45 min at room temperature. After dehydration using 100 % ACN for 15 min, samples were reduced with 25mM ABC (10mM DTT) for 1 h at 57 °C and alkylated (55mM iodoacetamide in 25mM ABC) for 30 min in the dark at room temperature. Gel pieces were washed twice with 25mM ABC, dehydrated twice with 100% ACN (15 min each) and dried (20 min). Gel cubes were incubated with sequencing grade-modified trypsin (Promega; 12.5 ng/ $\mu$ L in 40mM ABC with 10% ACN, pH 8.0) overnight at 37 °C. After digestion, peptides were extracted twice from gel pieces, first with a mixture of 50 % ACN – 5 % formic acid (FA) and second with 100% ACN. All these steps were done with a robot (Tecan, Mannedorf, Switzerland). Extracts were then dried using a vacuum centrifuge concentrator plus (Eppendorf, Hamburg, Germany).

Mass spectrometry analyses were performed using an Ultimate 3000 Rapid Separation Liquid Chromatographic (RSLC) system (Thermo Fisher Scientific) online with a Q Exactive Plus hybrid quadrupole Orbitrap mass spectrometer (Thermo Fisher Scientific). Briefly, peptides were solubilized in 3.5  $\mu$ L of 10 % ACN - 0.1 % TriFluoroAcetic acid (TFA). Then, peptides were loaded and washed on a C<sub>18</sub> reverse-phase precolumn (3  $\mu$ m particle size, 100 Å pore size, 75  $\mu$ m i.d., 2 cm length). The loading buffer contained 98% H<sub>2</sub>O, 2% ACN and 0.1% TFA. Peptides were then separated on a C<sub>18</sub> reverse-phase resin (2  $\mu$ m particle size, 100 Å pore size, 75  $\mu$ m i.d., 25 cm length) with a 20 min gradient from 99 % A (0.1 % FA and 100 % H<sub>2</sub>O) to 50 % B (80 % ACN, 0.085 % FA and 20% H<sub>2</sub>O).

The mass spectrometer acquired data throughout the elution process and operated in a data-dependent scheme with full MS scans acquired with the Orbitrap, followed by up to 10 MS/MS HCD spectra in the Orbitrap. Mass spectrometer settings were: full MS (AGC:  $3 \times 10^6$ , resolution:  $7 \times 10^4$ ,  $m/z$  range 400–2000, maximum ion injection time: 100 ms) and MS/MS (AGC:  $1 \times 10^5$ , maximum injection time: 100 ms, isolation window: 4 $m/z$ , dynamic exclusion time setting: 15 s). The fragmentation was permitted for precursors with a charge state of 2, 3 and 4. For the spectral processing, the software used to generate .mgf files was Proteome discoverer 1.4. Database searches were carried out using Mascot version 2.5.1 (Matrix Science, London, UK) on ‘human’ proteins (20,273 sequences) from the SwissProt databank containing 550 552 sequences (196 472 675 residues) (February 2016). The search parameters were as follows: the enzyme specificity as trypsin, carbamidomethylation as a variable modification for cysteins and oxidation as a variable modification for methionines. Up to 1 missed cleavage was tolerated, and mass accuracy tolerance levels of 4 ppm for precursors and 20 mmu for fragments were used for all tryptic mass searches. Positive identification was based on a Mascot score above the significance level (i.e. 5%). The reported proteins were always those with the highest number of peptide matches. Analysis, integration and interpretation of proteomic data derived from this 2D-DIGE were performed with the Ingenuity Pathway Analysis software.

### *Seahorse analysis*

Oxygen consumption rate (OCR) and extracellular acidification rate (ECAR) were analyzed on a Seahorse XFe24 extracellular flux analyser (Seahorse Biosciences, North Billerica, MA, USA) according to the manufacturer's instructions. Briefly, control and mutant cells were seeded at a density of 80 000 cells per well in a Seahorse XF24 plate and cultured for 12 hrs. The seeding density was based on initial assays that optimized both OCR and ECAR. One hour before the assay, cultured cells were washed three times in DMEM minimal assay media (Seahorse Biosciences, 37 °C, pH 7.40) supplemented with 1mM pyruvate and 2mM glutamine for ECAR measurements and with 5mM

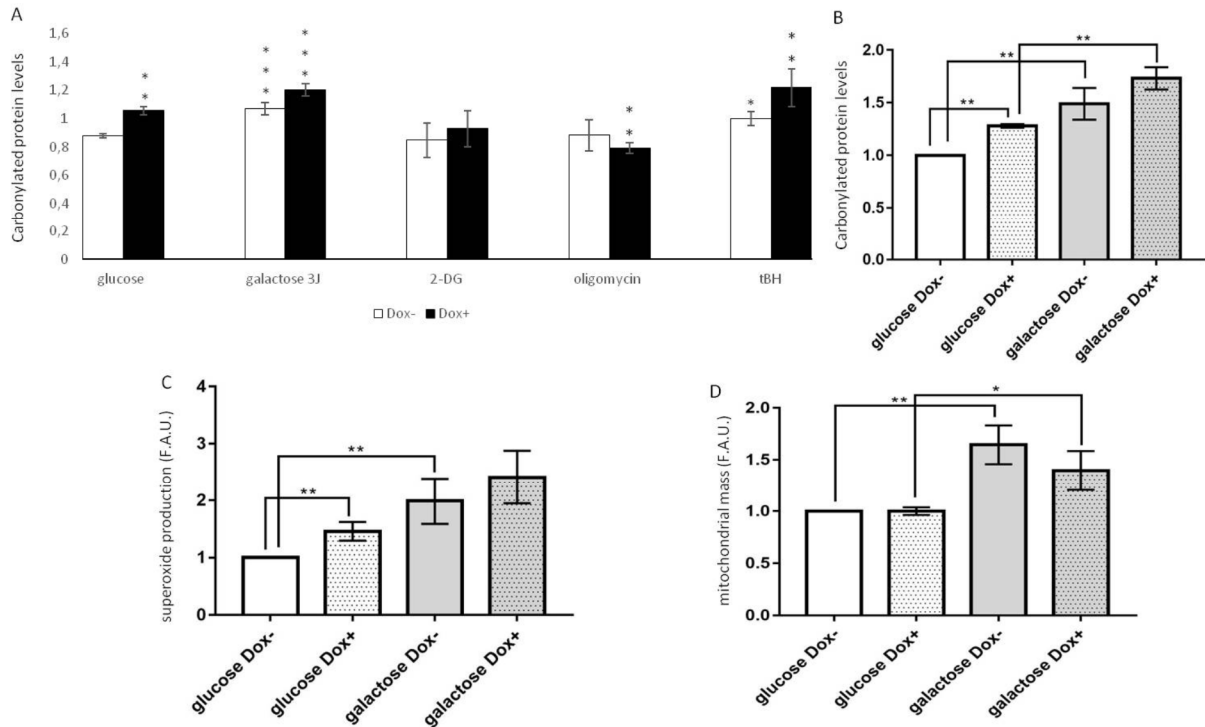
glucose or 5mM galactose for OCR essays, and equilibrated for 1 h at 37 °C in a non-CO<sub>2</sub> incubator. OCR and ECAR were measured in control condition (basal rates) and after successive injections of oligomycin 1μM, FCCP 1μM and rotenone 10μM for OCR measurements, and 5mM glucose or 5mM galactose, 1μm oligomycin and 100μM 2 deoxy-D-glucose for ECAR measurements. At the end of the experiment, proteins were extracted using 10μl of lysis buffer and quantified using the Bradford assay. OCR and ECAR values were then normalized to protein concentration in order to compare different conditions.

### ***Statistical analysis***

Results are presented as mean ± SEM. Differences between two groups were assessed by Student's t-test or Mann-Whitney test for non Gaussian distributions. Comparisons between more than two groups were assessed using one-way Anova test or Kruskal-Wallis test for non Gaussian distributions. Principal component analysis (PCA) was performed using the Decyder software. PCA is a mathematical procedure that can convert a set of variables (here proteome maps) into a coordinate system so that the greatest variance is depicted on the first coordinate (called first component or PC1), the second greatest variance on the second coordinate (PC2).

## Results

### *Oxidative stress and metabolic conditions are modulating the effect of Lon depletion on carbonylated protein levels in HeLa cells*



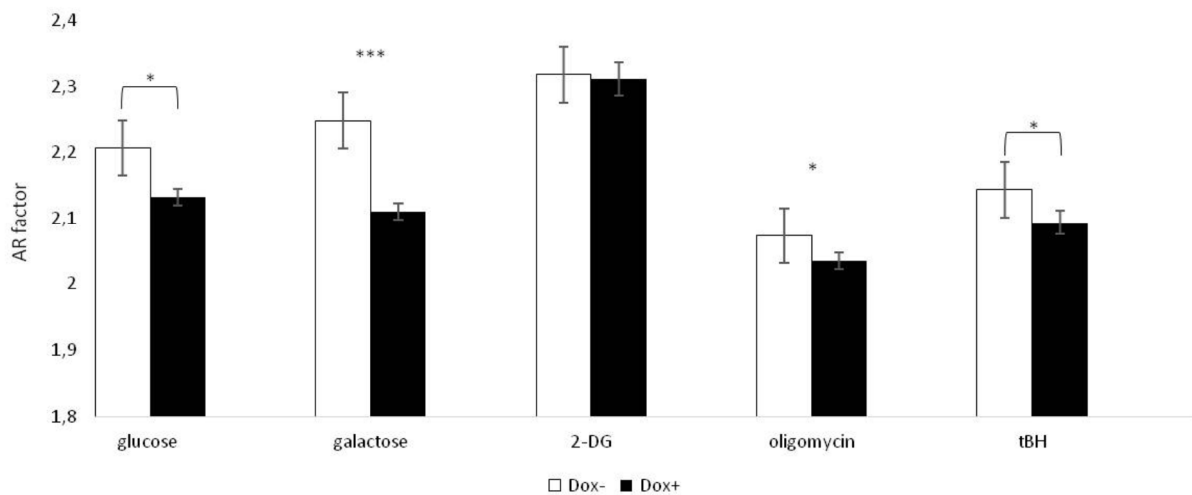
**Fig 1. Detection of oxidatively modified proteins, mitochondrial ROS production and mitochondrial mass.** Mitochondrial or total cell extracts were prepared from control (Dox-) or Lon depleted (Dox+) cells after 10 days of induction with doxycycline, under different conditions (glucose, galactose, 2-DG, oligomycin, tBH). **A**) Carbonylated proteins levels of cell extracts. Data represent the mean  $\pm$  SEM (n=3 to 7); student t test: \*p<0.05, \*\*p<0.01, \*\*\*p<0.001 versus glucose Dox-. **B**) Carbonylated proteins levels of mitochondrial fractions extracts. Data are normalized to the glucose Dox- condition and represent the mean  $\pm$  SEM (n=3 to 4); student t test: \*\*p<0.01. **C**) Superoxide production measured using MitoSox fluorescent intensity levels. Data are normalized to the glucose Dox- condition and represent the mean  $\pm$  SEM (n=3 to 6); student t test: \*\*p<0.01. **D**) Mitochondrial mass measured using MitoTracker-Red CMXRos fluorescence Data are normalized to the glucose Dox- condition and represent the mean  $\pm$  SEM (n=4 to 7); student t test: \*p<0.05, \*\*p<0.01.

We have previously reported that Lon depletion in HeLa cells is associated with an increase of oxidatively modified proteins when cells are cultured in the presence of glucose as carbon source [6]. In order to follow up with this observation and get further insights on oxidized protein accumulation, the effect of Lon depletion on oxidized proteins levels in total HeLa cellular extracts and mitochondrial fractions has been investigated under oxidative stress and different metabolic conditions. As protein carbonylation is a major hallmark of protein

oxidative damage [10], we used protein carbonyls as a marker of irreversible protein oxidation [11]. As previously shown, in glucose condition, Lon depleted cells (Dox+) showed a small but significant increase in total (Fig 1A) and mitochondrial (Fig 1B) protein carbonylation compared to control cells (Dox-). When glucose was replaced by galactose in order to promote mitochondrial respiration, we observed a similar increase in protein carbonylation in Lon depleted cells as compared to control cells,. We then investigated control and Lon depleted cells responses to several stresses. While treatment with tert-butyl hydroperoxide, a well-known oxidant, led to moderate increased protein carbonylation in control cells, the accumulation of carbonylated proteins reached excessive levels in the absence of Lon protease (Dox+). In contrast, cells treatment with 2-deoxy-D-glucose and oligomycin, two inhibitors of glycolysis and mitochondrial respiration respectively, did not result in increased protein oxidation either in control or in Lon depleted cells. Similar observations or, on the contrary, increased oxidative stress have already been noted with both reagents [16], [17], [18], [19], [20], [21]. Accordingly, increased mitochondrial protein carbonylation levels (Fig 1B) as well as increased mitochondrial superoxide production (Fig 1C) was found when HeLa cells were grown in galactose containing medium. Mitochondrial mass was found more important in galactose than in glucose (Fig 1D) but this biogenesis cannot explain the levels of oxidative injury in Lon depleted cells cultured in galactose since they have less mitochondrial content than controls.

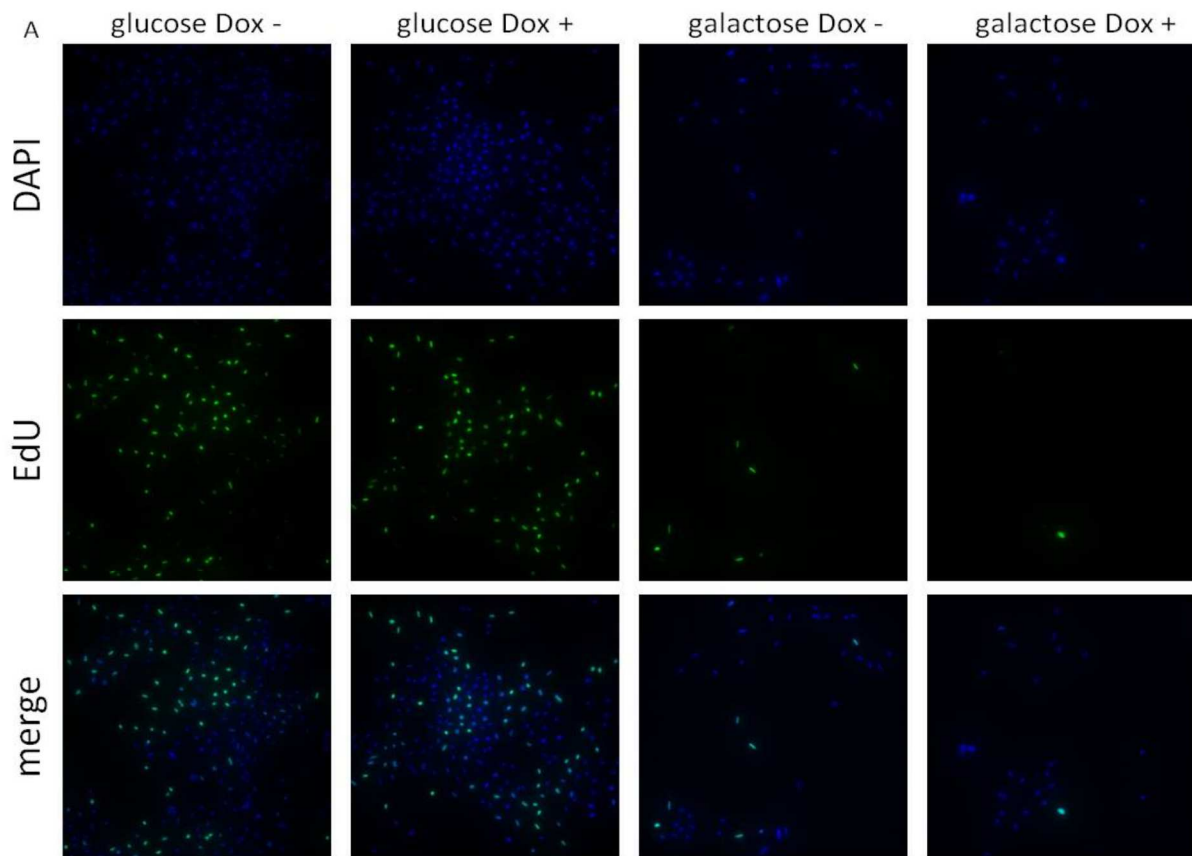
### ***Lon depletion is associated with an increased fragmentation of the mitochondrial network***

Beside the mass, another morphologic factor revealing the status of mitochondria is the aspect of the mitochondrial network. Hence we evaluated mitochondrial morphology using the aspect ratio (AR) defined by Koopman et al [10] which is aimed at reporting changes in length of the mitochondrion. In the same conditions than above (glucose, galactose, 2-deoxy-D-glucose, oligomycin and tert-butyl hydroperoxide), we observed that Lon depletion was associated with increased fragmentation of the mitochondrial network but for the 2-Deoxy-D-glucose treatment (Fig 2). The biggest variation in mitochondrial shape associated with Lon deficiency was observed when glucose was replaced by galactose. Relevant with the measurements of the mitochondrial mass, an increase in mitochondrial network fragmentation has been previously associated, like elevated protein carbonylation rates, with oxidative stress and ageing [27]. Taken together, these results led us to further address the effects of Lon depletion with HeLa cells cultured in galactose versus glucose containing medium.

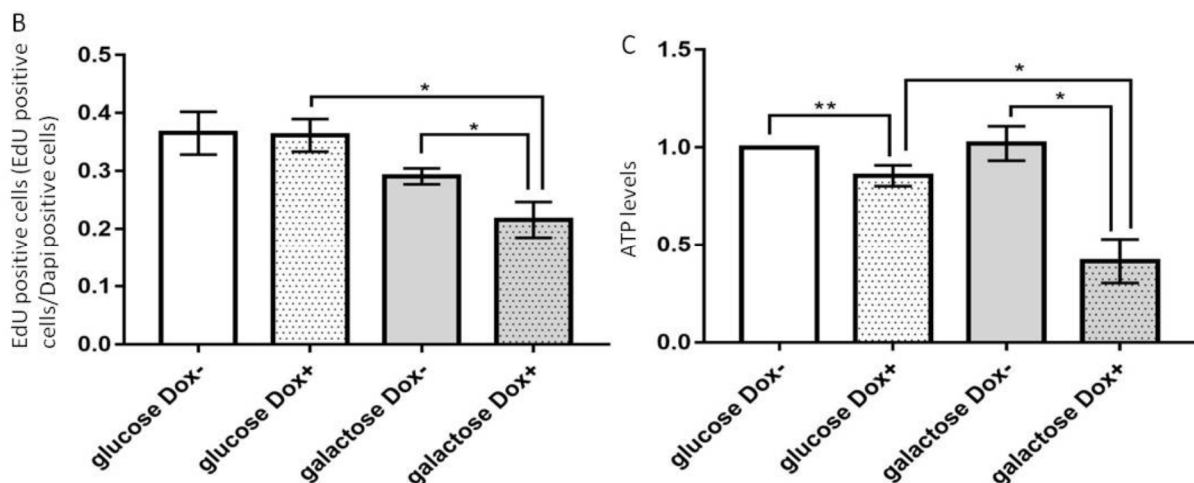


**Fig 2. Quantitative analysis of mitochondrial morphology.** After 10 days of induction with doxycycline, under different conditions (glucose, galactose, 2-DG, oligomycin, tBH), control (Dox-) or Lon depleted (Dox+) cells were plated at subconfluence. After fixation in 4% paraformaldehyde and 0.1% glutaraldehyde, mitochondrial compartment was visualized using polyclonal antibodies against cytochrome c oxidase subunit 2. After acquisition and binarization of fluorescent Images, mitochondrial network morphology was measured using the calculation of the Aspect ratio (AR). Data represent the mean  $\pm$  SEM (n=30); Mann-Whitney test: \*p<0.05, \*\*\*p<0.001.

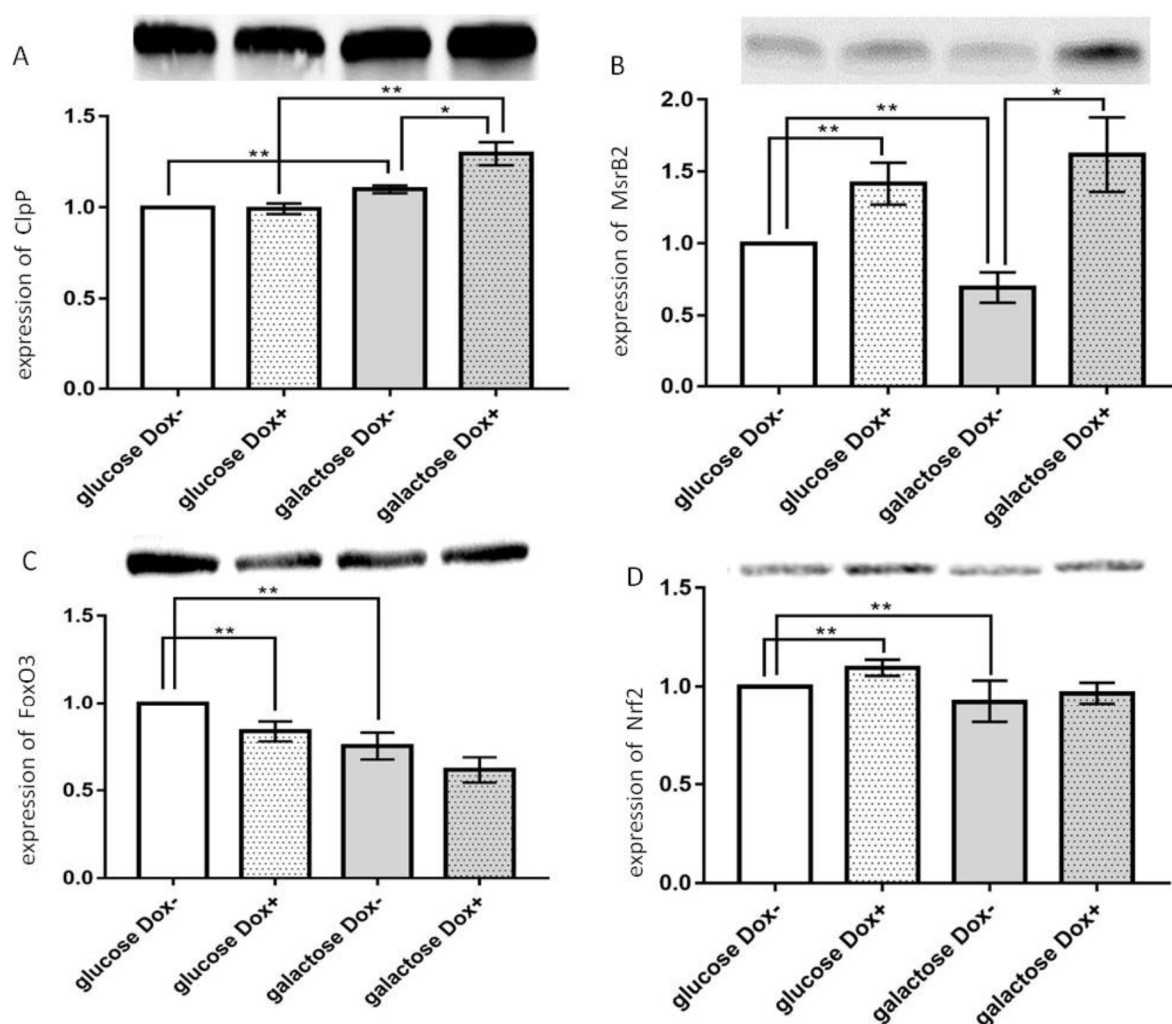
*Lon depletion is differentially affecting HeLa cells proliferation, ATP levels and mitochondrial protein maintenance in galactose versus glucose containing medium*



**Fig 3. Cell proliferation and ATP production. A)** Detection of proliferation in control (Dox-) or Lon depleted (Dox+) cells after 10 days of induction with doxycycline, under glucose or galactose conditions. Cells were treated with 10  $\mu$ M EdU for 4 hr, then detected an Alexa Fluor™ 488 azide (green). Cells were counterstained with DAPI (blue). **B)** Quantification of EdU-positive cells. Data represent the mean  $\pm$  SEM (n=3 to 5); student t test: \*p<0.05. **C)** CellTiter-Glo assay measuring cellular ATP levels of control (Dox-) or Lon depleted (Dox+) cells after 10 days of induction with doxycycline, under glucose or galactose conditions. Data are normalized to the glucose Dox- condition and represent the mean  $\pm$  SEM (n=3); student t test: \*p<0.05, \*\*p<0.01.



Since increased ROS and carbonylated proteins levels, variation of mitochondrial mass and mitochondrial network fragmentation can indicate mitochondrial dysfunction, we searched for a possible impact of Lon knock down at the cellular level. Following the incorporation of EdU (Fig 3A), we saw as significant decrease of cell proliferation of the mutants in galactose (Fig 3B) as already reported for cancer cells in this medium [24] [32]. ATP levels were lower in mutants of both conditions, especially in galactose. (Fig 3 C).



**Fig 4. Stress response.** Western blot analysis of proteins involved in protein quality control and oxidative stress response in whole cells homogenate of control (Dox<sup>-</sup>) or Lon depleted (Dox<sup>+</sup>) cells after 10 days of induction with doxycycline, under glucose or galactose conditions. Representative Western blots of the amount of **A)** ClpP, Mann-Whitney test: \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ ; **B)** MsrB2, student t test: \*\* $p < 0.01$ ; **C)** FoxO3, student t test: \*\* $p < 0.01$ ; **D)** Nrf2, student t test: \*\* $p < 0.01$ . Data are normalized to glucose Dox<sup>-</sup> condition and represent the mean  $\pm$  SEM (n=3 to 6).

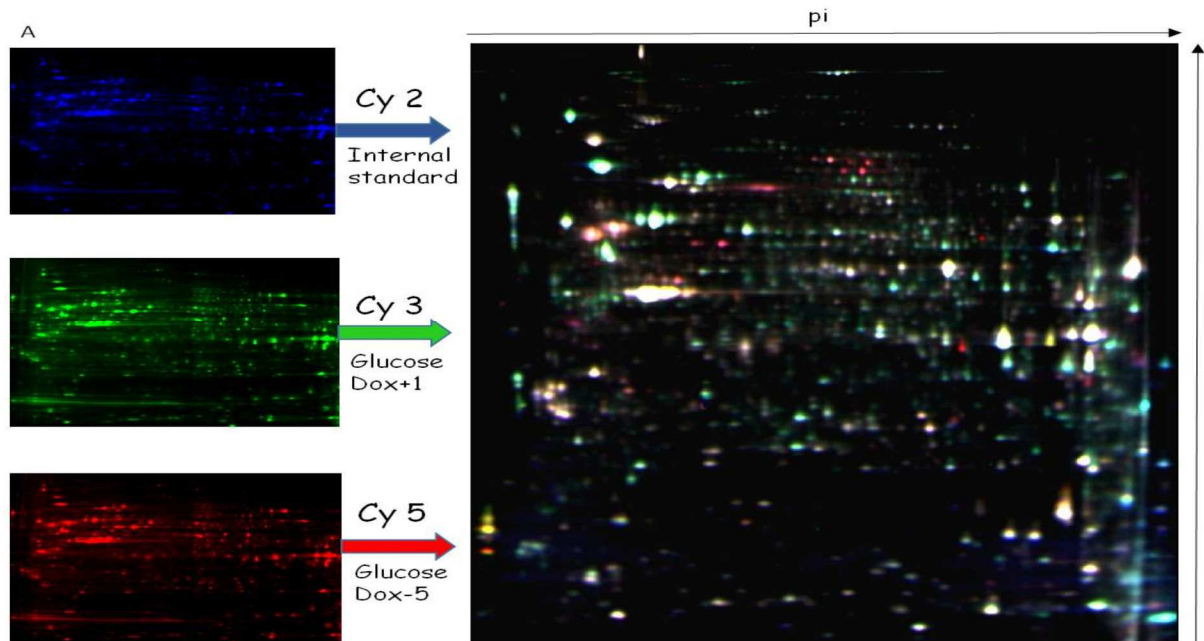


Looking for variations of others components of the quality control systems acting in mitochondria, we noted an over expression of the mitochondrial ClpP protease of Lon depleted cells in galactose (Fig 4A) while levels of the methionine sulfoxide reductase MsrB2, involved in the repair of oxidized proteins, [4] [13], increased in Lon depleted cells in both glucose and galactose conditions (Fig 4B). Here too it is the galactose containing medium conjugated with Lon deficiency that is associated with the most important response. We also looked at two potential regulators of the stress response and redox signaling, i.e. FoxO3 and Nrf2 [14]. In both glucose and galactose conditions, Nrf2 was only slightly up-regulated upon Lon depletion (Fig 4D) while FoxO3 showed the opposite, namely a small decrease in expression in Lon depleted cells (Fig 4C), also noted in galactose compared to glucose condition.

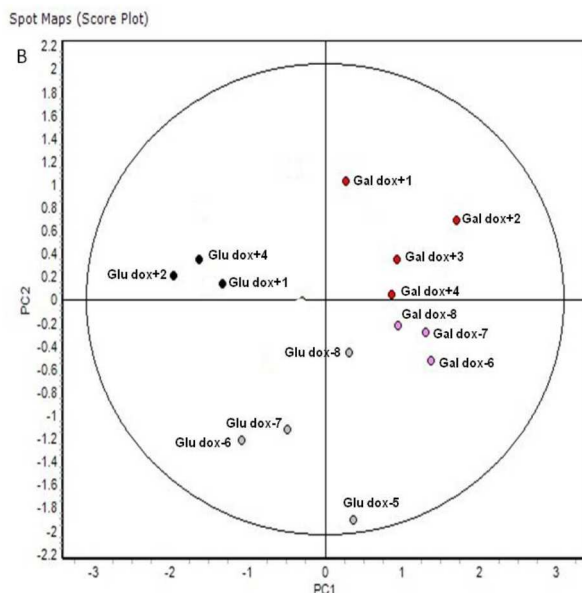
***Lon depletion results in modification of the expression of proteins involved in mitochondrial function and energy metabolism***

To fully explore protein expression modifications arising with Lon depletion, we used the 2D DIGE technology (Fig 5A). Four samples of each group (glucose Dox-, glucose Dox+, galactose Dox-, galactose Dox+) were compared in order to identify proteins, the expression of which is affected by Lon depletion. The Principal component analysis (PCA) grouped together the samples belonging to the same category (Fig 5B) revealing that each group have its own profile determined by both culture medium and expression level of the Lon protease. In glucose containing medium, protein spots submitted to mass spectrometry analysis resulted in the identification of 43 proteins exhibiting an over-expression when Lon is down regulated (Table 1). More than half of them are operating exclusively or at least in part in mitochondria. Concerning the 35 down-expressed proteins listed in glucose condition, only 20% are found in mitochondria (Table 2). The same trend was observed in Lon depleted cells in galactose containing medium, with about half of the 31 over-expressed proteins that are mitochondrial

(Table 3), and 19 down-expressed proteins, 15% of which are present in mitochondria (Table 4). In all cases, about half of the identified proteins are involved in two processes, energy metabolism as well as stress response and protein quality control (Tables 1 to 4 in supplementary data).

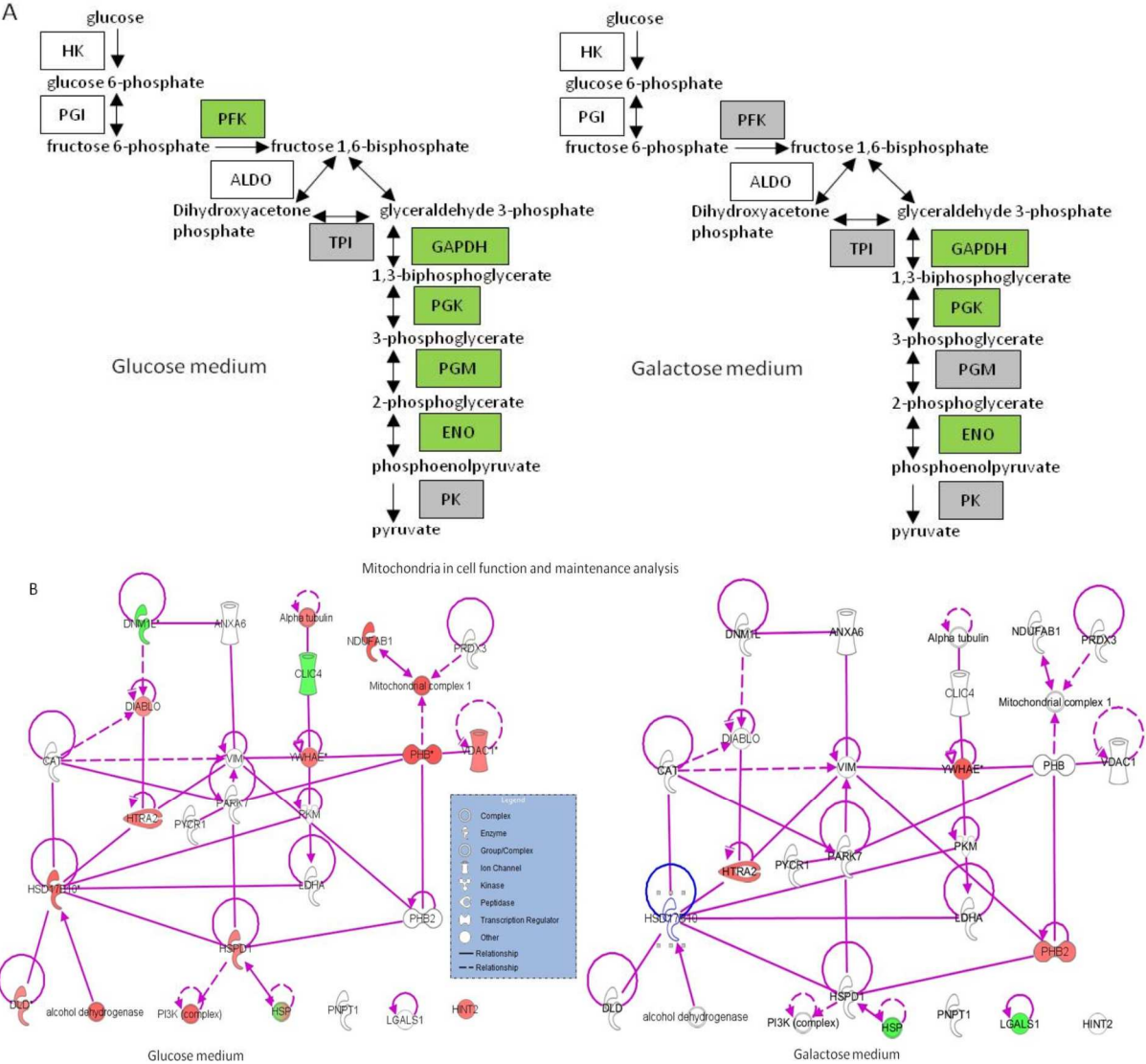


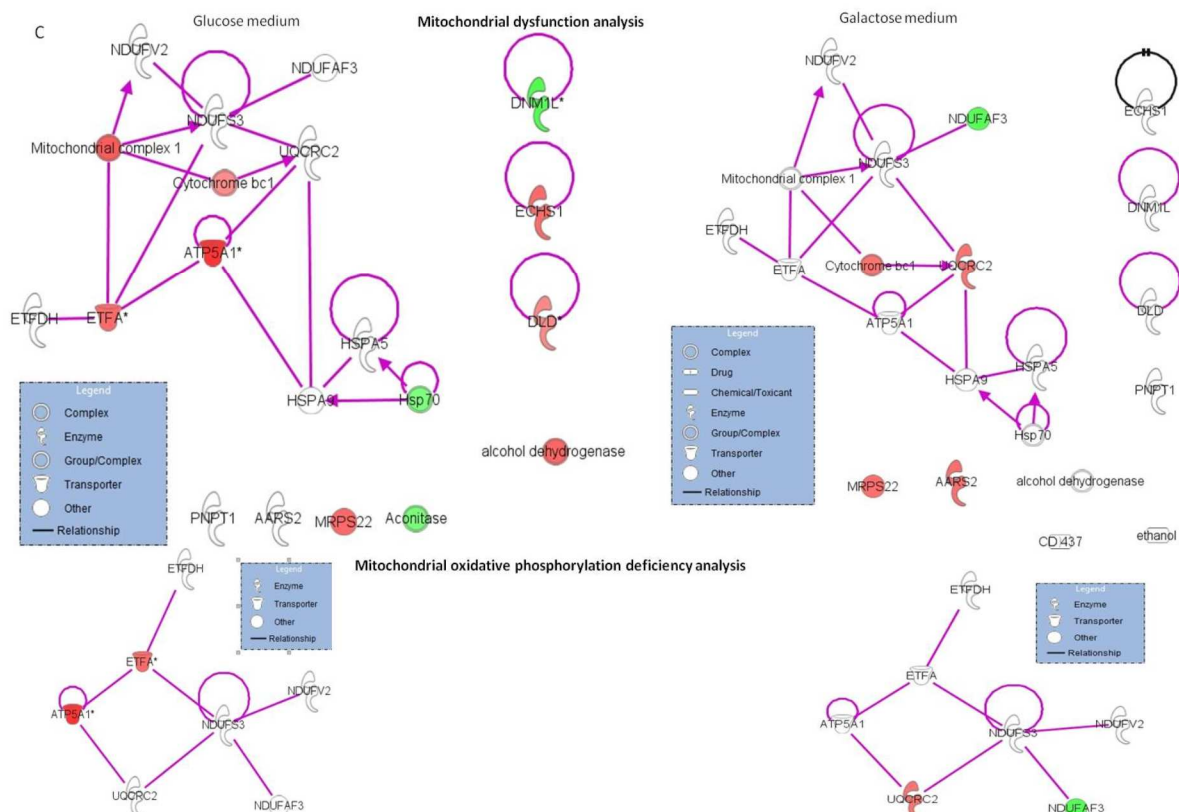
**Fig 5. 2D DIGE and Decyder analysis of proteomes of mitochondrial fractions.** **A)** Representative 2D-DIGE gel images of proteins of mitochondrial fractions of HeLa cells cultured in glucose medium with or without Lon depletion. After being labeled with CyDyes, proteins were electrofocused, separated on gradient acrylamide SDS-PAGE and scanned. The combined protein profile of internal standard, Glucose Dox+1 and Glucose Dox-5 samples shows green spots (proteins up-expressed in the Glucose Dox+1 sample), red spots (proteins up-expressed in the Glucose Dox-5 sample) and white spots (unchanged expression). **B)** Principal component analysis (PCA) showing the distribution of Cy3- and Cy5-labeled DIGE spots of interest (fold change  $\geq 1.3$  ; p value  $\leq 0,05$ ) of 14 samples separated on the basis of the differentially expressed protein.



Analysis of the 2D DIGE expression proteomics results with the Ingenuity Pathway Analysis software showed that glycolysis and mitochondrial dysfunction are the most impacted pathways by Lon depletion in glucose containing medium. These pathways are equally affected in

galactose containing medium upon Lon depletion. Others cellular networks linked with mitochondrial function and energy metabolism are also affected such as gluconeogenesis, TCA cycle, oxidative phosphorylation (OXPHOS), apoptosis signaling, fatty acid  $\beta$ -oxidation, urea cycle and calcium transport. Five enzymes involved in glycolysis were found under-expressed when Lon is down-regulated in glucose condition while this number was three in galactose containing medium (Fig 6A). Concerning mitochondrial dysfunction, oxidative phosphorylation and the role of mitochondria in cell function and maintenance, the number of proteins with modified expression upon Lon depletion was also more important in glucose compared to galactose containing medium (Fig 6 B and C).





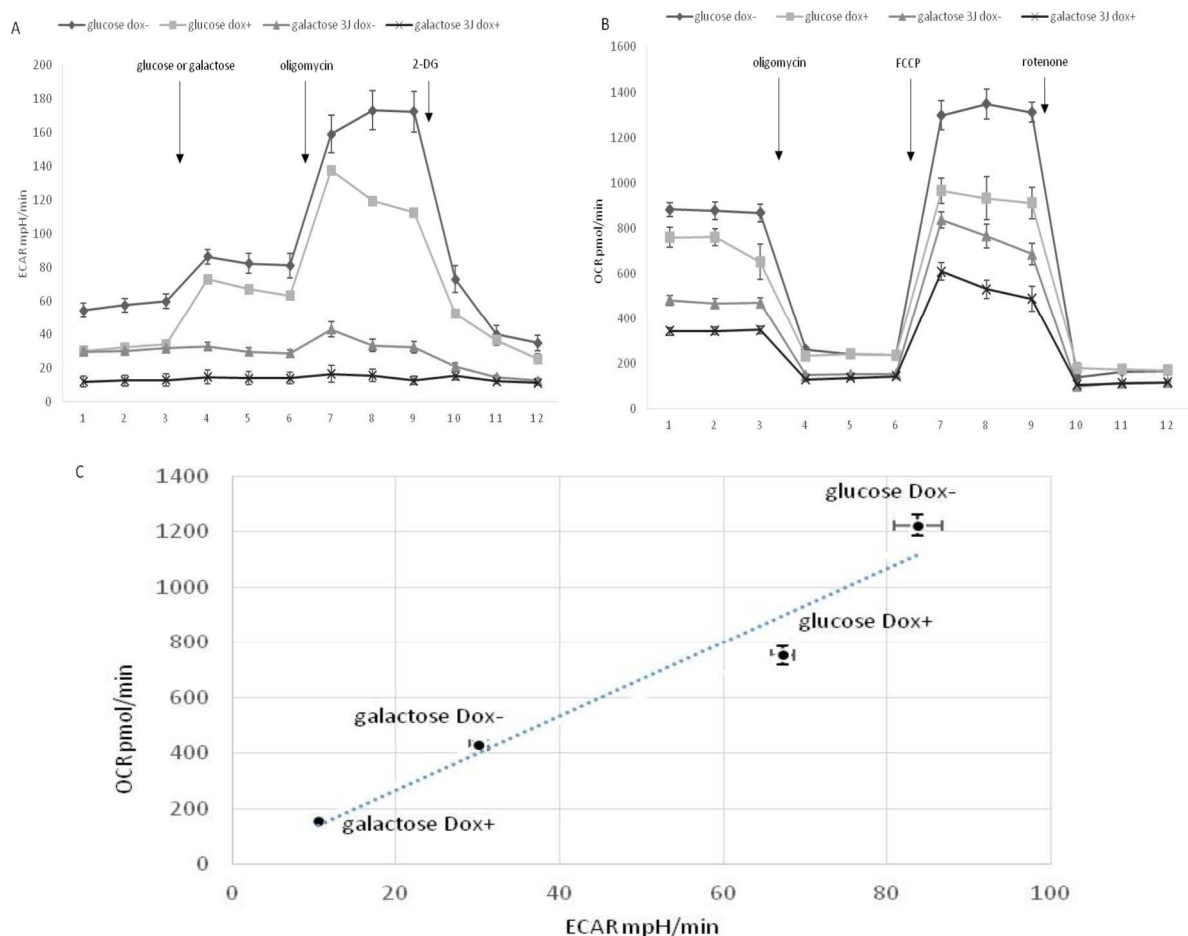
**Fig 6. Cellular pathways analysis of proteins reported to be modified by Lon down-regulation through the use of Ingenuity Pathways Analysis (Ingenuity Systems, <http://www.ingenuity.com/>). A), B), C) Analysis of protein pathways with Ingenuity Pathway. Proteins in red and green correspond respectively to some of the proteins identified as overexpressed or under-expressed when Lon is down-regulated. Proteins in grey correspond to some of the proteins modified but not significantly when Lon is down-regulated. White open nodes indicate proteins not identified in this analysis, but associated with the regulation of some of the proteins identified. A line denotes binding of proteins, whereas a line with an arrow denotes “acts on.” A dotted line denotes an indirect interaction. Abbreviations: HK, hexokinase; PGI, phosphoglucose isomerase; PFK, phosphofructo-kinase-1; ALDO, aldolase; TPI, triose phosphate isomerase; GAPDH, glyceraldehyde 3-phosphate dehydrogenase; PGK, phosphoglycerate kinase; PGM, phosphoglycero-mutase; ENO, enolase; PK, pyruvate kinase**

### ***Lon depletion results in alterations of the energetic metabolism***

Based on this expression proteomic results pointing to modifications of energy metabolism, we next performed functional studies using the Seahorse metabolic analyzer to assess the contribution of the mitochondrial respiratory chain and glycolysis to the energetic status of Lon depleted cells, in glucose and galactose containing media. In both conditions, Lon depleted cells demonstrated less active energy metabolism both in terms of oxygen consumption (OCR) and extracellular acidification (ECAR) (Fig 7 A & B). Considered with the ratio OCR versus ECAR

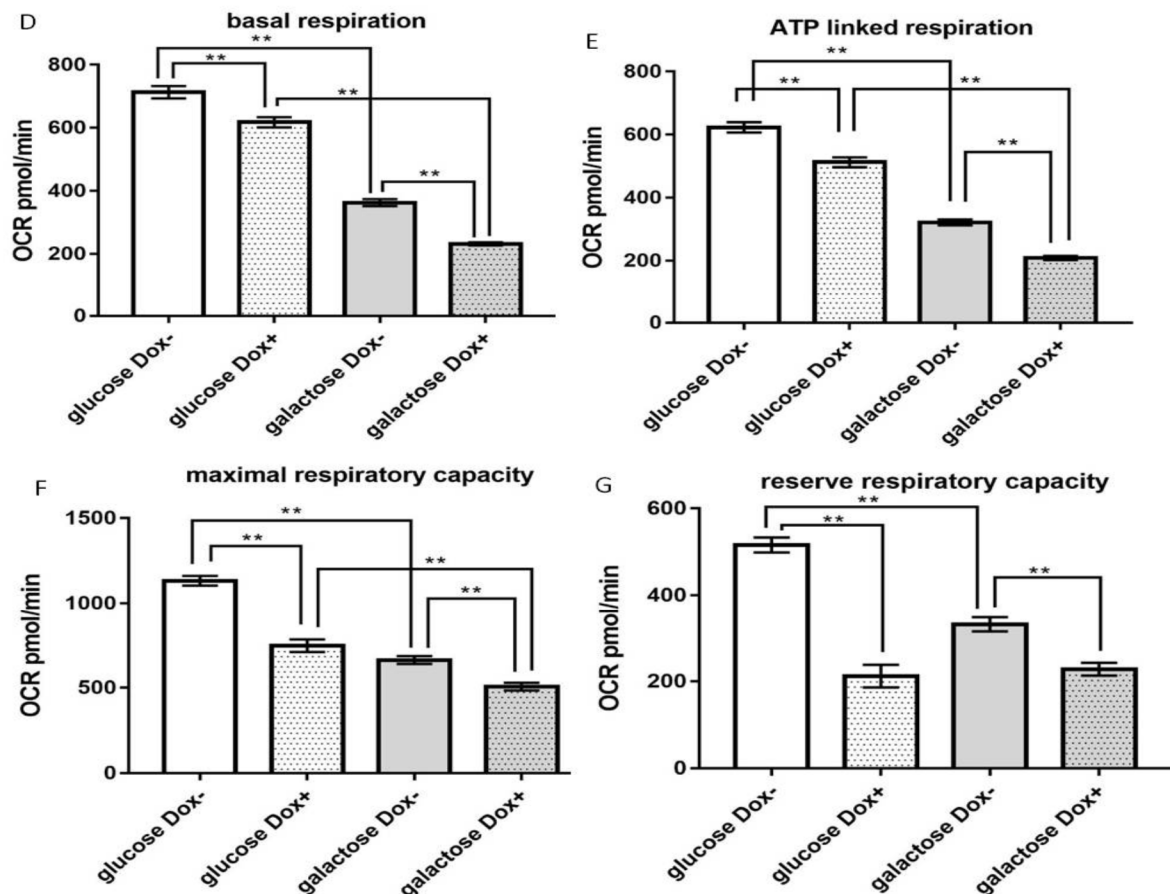
taken as a measure of the relative magnitude of OXPHOS versus glycolysis, Lon depleted cells in glucose exhibited a higher preference for glycolysis (Fig 7C). As expected, compared to glucose condition, cells in galactose demonstrated a decline of glycolysis activity (Fig. 7A) but, more surprisingly, this decline was not really compensated by a burst of OXPHOS activity (Fig. 7B).

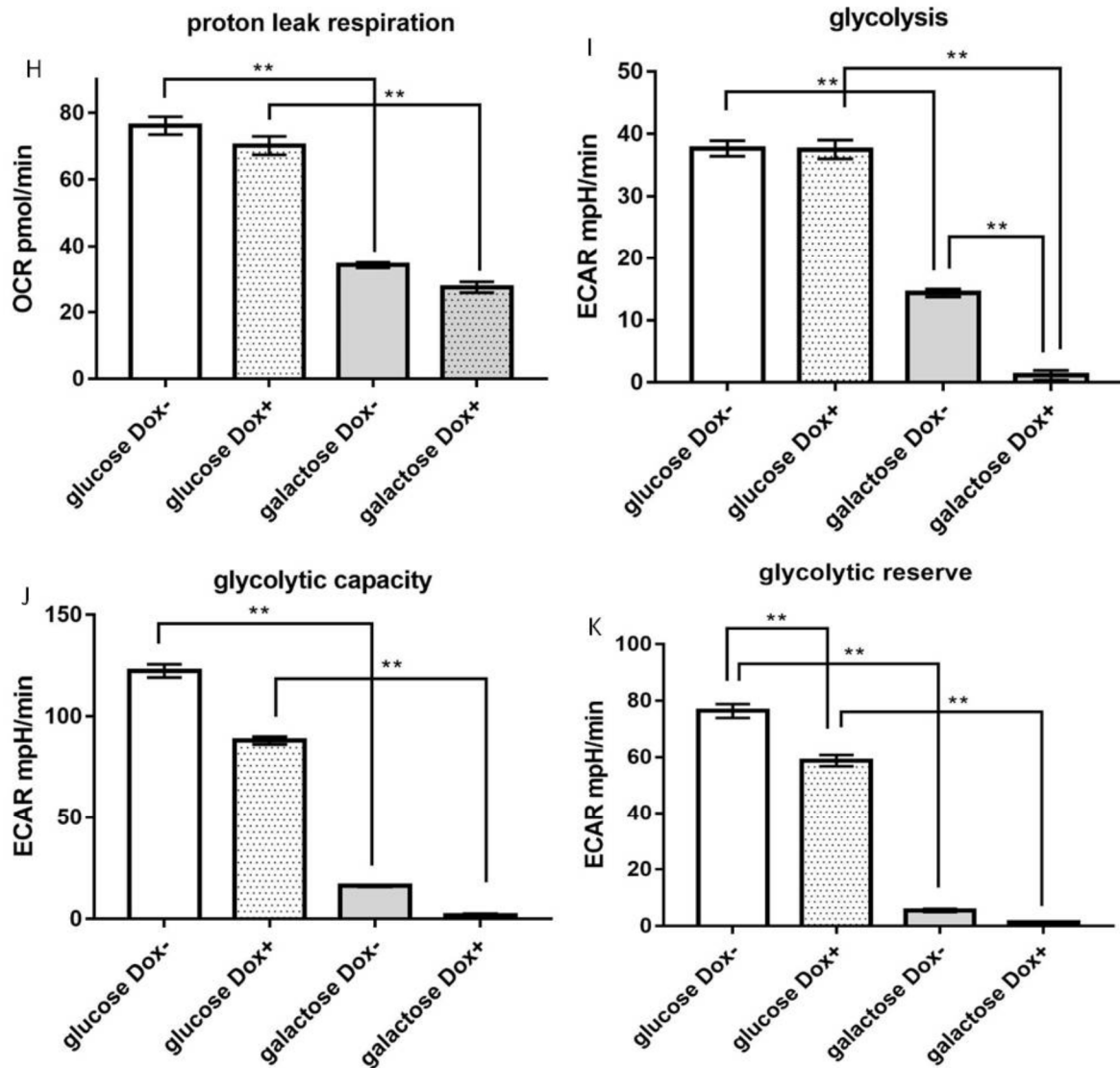
Concerning cells responses to drugs injections performed during the Seahorse metabolic analyzer experiments, both mutants presented with decreased productivity in term of OCR (basal respiration, ATP linked respiration, maximal respiratory capacity, reserve respiratory capacity and proton leak respiration) and ECAR (glycolysis, glycolytic capacity and glycolytic reserve) (Fig. 7 D to K). However Lon depleted cells in glucose showed the lowest reserve respiratory capacity (Fig. 7G) and no impact on their glycolysis activity (Fig. 7I), that may be related with their more glycolytic profile (Fig. 7C).



**Fig 6. OCR and ECAR in glucose or galactose medium with or without Lon knockdown.**

**A)** Extracellular acidification rate (ECAR) and **B)** oxygen consumption rate (OCR) were measured in a Seahorse XF24 analyzer. Each data-point represents mean  $\pm$  SEM, n=3. Cells were seeded at a density of 80,000. Glucose 10mM, galactose 10 $\mu$ M, oligomycin 1 $\mu$ M, 2-Deoxy-D-glucose 100mM, FCCP 1 $\mu$ M and rotenone 10 $\mu$ M were injected at the times indicated by the arrows. **C)** Basal OCR versus basal ECAR calculated from the data points 4,5,6 after glucose or galactose injection. **D)** The basal respiration OCR was calculated using the difference between the mean OCR of time points 1 to 3 (baseline) and the mean OCR of time points 10 to 12 (rotenone treatment). **E)** The ATP linked respiration OCR was calculated using the difference between the mean OCR of time points 1 to 3 (baseline) and the mean OCR of time points 4 to 6 (oligomycin treatment). **F)** The maximal respiratory capacity respiration OCR was calculated using the difference between the mean OCR of time points 7 to 9 (FCCP treatment) and the mean OCR of time points 10 to 12 (rotenone treatment). **G)** The reserve respiratory capacity OCR was calculated using the difference between the mean OCR of time points 7 to 9 (FCCP treatment) and the mean OCR of time points 1 to 3 (baseline). **H)** The proton leak respiration OCR was calculated using the difference between the mean OCR of time points 4 to 6 (oligomycin treatment) and the mean OCR of time points 10 to 12 (rotenone treatment). **I)** The glycolysis ECAR was calculated using the difference between the mean OCR of time points 4 to 6 (glucose or galactose treatment) and the mean OCR of time points 10 to 12 (2-DG treatment). **J)** The glycolytic capacity ECAR was calculated using the difference between the mean OCR of time points 7 to 9 (oligomycin treatment) and the mean OCR of time points 10 to 12 (2-DG treatment). **K)** The glycolytic reserve ECAR was calculated using the difference between the mean OCR of time points 7 to 9 (oligomycin treatment) and the mean OCR of time points 4 to 6 (glucose or galactose treatment). One-way ANOVA test or Kruskal-Wallis test: \*p<0.05, \*\*p<0.01.





## Discussion

In this study, we have investigated the effects of Lon depletion on protein and redox homeostasis as well as mitochondrial function in different metabolic conditions and stress situations. The observed increase in carbonylated protein levels concomitant with Lon knockdown, without and with different stresses, validates the important role of this mitochondrial protease in oxidized protein homeostasis, particularly when it comes to oxidative stress [15], i. e. with tert-butyl hydroperoxide (Fig.1A). Concerning the different metabolic conditions with 2-deoxy-D-glucose (2-DG), oligomycin, and galactose, they did not seem to impose on Lon depleted cells more oxidative injury than in glucose condition. The highest

levels of protein carbonylation in both control and Lon depleted cells were obtained with galactose which is consistent with galactose propensity to generate ageing in some animal models [22] particularly through increased oxidative stress [23].

The oxidative peaks observed in galactose (Fig 1B and 1C) can only be partially explained by a biggest mitochondrial mass. Indeed increase in mitochondrial mass noted with control cells in galactose (Fig 1D) is in agreement with previous observations for cells facing the absence of glucose, i.e. to compensate for the diminished supply of glycolytic ATP [32]. However, with less mitochondrial content and increased oxidative stress indicators, Lon depleted cells in galactose exhibited a different regulation of their mitochondrial mass that is operated through mitochondrial biogenesis and degradation by quality control [33].

Mitochondrial network modifications to Lon deficiency (Fig. 2) also support a deleterious effect of Lon down expression. Mitochondrial dynamics is a part of quality control system as fusion allows mitochondria to compensate defects in some of them while fission segregates healthy from damaged mitochondria when a certain threshold of damage is reached [28]. Fragmentation observed here with Lon down-regulation can thus indicate a mitochondrial dysfunction that appears more important in galactose than in glucose. Furthermore oxidative phosphorylation deficiency has been proven to be responsible for mitochondrial fragmentation [29]. A mitochondrial dysfunction was also found in Lon depleted melanoma cells that displayed an increase in mitochondrial fragmentation and ROS production, which caused the proteolytic processing of OPA1 [30]. Indeed, an excessive OPA1 processing can also promote mitochondrial fragmentation [31]. Concerning the network elongation exhibited by control cells in galactose and 2-DG, this has already been reported in HeLa cells upon glucose deprivation [24] [25]. This is most likely due to a switch from anaerobic to aerobic energy production, an adaptative response accompanied by a more extended mitochondrial network [26].



Based on the oxidative status, the mitochondrial abundance and network morphology of the Lon depleted cells, we can propose that Lon knockdown created a situation affecting mitochondrial function with a more important effect in galactose. This may explain why Lon depleted cells have less energy resource in the form of ATP levels (Fig 3C), especially in galactose medium where they showed the worst proliferation ability (Fig 3B). In galactose, energy metabolism is more dependent on oxidative phosphorylation [34] [35]. Hence the mitochondrial failure linked to Lon knockdown is more pronounced in galactose conditions that cumulate the decreased ATP production and proliferative capacity yet noted in cells with OXPHOS anomalies [36].

This mitochondrial dysfunction appeared to be underlined by mitochondrial quality control actors since a proteotoxic stress response arose in Lon depleted cells from MsrB2 (Fig 4B) and, in a lesser extent, the ClpP protease (Fig. 4A). Concerning the decreased expression of FoxO3 in cells with galactose and upon Lon depletion (Fig 4C), this has already been found in ageing cells and animals [37] [22]. The signaling pathway response may rather come from Nrf2 (Fig 4D), well-known for its role in antioxidant defense, particularly in case of threatened mitochondrial homeostasis [38], even if galactose induced a decreased expression of Nrf2 [39]. Moreover, a binding site for Nrf2 was found on the Lon promoter in a region essential for upregulating Lon in the presence of oxidative stress [40].

Analysis of the 2D DIGE results showed that two processes were particularly affected by Lon depletion, namely energy metabolism as well as stress response and protein quality control (Tables 1-4). Concerning protein quality control and stress response, Lon depletion induced variations in expression of proteins related to the role of mitochondria in cell function and maintenance (Fig. 6C), that were mainly up-regulations. In particular, without Lon, another mitochondrial serine protease showed enhanced expression, i.e. HtrA2 which is known for acting in case of oxidative stress [41]. Concerning energy metabolism, down-regulated proteins

upon Lon depletion are essentially located in cytosol and implicated in glycolysis. A down expression of enzymes involved in glycolysis has yet been found in muscle of old women with decreased energy metabolism [60]. Up-regulated proteins are rather situated in the mitochondria and involved in OXPHOS (Tables 1 to 4) (Fig. 6A & B). Such a transcriptional activation of proteins involved in composition, functioning and assembly of respiratory chain has already been reported in response to mitochondrial OXPHOS deficiencies [49]. In glucose condition, this remodeling is accompanied by over expression of  $\beta$ -oxidation components and reduced levels of lipid synthesis proteins. A similar metabolic reorganization has already been reported in cancer cells [42] and obesity-resistant mice [43] showing decreased lipid biosynthesis and increased lipid utilization in the mitochondria through fatty acid oxidation. This could counterbalance the reduced glycolysis and OXPHOS activities observed with Lon depletion (Fig. 7A and B) through increased production of lipolytic products and downregulation of lipid/sterol synthetic pathways.

Reduced energy metabolic activity noted in Lon depleted cells (Fig. 7) confirmed the hypothesis of mitochondrial dysfunction related to Lon deficiency and more importantly in galactose medium. This is consistent with the fall in ATP levels and the decrease in mitochondrial mass observed in Lon depleted cells in galactose condition (Fig. 1D and 3C). Both drops can be explained by the close link between energy metabolism and mitochondrial removal [50] and the benefit of degradation of damaged and free radical generating mitochondria [61].

Lon depleted cells revealed less active energy metabolic activity for nearly all parameters measured in this study (Fig. 7 D to K). Such an hypometabolism have been noted in a mouse model of Alzheimer's disease exhibiting oxidative stress and mitochondrial dysfunction [52]. Among the parameters that can indicate mitochondrial anomalies are respiratory reserve (Fig. 7G) the exhaustion of which has been reported with altered mitochondrial function [51], and

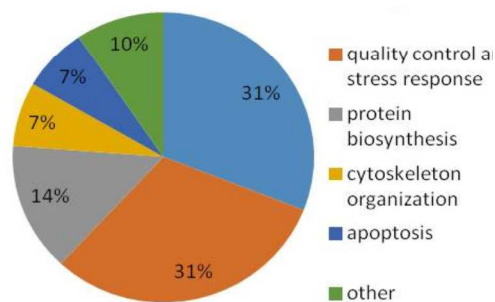
decreased glycolytic reserve (Fig. 7K) also indicating less tolerance to metabolic stress. By contrast, levels of proton leak respiration were not affected by Lon deficiency (Fig. 7H) which is in accordance with the increase of mitochondrial ROS production observed in Lon depleted cells and that are known to activate proton leak [53] [54]. This stimulation may minimize oxidative damage by tempering electrical potential and mitochondrial superoxide production [55].

Oxidative stress has been shown to inhibit glycolysis [44] and to impair oxidative phosphorylation [45]. Due to the complex interplay between protein oxidative damage and energy metabolism defect, it is not easy to determine how each of them share the responsibility of the decline of mitochondrial function observed here. Actually a decline of mitochondrial function is found in numerous diseases and the ageing process [46]. Decreased mitochondrial respiration can also be an adaptive stress response to face a redox stress [47] as well as reduced flux of the lower part of glycolysis [48]. It was mainly in this part of glycolysis that we found a down regulation of some glycolytic enzymes when Lon is depleted.

In conclusion, Lon knockdown induced a number of effects indicative of mitochondrial dysfunction in a context of oxidative stress. This mitochondrial dysfunction manifests in a particularly significant way through impaired energy metabolism. Such a picture is often associated with ageing and certain age-associated diseases as neurodegenerative diseases [56]. Moreover, the effects of Lon deficiency vary depending on the metabolic conditions showing a more pronounced dysfunction in galactose condition that underscores the importance of the Lon protease in mitochondrial homeostasis and stress response.

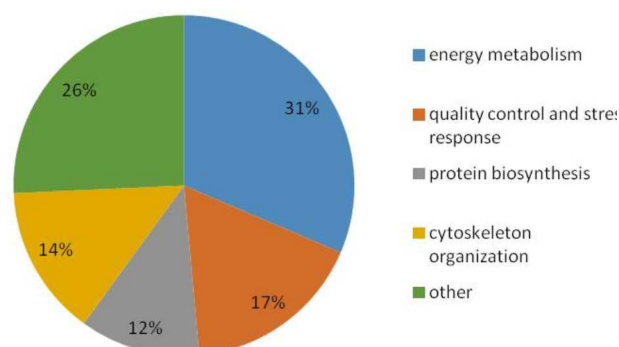
## Supplementary data

Identified protein name	Swiss-Prot accession n°
calreticulin	CALR_HUMAN
acyl-CoA dehydrogenase, very long chain, mitochondrial	ACADV_HUMAN
angio-associated migratory cell protein	AAMP_HUMAN
dihydrolipoyl dehydrogenase, mitochondrial	DLDH_HUMAN
cytosol aminopeptidase	AMPL_HUMAN
septin 6	SEPT6_HUMAN
ATP synthase subunit alpha, mitochondrial	ATPA_HUMAN
heat shock protein family D (Hsp60) member 1, mitochondrial	CH60_HUMAN
tubulin alpha 1a	TBB5_HUMAN
ATP synthase subunit beta, mitochondrial	ATPB_HUMAN
calumenin	CALU_HUMAN
cytochrome b-c1 complex subunit 1, mitochondrial	QCR1_HUMAN
tubulin beta 4B class IVb	TBB4B_HUMAN
NAD kinase 2, mitochondrial	NAKD2_HUMAN
28S ribosomal protein S22, mitochondrial	RT22_HUMAN
HtrA serine peptidase 2, mitochondrial	HTRA2_HUMAN
voltage dependent anion channel 1, mitochondrial	VDAC1_HUMAN
pyrroline-5-carboxylate reductase 1, mitochondrial	P5CR1_HUMAN
electron transfer flavoprotein subunit alpha, mitochondrial	ETF_A_HUMAN
Delta(3,5)-Delta(2,4)-dienoyl-CoA isomerase, mitochondrial	ECH1_HUMAN
14-3-3 protein epsilon	1433E_HUMAN
2-methoxy-6-polyprenyl-1,4-benzoquinol methylase, mitochondrial	COQ5_HUMAN
prohibitin, mitochondrial	PHB_HUMAN
cathepsin D	CATD_HUMAN
39S ribosomal protein L28, mitochondrial	RM28_HUMAN
enoyl-CoA hydratase, mitochondrial	ECHM_HUMAN
3-hydroxyacyl-CoA dehydrogenase type-2	HCD2_HUMAN
growth factor receptor-bound protein 2	GRB2_HUMAN
GrpE protein homolog 1, mitochondrial	GRPE1_HUMAN
mitochondrial assembly of ribosomal large subunit 1	MALSU1_HUMAN
proteasome subunit alpha 5	PSA5_HUMAN
fumarate hydratase, mitochondrial	FUMH_HUMAN
glutathione S-transferase kappa 1	GSTK1_HUMAN
heterogeneous nuclear ribonucleoproteins A2/B1	ROA2_HUMAN
cleavage and polyadenylation specificity factor subunit 5	CPSF5_HUMAN
matrix AAA peptidase interacting protein 1, mitochondrial	MAIP1_HUMAN
prostaglandin E synthase 2	PGES2_HUMAN
cell division control protein 42 homolog	CDC42_HUMAN
diablo homolog, mitochondrial	DBLOH_HUMAN
programmed cell death 6	PDCD6_HUMAN
translocon-associated protein subunit delta	SSRD_HUMAN
histidine triad nucleotide binding protein 2, mitochondrial	HINT2_HUMAN
acyl carrier protein, mitochondrial (ubiquinone oxidoreductase subunit AB1 NDUFB1)	ACPM_HUMAN



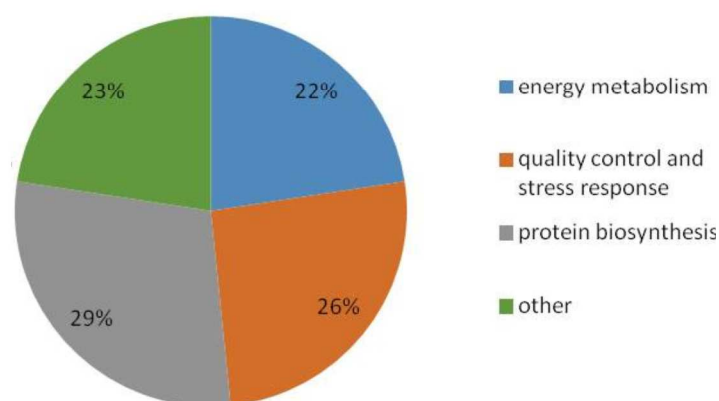
**Table 1. Protein over-expressed in glucose condition when Lon is down-regulated.** Protein identification of 2D-DIGE-identified differentially expressed spots in mitochondrial fractions of HeLa cells cultured in glucose medium with or without Lon depletion. Spots of interest (fold change  $\geq 1.2$ ; test  $p \leq 5\%$ ,  $n = 4$ ) were identified by mass spectrometry as described in Materials and methods. Proteins expressed in whole or in part in mitochondria are mentioned in red. Pie chart shows the main functions performed by the proteins listed here.

Identified protein name	Swiss-Prot accession n°
vinculin	VINC_HUMAN
<b>carbamoyl-phosphate synthase 1, mitochondrial</b>	CPS1_HUMAN
ATP-citrate synthase	ACLY_HUMAN
importin-5	IPO5_HUMAN
elongation factor 2	EF2_HUMAN
Cytoplasmic aconitase hydratase	ACOC_HUMAN
pre-mRNA-splicing factor ATP-dependent RNA helicase DHX15	DHX15_HUMAN
cortactin	SRC8_HUMAN
heat shock protein HSP 90-beta	HS90B_HUMAN
ATP-dependent 6-phosphofructokinase	PFKAP_HUMAN
moesin	MOES_HUMAN
<b>dynamamin 1 like</b>	DNM1L_HUMAN
lamin A/C	LMNA_HUMAN
heat shock 70 kDa protein 1A	HS71A_HUMAN
plastin-3	PLST_HUMAN
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein Q	HNRPQ_HUMAN
far upstream element-binding protein 1	FUBP1_HUMAN
T-complex protein 1 subunit gamma	TCPG_HUMAN
T-complex protein 1 subunit eta	TCPH_HUMAN
adenylyl cyclase-associated protein 1	CAP1_HUMAN
T-complex protein 1 subunit beta	TCPB_HUMAN
gamma-enolase	ENOG_HUMAN
<b>DnaJ homolog subfamily A member 1</b>	DNJA1_HUMAN
alpha-enolase	ENOA_HUMAN
phosphoglycerate kinase 1	PGK1_HUMAN
adenosylhomocysteinase	SAHH_HUMAN
farnesyl pyrophosphate synthase	FPPS_HUMAN
serine/threonine-protein phosphatase PP1-beta catalytic subunit	PP1B_HUMAN
annexin A1	ANXA1_HUMAN
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_HUMAN
<b>chloride intracellular channel 4</b>	CLIC4_HUMAN
<b>protein ABHD11</b>	ABHDB_HUMAN
phosphoglycerate mutase 1	PGAM1_HUMAN
<b>hydroxyacylglutathione hydrolase, mitochondrial</b>	GLO2_HUMAN
barrier to autointegration factor 1	BAF_HUMAN



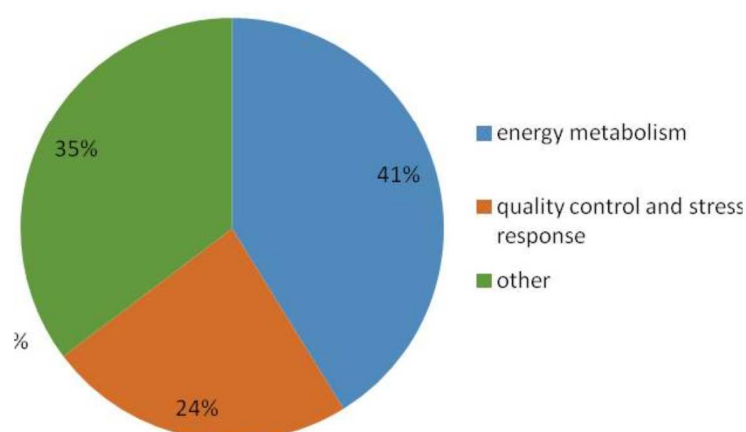
**Table 2. Protein down-expressed in glucose condition when Lon is down-regulated.** Protein identification of 2D-DIGE-identified differentially expressed spots in mitochondrial fractions of HeLa cells cultured in glucose medium with or without Lon depletion. Spots of interest (fold change  $\geq 1.2$ ; test  $p \leq 5\%$ ,  $n = 4$ ) were identified by mass spectrometry as described in Materials and methods. Proteins expressed in whole or in part in mitochondria are mentioned in red. Pie chart shows the main functions performed by the proteins listed here.

Identified protein name	Swiss-Prot accession n°
DNA mismatch repair protein Msh2	MSH2_HUMAN
alanine--tRNA ligase, mitochondrial	SYAM_HUMAN
X-ray repair cross complementing 6	XRCC6_HUMAN
bifunctional coenzyme A synthase	COASY_HUMAN
electron transfer flavoprotein-ubiquinone oxidoreductase, mitochondrial	ETFD_HUMAN
cytochrome b-c1 complex subunit 2, mitochondrial	QCR2_HUMAN
flap endonuclease 1	FEN1_HUMAN
succinyl-CoA ligase ADP-forming subunit beta, mitochondrial	SUCB1_HUMAN
lamin A/C	LMNA_HUMAN
actin, cytoplasmic 1	ACTB_HUMAN
medium-chain specific acyl-CoA dehydrogenase, mitochondrial	ACADM_HUMAN
eukaryotic translation initiation factor 3 subunit H	EIF3H_HUMAN
heterogeneous nuclear ribonucleoproteins C1/C2	HNRPC_HUMAN
serine-threonine kinase receptor-associated protein	STRAP_HUMAN
28S ribosomal protein S22, mitochondrial	RT22_HUMAN
annexin A2	ANXA2_HUMAN
AH receptor interacting protein	AIP_HUMAN
3-mercaptopyruvate sulfurtransferase	THTM_HUMAN
ribose-phosphate pyrophosphokinase 2	PRPS2_HUMAN
HtrA serine peptidase 2, mitochondrial	HTRA2_HUMAN
prohibitin-2	PHB2_HUMAN
annexin A5	ANXA5_HUMAN
chloride intracellular channel 2	CLIC2_HUMAN
cathepsin D	CATD_HUMAN
14-3-3 protein epsilon	1433E_HUMAN
T-complex protein 1 subunit beta	TCPB_HUMAN
protein ABHD11	ABHDB_HUMAN
matrix AAA peptidase interacting protein 1, mitochondrial	MAIP1_HUMAN
prostaglandin E synthase 2	PGES2_HUMAN
heterogeneous nuclear ribonucleoprotein A1	ROA1_HUMAN
ubiquitin-40S ribosomal protein S27a	RS27A_HUMAN



**Table 3. Protein over-expressed in galactose condition when Lon is down-regulated.** Protein identification of 2D-DIGE-identified differentially expressed spots in mitochondrial fractions of HeLa cells cultured in galactose medium with or without Lon depletion. Spots of interest (fold change  $\geq 1.2$ ; test  $p \leq 5\%$ ,  $n = 4$ ) were identified by mass spectrometry as described in Materials and methods. Proteins expressed in whole or in part in mitochondria are mentioned in red. Pie chart shows the main functions performed by the proteins listed here.

Identified protein name	Swiss-Prot accession n°
<b>carbamoyl-phosphate synthase ammonia, mitochondrial</b>	CPS1 HUMAN
neutral alpha-glucosidase AB	GANAB_HUMAN
heat shock protein HSP 90-beta	HS90B_HUMAN
radixin	RADI_HUMAN
gamma-enolase	ENOG_HUMAN
phosphoglycerate kinase 1	PGK1_HUMAN
fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN
<b>calcium uptake protein 2, mitochondrial</b>	MICU2_HUMAN
glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	G3P_HUMAN
ubiquitin domain-containing protein UBFD1	UBFD1_HUMAN
26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 13	PSD13_HUMAN
guanine nucleotide-binding protein G(i) subunit alpha-2	GNAI2_HUMAN
glutaredoxin-3	GLRX3_HUMAN
ferritin light chain	FRIL_HUMAN
eukaryotic translation initiation factor 1A, X-chromosomal	IF1AX_HUMAN
exosome complex component RRP4	EXOS2_HUMAN
<b>NADH dehydrogenase ubiquinone 1 alpha subcomplex assembly factor</b>	NDUF3_HUMAN
prefoldin subunit 5	PFD5_HUMAN
galectin 1	LEG1_HUMAN



**Table 4. Protein down-expressed in galactose condition when Lon is down-regulated.** Protein identification of 2D-DIGE-identified differentially expressed spots in mitochondrial fractions of HeLa cells cultured in galactose medium with or without Lon depletion. Spots of interest (fold change  $\geq 1.2$ ; test  $p \leq 5\%$ ,  $n = 4$ ) were identified by mass spectrometry as described in Materials and methods. Proteins expressed in whole or in part in mitochondria are mentioned in red. Pie chart shows the main functions performed by the proteins listed here.

## References

- [1] A. Nickel, M. Kohlhaas, and C. Maack, “Mitochondrial reactive oxygen species production and elimination,” *J. Mol. Cell. Cardiol.*, vol. 73, pp. 26–33, 2014.
- [2] K. M. Holmström and T. Finkel, “Cellular mechanisms and physiological consequences of redox-dependent signalling,” *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, vol. 15, no. 6, pp. 411–421, 2014.
- [3] A. Bayot, M. Gareil, A. Rogowska-Wrzesinska, P. Roepstorff, B. Friguet, and A. L. Bulteau, “Identification of novel oxidized protein substrates and physiological partners of the mitochondrial ATP-dependent Lon-like protease Pim1,” *J. Biol. Chem.*, vol. 285, no. 15, pp. 11445–11457, 2010.
- [4] M. P. Hamon, A. L. Bulteau, and B. Friguet, “Mitochondrial proteases and protein quality control in ageing and longevity,” *Ageing Res. Rev.*, vol. 23, no. PA, pp. 56–66, 2015.
- [5] T. Bender, C. Leidhold, T. Ruppert, S. Franken, and W. Voos, “The role of protein quality control in mitochondrial protein homeostasis under oxidative stress,” *Proteomics*, vol. 10, no. 7, pp. 1426–1443, Apr. 2010.
- [6] A. Bayot *et al.*, “Effect of Lon protease knockdown on mitochondrial function in HeLa cells,” *Biochimie*, vol. 100, no. 1, pp. 38–47, May 2014.
- [7] A.-L. Bulteau, L. I. Szwedda, and B. Friguet, “Mitochondrial protein oxidation and degradation in response to oxidative stress and aging,” *Exp. Gerontol.*, vol. 41, no. 7, pp. 653–7, Jul. 2006.
- [8] D. A. Bota, J. K. Ngo, and K. J. A. Davies, “Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 38, no. 5, pp. 665–77, Mar. 2005.
- [9] D. Bota, H. Van Remmen, and K. J. A. Davies, “Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress,” *FEBS Lett.*, vol. 532, no. 1–2, pp. 103–6, Dec. 2002.
- [10] M. Fedorova, R. C. Bollineni, and R. Hoffmann, “Protein carbonylation as a major hallmark of oxidative damage: Update of analytical strategies,” *Mass Spectrom. Rev.*, vol. 33, no. 2, pp. 79–97, 2014.
- [11] M. A. Baraibar and B. Friguet, “Oxidative proteome modifications target specific cellular pathways during oxidative stress, cellular senescence and aging,” *Exp. Gerontol.*, vol. 48, no. 7, pp. 620–625, 2013.
- [12] W. J. H. Koopman, H.-J. Visch, J. A. M. Smeitink, and P. H. G. M. Willems, “Simultaneous quantitative measurement and automated analysis of mitochondrial morphology, mass, potential, and motility in living human skin fibroblasts,” *Cytom. Part A*, vol. 69A, no. 1, pp. 1–12, 2006.
- [13] D. M. Otte *et al.*, “Identification of the Mitochondrial MSRB2 as a Binding Partner of LG72,” *Cell. Mol. Neurobiol.*, vol. 34, no. 8, pp. 1123–1130, 2014.



- [14] L. O. Klotz, C. Sánchez-Ramos, I. Prieto-Arroyo, P. Urbánek, H. Steinbrenner, and M. Monsalve, “Redox regulation of FoxO transcription factors,” *Redox Biol.*, vol. 6, pp. 51–72, Dec. 2015.
- [15] J. K. Ngo, L. C. D. Pomatto, and K. J. A. Davies, “Upregulation of the mitochondrial Lon Protease allows adaptation to acute oxidative stress but dysregulation is associated with chronic stress, disease, and aging,” *Redox Biol.*, vol. 1, no. 1, pp. 258–264, 2013.
- [16] D. Zhang, J. Li, F. Wang, J. Hu, S. Wang, and Y. Sun, “2-Deoxy-D-glucose targeting of glucose metabolism in cancer cells as a potential therapy,” *Cancer Lett.*, vol. 355, no. 2, pp. 176–183, 2014.
- [17] W. Duan and M. P. Mattson, “Dietary restriction and 2-deoxyglucose administration improve behavioral outcome and reduce degeneration of dopaminergic neurons in models of Parkinson’s disease,” *J. Neurosci. Res.*, vol. 57, no. 2, pp. 195–206, 1999.
- [18] N. Jelluma, “Glucose Withdrawal Induces Oxidative Stress followed by Apoptosis in Glioblastoma Cells but not in Normal Human Astrocytes,” *Mol. Cancer Res.*, vol. 4, no. 5, pp. 319–330, 2006.
- [19] T. J. Schulz, K. Zarse, A. Voigt, N. Urban, M. Birringer, and M. Ristow, “Glucose Restriction Extends *Caenorhabditis elegans* Life Span by Inducing Mitochondrial Respiration and Increasing Oxidative Stress,” *Cell Metab.*, vol. 6, no. 4, pp. 280–293, 2007.
- [20] M. H. A. Bakar, M. R. Sarmidi, C. K. Kai, H. Z. Huri, and H. Yaakob, “Amelioration of Mitochondrial Dysfunction-Induced Insulin Resistance in Differentiated 3T3-L1 Adipocytes via Inhibition of NF- $\kappa$ B Pathways,” *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 15, no. 12, pp. 22227–22257, 2014.
- [21] L. A. Shchepina *et al.*, “Oligomycin, inhibitor of the F<sub>0</sub> part of H<sup>+</sup>-ATP-synthase, suppresses the TNF-induced apoptosis,” *Oncogene*, vol. 21, no. 53, pp. 8149–8157, 2002.
- [22] J. Li, C.-X. Zhang, Y.-M. Liu, K.-L. Chen, and G. Chen, “A comparative study of anti-aging properties and mechanism: resveratrol and caloric restriction,” *Oncotarget*, vol. 8, no. 39, pp. 65717–65729, 2017.
- [23] D. Delwing-de Lima *et al.*, “Galactose alters markers of oxidative stress and acetylcholinesterase activity in the cerebrum of rats: protective role of antioxidants,” *Metab. Brain Dis.*, vol. 32, no. 2, pp. 359–368, 2017.
- [24] R. Rossignol, R. Gilkerson, R. Aggeler, K. Yamagata, S. J. Remington, and R. A. Capaldi, “Energy Substrate Modulates Mitochondrial Structure and Oxidative Capacity in Cancer Cells,” *Cancer Res.*, vol. 64, no. 3, pp. 985–993, 2004.
- [25] J. Li *et al.*, “Mitochondrial elongation-mediated glucose metabolism reprogramming is essential for tumour cell survival during energy stress,” *Oncogene*, vol. 36, no. 34, pp. 4901–4912, 2017.
- [26] W. J. H. Koopman, “Inhibition of complex I of the electron transport chain causes O<sub>2</sub>-{middle dot}-mediated mitochondrial outgrowth,” *AJP Cell Physiol.*, vol. 288, no. 6, pp. C1440–C1450, 2005.

- [27] J. F. Halling, S. Ringholm, J. Olesen, C. Prats, and H. Pilegaard, "Exercise training protects against aging-induced mitochondrial fragmentation in mouse skeletal muscle in a PGC-1 $\alpha$  dependent manner," *Exp. Gerontol.*, vol. 96, pp. 1–6, 2017.
- [28] A. M. Youle, R. J., & van der Blik, "Mitochondrial fission, fusion, and stress," *Science (80-. )*, vol. 337, no. 6098, pp. 1062–1065, 2012.
- [29] O. Guillery, F. Malka, P. Frachon, D. Milea, M. Rojo, and A. Lombès, "Modulation of mitochondrial morphology by bioenergetics defects in primary human fibroblasts," *Neuromuscul. Disord.*, vol. 18, no. 4, pp. 319–330, 2008.
- [30] P. M. Quirós *et al.*, "ATP-Dependent Lon Protease Controls Tumor Bioenergetics by Reprogramming Mitochondrial Activity," *Cell Rep.*, vol. 8, no. 2, pp. 542–556, 2014.
- [31] T. MacVicar and T. Langer, "OPA1 processing in cell death and disease – the long and short of it," *J. Cell Sci.*, vol. 129, no. 12, pp. 2297–2306, 2016.
- [32] R. Domenis, E. Bisetto, D. Rossi, M. Comelli, and I. Mavelli, "Glucose-modulated mitochondria adaptation in tumor cells: A focus on ATP synthase and Inhibitor Factor 1," *Int. J. Mol. Sci.*, vol. 13, no. 2, pp. 1933–1950, 2012.
- [33] S. Michel, A. Wanet, A. De Pauw, G. Rommelaere, T. Arnould, and P. Renard, "Crosstalk between mitochondrial (dys)function and mitochondrial abundance," *J. Cell. Physiol.*, vol. 227, no. 6, pp. 2297–2310, 2012.
- [34] J. D. Arroyo *et al.*, "A Genome-wide CRISPR Death Screen Identifies Genes Essential for Oxidative Phosphorylation," *Cell Metab.*, vol. 24, no. 6, pp. 875–885, 2016.
- [35] B. H. Robinson, R. Petrova-Benedict, J. R. Buncic, and D. C. Wallace, "Nonviability of cells with oxidative defects in galactose medium: A screening test for affected patient fibroblasts," *Biochem. Med. Metab. Biol.*, vol. 48, no. 2, pp. 122–126, 1992.
- [36] K. Birsoy, T. Wang, W. W. Chen, E. Freinkman, M. Abu-Remaileh, and D. M. Sabatini, "An Essential Role of the Mitochondrial Electron Transport Chain in Cell Proliferation Is to Enable Aspartate Synthesis," *Cell*, vol. 162, no. 3, pp. 540–551, 2015.
- [37] L. R. Saunders and E. Verdin, "Sirtuins: Critical regulators at the crossroads between cancer and aging," *Oncogene*, vol. 26, no. 37, pp. 5489–5504, 2007.
- [38] A. T. Dinkova-Kostova and A. Y. Abramov, "The emerging role of Nrf2 in mitochondrial function," *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 88, no. Part B, pp. 179–188, 2015.
- [39] F. Dong *et al.*, "Quercetin ameliorates learning and memory via the Nrf2-ARE signaling pathway in D-galactose-induced neurotoxicity in mice," *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, vol. 491, no. 3, pp. 636–641, 2017.
- [40] M. Pinti *et al.*, "Functional characterization of the promoter of the human Lon protease gene," *Mitochondrion*, vol. 11, no. 1, pp. 200–206, 2011.
- [41] S. Krick *et al.*, "Mpv17l protects against mitochondrial oxidative stress and apoptosis by activation of Omi / HtrA2 protease," 2008.

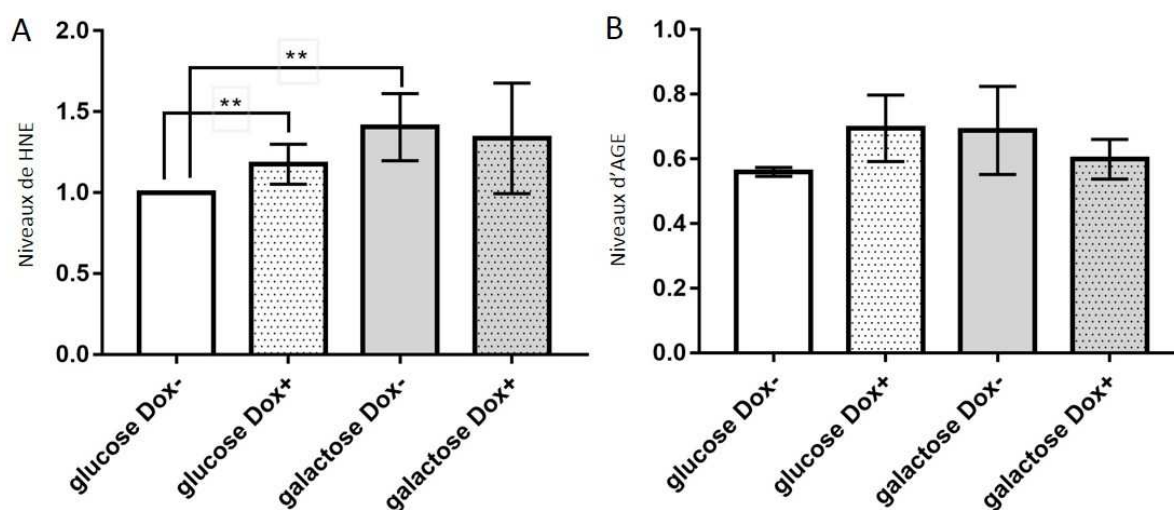
- [42] H. J. Wright *et al.*, “CDCP1 drives triple-negative breast cancer metastasis through reduction of lipid-droplet abundance and stimulation of fatty acid oxidation,” *Proc. Natl. Acad. Sci.*, vol. 114, no. 32, pp. E6556–E6565, 2017.
- [43] F. Castro-Chavez *et al.*, “Coordinated Upregulation of Oxidative Pathways and Downregulation of Lipid Biosynthesis Underlie Obesity Resistance in Perilipin Knockout Mice: A Microarray Gene Expression Profile,” *Diabetes*, vol. 52, no. 11, pp. 2666–2674, 2003.
- [44] Z.-P. Lv, Y.-Z. Peng, B.-B. Zhang, H. Fan, D. Liu, and Y.-M. Guo, “Glucose and lipid metabolism disorders in the chickens with dexamethasone-induced oxidative stress,” *J. Anim. Physiol. Anim. Nutr. (Berl.)*, vol. 7, no. August, pp. 1–12, 2017.
- [45] M. F. Beal, “Aging, energy, and oxidative stress in neurodegenerative diseases,” *Ann. Neurol.*, vol. 38, no. 3, pp. 357–366, 1995.
- [46] J. T. Legault *et al.*, “A Metabolic Signature of Mitochondrial Dysfunction Revealed through a Monogenic Form of Leigh Syndrome,” vol. 13, no. 5, pp. 981–989, 2015.
- [47] R. K. J. Olsen, N. Cornelius, and N. Gregersen, “Redox signalling and mitochondrial stress responses; lessons from inborn errors of metabolism,” *J. Inherit. Metab. Dis.*, vol. 38, no. 4, pp. 703–719, 2015.
- [48] A. Kuehne *et al.*, “Acute Activation of Oxidative Pentose Phosphate Pathway as First-Line Response to Oxidative Stress in Human Skin Cells,” *Mol. Cell*, vol. 59, no. 3, pp. 359–371, 2015.
- [49] F. Reinecke, J. A. M. Smeitink, and F. H. van der Westhuizen, “OXPHOS gene expression and control in mitochondrial disorders,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Basis Dis.*, vol. 1792, no. 12, pp. 1113–1121, 2009.
- [50] S. Melser, J. Lavie, and G. Bénard, “Mitochondrial degradation and energy metabolism,” *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.*, vol. 1853, no. 10, pp. 2812–2821, 2015.
- [51] C. Desler, T. L. Hansen, J. B. Frederiksen, M. L. Marcker, K. K. Singh, and L. Juel Rasmussen, “Is there a link between mitochondrial reserve respiratory capacity and aging?,” *J. Aging Res.*, vol. 2012, 2012.
- [52] J. Yao, R. W. Irwin, L. Zhao, J. Nilsen, R. T. Hamilton, and R. D. Brinton, “Mitochondrial bioenergetic deficit precedes Alzheimer’s pathology in female mouse model of Alzheimer’s disease,” *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.*, vol. 106, no. 34, pp. 14670–14675, 2009.
- [53] A. B. Thrush *et al.*, “Lower mitochondrial proton leak and decreased glutathione redox in primary muscle cells of obese diet-resistant versus diet-sensitive humans,” *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, vol. 99, no. 11, pp. 4223–4230, 2014.
- [54] P. S. Brookes, “Mitochondrial H<sup>+</sup> leak and ROS generation: An odd couple,” *Free Radic. Biol. Med.*, vol. 38, no. 1, pp. 12–23, 2005.

- [55] A. S. Divakaruni and M. D. Brand, "The Regulation and Physiology of Mitochondrial Proton Leak," *Physiology*, vol. 26, no. 3, pp. 192–205, 2011.
- [56] K. Parameshwaran, M. H. Irwin, K. Steliou, and C. A. Pinkert, "Galactose Effectiveness in Modeling Aging and Therapeutic Antioxidant Treatment in Mice," *Rejuvenation Res.*, vol. 13, no. 6, pp. 729–735, 2010.
- [57] E. K. Ahmed, A. Rogowska-Wrzesinska, P. Roepstorff, A.-L. Bulteau, and B. Friguet, "Protein modification and replicative senescence of WI-38 human embryonic fibroblasts.," *Aging Cell*, vol. 9, no. 2, pp. 252–72, Apr. 2010.
- [58] Y. Mallat *et al.*, "Proteome Modulation in H9c2 Cardiac Cells by microRNAs miR-378 and miR-378," *Mol. Cell. Proteomics*, vol. 13, no. 1, pp. 18–29, Jan. 2014.
- [59] A. Shevchenko, A. Loboda, and W. Ens, "Archived polyacrylamide gels as a resource for proteome characterization by mass spectrometry," *Electrophoresis*, vol. 22, no. 6, pp. 1194–1203, 2001.
- [60] M. Gueugneau *et al.*, "Proteomics of muscle chronological ageing in post-menopausal women," *BMC Genomics*, vol. 15, pp. 1–24, 2015.
- [61] J. J. Lemasters, "Selective Mitochondrial Autophagy, or Mitophagy, as a Targeted Defense Against Oxidative Stress, Mitochondrial Dysfunction, and Aging," *Rejuvenation Res.*, vol. 8, no. 1, pp. 3–5, 2005.

# **Résultats supplémentaires**

## 1) Peroxydation lipidique et glycoxydation dans les cellules HeLa déficientes en Lon

Les systèmes protéolytiques constituent l'un des outils préférentiellement utilisés par la cellule pour se protéger des dommages irréversibles infligés aux protéines. Notamment engendrée en situation de stress oxydant, la carbonylation figure au nombre des atteintes oxydatives majeures portées aux protéines (Tanase et al. 2016). Nous avons observé précédemment (cf publication 2) que les protéines des cellules HeLa déficientes en Lon affichaient des niveaux de carbonylation supérieurs à ceux mesurés en présence de Lon. Un résultat cohérent avec les capacités de Lon à éliminer les protéines oxydées (Bayot et al. 2010). Il s'agissait là de cibler la carbonylation des protéines en général. En effet, la carbonylation peut aussi provenir d'une conjugaison avec des produits de peroxydation lipidique tels le 4-hydroxynonéal (HNE), ou d'une glycoxydation générant des AGE, deux processus également délétères (Hauck and Bernlohr 2016), (Vanhooren 2015) (cf Introduction, paragraphe "Les espèces réactives de l'oxygène dans les dommages aux biomolécules").



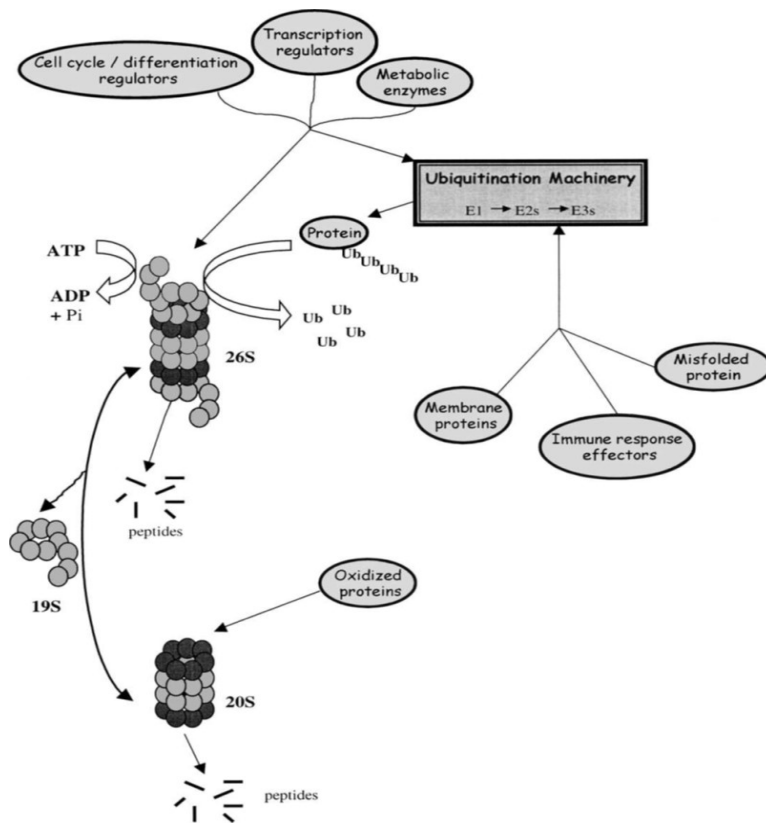
**Figure RS1 : niveaux de marqueurs de la peroxydation lipidique et de la glycoxydation dans des fractions enrichies en mitochondries de cellules déficientes ou non en Lon.** Les niveaux des adduits HNE, produit de la peroxydation lipidique (A) et d'AGE, produit de glycation avancée (B) ont été analysés par western blot après 10 jours d'induction (Dox+) ou non (Dox-) à la doxycycline dans des milieux supplémentés en glucose ou galactose. Les résultats concernant les HNE sont normalisés par rapport à la condition glucose Dox-. Les résultats correspondent aux moyennes de 3 à 5 expériences indépendantes. Statistiques : test de Student : \*\*p<0.01.

Nous nous sommes donc penchés sur les niveaux d'adduits HNE, quantitativement l'un des plus importants produits de la peroxydation lipidique (Castro et al. 2017), et d'AGE (Figure RS1 A et B) dans des fractions enrichies en mitochondries de cellules HeLa déficientes ou non

en Lon. La sous expression de Lon ne s'est pas traduite par une augmentation significative des protéines affectées par la glycoxydation. Quant au niveau des protéines modifiées par l'ajout de HNE, il s'élève sous l'effet d'une déplétion en Lon en condition glucose. Il apparaît donc que l'effet d'une sous expression de Lon se manifeste plus par une accumulation de protéines présentant une carbonylation issue d'une oxydation que par une élévation des contingents de protéines modifiées par des adduits de peroxydation lipidique ou par glycoxydation.

En revanche le recours à un milieu supplémenté en galactose se traduit par la hausse des niveaux de HNE et AGE préalablement décrite avec cette source de carbone (Pawar and Jadhav 2017), (Shwe et al. 2018).

## 2) Activité du protéasome dans les cellules HeLa déficientes en Lon

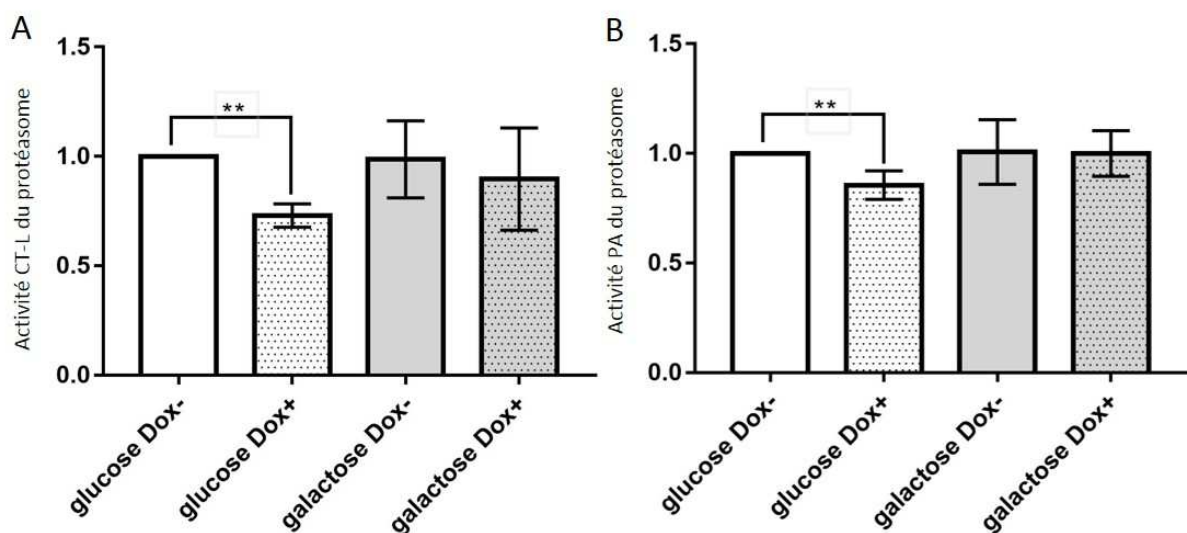


**Figure 21 : représentation schématique de la dégradation par le protéasome (d'après Carrard et al. 2002).** La majeure partie des substrats du protéasome sont ubiquitinylés préalablement à leur dégradation par le protéasome 26S quoique certains substrats de la machinerie 26S puissent être dégradés sans ubiquitinylation. Pour sa part, Le protéasome 20S dégrade les protéines oxydées de façon ATP et ubiquitine indépendante.

Système protéolytique majeur du cytosol et du noyau, le protéasome est un complexe multienzymatique jouant un rôle clé dans la dégradation des protéines endommagées (Friguet 2000). Il fonctionne sous deux formes : 26S et 20S. Le protéasome 20S porte la composante protéolytique. Le protéasome 26S est pour sa part constitué par l'ensemble comprenant une unité 20S prise en sandwich entre deux particules régulatrices 19S. Ces deux particules 19S sont composées d'un domaine ATPase et d'un domaine de reconnaissance de l'ubiquitine

(Figure 21). Le protéasome 20S déploie trois principales activités protéolytiques : l'activité trypsine-like qui catalyse l'hydrolyse de la liaison peptidique située après les résidus basiques comme l'arginine ou la lysine, l'activité chymotrypsine-like qui agit après les larges résidus hydrophobes comme la tyrosine ou la phénylalanine, l'activité peptidylglutamyl-peptide hydrolase qui agit après les résidus acides comme le glutamate.

Différentes études ont démontré une baisse des activités du protéasome au cours du vieillissement (Carrard 2002) ainsi que suite à un stress oxydant. En effet, les protéines les plus affectées par l'oxydation peuvent devenir résistantes à la dégradation par protéolyse et former ainsi des agrégats susceptibles d'inhiber l'activité du protéasome, vraisemblablement en empêchant les substrats d'accéder aux unités protéolytiques (Friguet 1994), (Bulteau et al. 2001). Des modifications oxydatives du protéasome lui-même peuvent également altérer son fonctionnement (Carrard et al. 2003), (Hohn and Grune 2014).



**Figure RS2 : activité chymotrypsine-like (CT-L) et peptidylglutamyl-peptide hydrolase (PA) du protéasome dans des cellules déficientes ou non en Lon.** Les activités CT-L (A) et PA (B) ont été mesurées après 10 jours d'induction (Dox+) ou non (Dox-) à la doxycycline dans des milieux supplémentés en glucose ou galactose. Les résultats sont normalisés par rapport à la condition glucose Dox-. Ils correspondent aux moyennes de 4 à 5 expériences indépendantes. Statistiques : test de Student : \*\*p<0.01.

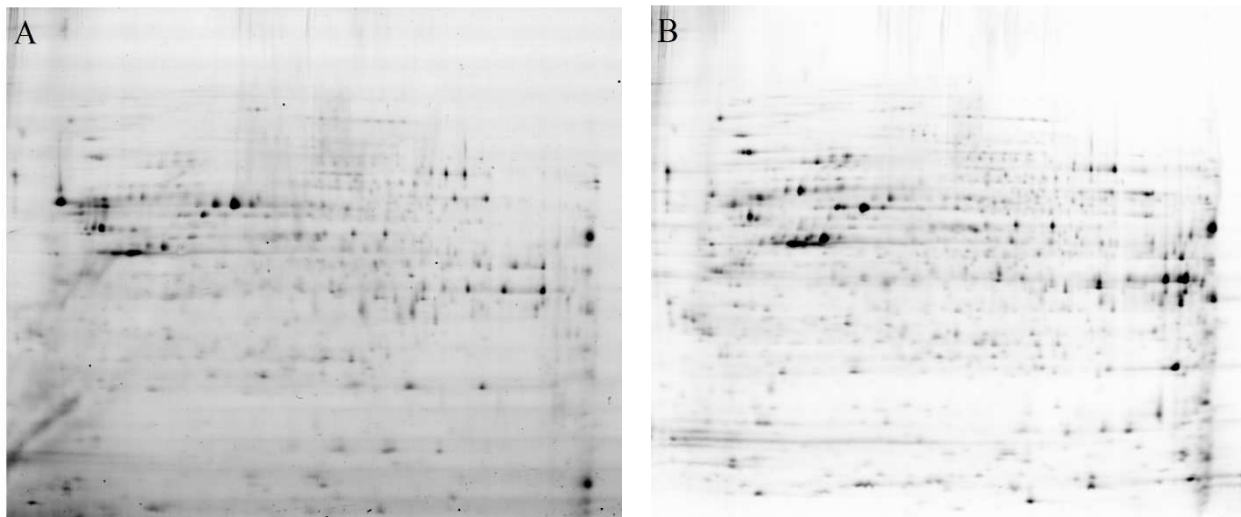
En vue d'approfondir nos premiers travaux consacrés à l'effet d'une déplétion en Lon sur l'activité du protéasome (cf publication 1), nous avons ici approfondi les effets d'une déplétion en Lon sur deux activités du protéasome, les activités chymotrypsine-like (CT-L) et peptidylglutamyl-peptide hydrolase (PA), et dans deux conditions. Cette étude a confirmé qu'une défaillance en Lon est associée à une moindre activité du protéasome, de façon significative seulement en condition glucose (Figure RS2 A et B). Il apparaît donc qu'une



défaillance de la protéase Lon dans la mitochondrie soit de nature à perturber la dégradation et le renouvellement des protéines dans d'autres compartiments cellulaires.

### 3) Identification de protéines présentant des niveaux d'oxydation modifiés par une déficience en Lon

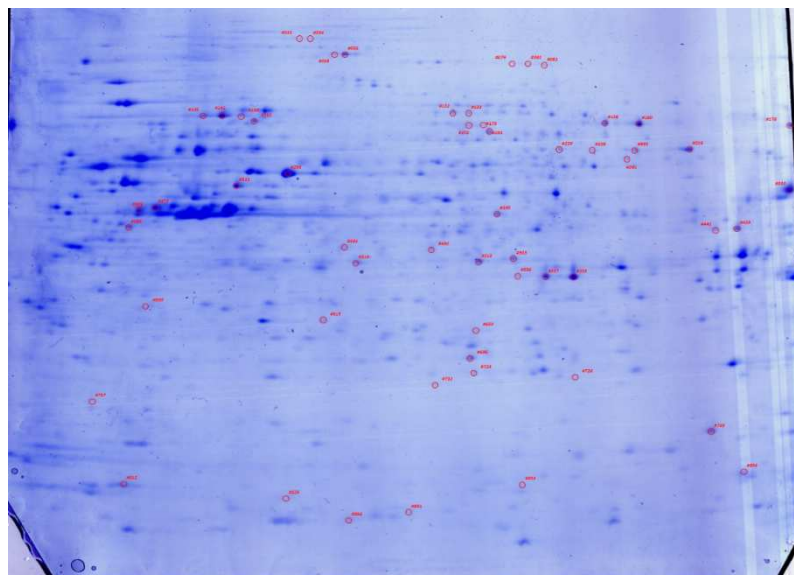
Après avoir identifié un certain nombre de protéines dont l'expression est modifiée en absence de Lon (cf publication 2), et compte tenu du contexte de stress oxydant associé à cette carence, nous avons souhaité ouvrir des perspectives en recherchant des protéines présentant des niveaux d'oxydation augmentés ou diminués dans le cadre d'une sous-expression de Lon dans un milieu supplémenté en glucose.



**Figure RS3 A et B : analyse par la technique de 2D DIGE des modifications d'oxydation des protéines entre fractions enrichies en mitochondries de cellules déficientes ou non en Lon.** Après focalisation isoélectrique et séparation des protéines sur gel SDS-PAGE, les gels ont été numérisés suivant les longueurs d'ondes des fluorophores utilisés : une cyanine 5 hydrazide marquant les groupes carbonyles des protéines pour évaluer les niveaux d'oxydation (A) ; une cyanine 3 NHS marquant les groupes amines des protéines pour évaluer les niveaux d'expression (B).

Dans ce but, nous avons adapté le protocole de 2D DIGE utilisé pour identifier des protéines affichant des variations de niveau d'expression (cf publication 2). Si le niveau d'expression des protéines a été mesuré au moyen de la fluorescence émise par une cyanine marquant les protéines (Figure RS3 B), le niveau d'oxydation des protéines a quant à lui été évalué en utilisant une autre cyanine porteuse d'une fonction hydrazide se fixant spécifiquement aux groupes carbonyles libres des protéines (Figure RS3 A). Ce double marquage permet de normaliser les niveaux d'oxydation par rapport aux niveaux d'expression des protéines. Après une séparation des protéines en deux dimensions (focalisation isoélectrique puis sur gel SDS

PAGE) et détermination des spots d'intérêt (Figure RS3 C), le recours à la spectrométrie de masse a permis d'identifier les protéines présentant une variation de niveau d'oxydation lorsque l'on compare les fractions enrichies en mitochondries de cellules HeLa exprimant Lon à celle qui sont privées de cette protéase (Figure RS3 D).



**Figure RS3 C : gel préparatif coloré au bleu de Coomassie.** Un gel préparatif a été réalisé avec 150 µg de protéines issues du standard interne (mélange équimolaire de tous les échantillons) puis coloré au bleu de Coomassie pour repérer les spots d'intérêt (numérotés en rouge ; Anova  $\leq 0,05$ , fold change  $\geq 1,5$ ) qui seront ensuite identifiés par spectrométrie de masse.

Protéines plus oxydées en condition Dox+ :		
métabolisme	Carbamoyl-phosphate synthase [ammonia]	CPSM_HUMAN *
	Pyruvate kinase PKM	KPYM_HUMAN
contrôle qualité	Heat shock protein HSP 90-beta	HS90B_HUMAN
cytosquelette	Actin, cytoplasmic	ACTB_HUMAN
	Vimentin	VIME_HUMAN
expression des gènes	Keratin, type II cytoskeletal 1	K2C1_HUMAN
Protéines moins oxydées en condition Dox+ :		
métabolisme	Fructose-bisphosphate aldolase A	ALDOA_HUMAN
	Isocitrate dehydrogenase	IDH3A_HUMAN *
contrôle qualité	Stress-induced-phosphoprotein 1	STIP1_HUMAN
cytosquelette	Keratin, type II cytoskeletal 8	K2C8_HUMAN
expression des gènes	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein H3	HNRH3_HUMAN
	Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like	HNRDL_HUMAN
	Elongation factor 2	EF2_HUMAN

\* : protéines mitochondriales

**Figure RS3 D : protéines identifiées avec des niveaux de carbonylation plus ou moins élevés dans des fractions enrichies en mitochondries de cellules déficientes en Lon.** Les spots d'intérêt ont été identifiés par MS/MS Orbitrap à partir de fractions enrichies en mitochondries de cellules collectées après 10 jours d'induction (Dox+) ou non (Dox-) à la doxycycline dans un milieu supplémenté en glucose ; Anova  $\leq 0,05$ , fold change  $\geq 1,5$  ; n = 4.

De façon intéressante, on remarque que les résultats de cette 2D oxiDIGE recourent ceux de la 2D DIGE effectuée précédemment (cf publication 2). Là aussi, le métabolisme énergétique et le contrôle qualité des protéines font partie des domaines les plus concernés par les variations de modifications oxydatives des protéines associées à une déplétion en Lon. Deux autres secteurs sont également affectés, le cytosquelette et l'expression des gènes. Là aussi, la glycolyse est particulièrement touchée par une sous expression de Lon puisque deux enzymes intervenant dans cette voie sont modifiées, la pyruvate kinase et la fructose bisphosphate aldolase A. Quant au contrôle qualité des protéines, sans Lon, la chaperone Hsp90 $\beta$ , qui s'est révélée sous exprimée, se retrouve ici plus oxydée. Pour sa part moins oxydée en absence de Lon, la cochaperone Stip1 intervient dans la régulation des chaperones Hsp90 et Hsp70 (Odunuga, Longshaw, and Blatch 2004). La régulation de l'activité de Hsp90 peut donc être influencée à deux niveaux par un knock down de Lon.

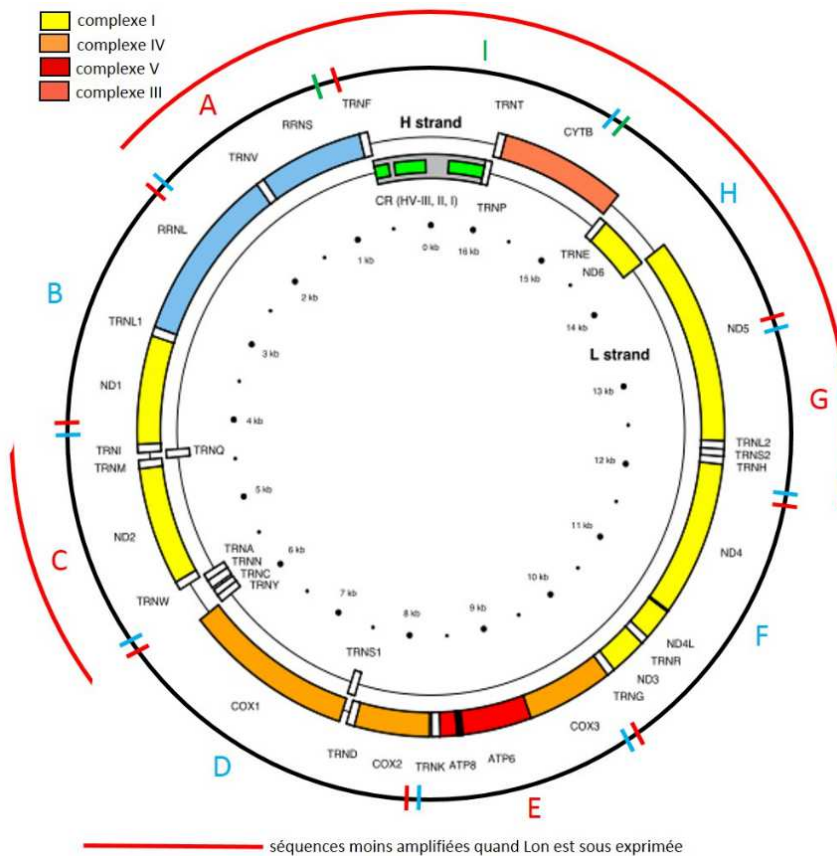
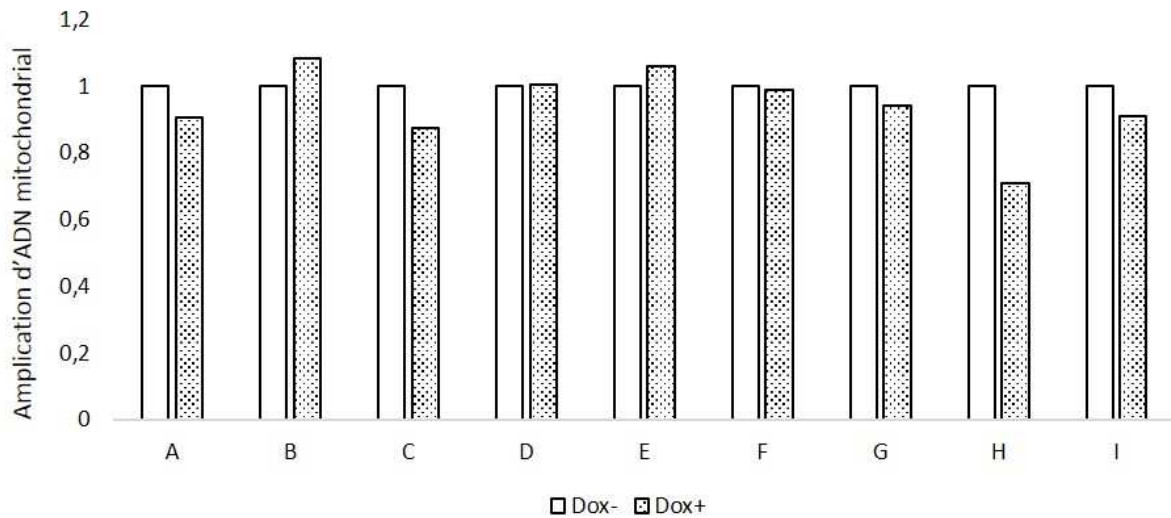
#### **4) Dommages à l'ADN mitochondrial dans les cellules HeLa déficientes en Lon**

Rechercher d'éventuels dommages à l'ADN mitochondrial associés à une sous expression de Lon nous a semblé une autre perspective intéressante pour approfondir les fonctions assurées par cette protéase. Lon est connue pour interagir directement avec l'ADN mitochondrial. Outre un rôle de maintenance de ce génome, elle concourt à la régulation de la réplication et de la transcription de l'ADN mitochondrial (Pomatto, Raynes, and Davies 2017) et des lésions de cet ADN ont été repérées chez la levure privée de la protéase PIM1/Lon (Van Dyck 1998)

Afin de vérifier si l'intégrité de l'ADN mitochondrial est ou non préservée dans nos cellules HeLa déficientes en Lon, nous avons procédé à des expériences de PCR longue extension (LX PCR). Cette technique se fonde sur le principe que des lésions de l'ADN (sites abasiques, ruptures de brin, dimères de thymine) peuvent ralentir, voire bloquer la progression de l'ADN polymérase. L'amplification d'une séquence endommagée donnera donc des résultats moins bons que celle d'une séquence indemne. Pour repérer de façon relativement précise les sites d'éventuelles lésions, l'ADN mitochondrial a été divisé en neuf séquences consécutives (Figure 22) et neuf paires de primers ont été utilisées pour amplifier ces séquences séparément.

Selon nos résultats, une déplétion en Lon se traduit par une amplification moindre de l'ADN mitochondrial dans deux secteurs, entre les nucléotides 4155 et 4175 et entre les

nucléotides 11614 et 520 (Figure RS 4). Ces résultats laissent donc augurer de dommages à l'ADN dans deux sites codant pour des sous-unités des complexes I et III de la chaîne respiratoire. Aucune des protéines codées par ces deux séquences ne figurent dans la liste des protéines modifiées identifiées à l'issue de nos expériences de 2D DIGE et 2D oxiDIGE. Toutefois, cette liste comprend des protéines en lien avec trois complexes de la chaîne respiratoire, parmi lesquels les complexes I et III (cf publication 2).



**Figure RS 4 : niveaux d'amplification de neuf séquences d'ADN mitochondrial de cellules déficientes ou non en Lon.** Neuf séquences d'ADN mitochondrial (A à I) ont été amplifiées après 10 jours d'induction (Dox+) ou non (Dox-) à la doxycycline dans un milieu supplémenté en glucose. Les résultats sont normalisés par rapport à la condition glucose Dox- et correspondent aux moyennes de 2 expériences indépendantes. Ci-contre, les séquences présentant un déficit d'amplification lorsque Lon est déficiente sont surlignées d'un demi-cercle rouge sur le schéma de l'ADN mitochondrial.

Par ailleurs, l'une de ces deux séquences susceptibles de dommages héberge un site sur lequel Lon put se lier, à savoir la région contrôle contenant les origines de réplication ainsi que les promoteurs des brins lourd et léger constituant l'ADN mitochondrial.

Les conséquences d'une déplétion en Lon sur l'apparition de dommages à l'ADN mitochondrial peuvent donc être de nature à perturber le métabolisme énergétique ainsi que la réplication et la transcription de ce génome comme cela a été observé dans des fibroblastes humains immortalisés (Zurita Rendon 2018). Autant de mécanismes pouvant contribuer aux anomalies de la fonction mitochondriale que nous avons relevées au fil de nos travaux.

## **Matériel et méthodes**

### **1) Mesure des niveaux de HNE et AGE**

Les niveaux de HNE et AGE ont été mesurés par western blot à partir de fractions enrichies en mitochondries. Après extraction et dosage des protéines, 30 µg de protéines par échantillons ont été séparés sur gel SDS-PAGE puis transférés sur membrane de nitrocellulose Hybond (Amersham Pharmacia Biotech, Piscataway, USA). HNE et AGE ont été détectés au moyen d'anticorps anti-4 Hydroxynonanal (abcam ab46545 ; dilution au 1/1000è) et anti-AGEs (TransGenic Inc. KH001 ; dilution au 1/1300è) détectés par des anticorps secondaires anti lapin ou anti souris, DyLight 800 ou 700 (Invitrogen™). La quantification des signaux fluorescents a été réalisée avec le logiciel ImageJ.

### **2) Mesure des activités chymotrypsine-like et peptidylglutamyl-peptide hydrolase du protéasome**

Les activités chymotrypsine-like (CT-L) et peptidylglutamyl-peptide hydrolase (PA) ont été déterminées en utilisant deux substrats peptidiques fluorogènes spécifiques de chacune des deux activités : le N-Succinyl-Leu-Leu-Val-Tyr-AMC (LLVY-AMC) pour l'activité CT-L et le N-Cbz-Leu-Leu-Glu-Na (LLE-N) pour l'activité PA. Ces deux activités ont été mesurées à partir de la fluorescence émise par la libération des fluorophores AMC (7-amino-4-méthylcoumarine) et NA (β-Naphthylamine).

Cette mesure a été effectuée en plaque 96 puits. Dans chaque puits ont été déposés 10 µg de protéines dans un volume total de 90 µl complété par un tampon Tris 20mM pH 7,5. 10 µl d'une solution contenant le peptide fluorogène (LLVY-AMC) ou (LLE-N) ont été ajoutés, soit une concentration finale du substrat de 20µM. Pour chaque catégorie d'échantillon, un puits supplémentaire a reçu en plus un inhibiteur du protéasome, du MG 132 à une concentration finale de 100µM. La fluorescence a été mesurée à l'aide d'un fluorimètre (FLUOstar Optima, BMG Labtech), λ excitation 355 ; λ émission 460.

### 3) Analyse protéomique

Les modifications oxydatives subies par les protéines ont été mises en évidence au moyen d'une variante de la 2D DIGE permettant de quantifier les modifications d'expression du protéome avec un marquage des groupes amines par une cyanine NHS ester (CyNHS) puis les modifications d'oxydation des protéines avec un marquage des groupes carbonyles par une cyanine hydrazide (CyHz).

Les protéines ont été extraites à partir de fractions enrichies en mitochondries dans un tampon urée 8M, thiourée 2M, CHAPS 4%, DTT 10mM. Un standard interne a été constitué par un mélange équimolaire de protéines provenant de chacun des échantillons. Après dosage, 150µg de protéines de chaque échantillon ont été incubés en présence de CyHz 5. Les protéines marquées ont ensuite été soumises à une précipitation, resolubilisées dans un tampon urée 8M, thiourée 2M, CHAPS 4% puis 50µg de protéines de chaque échantillon ont été incubés en présence de CyNHS 3. 400µg de protéines provenant du SI (jusqu'ici non marquées) ont été incubés en présence de CyNHS 2. On a alors procédé à un mélange des échantillons de telle sorte que chaque mélange comprenne un échantillon Dox-, un échantillon Dox+ et 50µg de protéines provenant du SI. Ces mélanges ont été soumis à une focalisation isoélectrique sur des strips IPG pH 3-11 NL. Les strips ont été équilibrés dans un tampon d'équilibration urée 6M, SDS 2%, glycérol 30%, Tris-HCl 50 mM pH 8,6 en deux étapes : une première étape avec du tampon d'équilibration complété avec du DTT 1%, une seconde étape avec du tampon d'équilibration complété avec de l'iodoacétamide 4,7%. Chaque strip a ensuite été placé sur un gel pour une étape de séparation des protéines par électrophorèse SDS PAGE.

L'acquisition des images et l'analyse des données ont été respectivement réalisées sur un Ettan DIGE Imager et au moyen du logiciel SameSpots. Les spots d'intérêt ont été retenus à partir des critères suivants : Anova  $\leq 0,05$ , fold change  $\geq 1,5$  et repérés sur un gel préparatif réalisé pendant l'expérience avec 150µg de protéines provenant du SI puis coloré au bleu de Coomassie. Prélevés manuellement ces spots ont servi à l'identification des protéines modifiées par spectrométrie de masse (MS/MS Orbitrap).

#### 4) Mesure des niveaux d'amplification de séquences de l'ADN mitochondrial

Les paires de primers utilisées pour amplifier les séquences d'ADN mitochondrial A à I ont été conçues selon le tableau suivant :

Forward primer	Nucleotide positions	Reverse primer	Nucleotide positions	Product size (bp)
SC-A-for	503–520	SC-A-rev	2484–2463	1982
SC-B-for	2364–2386	SC-B-rev	4249–4228	1886
SC-C-for	4155–4175	SC-C-rev	6220–6199	2066
SC-D-for	6113–6133	SC-D-rev	8017–7996	1905
SC-E-for	7925–7944	SC-E-rev	9884–9863	1960
SC-F-for	9767–9784	SC-F-rev	11748–11727	1982
SC-G-for	11614–11635	SC-G-rev	13638–13617	2025
SC-H-for	13539–13559	SC-H-rev	15431–15409	1893
SC-I-for	15331–15350	SC-I-rev	836–815	2075

L'amplification des séquences d'ADN mitochondrial a été effectuée puis évaluée à partir de 3ng d'ADN total extraits de chaque échantillon selon le protocole utilisé par Terluk et al. (Terluk et al. 2015).



**Conclusions générales**  
**et**  
**perspectives**

La protéase Lon constitue un point de convergence entre deux composantes majeures de la cellule eucaryote, la mitochondrie et la protéolyse. Indispensable à la vie de la cellule, la première ne peut fonctionner correctement sans la seconde. Sans Lon, la mitochondrie perd un de ses plus importants moyens de faire face au stress que représente l'accumulation de protéines endommagées retrouvées dans le vieillissement et dans certaines pathologies. Le lien entre cette accumulation et ces états morbides ? Une dysfonction mitochondriale préjudiciable à la vie de la cellule ! Préciser le rôle de Lon dans l'homéostasie protéique et la fonction mitochondriale permettrait donc de à mieux cerner les mécanismes en jeu dans un certain nombre de processus délétères.

En 1944, Evelyn Witkin découvre que la souche mutante B/r d'*Escherichia coli* résiste au rayonnement UV. Alors que les souches B irradiées cessent de se diviser, s'allongent et meurent, le mutant B/r soumis aux mêmes conditions reprend la division qu'il avait momentanément arrêtée. (Witkin 1947). Il s'avèrera ultérieurement que la souche B/r ne possède pas l'inhibiteur de la division cellulaire Sfi. En revanche, si Sfi est exprimée dans la souche B, c'est une autre protéine qui lui fait défaut, la protéase Lon qui normalement dégrade Sfi. Donc sans Lon plus de division et, comme il y a une limite à la vie d'*Escherichia coli* en absence de division, la souche B irradiée finit par mourir.

Les premières études sur des mutations de Lon ont été réalisées sur *Escherichia. Coli*, dans les années 1960 (Howard-Flanders 1964), et la plupart des connaissances acquises sur Lon proviennent de travaux sur cette bactérie. Une bonne partie des conclusions auxquelles ils ont abouti est applicable à la protéase mitochondriale Lon mais ces investigations ne peuvent toutefois pas dispenser de recherches menées directement sur la cellule eucaryote. A cette fin, les cellules HeLa représente un modèle intéressant. Tout d'abord il a été démontré que Lon est exprimée dans les cellules HeLa (Wang 1993) et que cette expression est accrue en conditions de stress (Hori et al. 2002). Un certain nombre d'études sur Lon ont d'ailleurs été réalisées en utilisant cette lignée cellulaire (König 2017), (Bezawork-Geleta et al. 2015), (Kil et al. 2015), (Fukuda et al. 2007),...

Ensuite, les cellules HeLa constituent des modèles cellulaires appropriés pour étudier l'effet de modulations de l'expression de Lon. En effet, les transfections opérées dans ces cellules se soldent par des résultats très satisfaisants (Del Carpio 2014). C'est ainsi que grâce

au shRNA anti-Lon introduit dans nos cellules HeLa, nous avons obtenu une baisse d'environ 80% de l'expression de Lon. De plus, l'intégration d'un shRNA est stable, ce qui procure une extinction durable de l'expression de la protéine cible, ce qui n'est pas le cas avec un siRNA. Il apparaît également que le silencing imposé par un shRNA est plus efficace que lorsqu'il provient d'un siRNA (McAnuff, Rettig, and Rice 2007). Un constat entre autres établi dans des cellules HeLa (Siolas et al. 2005).

Par ailleurs, une partie des expérimentations menées dans le cadre de ce doctorat a été effectuée sur des fractions de cellules HeLa enrichies en mitochondries. Compte tenu de la faible représentation du protéome mitochondrial dans le protéome total, ce choix nous a notamment permis de mettre en évidence des variations d'expression ou de modifications de protéines mitochondriales qui auraient été trop peu abondantes dans des extraits protéiques totaux pour être décelées. Par rapport à des mitochondries purifiées, ces fractions enrichies en mitochondries présentent aussi l'avantage de ne pas exclure de l'analyse un certain nombre de protéines cytosoliques en lien avec le fonctionnement de la mitochondrie.

En sous exprimant Lon de façon significative et durable dans notre modèle de cellules HeLa, nous avons ainsi obtenu des résultats précisant le rôle de cette protéase dans la réponse au stress et le contrôle qualité des protéines et mettant en évidence l'importance de Lon dans une fonction majeure de la mitochondrie, le métabolisme énergétique. Nous avons également observé que les conséquences d'une déficience en Lon étaient modulées par la source de carbone à la disposition des cellules puisque ces effets peuvent varier selon que le milieu de culture est supplémenté en glucose ou en galactose.

## **La protéase Lon dans l'homéostasie protéique et la réponse au stress**

Pour conserver un protéome en état de fonctionnement, la mitochondrie doit faire face à plusieurs défis. Tout d'abord, elle doit importer la majeure partie de son protéome et assurer à ce protéome une conformation adéquate. Ensuite, les diverses composantes de la chaîne respiratoire étant codées par le génome nucléaire ou par le génome mitochondrial, il lui faut assurer un équilibre entre les expressions de ces deux génomes. Enfin la production d'ATP par la phosphorylation oxydative s'accompagnant d'une formation d'ERO, la chaîne respiratoire

doit affronter les dommages que ces dernières infligent aux protéines, à l'ADN mitochondrial et aux lipides.

C'est vraisemblablement face à ce dernier défi que le concours de Lon est le plus important. Particulièrement impliquée dans la dégradation des protéines oxydées, Lon constitue la première ligne de défense de la matrice mitochondriale contre les dommages oxydatifs. Une aptitude que nos résultats confirment puisque c'est avec un agent oxydant, le tert-Butyl Hydroperoxyde (Carletti et al. 2018), que nous avons obtenu la plus forte augmentation de niveaux de protéines carbonylées en absence de Lon. Une défaillance de Lon a néanmoins suffi à engendrer un stress oxydant dont l'amplitude et les conséquences ont varié en fonction des sources de carbone. Deux marqueurs caractéristiques du stress oxydant, la carbonylation des protéines et la production d'ERO, ont témoigné dans notre étude de l'implication de Lon dans la lutte contre les dommages oxydatifs. Si l'accumulation de protéines oxydées peut se concevoir comme une conséquence directe de la sous expression de Lon, l'augmentation des niveaux d'ERO s'interprète plutôt comme un effet secondaire de cette accumulation de protéines modifiées. En altérant la fonction des protéines, ces modifications ont vraisemblablement provoqué un dysfonctionnement des systèmes de contrôle qualité et de la phosphorylation oxydative aboutissant à une stimulation de la production d'ERO.

Un tel effet a déjà été observé au niveau du complexe I de la chaîne respiratoire (Sharma 2009) et les moindres performances de la phosphorylation oxydative que nous avons observées dans les cellules déplétées en Lon vont dans ce sens. Quant aux systèmes de contrôle qualité, eux aussi ont montré des modifications susceptibles d'amoindrir les défenses des cellules déficientes en Lon. Celles-ci ont notamment présenté une baisse d'expression de la chaperone Hsp90 qui peut s'expliquer là par le clivage que le stress oxydant opère sur cette protéine (Haase and Fitze 2016). D'autant que nos résultats montrent une augmentation des niveaux de Hsp90 oxydées en absence de Lon. De plus, Hsp70, connue pour former de concert avec Hsp90 une machinerie assurant le repliement des protéines (Lackie et al. 2017), est également sous exprimée dans les cellules déplétées en Lon en condition glucose. Un résultat cohérent avec une défaillance en Hsp90 puisque, sans Hsp90, les protéines travaillant en association avec cette chaperone sont dégradées par la protéasome (Beck 2001).

Intervenant majeur dans la maintenance de l'homéostasie protéique, le protéasome semble lui aussi souffrir de l'absence de Lon puisque nous avons observé une baisse de son activité dans les cellules déplétées en Lon en condition glucose. Un résultat qui témoigne

également en faveur d'un stress oxydant puisque plusieurs études suggèrent une inhibition du protéasome par les produits d'oxydation, apparemment par un mécanisme de blocage de l'accessibilité des substrats (Friguet and Szweda 1997), (Bulteau et al. 2001). Comment le protéasome, qui opère dans le cytosol, peut-il être affecté par une augmentation des contingents de protéines oxydées dans la matrice mitochondriale ? Via le système OMMAD (Outer Mitochondrial Membrane Associated Dégradation). Ancré sur la face cytosolique de la membrane mitochondriale externe, ce complexe est composé d'ubiquitines ligases E3 et d'ATPase Cdc48/p97 qui lie les protéines ubiquitinylées pour les transférer au protéasome (Benischke et al. 2014). Bien que OMMAD soit situé sur la membrane externe, diverses observations accréditent la thèse d'une translocation de protéines de la matrice ou de la membrane interne vers la membrane externe à des fins d'ubiquitylation et de dégradation par le protéasome (Taylor and Rutter 2011).

Le stress engendré par une perte de Lon ne s'est toutefois pas seulement traduit par un amoindrissement des capacités des systèmes de maintenance de l'homéostasie protéique. Nous avons également noté des réactions de réponse au stress de la part de certains acteurs du contrôle qualité. A commencer par HtrA2, une autre sérine protéase mitochondriale surexprimée quand Lon fait défaut. A l'égal de Lon, HtrA2 est une protéine de réponse au stress et elle est impliquée dans le stress oxydant. Bien que cette protéase soit située dans un autre compartiment mitochondrial, l'espace intermembranaire, un renfort de sa part est d'autant plus envisageable qu'une surexpression de Lon a été observée dans des souris n'exprimant pas HtrA2 (Goo, Rhim, and Kang 2014). De plus ces souris présentent également une surexpression des prohibitines, un phénomène que nous avons également observé sans Lon. Impliquées dans la maintenance de l'homéostasie mitochondriale, les prohibitines ont déjà prouvé un rôle protecteur contre le stress oxydant (Zhou et al. 2013).

Nos travaux peuvent ainsi conclure à un rôle significatif de Lon dans la maintenance de l'homéostasie protéique mitochondriale et la réponse au stress, rôle se manifestant de diverses manières. Lon agit donc en utilisant différents réseaux qu'elle est en mesure d'influencer directement ou non. C'est ainsi que nous avons noté des répercussions d'une sous expression de Lon jusque dans la dynamique du réseau mitochondrial, une activité essentielle de la mitochondrie et qu'elle utilise entre autres comme outil de contrôle qualité (Ni, Williams, and Ding 2015).

## **La protéase Lon dans la fonction mitochondriale**

Compte tenu des fonctions capitales assurées par la mitochondrie, il n'est pas étonnant de retrouver une dysfonction mitochondriale dans un certain nombre de maladies comme c'est aussi le cas dans le vieillissement (Moehle, Shen, and Dillin 2018). Maintenir l'homéostasie protéique dans la mitochondrie étant un prérequis indispensable à un fonctionnement mitochondrial opérant, l'on pouvait s'attendre à une incidence d'une sous expression de Lon sur la fonction mitochondriale.

Activité mitochondriale majeure, le métabolisme énergétique constitue un témoin de choix de l'état de la fonction mitochondriale. Or nous avons constaté que, sans Lon, ce métabolisme énergétique affiche une baisse d'activité, que ce soit dans la mitochondrie, au niveau de la phosphorylation oxydative, ou en dehors, au niveau de la glycolyse. Cette réduction de l'activité métabolique se traduit vraisemblablement par une diminution des rendements en ATP puisque nous avons constaté une baisse des niveaux d'ATP dans les cellules déficientes en Lon. Plusieurs des indicateurs du métabolisme énergétique que nous avons mesurés confirment une altération du fonctionnement de la phosphorylation oxydative. C'est ainsi que nous avons remarqué que l'absence de Lon s'accompagne d'une baisse importante de la réserve respiratoire, un paramètre qui représente les quantités d'ATP que la chaîne respiratoire peut fournir en supplément dans le cas d'une augmentation soudaine de la demande en énergie. Même constat concernant la capacité respiratoire maximale qui témoigne de plus d'une dysfonction mitochondriale durable puisque ce paramètre dépend notamment d'une régulation sur le long terme de la phosphorylation oxydative (Desler et al. 2012). Sans Lon, nos cellules disposent donc d'une moindre capacité à faire face à des événements nécessitant une dépense accrue d'énergie et cette vulnérabilité n'est pas seulement transitoire.

Conclure à une dysfonction mitochondriale peut sembler contradictoire avec la surexpression de certaines sous unités de la chaîne respiratoire que nous avons remarquée en absence de Lon. On sait maintenant que les différents complexes de la chaîne respiratoire sont organisés en supercomplexes dont la composition est variable. La stœchiométrie de ces complexes est donc elle aussi variable et une modulation de cette dernière a déjà été observée dans certaines conditions (Greggio et al. 2017). Une réorganisation des supercomplexes a également été relevée dans un contexte de stress oxydant avec, par exemple une augmentation des complexes I isolés (Anwar et al. 2018). La surexpression de sous unités de complexes I, III et IV que nous avons notée en absence de Lon est donc compatible avec une dysfonction

mitochondriale. De plus, surexprimer les complexes I et III peut contribuer à expliquer l'augmentation des niveaux d'ERO que nous avons relevée dans les cellules déplétées en Lon puisque ces deux complexes sont les principaux producteurs d'ERO.

Conjointement aux anomalies du métabolisme que nous avons repérées en absence de Lon nous avons noté une surexpression de protéines susceptibles de venir à la rescousse. C'est le cas de 14-3-3 epsilon. Il a été démontré que cette protéine de réponse au stress (Xu et al. 2013) intervenant dans la régulation du métabolisme interagit entre autres avec la GAPDH (glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase) (Liang et al. 2009). Or, de façon intéressante, cette enzyme de la glycolyse est sous exprimée dans nos cellules déplétées en Lon. Quant à la stimulation de l'expression des prohibitines évoquée plus haut, elle peut aussi contribuer à cette stratégie de défense puisque les prohibitines sont impliquées dans la régulation de l'activité de la chaîne respiratoire et qu'un stress mitochondrial peut accroître leur expression (Artal-Sanz and Tavernarakis 2009).

Les altérations du génome mitochondrial constituent une autre source importante de dysfonction mitochondriale. Les premiers résultats que nous avons obtenus en amplifiant des séquences d'ADN mitochondrial laissent à penser qu'une sous expression de Lon est associée à des dommages sur certaines séquences de cet ADN. Un constat qui n'est pas surprenant puisque Lon entretient des liens étroits avec le génome mitochondrial. N'intervient-elle pas dans sa maintenance, sa réplication et sa transcription (Matsushima, Goto, and Kaguni 2010). Lon est par ailleurs l'un des constituants du nucléoïde, un complexe protéique impliqué dans la maintenance et la transcription du génome mitochondrial. L'absence de Lon et le stress oxydant qui en résulte sont donc autant de facteurs qui ont pu affecter l'ADN mitochondrial ainsi que sa réplication et sa transcription. De plus, les séquences d'ADN susceptibles d'être endommagées ici abritent notamment la région qui contrôle la réplication et la transcription, région constituant par ailleurs un site de fixation de Lon. Nos investigations préliminaires permettent ainsi de penser qu'une défaillance en Lon inflige à l'ADN mitochondrial des effets délétères constituant un facteur supplémentaire de dysfonction mitochondriale. Un lien entre des dommages à l'ADN mitochondrial et une altération du fonctionnement de la chaîne respiratoire a effectivement déjà été mis en évidence (Ide 2001), (Yakes 1997).

## Perspectives

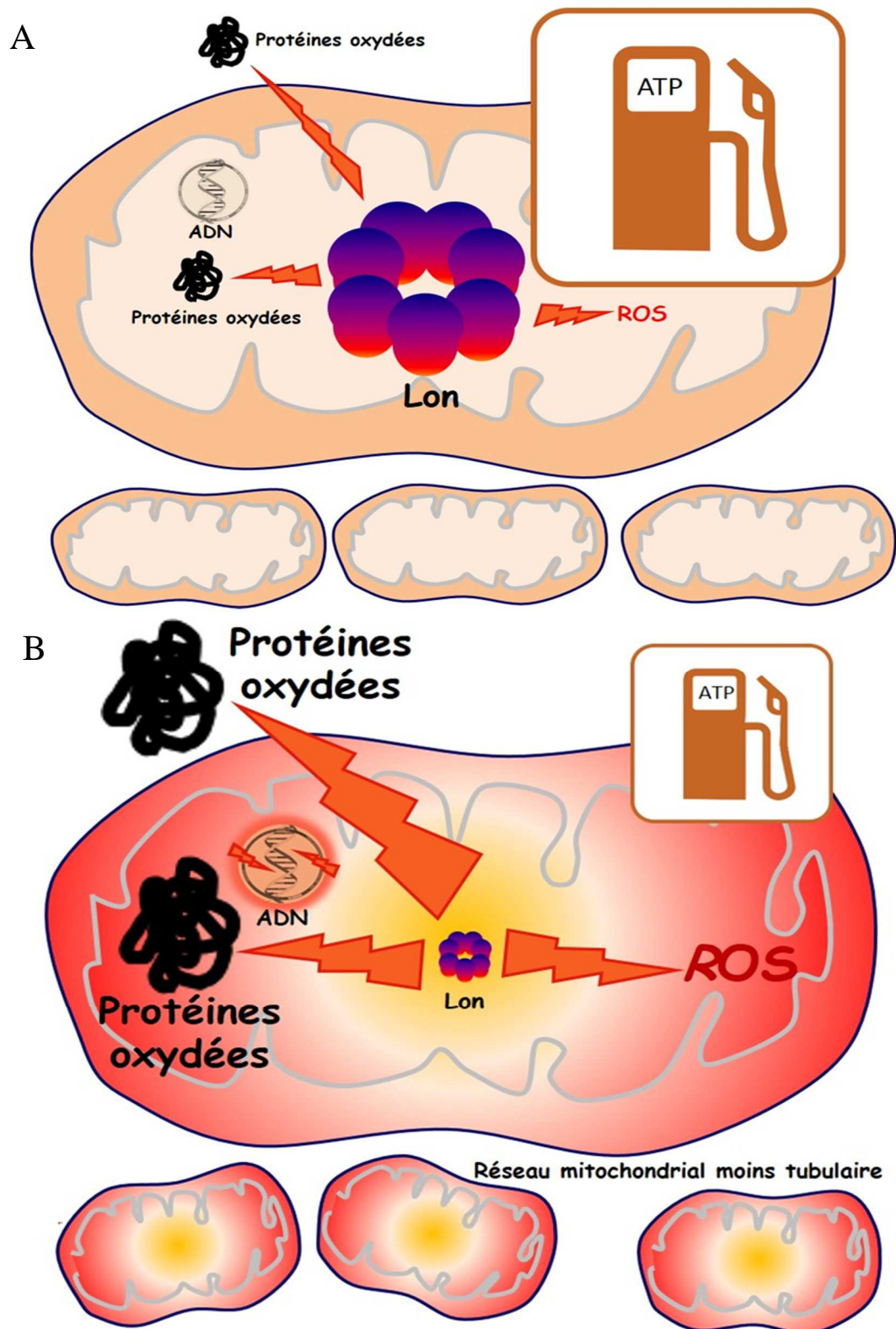
Il est difficile d'évaluer l'intensité de la dysfonction mitochondriale que nous avons observée dans nos cellules HeLa sous exprimant Lon. Elle est néanmoins suffisante pour diminuer les niveaux d'ATP intracellulaires et entraver en condition galactose la prolifération de cellules connues pour leurs remarquables capacités à se multiplier. Il a été prouvé qu'un stress oxydant modéré provenant de la mitochondrie pouvait stimuler l'activité du protéasome et améliorer la longévité de *C. elegans* (Bragoszewski, Turek, and Chacinska 2017). La dysfonction mitochondriale mise en évidence par nos résultats n'est pas de cette nature. Elle n'est effectivement pas associée à un mécanisme de compensation entre ces deux systèmes protéolytiques que sont Lon et le protéasome puisque nous avons noté une baisse de l'activité du second en absence de la première.

En condition galactose, les cellules bénéficiant de la présence de Lon ont démontré une dysfonction mitochondriale plus prononcée que les cellules privées de Lon en condition glucose. Et c'est sans Lon en condition galactose que nous avons constaté la fonction mitochondriale la plus perturbée. Par ailleurs, bien qu'appartenant le plus souvent aux mêmes domaines d'activité, les protéines modifiées par une sous expression de Lon sont pour la majeure partie différentes selon que le milieu de culture est supplémenté en glucose ou en galactose. Changer de source de carbone a donc une influence sur les anomalies de la fonction mitochondriale engendrées par une sous expression de Lon. La propension du galactose à favoriser le vieillissement, notamment par le canal d'un stress oxydant (Delwing-de Lima et al. 2017), a peut être infligé aux cellules déplétées en Lon un niveau de stress plus élevé. Il serait donc intéressant d'explorer plus avant les modifications du métabolisme liées à une extinction d'expression de Lon. Nos résultats laissent entrevoir que le métabolisme des lipides n'est pas affecté de la même façon par une défaillance de Lon dans les cellules en condition glucose et dans celles en condition galactose. Approfondir cette voie ainsi que d'autres axes du métabolisme énergétique, telles que la glutaminolyse ou la voie des pentoses phosphates, pourrait permettre de préciser le rôle de Lon. Analyser les variations de la composition de la chaîne respiratoire lorsque Lon fait défaut permettrait en outre de mieux comprendre ce qui se produit au niveau de la phosphorylation oxydative.

L'étude d'autres fonctions mitochondriales peut également être riche en enseignements sur l'action de la protéase Lon. L'on pourrait ainsi examiner les effets d'une déplétion en Lon



sur l'apoptose, l'homéostasie du calcium, les systèmes redox (glutathion, thioredoxine), la localisation des mitochondries dans la cellule, la signalisation rétrograde et les voies de signalisation impliquées dans la réponse au stress. Nos résultats laissent déjà entrevoir une mobilisation de la voie Nrf2. L'extinction d'autres systèmes protéolytiques conjointement à celle de Lon constituent aussi des voies d'investigation possibles. Il serait notamment opportun de se pencher sur les répercussions d'une sous expression de ClpP, l'autre protéase de la matrice mitochondriale, lorsque Lon est elle aussi défaillante. Une modification des niveaux d'expression de Lon et ClpP a ainsi été trouvée chez un patient atteint d'une forme de paraplégie spastique héréditaire (Hansen et al. 2008) ainsi que chez des souris modèles de l'ataxie de Friedreich (Guillon et al. 2009). Dans le second cas, il s'agissait d'une surexpression de ces deux protéases suggérant là qu'il serait également intéressant d'analyser les conséquences d'une stimulation de l'expression de Lon. Maîtriser la modulation des niveaux d'expression de Lon peut contribuer à mieux cerner et mieux traiter les mécanismes de certaines maladies. Une étude a déjà démontré qu'une surexpression de Lon est favorable au développement des tumeurs cancéreuses (Cheng et al. 2013).

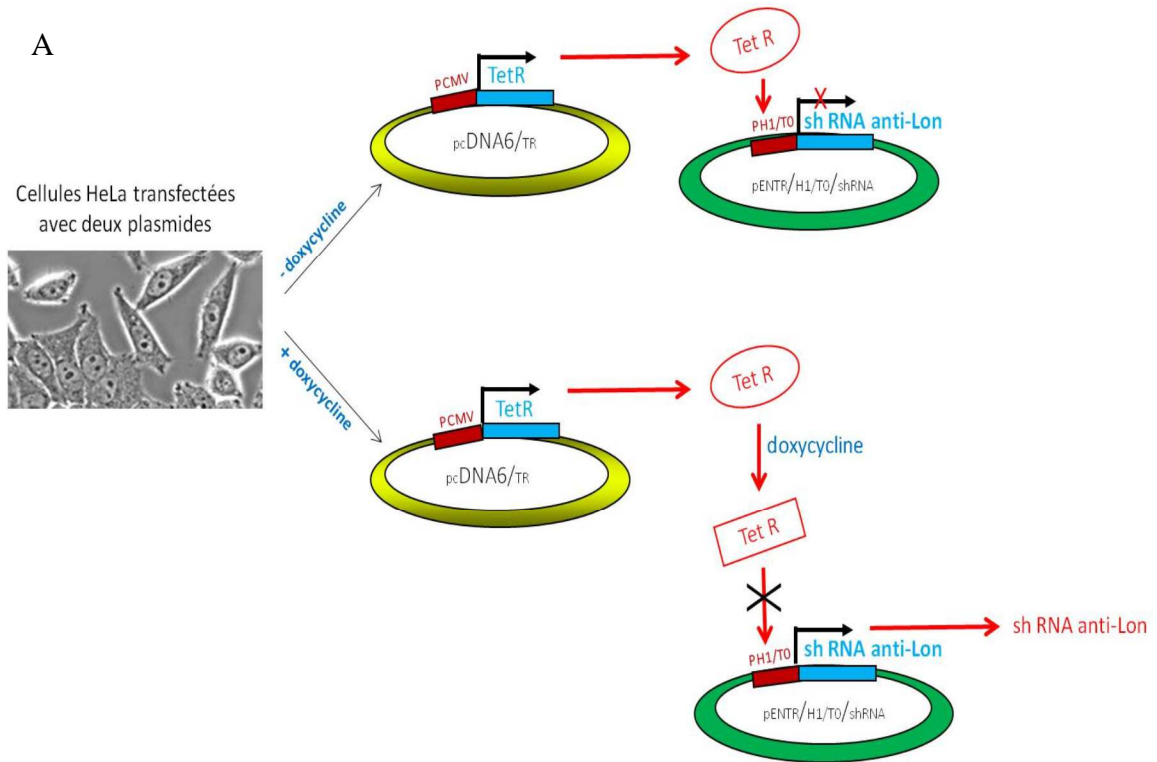


**Figure 22 : effet d'une déplétion en Lon sur l'homéostasie protéique et la fonction mitochondriale.** Après 10 jours d'induction (Dox+) (B) ou non (Dox-) (A) à la doxycycline les cellules déplétées en Lon ont montré une hausse des niveaux d'ERO mitochondriaux et de protéines oxydées, des dommages à l'ADN mitochondrial, un réseau mitochondrial moins tubulaire et une baisse des niveaux d'ATP.

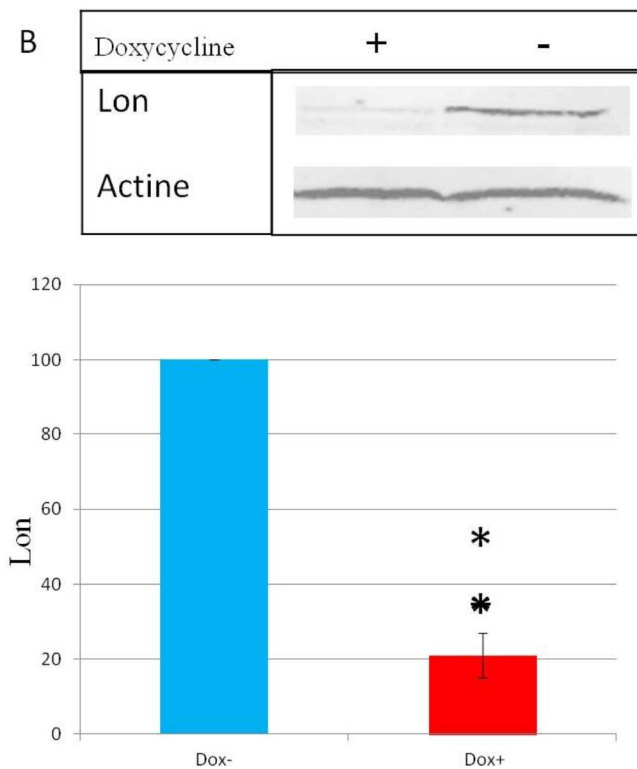
# **Annexes**

# Annexe 1

## Une approche shRNA inducible pour moduler l'expression de Lon

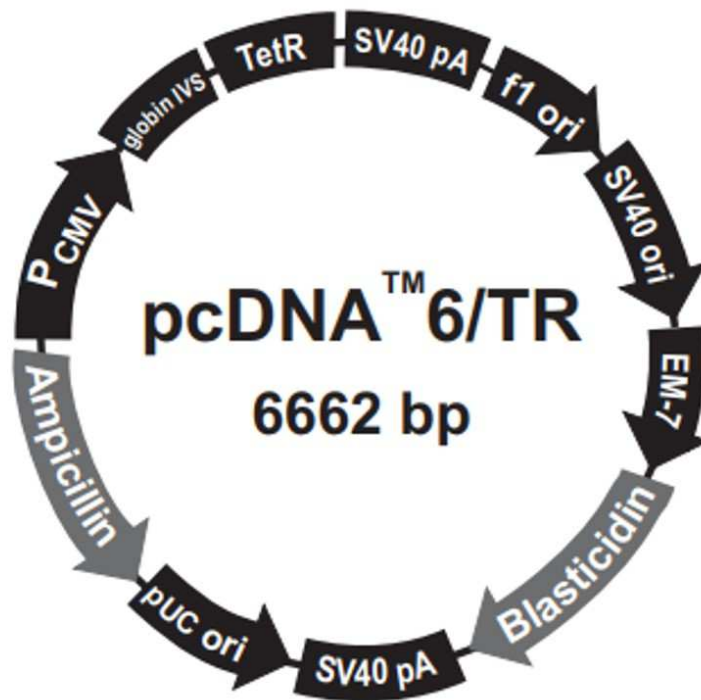


### Régulation de l'expression génique par la tétracycline



**Figure 23 : système Tet-on de contrôle de l'expression génique.** **A)** Un premier plasmide permet l'expression du répresseur de la tétracycline, Tet R. En se fixant sur la séquence contrôlant le promoteur du plasmide codant le shRNA anti-Lon, Tet R inhibe l'expression de ce shRNA. En présence de doxycycline, le répresseur Tet R perd son affinité pour son récepteur et le shRNA est exprimé. **B)** L'expression du sh RNA anti-Lon permet de réduire d'environ 80% l'expression de la protéase Lon.

Le plasmide permettant l'expression du répresseur de la tétracycline TetR est un vecteur pcDNA6/TR (Invitrogen) (Figure 24)



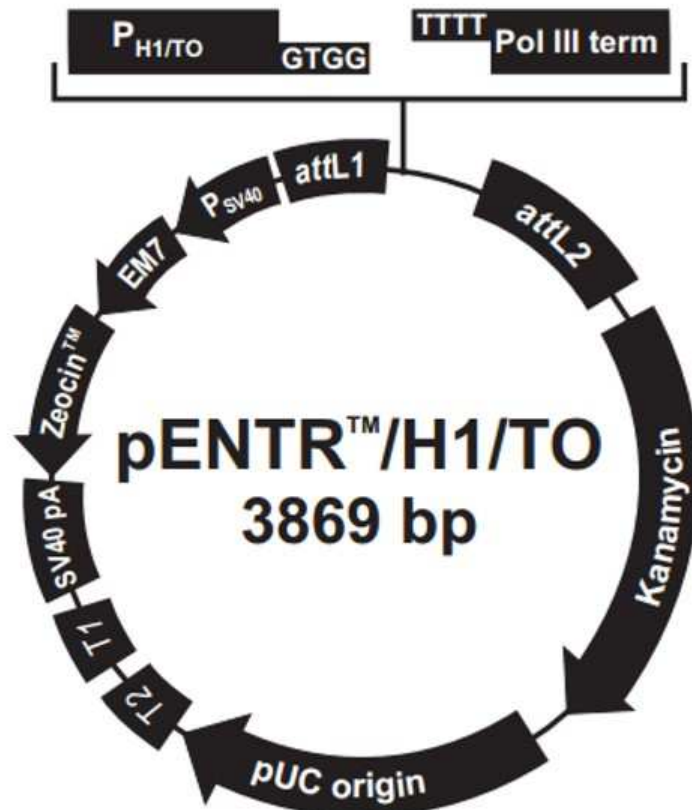
**Figure 24 : caractéristiques du vecteur pcDNA6/TR.** Le vecteur pcDNA6/TR permet d'exprimer le répresseur de la tétracycline (TetR) sous le contrôle du promoteur P<sub>CMV</sub>. Il contient également le gène de résistance à la blastidicine rendant possible la sélection des lignées cellulaires exprimant TetR.

La séquence d'ADN double brin codant pour le shRNA d'intérêt, ici un sh RNA anti Lon, est quant à elle clonée dans un vecteur d'expression pENTR/H1/TO (Invitrogen) (Figure 25). Transfecté de façon transitoire ou stable – lorsqu'il est inséré dans le génome – ce vecteur permet l'expression d'une séquence shRNA sous le contrôle du promoteur P<sub>H1/TO</sub> inductible à la tétracycline ou à l'un de ses dérivés, telle la doxycycline.

Cette régulation de l'expression génique par la tétracycline est rendue possible par l'insertion dans le promoteur du vecteur pENTR/H1/TO de deux séquences opératrices tetO procurant deux sites de fixation pour deux molécules de répresseur TetR. En absence de tétracycline (ou doxycycline), les molécules de TetR exprimée par le vecteur pcDNA6/TR se présentent sous la forme d'homodimères dotés d'une forte affinité pour les séquences TetO du vecteur pENTR/H1/TO. La fixation des homodimères de TetR sur les séquences TetO empêche la transcription du shRNA anti-Lon. Lorsque le milieu de culture cellulaire est supplémenté en doxycycline, cette dernière se lie avec une forte affinité aux homodimères TetR, induisant alors

un changement de leur conformation les rendant inaptes à se fixer sur les séquences TetO. Rien n'empêche alors la transcription du shRNA anti-Lon qui va ensuite cibler une région de la séquence codante du gène Lon (Figure 26).

**Figure 25 : caractéristiques du vecteur pENTR/H1/TO.** Le vecteur pENTR/H1/TO permet



le clonage orienté d'une séquence shRNA double brin sous le contrôle du promoteur P<sub>CMV</sub>. Il contient le gène de résistance à la zéocine rendant possible la sélection et le maintien de transfectants stables.

La séquence shRNA utilisée dans notre étude pour éteindre l'expression de la protéase Lon s'est inspirée des travaux réalisés par l'équipe de Carolyn K. Suzuki aux Etats-Unis (Lu et al. 2007). Cette séquence correspond à une région de 19 nucléotides sur l'ADNc (Figure 26).

```

ATGGCGGCGAGCACTGGCTACGTGCGACTGTGGGGAGCGGCGGGTGCTGGGTG
CTGCGGCGGCCGATGCTGGCCGCCGGGGGGCGGGTTCCCACTGCAGCAGGA
GCGTGGTTGCTCCGAGGCCAGCGGACCTGCGACGCCTCTCCTCCTTGGGCACTGT
GGGGCCGAGGCCCGCAATTGGGGGCCAATGGCGGGGGTTTTGGGAAGCGAGCA
GCCGCGGCGGAGGCGCATTCTCGGGGGCGAGGACGCCTCCGAGGGCGGCGCGG
AGGAAGGAGCCGGCGGCGCGGGGGGCGAGCGGGGCGCCGGGGAAGGCCCGGTC
ATAACGGCGCTCACGCCCATGACGATCCCCGATGTGTTTCCGCACCTGCCGCTCA
TCGCCATCACCCGCAACCCGGTGTTCGCGCTTTATCAAGATTATCGAGGTAA
AAATAAGAAGTTGGTTGAGCTGCTGAGAAGGAAAGTTTCGTCTCGCCCAGCCTTAT
GTCGGCGTCTTTCTAAAGAGAGATGACAGCAATGAGTCGGATGTGGTTCGAGAGC
CTGGATGAAATCTACCACACGGGGACGTTTGCCAGATCCATGAGATGCAGGACC

```

TTGGGGACAAGCTGCGCATGATCGTCATGGGACACAGAAGAGTCCATATCAGCA  
GACAGCTGGAGGTGGAGCCCAGGAGCCGGAGGCGGAGGACGAGCTGAGCGCCAG  
CGCAGGAAGTCAAAGCGGGGCAAGAAGGAGGCGGAGGACGAGCTGAGCGCCAG  
GCACCCGGCGGAGCTGGCGATGGAGCCCACCCCTGAGCTCCCGGCTGAGGTGCTC  
ATGGTGGAGGTAGAGAACGTTGTCCACGAGGACTTCCAGGTCACGGAGGAGGTG  
AAAGCCCTGACTGCAGAGATCGTGAAGACCATCCGGGACATCATTGCCTTGAACC  
CTCTCTACAGGGAGTCAGTGCTGCAGATGATGCAGGCTGGCCAGCGGGTGGTGG  
ACAACCCCATCTACCTGAGCGACATGGGCGCCGCGCTCACCGGGGCCGAGTCCCA  
TGAGCTGCAGGACGTCCTGGAAGAGACCAATATTCCTAAGCGGCTGTACAAGGC  
CCTCTCCCTGCTGAAGAAGGAATTTGAACTGAGCAAGCTGCAGCAGCGCCTGGGG  
CGGGAGGTGGAGGAGAAGATCAAGCAGACCCACCGTAAGTACCTGCTGCAGGAG  
CAGCTAAAGATCATCAAGAAGGAGCTGGGCCTGGAGAAGGACGACAAGGATGCC  
ATCGAGGAGAAGTTCGGGAGCGCCTGAAGGAGCTCGTGGTCCCAAGCACGTC  
ATGGATGTTGTGGACGAGGAGCTGAGCAAGCTGGGCCTGCTGGACAACCACTCCT  
CGGAGTTCAATGTCACCCGCAACTACCTAGACTGGCTCACGTCCATCCCTTGGGG  
CAAGTACAGCAACGAGAACCTGGACCTGGCGCGGGCACAGGCAGTGCTGGAGGA  
AGACCACTACGGCATGGAGGACGTCAAGAAACGCATCCTGGAGTTCATTGCCGTT  
AGCCAGCTCCGCGGCTCCACCCAGGGCAAGATCCTCTGCTTCTATGGCCCCCTG  
GCGTGGGTAAGACCAGCATTGCTCGCTCCATCGCCCGCGCCCTGAACCGAGAGTA  
CTCCGCTTCAGCGTCGGGGGCATGACTGACGTGGCTGAGATCAAGGGCCACAGG  
CGGACCTACGTGGGCGCCATGCCCGGGAAGATCATCCAGTGTTTGAAGAAGACC  
AAGACGGAGAACCCCTGATCCTCATCGACGAGGTGGACAAGATCGGCCGAGGC  
TACCAGGGGGACCCGTCGTCGGCACTGCTGGAGCTGCTGGACCCAGAGCAGAAT  
GCCAACTTCCTGGACCACTACCTGGACGTGCCCGTGGACTTGTCCAAGGTGCTGT  
TCATCTGCACGGCCAACGTCACGGACACCATCCCCGAGCCGCTGCGAGACCGTAT  
GGAGATGATCAACGTGTCGGGCTACGTGGCCAGGAGAAGCTGGCCATTGCGGA  
GCGCTACCTGGTGCCCCAGGCTCGCGCCCTGTGTGGCTTGGATGAGAGCAAGGCC  
AAGCTGTCATCGGACGTGCTGACGCTGCTCATCAAGCAGTACTGCCGCGAGAGCG  
GTGTCCGCAACCTGCAGAAGCAAGTGGAGAAGGTGTTACGGAAATCGGCCTACA  
AGATTGTCAGCGGCGAGGCCGAGTCCGTGGAGGTGACGCCCCGAGAACCTGCAGG  
ACTTCGTGGGGAAGCCCGTGTTCACCGTGGAGCGCATGTATGACGTGACACCGCC  
CGGCGTGGTCATGGGGCTGGCCTGGACCGCAATGGGAGGCTCCACGCTGTTTGTG  
GAGACATCCCTGAGACGGCCACAGGACAAGGATGCCAAGGGTGACAAGGATGGC  
AGCCTGGAGGTGACAGGCCAGCTGGGGGAGGTGATGAAGGAGAGCGCCCCGATA  
GCCTACACCTTCGCCAGAGCCTTCCTCATGCAGCACGCCCCCGCCAATGACTACC  
TGGTGACCTCACACATCCACCTGCATGTGCCCGAGGGCGCCACCCCCAAGGACGG  
CCCAAGCGCAGGCTGCACCATCGTCACGGCCCTGCTGTCCCTGGCCATGGGCAGG  
CCTGTCCGGCAGAATCTGGCCATGACTGGCGAAGTCTCCCTCACGGGCAAGATCC  
TGCCTGTTGGTGGCATCAAGGAGAAGACCATTGCGGCCAAGCGCGCAGGGGTGA  
CGTGCATCGTCCTGCCAGCCGAGAACAAGAAGGACTTCTACGACCTGGCAGCCTT  
CATCACCGAGGGCCTGGAGGTGCACTTCGTGGAACACTACCGGGAGATCTTCGAC  
ATCGCCTTCCCGGACGAGCAGGCAGAGGCGCTGGCCGTGGAACGGTGA

**Figure 26 : séquence codante du gène Lon humain.** Cette séquence de 2880 nucléotides correspond à l'ADNc codant la protéine Lon humaine. La région ciblée par le shRNA est surlignée en jaune (nucléotides 469 à 487 de m'ADNc).

MAASTGYVRLWGAARCVLRRPMLAAAGGRVPTAAGAWLLRGQRTCDASPPWAL  
WGRGPAIGGQWRGFWEASSRGGGAFSGGEDASEGGAEAGGAGGSAGAGEGPVI  
TALTPMTIPDVFPHLPLIAITRNPVFPRIKIIIEVKNKLVLLRRKVRLAQPYYVGVFLK

RDDSNESDVVESLDEIYHTGTFAQIHEMQDLGDKLRMIVMGHRRVHISRQLEVEPEE  
PEAENKHKPRRKS KR GKKEAEDELSARHPAELAMEPTPELPAEVL MVEVENVHED  
FQVTEEVKALTA EIVKTIRDIIALNPLYRESVLQMMQAGQRVVDNPIYLSDMGAALT  
GAESHELQDVLEETNIPKRLYKALSLLKKEFELSKLQQR LGREVEEKIKQTHRKYLLQ  
EQLKIIKKELGLEKDDKDAIEEKFRERL KELVVPKHVMDVVDEELSKLGLLDNHSSEF  
NVTRNYLDWLTSIPWGKYSNENLDLARAQAVLEEDHYGMEDVKKRILEFIAVSQLR  
GSTQGKILCFYGPPGVGKTSIARSARALNREYFRFSVGGMTDVAEIKGHRRTYVGA  
MPGKIIQCLKKTENPLILIDEVDKIGRGYQGDPS SALLELLDPEQANFLDHYLDVP  
VDLSKVLFICTANVTDTIPEPLRDRMEMINVS GYVAQEKLAI AERYLVPQARALCGLD  
ESKAKLSSDVLTLLIKQYCRESGVRNLQKQVEKVL RKSAYKIVSGEAESVEVTPENLQ  
DFVGKPVFTVERMYDVTPPGVVMGLAWTAMGGSTL FVETSLRRPQDKDAKGDKDG  
SLEVTGQLGEVMKESARIAYTFARAFLMQHAPANDYLVTSHIHLHVPEGATPKDGPS  
AGCTIVTALLSLAMGRPVRQNLAMTGEVSLTGKILPVGGIKEKTIAAKRAGVTCIVLP  
AENKKDFYDLAAFITEGLEVHFVEHYREIFDIAFPDEQAEALAVER

**Figure 27 : séquence peptidique (959 acides aminés) de la protéine Lon humaine issue de la séquence codante du gène Lon humain.**



## Annexe 2

### Préparation des fractions enrichies en mitochondries

Un certain nombre des résultats présentés dans cette thèse ont été obtenus à partir de fractions de cellules HeLa enrichies en mitochondries. Cette stratégie nous a permis de mettre en évidence des variations du protéome mitochondrial associées à une sous expression de la protéase Lon qui n'auraient pu être observées en travaillant sur des cellules entières compte tenu de la faible représentation des protéines mitochondriales dans le protéome total. Le choix du protocole de préparation de ces fractions enrichies en mitochondries nous a amenés à tester plusieurs méthodes avec un objectif : obtenir des extraits améliorant la représentativité des protéines mitochondriales sans atteindre un niveau de purification éliminant toutes les protéines cytosoliques compte tenu du fait que bon nombre de ces dernières interviennent dans le fonctionnement de la mitochondrie.

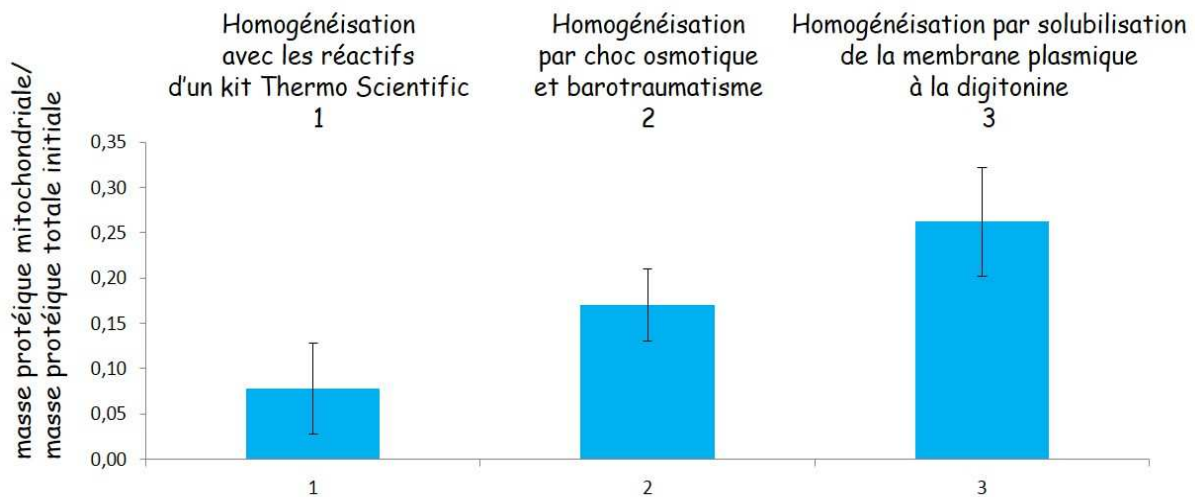
Nous avons ainsi comparé les fractions mitochondriales obtenues à partir de trois méthodes. A chaque fois, les fractions mitochondriales et cytosoliques ont été séparées par centrifugation différentielle au terme des trois procédés suivants :

- 1) après la lyse des cellules au moyen des réactifs du kit "Mitochondria isolation kit for cultured cells" (ThermoFisher Scientific)
- 2) après une homogénéisation des contenus cellulaires par un choc osmotique et barotraumatisme
- 3) après solubilisation des cellules à la digitonine

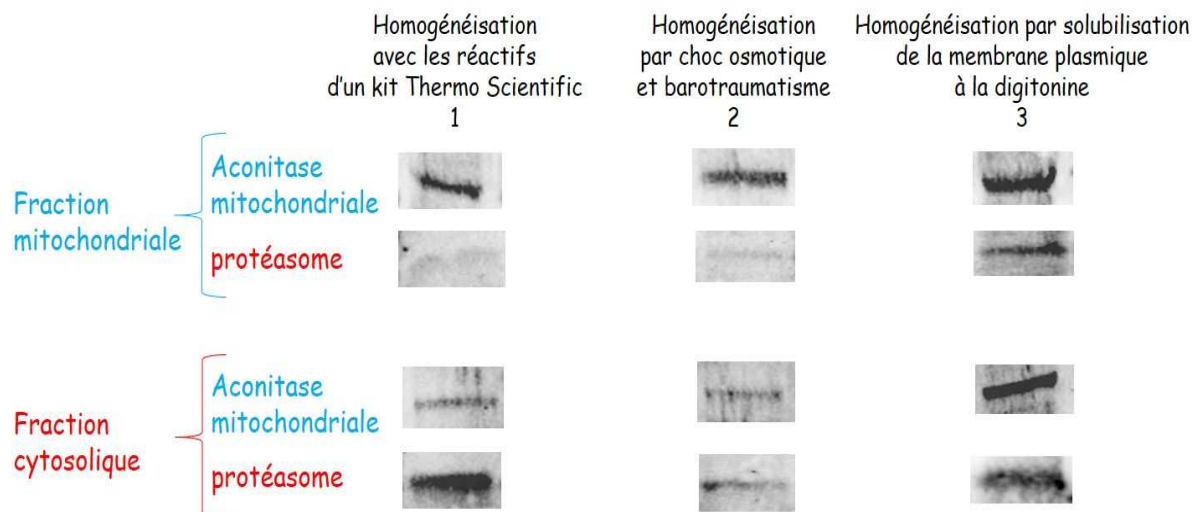
Nous avons ensuite mesuré le rendement de chaque méthode en rapportant la quantité de protéines se trouvant dans chaque fraction mitochondriale à la quantité totale de protéines contenues au départ dans nos cellules (Figure 28). Nous avons également vérifié la pureté de nos fractions mitochondriales et cytosoliques en contrôlant par western blot l'expression d'une protéine cytosolique (une sous-unité du protéasome) et d'une protéine mitochondriale (l'aconitase mitochondriale) dans ces fractions (Figure 29).

L'analyse de ces résultats a permis de constater que la solubilisation à la digitonine (méthode 3) procurait le meilleur rendement en protéines dans les fractions mitochondriales mais les fractions mitochondriales et cytosoliques les moins pures. Nous avons donc opté pour la méthode 2 (homogénéisation par choc osmotique et barotraumatisme). Tout en aboutissant à

des fractions relativement pures et certes un peu moins bien purifiées qu'avec la méthode 1 (kit ThermoScientific), cette méthode 2 permet d'obtenir des fractions mitochondriales avec un rendement en protéines plus satisfaisant que la méthode 1.



**Figure 28 : ratio masse protéique de chaque fraction mitochondriale sur masse protéique cellulaire totale initiale en fonction des méthodes de préparation des fractions mitochondriales.** Les protéines ont été extraites puis dosées par la méthode de Bradford avant et après la préparation des fractions mitochondriales. Les données représentent la moyenne et l'écart-type de 3 échantillons.



**Figure 29 : vérification de la pureté des fractions mitochondriales et cytosoliques obtenues à l'issue des trois méthodes de préparation.** Après migration sur gel SDS-PAGE et transfert sur membrane de nitrocellulose, l'expression des protéines d'intérêt a été mise en évidence après hybridation avec un anticorps primaire anti sous-unité du protéasome (préparé par le laboratoire, dilution 1/1000<sup>e</sup>) et un anticorps primaire anti aconitase mitochondriale (préparé par le laboratoire, dilution 1/1000<sup>e</sup>). Ces anticorps primaires ont été détectés au moyen d'un anticorps secondaire anti lapin couplé à la peroxydase (Dy Light 800 Invitrogen).

## Matériel et méthodes

### ***Lignée cellulaire***

Les cellules utilisées sont des cellules HeLa cultivées dans du milieu DMEM (Gibco Life Technologies) supplémenté avec 2mM L-glutamine (Sigma, G7513), 1% pénicilline/streptomycine (Sigma, P4333), 5 µg/ml blasticidine (Invitrogen, R210-01) et 10% sérum de veau fœtal (SVF).

Pour les préparations de fractions mitochondriales et cytosoliques, les cellules sont décollées par une solution de trypsine pendant 5 minutes à 37°C ensuite inactivée par l'ajout de SVF dans du DMEM. Elles sont ensuite été concentrées par centrifugation (1000g, 8 minutes, 4°C).

### ***Méthode 1 : kit "Mitochondria isolation kit for cultured cells" (ThermoFisher Scientific)***

Les fractions mitochondriales et cytosoliques ont été préparées selon les instructions du fabricant (ThermoFisher Scientific, ref 89874)

### ***Méthode 2 : préparation des fractions mitochondriales après homogénéisation des contenus cellulaires par un choc osmotique et barotraumatisme***

Les culots cellulaires sont repris dans 1 ml solution 10mM Hepes - 250 mM sucrose à pH 7,4 puis homogénéisés par allers-retours à travers une aiguille 22G. Les homogénats sont centrifugés (1000 g, 5 min, 4°C). Les surnageants sont ensuite centrifugés (11000 g, 10 min, 4°C). Les culots mitochondriaux et les suspensions cytosoliques ainsi obtenus sont conservés à -80°C

### ***Méthode 3 : préparation des fractions mitochondriales après homogénéisation des contenus cellulaires par solubilisation à la digitonine***

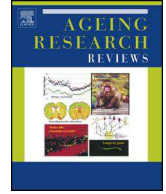
Les culots cellulaires sont incubés pendant 5 minutes à 4°C dans une solution de digitonine respectant un rapport digitonine/masse protéique = 4/5. Avec ce rapport, seules les mitochondries ne sont pas solubilisées. Deux volumes de PBS 1X sont ensuite ajoutés. Après une centrifugation (10000g, 10 minutes, 4°C), les culots mitochondriaux et les suspensions cytosoliques ainsi obtenus sont conservés à -80°C

## **Annexe 3**

## **Publication 3**

# Mitochondrial proteases and protein quality control in ageing and longevity

Marie-Paule Hamon, Anne-Laure Bulteau, Bertrand Friguet



## Review

## Mitochondrial proteases and protein quality control in ageing and longevity

Marie-Paule Hamon<sup>a,b,c</sup>, Anne-Laure Bulteau<sup>d</sup>, Bertrand Friguet<sup>a,b,c,\*</sup><sup>a</sup> Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 8256, Biological Adaptation and Ageing – IBPS, F-75005 Paris, France<sup>b</sup> CNRS-UMR 8256, F-75005 Paris, France<sup>c</sup> INSERM U1164, F-75005 Paris, France<sup>d</sup> IPREM-LCABIE UMR 5254, 2 rue du président Angot, F-64000 Pau, France

## ARTICLE INFO

## Article history:

Received 7 November 2014  
 Received in revised form  
 23 December 2014  
 Accepted 27 December 2014  
 Available online 8 January 2015

## Keywords:

Ageing  
 Mitochondrial protein degradation  
 Lon protease  
 Clp proteases  
 Protein oxidation  
 Protein maintenance

## ABSTRACT

Mitochondria have been implicated in the ageing process and the lifespan modulation of model organisms. Mitochondria are the main providers of energy in eukaryotic cells but also represent both a major source of reactive oxygen species and targets for protein oxidative damage. Since protein damage can impair mitochondrial function, mitochondrial proteases are critically important for protein maintenance and elimination of oxidized protein. In the mitochondrial matrix, protein quality control is mainly achieved by the Lon and Clp proteases which are also key players in damaged mitochondrial proteins degradation. Accumulation of damaged macromolecules resulting from oxidative stress and failure of protein maintenance constitutes a hallmark of cellular and organismal ageing and is believed to participate to the age-related decline of cellular function. Hence, age-related impairment of mitochondrial protein quality control may therefore contribute to the age-associated build-up of oxidized protein and alterations of mitochondrial redox and protein homeostasis.

© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## Contents

1. Introduction .....	57
2. Mitochondrial proteases: an overview .....	57
3. Structure and operating mode of mitochondrial matrix proteases .....	58
3.1. The mitochondrial matrix protease Lon .....	58
3.2. The mitochondrial matrix proteases Clp .....	58
4. Protein quality control in the mitochondria and ageing .....	59
4.1. Mitochondrial protein quality control systems: an overview .....	59
4.2. Implication of the mitochondrial matrix protease Lon .....	62
4.3. Implication of the mitochondrial matrix protease Clp .....	63
5. Conclusion .....	63
Acknowledgments .....	64
References .....	64

**Abbreviations:** AAA, ATPase associated with diverse cellular activities; Clp, caseinolytic protease; CoQ, coenzyme Q; HIF, hypoxia-inducible factor; HSP, heat shock protein; IMP, inner membrane peptidase; MIP, mitochondrial intermediate peptidase; MPP, mitochondrial processing peptidase; mtDNA, mitochondrial DNA; mtUPR, mitochondrial unfolded protein response; OMMAD, outer mitochondrial membrane associated degradation; PARL, presenilin-associated rhomboid-like protease; PINK, PTEN-induced putative kinase; ROS, reactive oxygen species; Sdh, succinate dehydrogenase; SPG, spastic paraplegia; TCA cycle, tricarboxylic acid cycle; UPS, ubiquitin-proteasome system.

\* Corresponding author at: Sorbonne Universités, UPMC Univ Paris 06, UMR 8256, Biological Adaptation and Ageing – IBPS, F-75005 Paris, France. Tel.: +33 1 44 27 37 02; fax: +33 1 44 27 51 40.

E-mail address: [bertrand.friguet@upmc.fr](mailto:bertrand.friguet@upmc.fr) (B. Friguet).

<http://dx.doi.org/10.1016/j.arr.2014.12.010>

1568-1637/© 2015 Elsevier B.V. All rights reserved.

## 1. Introduction

Mitochondria are organelles bounded by a double membrane delineating four compartments, namely, from outside to inside, the outer membrane, the intermembrane space, the inner membrane and the matrix. Crossroad of many metabolic pathways, mitochondrion is producing an important part of the energy required by the cell. This energy is provided by the electron transport chain, the functioning of which also produces reactive oxygen species (ROS) that are well known for damaging proteins. Hence, mitochondrial proteins are particularly exposed to mitochondrial ROS and represent targets for oxidative modification and subsequent loss of function and/or gain of toxic function due to oxidized protein aggregates and cross-linked inclusion bodies formation. To cope with this particular environment, mitochondria have their own protein quality control system in which mitochondrial proteases are key players in managing oxidized and misfolded proteins (Luce et al., 2010; Ugarte et al., 2010). Both accumulation of damaged proteins and mitochondrial dysfunction have been reported to contribute to ageing and age-related diseases (Nyström, 2005; Farout and Friguete, 2006). Moreover, mitochondria and more specifically mitochondrial protein quality control components such as the Lon and the Clp proteases have also been implicated in regulating the longevity of such model organisms as *Podospira anserina* and yeast (Luce and Osiewacz, 2009; Adam et al., 2012; Osiewacz and Bernhardt, 2013; Erjavec et al., 2013). Removal of damaged protein has been recognized as a critical function for cellular homeostasis and survival (Baker et al., 2011; Lionaki and Tavernarakis, 2013) while failure of protein maintenance (i.e. degradation and repair) has been evidenced as a major contributor to the age-associated accumulation of oxidatively damaged proteins (Farout and Friguete, 2006; Ugarte et al., 2010). Hence, the age-associated impairment of mitochondrial protein quality control systems may result in mitochondrial dysfunction. In this paper, proteases that are implicated in mitochondrial protein homeostasis in the different compartments of the mitochondrion are first described with a special emphasis on the mitochondrial matrix Lon and Clp proteases. Then, the implication of these mitochondrial proteases in the age-related impairment of mitochondrial protein quality control and mitochondrial dysfunction is further addressed.

## 2. Mitochondrial proteases: an overview

Mitochondrial protein homeostasis relies for a significant part on proteases located in the different compartments of the mitochondrion (Table 1). Although, no protease has been identified in the outer membrane, the ubiquitin-proteasome system (UPS) performs a protein quality control through the outer mitochondrial membrane associated degradation (OMMAD) at the cytosolic side of this membrane (Benischke et al., 2014). The OMMAD is composed of membrane-anchored RING-finger type E3 ubiquitin ligases and the AAA-(ATPase associated with diverse cellular activities) ATPase Cdc48/p97 that binds the ubiquitinated membrane proteins and transports them to the cytosol for degradation. Other actors of the OMMAD have also been identified, such as Vms1 in yeast and Parkin in mammals that act in the recruitment of Cdc48/p97 (Taylor and Rutter, 2011). Furthermore, the UPS system has also been implicated in the degradation of proteins from other mitochondrial compartments (Baker et al., 2014). Indeed, ubiquitination, retro-translocation to the outer membrane and degradation by the proteasome have been reported for several proteins from various mitochondrial compartments (Taylor and Rutter, 2011).

The intermembrane space houses the soluble protease HtrA2/Omi and the metalloprotease Atp23. HtrA2/Omi is a serine protease implicated in apoptosis when released in the cytosol with a possible chaperone function within the mitochondrion

**Table 1**  
Mitochondrial proteases.

Yeast	Homo sapiens	Localization	Function
	HtrA2/Omi	IM	Implication in apoptosis; putative chaperone
( <i>i</i> -AAA) Yme1	YME1L	IM	Quality control
(IMP) Imp1, Imp2	IMMP1L, IMMP2L	IM	Processing of presequences
( <i>m</i> -AAA) Yta1, Yta12	AFG3L2, SPG7	IM	Quality control; processing
Oma1	OMA1	IM	Processing
(Rhomboid) Pcp1	PARL	IM	Processing; protection from apoptosis
Atp23	XRCC6BP1, KUB3	IMS	Processing; chaperone
Mop112	Prep	IMS	Degradation of peptides and presequences
Prd1, saccharolysin	Neurolysin	IMS	Degradation of peptides and presequences
	ClpP	M	Quality control
Lap3	Bleomycin hydrolase	M	Detoxification
(Lon) Pim1	LONP1	M	Quality control
(MIP) Oct1	MIPEP, MIP	M	Processing of presequences
(MPP) Mas1, Mas2	MPPA, MPPB	M	Processing of presequences

AAA, ATPase associated with diverse cellular activities; Clp, caseinolytic protease; IM, inner membrane; IMP, inner membrane peptidase; IMS, intermembrane space; M, matrix; MIP, mitochondrial intermediate peptidase; MPP, mitochondrial processing peptidase; PARL, presenilin-associated rhomboid-like protease.

(Vande Walle et al., 2008). In mice HtrA2/Omi has been involved in the regulation of the mitochondrial ubiquitin ligase Mulan E3, the accumulation of which increases mitophagy upon HtrA2/Omi down-regulation (Cilenti et al., 2014). In yeast, Atp23 has been described as exhibiting a dual function of processing peptidase and chaperone involved in ATP synthase biogenesis (Osman et al., 2007). Atp23 has also been found to act in phospholipid metabolism since it degrades UPS1, a protein involved in regulating the accumulation of phosphatidylethanolamine and cardiolipin in mitochondria (Potting et al., 2010).

Two AAA proteolytic complexes are the main actors of the quality control in the inner membrane, namely the *i*-AAA and the *m*-AAA proteases. The catalytic domains of the *i*-AAA protease face the *intermembrane* space, whereas the *m*-AAA protease is active on the *matrix* side. They exert various non proteolytic and proteolytic activities such as degradation of non native proteins to peptides and participation in the biogenesis of some proteins by acting as processing enzymes (Gerdes et al., 2012). The yeast *m*-AAA protease regulates mitochondrial ribosome assembly and translation by controlling proteolytic maturation of a ribosomal subunit (Nolden et al., 2005). As for Atp23, *i*-AAA is involved in yeast mitochondrial phospholipid metabolism by mediating degradation of UPS2 and UPS1 (Potting et al., 2010). In *P. anserina*, the *i*-AAA protease exhibits properties of a heat shock response protein (Weil et al., 2011). Moreover, *i*-AAA and *m*-AAA are probably involved in the quality control of intermembrane space and matrix proteins.

The metalloprotease Oma1 and the presenilin-associated rhomboid-like protease PARL (also named Pcp1, Rbd1 or Mdm37) are also localized in the inner membrane. Oma1 has been shown to ensure the proteolysis of a misfolded derivative of the polytopic inner membrane protein Oxa1 in an ATP-independent manner (Kaser et al., 2003). Oma1 associates with the *i*-AAA protease in order to modulate mitochondrial dynamics through OPA1 proteolysis (Baker et al., 2014). In yeast, Oma1 plays an important role in stress response under damage-eliciting conditions by preserving

mitochondrial function in conjunction with other mitochondrial quality control components like m-AAA, i-AAA, and Pcp1-rhomboid proteases (Bohovyach et al., 2014). PARL activity has also been implicated in mitochondrial dynamics as well as in apoptosis (Hill and Pellegrini, 2010). In lymphocytes and neurons of mice, PARL associates with the Bcl-2 related family protein Hax1 in the inner membrane. These interactions allowed Hax1 to present the mitochondrial protease HtrA2 to PARL for its subsequent processing thus providing protection from apoptosis (Chao et al., 2008).

Three peptidases, MPP (mitochondrial processing peptidase), IMP (inner membrane peptidase) and MIP (mitochondrial intermediate peptidase), ensure the cleavage of the presequence of precursor proteins targeted to the various sub-compartments of the mitochondria (Gakh et al., 2002). MPP is situated in the matrix and acts upon precursors designed to the matrix or in transit to the inner membrane or the intermembrane space. MIP, also localized into the matrix, cleaves precursor intermediates generated by MPP. IMP is anchored in the inner membrane and takes part in the maturation of mitochondrial proteins of the intermembrane space. All these three enzymes are structurally and functionally conserved across species. Mammalian mitochondria also house several oligopeptidases. Prep (Mop112 in yeast) and neurolysin (Prd1 or saccharolysin in yeast) degrade peptides and presequences in the intermembrane space (Koppen and Langer, 2007). Bleomycine hydrolase (Lap3 in yeast) is an aminopeptidase of the cysteine protease family that lies both in the mitochondrial matrix and in the cytosol (Sickmann et al., 2003).

Matrix protein quality control is mainly achieved by Lon and ClpP, two AAA proteases that are also key players in damaged mitochondrial proteins degradation (Baker et al., 2011). Hence, we will be focusing on Lon and ClpP proteases, the role of which is significant for mitochondrial quality control during ageing since the mitochondrial matrix has very high protein density in a high ROS production environment.

### 3. Structure and operating mode of mitochondrial matrix proteases

#### 3.1. The mitochondrial matrix protease Lon

The Lon protease was the first ATP-dependent protease to be identified. It was evidenced as the product of the Lon gene in *Escherichia coli* and its implication in protein stability and abnormal protein degradation was first demonstrated in this bacteria (Gottesman et al., 1981; Chung and Goldberg, 1981). The human Lon was then identified as a mitochondrial protease by Wang et al. (1993). It is present in most bacterial species but also in Archaea and in the mitochondrion of eukaryotic cells as well as in the chloroplast of algae and plant cells.

The Lon protease is encoded by a single nuclear gene to form homo-oligomeric ring complexes (Fig. 1). Catalytically active human Lon requires hexameric ring formation (García-Nafria et al., 2010). However other Lon complexes have been observed: heptamers in *Saccharomyces cerevisiae* (Stahlberg et al., 1999), with a state of equilibrium between hexamer, tetramer and dimer, or between hexamer and trimer depending on Mg<sup>2+</sup> concentration in *Mycobacterium smegmatis* (Rudyak et al., 2001).

Each polypeptide chain contains both a protease and an AAA+ domain. The protease domain has a Ser-Lys catalytic dyad (Botos et al., 2004) which is different from the classic catalytic triad Asp-His-Ser found in other AAA+ proteases such as ClpXP (Polgár, 2005).

Lon proteases can be divided in two families. Lon A proteases, found in most bacteria, exhibit a large N-terminal substrate binding domain of about 300 amino acids, an AAA+ domain involved in ATP binding and hydrolysis, and a C-terminal proteolytic domain. Lon B proteases, that are mainly present in Archaea, lack the N-terminal

domain but have a transmembrane region inserted between the small and large AAA+ subdomains (Rotanova et al., 2004), that allows the orientation of the pore region of the protease to the inner face of the cell membrane. Lon B is also present in some bacteria which host both types of Lon.

The N-terminal domain of Lon A plays an important role in substrate binding. Indeed, variants of Lon exhibiting a series of deletions in their N-terminal domain lose their ability to bind substrates, while they maintain their ATPase activity and can hydrolyze smaller peptides (Roudiak and Shrader, 1998).

Once recognized, Lon substrates are unfolded if necessary in an ATP-dependent manner and then transferred through the pore and into the proteolytic chamber for degradation. ATP binding to the AAA module of the Lon complex results in a change in Lon conformation into a proteolytically active state. Lon interacts with sequences generally located in the hydrophobic core of substrates and rarely on the surface (Gur and Sauer, 2008). However, misfolded proteins are not the only Lon substrates since Lon also degrades several folded regulatory proteins that generally carry a degradation tag at their amino- or carboxy-terminus (Birghan et al., 2000). A histidine and a penultimate tyrosine in this tag play a critical role for the cleavage by the Lon protease (Gur and Sauer, 2009; Ishii and Amano, 2001).

In addition to its recognition function, the N-terminal domain of Lon has been implicated in the regulation of its activity since it has been shown that substrate binding have an effect on enzyme architecture and function (Wohlever et al., 2014). Lon activity can also be controlled by its quaternary structures. For example, in *E. coli*, Lon hexamers can interact to form a dodecamer with the proteolytic site of each hexamer at opposite ends and a matrix of N-terminal domains creating pores that could provide entry for substrates. Formation of dodecamers significantly decreases large substrates but not small proteins degradation, therefore the hexamer–dodecamer equilibrium in cells could modulate Lon activity (Vieux et al., 2013).

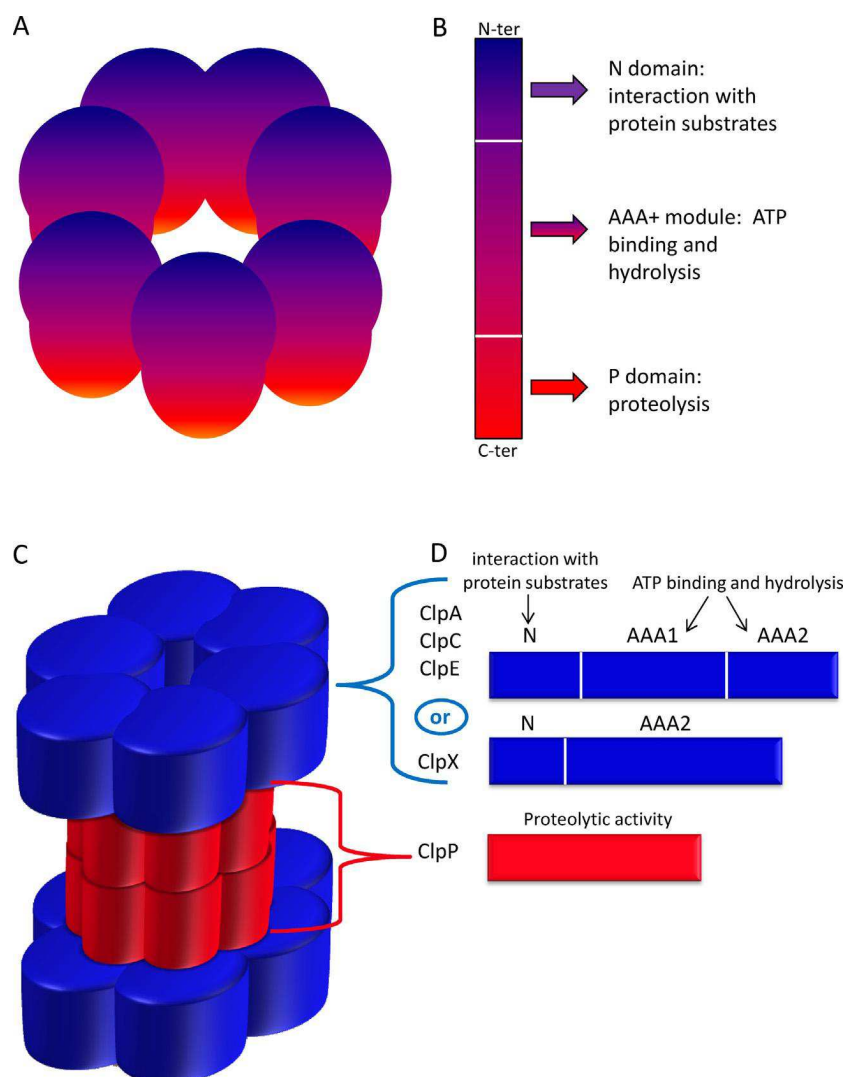
So far, only few Lon inhibitors have been described even if non-peptidic molecules have revealed promising results in order to develop specific inhibition of Lon (Bayot et al., 2008).

#### 3.2. The mitochondrial matrix proteases Clp

Clp proteases constitute a family encompassing ClpAP, ClpCP, ClpEP, ClpXP and ClpYQ, that are found in a wide range of prokaryotic and in the mitochondrion of eukaryotic cells as well as in the chloroplast of algae and plant cells. They are active in the form of complexes including two functional elements: a proteolytic subunit (ClpP or ClpQ) sandwiched between two ATPase-active chaperone rings (ClpA, ClpC, ClpE, ClpX or ClpY) depending on the species (Kress et al., 2009). ClpP can interact with any of the chaperones ClpA, ClpC, ClpE and ClpX but ClpQ can only assemble with ClpY forming the ClpYQ complex also named HslUV. However, in the case of the bacterial ClpAP protease, it was also shown that ClpP is able to cleave full-length proteins without being associated with ClpA but at a much slower rate (Jennings et al., 2008).

The proteolytic core is made of two stacked rings, heptameric in ClpP, hexameric in ClpQ, with their serine or threonine-type active sites sequestered from the outside solution (Fig. 1). Single ClpP-rings seem to be formed before associating in double rings. The chaperone subunits have been grouped into two categories: the class I that contains protomers with two consecutive AAA modules responsible for ATP binding and hydrolysis (ClpA, ClpC and ClpE), the class II (ClpX and ClpY) that have only one AAA module. All chaperones have one N-terminal domain devoted to substrates binding. Chaperones are toroidal hexamers assembled around a central pore.

ClpXP is present in almost all bacteria while ClpA is found in the Gram-negative bacteria, ClpC in Gram-positive bacteria and



**Fig. 1.** Structure of the Lon and Clp proteases. (A) Oligomeric structure of the Lon protease. (B) Monomeric Lon protease domains. (C) Oligomeric structure of the Clp proteases. (D) Monomeric Clp protease domains.

cyanobacteria, ClpYQ and ClpAP in most bacteria and in certain Gram-positive bacteria. ClpAP, ClpXP and ClpYQ co-exist in *E. coli* while only the ClpXP complex is present in humans.

Most class I Clp chaperones need the presence of nucleotide to achieve the oligomeric state (Kress et al., 2009). This hexameric structure is required prior to its association with the proteolytic subunits. The structure differs according to the protease, namely heptameric for ClpP or hexameric for ClpQ.

Substrates are recognized and unfolded by the chaperone subunits and then transferred through their central pore to the protease compartment where they are hydrolyzed into 5–10 amino acid long peptides (Yu and Houry, 2007). Both ClpX and ClpA have loops localized in their central channel that recognize terminal sequences, or “tags”, in substrate proteins (Hinnerwisch et al., 2005). Then, the unfolding process can be operated due to particular Clp ATPases features: a narrow entrance with loops involved in substrate binding, a central channel with no evident sequence affinity and ATP-hydrolysis-powered loops where the substrate is unfolded and translocated into the protease cylinder for degradation (Kress et al., 2009).

The proteolytic cores ClpP or ClpQ harbor hydrophobic grooves which bind candidate proteins for degradation and house the catalytic triad Asp-His-Ser (Wang et al., 1997). This mechanism of processive degradation results in production of peptides, the length

of which seems under the control of the protease subunit, at least in the case of ClpP (Jennings et al., 2008).

#### 4. Protein quality control in the mitochondria and ageing

##### 4.1. Mitochondrial protein quality control systems: an overview

Mitochondria have been recognized as playing an important role in ageing and in a number of age-related pathologies such as Alzheimer’s and Parkinson’s diseases (Kwong et al., 2006). This central role has been supported by the mitochondrial free radical theory of ageing for which rising levels of free radicals produced by the mitochondrial metabolism result in increased oxidative damage to various macromolecules. Accordingly, ROS production and mitochondrial dysfunction thus form a vicious cycle that is believed to represent a major driving force of ageing.

Although doubt has been casted on this theory of ageing (Bratic and Larsson, 2013), it remains that numerous studies link mitochondrial function with the ageing process and lifespan modulation of model organisms. As protein damage can interfere with mitochondrial function, mitochondrial protein quality control is critically important in mediating ageing and longevity given that the most common source of protein damage is oxidation and mitochondria are main source of ROS. Indeed, oxidative stress



represents a real challenge for mitochondrial proteostasis as it generates numerous deleterious effects (Lionaki and Tavernarakis, 2013). Moreover, failure of protein maintenance is a major contributor to the age associated accumulation of oxidized proteins which is believed to participate to the age-related decline of cellular function (Farout and Friguét, 2006). In particular, concomitant with the age-related decline of the protein quality control, protein carbonylation results in the formation of cytotoxic aggregates that have been linked with many age-related disorders (Nyström, 2005).

In addition, low levels of ROS have been shown to play an important role in cellular signaling as messenger acting in the regulation of different pathways (Ray et al., 2012) including the antioxidant defense system (Wang et al., 2013). The maintenance of this downstream response also advocates for the importance of mitochondrial protein quality control. Hence, regulation of the mitochondrial oxidative status by mitochondrial quality control systems may therefore impact ageing and longevity.

Among reactive oxygen species, superoxide anion, hydrogen peroxide and organic hydroperoxides can be eliminated by redox reactions. In mitochondria, they are catalyzed by enzymes including manganese superoxide dismutase, catalase, peroxiredoxins, glutathione peroxidase and phospho-lipid hydroperoxide glutathione peroxidase (Friguét et al., 2008). However, detoxification systems can be overwhelmed and are not sufficient to prevent all oxidative damage to proteins. Hence, the quality control systems come into play in order to clear cells of damaged proteins, the accumulation and aggregation of which are involved in mechanisms underlying the ageing process.

Elimination of oxidized proteins is achieved through repair and degradation. Mitochondria are provided with different means in order to ensure both activities. Only sulfur-containing amino acids cysteine and methionine are entitled to oxidized protein repair systems that are thioredoxin/thioredoxin reductase, glutaredoxin/glutathione/glutathione reductase, sulfiredoxin and methionine sulfoxide reductases (Ugarte et al., 2010; Baraibar and Friguét, 2013). These repair systems have been reported to contribute to the resistance to oxidative stress and the modulation of the lifespan of model organisms (Friguét et al., 2008).

Protein quality control can also be ensured by chaperones. Mitochondria have to import the vast majority of their proteins. This process requires chaperone proteins from the HSP60, HSP70 and HSP100 families that are also involved in protein folding, prevention of aggregation and disaggregation as well as protein degradation (Wiedemann et al., 2004). Moreover, the predisposition to oxidation of misfolded proteins (Dukan et al., 2000) argues for an essential role for mitochondrial chaperones in preventing protein oxidative damage. Mitochondria have also to cope with unfolded and misfolded proteins as well as unassembled protein complexes. Such cases require the resort to the proteostasis machinery referred as to the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR). This transcriptional program of some mitochondrial chaperones and proteases, notably ClpP, is triggered by stresses impairing mitochondrial proteostasis. In mammals, two mtUPR have already been identified, in the matrix and the intermembrane space (Jovaisaite et al., 2014).

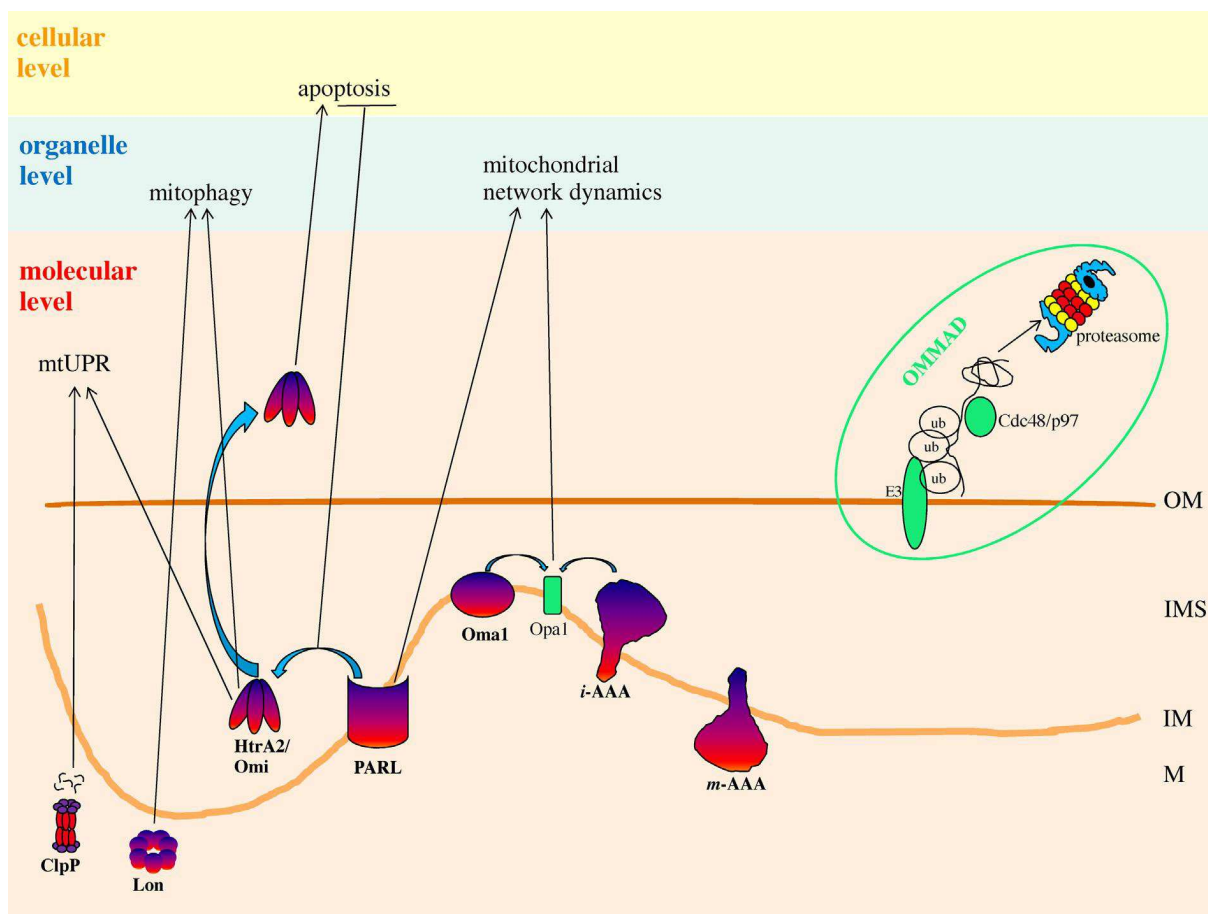
A positive correlation between the mtUPR level and lifespan has been shown in *Caenorhabditis elegans* and the mtUPR has been involved in lifespan modulation of flies and mice (Houtkooper et al., 2013; Jensen and Jasper, 2014). Overexpression of mitochondrial HSP70 has extended the lifespan of nematode and the proliferation capacity of human cells while its modification under oxidative stress may result in functional impairment due to inefficient protein import and protein misfolding and aggregation induced by inefficient chaperoning (Yaguchi et al., 2007). Up-regulation of mitochondrial HSP22 has resulted in increased lifespan of fly (Morrow et al., 2004a) while the opposite has been observed with a

HSP22 knockout (Morrow et al., 2004b). Interestingly, stress resistance was shown to increase under HSP22 up-regulation and to decrease with absence of HSP22.

As for the HtrA2/Omi protease, that has a putative chaperone function, a neurodegenerative phenotype has been observed in mice lacking this mitochondrial intermembrane space protease (Vande Walle et al., 2008). Concerning the *m*-AAA protease, Kondadi et al. (2014) suggested that, upon *m*-AAA protease subunit FsG3L2 depletion, the resulting disturbance in respiratory chain assembly triggers ROS production. This increase in ROS production leads to Tau hyperphosphorylation which can affect the ante-retrograde transport and also induce ageing-associated disorders through accumulation of fibrillary tau inclusions in the central nervous system (Kondadi et al., 2014).

Although it cannot be classified as a detoxification or repair system, coenzyme Q (CoQ) takes place in mitochondrial quality control due to the antioxidant capacities of its reduced form. The major antioxidant role of CoQ is in preventing lipid peroxidation (Kotiadis et al., 2014). Nevertheless CoQ also displays prooxidant properties and its role in ageing has not yet been well established even if amelioration of age-related impairment and reduced protein oxidation have been observed in mice with CoQ supplementation (Shetty et al., 2014).

Concerning the non-repairable protein modifications that represent the largest group, their removal depends on the degradation of altered proteins by the proteases located in the different compartments of the mitochondria (Fig. 2). Accumulation of damaged macromolecules resulting from oxidative stress and failure of protein maintenance constitutes a hallmark of cellular and organismal ageing (Ugarte et al., 2010). In the mitochondrial matrix, the proteolysis of these damaged proteins is essentially ensured by the Lon protease and, to a lesser extent, by the ClpP proteases. Furthermore increased levels of protein carbonyls are found in numerous age-related diseases and a significant part of modified proteins identified during ageing and age-related diseases are located in mitochondria (Baraibar et al., 2012) pointing out the important role of the two soluble matrix proteases in the ageing processes. Interestingly, defects in mitochondrial proteases like the *i*-AAA and the *m*-AAA proteases, primarily tasked with degrading misassembled or unfolded proteins, have been associated with the progression of neurodegenerative diseases while up-regulation of Lon and ClpP proteases has been implicated in preventing premature ageing since they control the levels of functional and damaged or misfolded proteins in mitochondrial matrix (Luce et al., 2010). Moreover, mice without functional HtrA2/Omi protease activity exhibited impaired mitochondrial function and premature ageing while a decrease in the mitochondrial membrane potential and an increase in ROS generation was noted in HtrA2<sup>-/-</sup> murine cells (Goo et al., 2014). In *P. anserina*, deletion of the gene encoding the *i*-AAA protease PaIAP has generated a temperature-dependent effect on ageing, that is increased longevity at 27 °C and reduced lifespan at 37 °C (Weil et al., 2011). A role for the OMMAD system in longevity has been underscored in yeast and mammals, since defects in Vms1, one of its protein partner, have been associated with impaired ubiquitin-dependent mitochondrial protein degradation, hypersensitivity to oxidative stress, mitochondrial failure and compromised viability (Heo et al., 2010). The yeast protease Lap3 was identified among several factors that negatively regulate sirtuin activity which is playing an important role in ageing (Raisner and Madhani, 2008). The mitochondrial inner membrane protease Oma1 has been shown to prevent ROS accumulation due to a proteolytic role that has been proven critical in yeast survival (Bohovyč et al., 2014). Civitarese et al. (2010) have proposed a contribution for the PARL protease in mitochondrial anomalies seen in ageing and type 2 diabetes mellitus since PARL mRNA and mitochondrial mass is reduced in elderly people and human subjects.



**Fig. 2.** Mitochondrial proteases in protein quality control. Due to their proteolytic and/or chaperone activities, some mitochondrial proteases are involved in one or more quality control pathways. Under stress conditions HtrA2/Omi translocates in the cytosol where it is involved in apoptosis. Processing of HtrA2/omi by PARL provides protection from apoptosis. Oma1 and *i*-AAA act in mitochondrial network dynamics through processing of the Opa1 protein implicated in mechanisms of mitochondrial fusion (AAA, ATPase associated with diverse cellular activities; Clp, caseinolytic protease; IM, inner membrane; IMS, intermembrane space; M, matrix; OM, outer membrane; OMMAD, outer mitochondrial membrane associated degradation; PARL, presenilin-associated rhomboid-like protease; mtUPR, mitochondrial unfolded protein response).

They have also shown that PARL protein depletion in human muscle lowered mitochondrial oxidative capacity, increased protein oxidation and ROS production, and impaired insulin signaling, all known metabolic defects in diabetes mellitus and ageing (Civitaresse et al., 2010). Given the particular environment in mitochondria, notably the significant ROS load, protein processing and degradation of modified proteins are most important in mitochondrial protein quality control and thus in ageing.

Mitochondrial quality can also be achieved by means of vesicular transport from mitochondria to lysosomes in mitochondria derived vesicles in order to remove and degrade damaged mitochondrial cargo. These stress-induced vesicles appear within functional mitochondria and ensure a selective transport. They are particularly enriched in oxidized proteins (Soubannier et al., 2012).

As the main mechanism for the elimination of damaged mitochondria, mitophagy represents another important mitochondrial quality control pathway and appears to result from mitochondria dysfunction (Redmann et al., 2014). So far no direct link has been shown between mitophagy that acts at the organelle level and the mitochondrial maintenance systems that intervene at the molecular level. However, the Lon protease has been shown to take place in the regulation of the PINK1-Parkin pathway directing mitochondria towards mitophagy (Thomas et al., 2014). Moreover, phenotype of animals lacking the mitochondrial protease HtrA2/Omi indicated a pro-survival role of this protein in mitochondria, in particular its implication in one of the mitophagic pathways (Cilenti

et al., 2014). Furthermore, the early steps of mitophagy are under proteolytic control (Baker et al., 2011) and such age-related factors as increased levels of ROS or excess load of unfolded proteins, are likely to trigger mitophagy (Frank et al., 2012; Jin and Youle, 2013) underscoring the view that all parts of mitochondrial quality control may act together through more or less direct interaction. Moreover, mitophagy has been shown to be involved in the ageing process and the longevity of model organisms as the age-related decline of this mechanism is associated with an accumulation of damaged mitochondria, increased apoptosis and oxidative stress (Chistiakov et al., 2014). In yeast under caloric restriction, macromitophagy was shown to contribute to extended lifespan through modulation of vital cellular mechanisms in and out of the mitochondria, notably lipid homeostasis (Richard et al., 2013). Mitochondrial network dynamics, that also provides an organelle quality control, also requires intervention of proteolysis (Campello et al., 2014). In yeast and *P. anserina* mitochondrial morphology has been linked with ageing and programmed cell death (Bernhardt et al., 2014).

Still on mitochondrial quality control at the organelle level, some authors have mentioned the elimination from cells of fragmented mitochondria that are directly exported in the extracellular space. This mechanism referred as to mitoptosis is a programmed cell death affecting mitochondria in form of an apoptotic-like change that may follow various modalities (Chaabane et al., 2013). Mitoptosis has been found to promote cell survival in ciliated protozoan and has been proposed to occur for clearing damaged mitochondria (Hammerling and Gustafsson, 2014).

Finally, recent studies have assigned to mitochondrial quality control another operating mode through mitochondrial-nuclear communication inducing a stress response and activating different pathways with a potential effect on longevity, notably transcription of nuclear genes involved in the maintenance of mitochondrial function like mitophagy or unfolded protein response (Hill and Van Remmen, 2014). Enhancement of longevity in model organisms with up-regulation of this mitochondrial stress response has been documented. Thus, strategies for mitochondrial protein quality control are various underscoring the importance of the management of damaged proteins and their deleterious effects in the ageing process.

#### 4.2. Implication of the mitochondrial matrix protease Lon

The mitochondrial matrix is very protein dense since it houses the mitochondrial translation machinery, enzymes of the TCA cycle and other metabolic pathways. Therefore, a high level of mitochondrial protein regulation and quality control occurs in this compartment. In this environment particularly exposed to ROS, the Lon protease is considered as the main defense line against oxidized proteins build-up and thus believed to play a major role in the ageing process due to the relation between oxidative damage and premature ageing as well as age-related diseases.

Indeed, evidence has been provided that the Lon protease is involved in oxidized protein degradation (Bayot et al., 2010). Enzymes with oxidation-sensitive prosthetic groups are prone to oxidative damage and primary targets for degradation by Lon (Bender et al., 2010). Bayot et al. (2010) have identified proteins showing increased oxidation level in yeast depleted for PIM1/Lon including mitochondrial stress proteins such as Hsp60 and Sod2. Moreover, Lon activity has been found to have decreased in liver of old rats compared with young ones while an increase of oxidized proteins has been observed in the mitochondrial matrix of old animals (Bakala et al., 2003). In yeast, the absence of Lon has been shown to result in the accumulation of electron dense aggregates and mitochondrial DNA deletion (Van Dyck et al., 1994). Lon deficiency led to an accumulation of carbonylated proteins in mitochondria of yeast and HeLa cells (Bayot et al., 2010, 2014).

As a key player in the elimination of oxidized mitochondrial proteins, the Lon protease has a critical role in the maintenance of mitochondrial matrix protein homeostasis and hence in mitochondrial functional and structural integrity (Bulteau et al., 2006). Thus, Bota et al. (2005) demonstrated that Lon expression knockdown in human lung fibroblasts induces impairment of mitochondrial morphology and function and activates apoptosis. Furthermore, Ngo and Davies (2009) have proposed that Lon is a human stress protein given the important increase in Lon levels as well as conserved mitochondrial function and improved cell survival in rhabdomyosarcoma cells exposed to different stresses. An induction of Lon accompanied by an enhancement of mitochondrial biogenesis has also been observed in hyperthyroidic rats and rats harboring the Zadjela hepatoma tumor (Luciakova et al., 1999). Lon gene promoter carries HIF-1 (hypoxia-inducible factor 1) binding sites and its transcription is activated by HIF-1 in hypoxic mammalian cells (Fukuda et al., 2007).

This implication of the Lon protease in mitochondrial homeostasis leads to grant it a significant part of mitochondrial dysfunction noted in aged tissues given that Lon levels and/or activity have been found to decline with ageing as reported in a study on skeletal muscle from mice (Lee et al., 1999; Bota et al., 2002). This deleterious effect of ageing on Lon was exacerbated by increased chronic oxidative stress. Lon inducibility was also abolished after an oxidative treatment in senescent WI-38 fibroblasts (Ngo et al., 2011). Ngo et al. (2013) are in favor of a biphasic regulation of Lon, i.e. an up-regulation induced by transient stress and a down-regulation when

dealing with chronic stress and ageing. Moreover, in a mouse model of pressure overload heart failure, Lon have shown to be prone to oxidative modifications that reduce its protease activity (Hoshino et al., 2014). Variations in Lon protease has been revealed as tissue-dependent since age-related increase in Lon levels has been found in rat hearts together with unchanged Lon activity suggesting an accumulation of inactive Lon (Delaval et al., 2004). Conversely Lon activity increased in senescent WI-38 compared to young ones without increase in Lon levels (Ahmed et al., 2010). Combined effects of the loss of protein homeostasis due to Lon decline and increased oxidative stress noted in ageing may constitute one of the critical issues to be covered.

Quality control activities of Lon are not only restricted to modified protein degradation. They are also mediated through Lon action on misfolded proteins and mitochondrial DNA. In yeast Lon (also referred as to Pim1) has been shown to degrade misfolded polypeptides (Von Janowsky et al., 2005). This occurs in cooperation with chaperones or when chaperones fail in protein refolding (Bender et al., 2011). In yeast, mammals and some bacteria, Lon may also prevent accumulation of misfolded protein owing to a chaperone activity independent of proteolysis (Wohlever et al., 2014).

Lon can bind mitochondrial DNA with the highest affinity to a single-stranded sequence located in the control region and overlapping the high strand promoter in human cultured cells (Lu et al., 2013). Given its preferential binding, Lon may be involved in regulating the replication and the transcription of mtDNA (Lee and Suzuki, 2008). Furthermore Lon interacts with some components of the nucleoid, i.e. mtDNA polymerase  $\gamma$ A, mtDNA helicase Twinkle (Liu et al., 2004), and the mitochondrial transcription factor TFAM that is degraded by Lon (Matsushima and Kaguni, 2012), suggesting an implication of Lon in mtDNA metabolism and integrity. In *S. cerevisiae*, loss of Pim1/Lon induced mtDNA deletion and impairment of mitochondrial gene expression (Van Dyck et al., 1998).

Since mtDNA mutations accumulate over lifespan, the role of Lon in mtDNA turn over and maintenance represents another possibility for its involvement in ageing processes. mtDNA mutator mouse that harbors mtDNA polymerase  $\gamma$  mutation have been shown to develop premature ageing phenotypes and no significant changes in ROS production giving advantage to mtDNA mutations compared with ROS theory to explain ageing in this model (Chistiakov et al., 2014). This role of Lon in mtDNA quality control seems modulated by different factors given its mtDNA binding depends on the presence of protein substrate or nucleotide (Liu et al., 2004). Moreover, HeLa cells have demonstrated reduced Lon mtDNA binding and little if any mtDNA damage upon oxidative stress in Lon-depleted cells (Lu et al., 2007). Due to its multiple functions affecting both mitochondrial activities and integrity, the role of Lon in ageing and longevity can thus take different forms.

Concerning the consequences of Lon age-associated decline, Erjavec et al. (2013) have demonstrated that replicative lifespan is reduced in yeasts with Pim1/Lon deficiency. Conversely the fungal ageing model *P. anserina* has exhibited both lifespan and healthspan extension in the context of Lon overexpression (Luca and Osiewacz, 2009). In human lung fibroblasts, formation of abnormal mitochondria, i.e. enlarged and/or miniature mitochondria and mitochondria with electron dense inclusions, has resulted from selective Lon-down-regulation (Bota et al., 2005). This phenotype is reminiscent to those exhibited by aged tissues (Seo et al., 2010).

Impairment of Lon over lifespan may also be, at least in part, responsible for increased mitophagy. Jin and Youle (2013) have reported that excess of unfolded proteins in the mitochondrial matrix induced accumulation of PINK1 resulting in mitophagy and that Lon knockdown greatly increased PINK1 levels also triggering mitophagy.

The implication of Lon in mitochondrial quality control has also impact in various diseases whether or not they are age-related.

This involvement has been especially reported in cancer development due to the action of Lon in regulating mitochondrial metabolism and DNA changes (Bulteau and Bayot, 2011). Lon knockdown induced a senescence phenotype mainly due to DNA damage response in murine melanoma cells (Quirós et al., 2014). This phenotype can be bypassed through Lon overexpression underscoring a possible modulation of tumorigenic properties of cancer cells through variation of Lon levels. This result is relevant with the lesser susceptibility of Lon-heterozygous mice in developing tumors compared with control mice (Quirós et al., 2014).

In hereditary paraganglioma, *Sdh5* carries a mutation that predominantly directs it to degradation by Lon thus compromising its interaction with *Sdha* (Bezawork-Geleta et al., 2014). Hansen et al. (2008) have suggested that the decline in Lon and Clp levels noted in hereditary spastic paraplegia (SPG13) is a compensation mechanism in order to prevent rapid degradation resulting from the Hsp60 mutation responsible for this pathology. Conversely, concomitant increased Lon and ClpP levels and loss of mitochondrial Fe-S proteins have been found in the muscle creatine kinase mouse heart model for Friedreich ataxia (Guillon et al., 2009). To our knowledge, no Lon mutation has been identified to date in patients enabling the determination of a phenotype associated with a Lon defect. Nevertheless, its involvement in age-related and other diseases may consider using it as target for anti-ageing strategy or disease treatments.

#### 4.3. Implication of the mitochondrial matrix protease Clp

The best known implication of ClpP protease in protein mitochondrial quality control is probably its role in the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR). This function brings ClpP at the center of age-related processes since ageing is associated with build-up of misfolded and unfolded protein aggregates resulting in harmful effects on cell function (Sherman and Goldberg, 2001).

Similarly to the Lon protease, ClpP can be considered as a stress protein since its expression is induced in stress conditions, in eukaryotes and in prokaryotes (Gispert et al., 2013).

Unfolded and misfolded proteins can generate stress when their quantity exceeds the protein folding capacity of their cellular compartment. In order to deal with this event, some organelles have a specific signaling pathway known as unfolded protein response (UPR). mtUPR is achieved through mitochondrial-to-nucleus signal transduction induced by unfolded protein stress and resulting in the activation of genes encoding mitochondrial chaperones and proteases (Pellegrino et al., 2013).

ClpP is a pillar of mtUPR and this protein quality control activity is all the more important given that mitochondrial protein-folding environment have to cope with different challenges such as oxidative DNA and protein damage, complexity of mitochondrial biogenesis and assembly of mitochondrial complexes components encoded by both the mitochondrial and the nuclear genomes (Haynes and Ron, 2010). Haynes et al. have demonstrated that ClpXP likely initiated the mtUPR by recognizing and degrading unfolded proteins when mitochondrial chaperones capacity is overwhelmed. Attenuation of mtUPR has been noted in *C. elegans* with reduced ClpP activity (Haynes et al., 2007) while accumulation of unfolded proteins in the mitochondrial matrix of mammals upregulated ClpP and mitochondrial chaperones (Aldridge et al., 2007).

Since the loss of mitochondrial protein homeostasis has been linked with diseases and ageing, impairment of mtUPR, and thus ClpP, appear to play a central role in ageing process. Durieux et al. (2011) have shown that the mtUPR is required for electron transport chain (ETC) mediated longevity in *C. elegans*. Silencing of mtUPR components of long-lived ETC mutants abolished their extended lifespan. Mutated mouse with decreased cytochrome c

oxidase activity exhibited an increase in longevity and an induction of mtUPR (Pulliam et al., 2014). In *Drosophila melanogaster*, overexpression of mtUPR chaperones in muscle had no effect on lifespan but improved healthspan through preserved mitochondrial and muscle function (Owusu-Ansah et al., 2013). However, the relationship between longevity and mtUPR appears to be complex since lifespan of some *C. elegans* mitochondrial mutants with enhanced mtUPR was not increased or even shortened compared with the wild-type (Bennett et al., 2014). As an essential component of the mtUPR, ClpP is therefore likely to contribute to lifespan modulation.

Another mechanism of mtUPR has been described in the inter-membrane space of mammals mitochondria that involves the mitochondrial protease HTRA2 (Jovaisaite et al., 2014).

As for the role of ClpP in oxidative stress defense, studies in *Streptococcus agalactiae* under heat shock have demonstrated that ClpP prevents protein oxidation. Increased levels of oxidized DnaK, a key modulator of the heat-shock regulon, have been reported in a mutant lacking ClpP (Nair, 2003). ClpP appears to have a role in reducing protein carbonyls formation in cells lacking Lon and HslIVU (Fredriksson and Ballesteros, 2005).

ClpP activity has also been linked with mtDNA maintenance since ClpP deficiency has been associated with mtDNA accumulation with an impact on transcripts levels of mitochondrially encoded genes in ClpP null mice (Gispert et al., 2013). ClpX accumulation was also observed in this model. Since this chaperone is involved in mtDNA condensation (Kasashima et al., 2012), Gispert et al. (2013) concluded that ClpP is a modifier factor for reducing mtDNA levels and a suppressor of ClpX levels acting in mtDNA turnover. As Lon does, ClpP is involved in different activities resulting in various ways to impact ageing processes.

Indeed, due to its important place in mitochondrial quality control, ClpP has been involved in longevity and ageing. This protease has been shown to decline with age in *Arabidopsis thaliana* (Weaver et al., 1999). ClpP null mouse exhibited age-related phenotypes as well as severe growth retardation, reduction of spontaneous activity and decreased survival (Gispert et al., 2013). In contrast, ClpP deletion in *P. anserina* induced an extended lifespan without any distinct impairment. This longevity phenotype was reverted by the expression of human ClpP (Fischer et al., 2013).

Finally, ClpP mutations have been found in patients suffering from the Perrault syndrome (Jenkinson et al., 2013) and, as mentioned earlier, variations in ClpP levels have been noted in hereditary spastic paraplegia and Friedreich ataxia. As for Lon, due to its involvement in age-related and other diseases, the Clp protease may be considered as a target for disease treatments or anti-ageing strategy.

## 5. Conclusion

It is clear that the mitochondrial matrix proteases Lon and Clp play an important role in mitochondrial protein quality control and cellular homeostasis through, at least in part, the degradation of oxidatively damaged proteins. On the other hand, disruption of protein homeostasis is recognized as an important contributor to the ageing process and in the development of age-related diseases while mitochondrial dysfunction has also been implicated in ageing and degenerative diseases. Only recently, attention has been drawn on mitochondrial protein alterations and on the fate of intra-mitochondrial protein quality control in these processes. Nevertheless, specific proteins involved in energy production and/or redox regulation have been already shown to represent sensitive targets for age- and/or oxidative stress-induced modifications. The mitochondria are housing chaperones, repair and proteolytic enzymes that all participate to intra-mitochondrial

protein quality control, the function of which has been found to be affected with age. Modulation of the expression of several mitochondrial chaperones (e.g. Hsp22) and proteases such as Lon and Clp has demonstrated their implication in longevity and protection against oxidative protein modifications. Hence, the mechanisms by which alterations of mitochondrial protein maintenance systems are implicated in disruption of mitochondrial function and their implication in ageing and age-related diseases need to be further analyzed.

## Acknowledgments

The authors wish to acknowledge the EU-funded projects PROTEOMAGE, MARK-AGE and MYOAGE, under FP6 and FP7, as well as to the COST Action CM1001.

## References

- Adam, C., Picard, M., Déquard-Chablat, M., Sellem, C.H., Denmat, S.H., Contamine, V., 2012. Biological roles of the *Podospora anserina* mitochondrial Lon protease and the importance of its N-domain. *PLoS One* 7, e38138.
- Ahmed, E.K., Rogowska-Wrzesinska, A., Roepstorff, P., Bulteu, A.-L., Friguet, B., 2010. Protein modification and replicative senescence of WI-38 human embryonic fibroblasts. *Ageing Cell* 9, 252–272.
- Aldridge, J.E., Horibe, T., Hoogenraad, N.J., 2007. Discovery of genes activated by the mitochondrial unfolded protein response (mtUPR) and cognate promoter elements. *PLoS One* 2, e874.
- Bakala, H., Delaval, E., Hamelin, M., Bismuth, J., Borot-Laloi, C., Corman, B., Friguet, B., 2003. Changes in rat liver mitochondria with aging. *Eur. J. Biochem.* 270, 2295–2302.
- Baker, M.J., Palmer, C.S., Stojanovski, D., 2014. Mitochondrial protein quality control in health and disease. *Br. J. Pharmacol.* 171, 1870–1889.
- Baker, M.J., Tatsuta, T., Langer, T., 2011. Quality control of mitochondrial proteostasis. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 3, a007559.
- Baraibar, M.A., Friguet, B., 2013. Oxidative proteome modifications target specific cellular pathways during oxidative stress, cellular senescence and aging. *Exp. Gerontol.* 48, 620–625.
- Baraibar, M.A., Liu, L., Ahmed, E.K., Friguet, B., 2012. Protein oxidative damage at the crossroads of cellular senescence, aging, and age-related diseases. *Oxid. Med. Cell Longev.* 2012, 919832.
- Bayot, A., Basse, N., Lee, I., Gareil, M., Pirotte, B., Bulteu, A.-L., Friguet, B., Reboud-Ravaux, M., 2008. Towards the control of intracellular protein turnover: mitochondrial Lon protease inhibitors versus proteasome inhibitors. *Biochimie* 90, 260–269.
- Bayot, A., Gareil, M., Chavatte, L., Hamon, M.-P., L'Hermitte-Stead, C., Beaumatin, F., Priault, M., Rustin, P., Lombès, A., Friguet, B., Bulteu, A.-L., 2014. Effect of Lon protease knockdown on mitochondrial function in HeLa cells. *Biochimie* 100, 38–47.
- Bayot, A., Gareil, M., Rogowska-Wrzesinska, A., Roepstorff, P., Friguet, B., Bulteu, A.-L., 2010. Identification of novel oxidized protein substrates and physiological partners of the mitochondrial ATP-dependent Lon-like protease Pim1. *J. Biol. Chem.* 285, 11445–11457.
- Bender, T., Leidhold, C., Ruppert, T., Franken, S., Voos, W., 2010. The role of protein quality control in mitochondrial protein homeostasis under oxidative stress. *Proteomics* 10, 1426–1443.
- Bender, T., Lewrenz, I., Franken, S., Baitzel, C., Voos, W., 2011. Mitochondrial enzymes are protected from stress-induced aggregation by mitochondrial chaperones and the Pim1/LON protease. *Mol. Biol. Cell* 22, 541–554.
- Benischke, A.-S., Hemion, C., Flammer, J., Neutzner, A., 2014. Proteasome-mediated quality control of S-nitrosylated mitochondrial proteins. *Mitochondrion* 17, 182–186.
- Bennett, C.F., Vander Wende, H., Simko, M., Klum, S., Barfield, H., Choi, H., Pineda, V.V., Kaerberlein, M., 2014. Activation of the mitochondrial unfolded protein response does not predict longevity in *Caenorhabditis elegans*. *Nat. Commun.* 5, 3483.
- Bernhardt, D., Hamann, A., Osiewacz, H.D., 2014. The role of mitochondria in fungal aging. *Curr. Opin. Microbiol.* 22C, 1–7.
- Bezawork-Geleta, A., Saiyed, T., Dougan, D.A., Truscott, K.N., 2014. Mitochondrial matrix proteostasis is linked to hereditary paraganglioma: LON-mediated turnover of the human flavinylation factor SDH5 is regulated by its interaction with SDHA. *FASEB J.* 28, 1794–1804.
- Birghan, C., Mundt, E., Gorbalenya, A.E., 2000. A non-canonical Lon proteinase lacking the ATPase domain employs the ser-Lys catalytic dyad to exercise broad control over the life cycle of a double-stranded RNA virus. *EMBO J.* 19, 114–123.
- Bohovich, I., Donaldson, G., Christianson, S., Zahayko, N., Khalimonchuk, O., 2014. Stress-triggered activation of the metalloprotease Oma1 involves its C-terminal region and is important for mitochondrial stress protection in yeast. *J. Biol. Chem.* 289, 13259–13272.
- Bota, D., Van Remmen, H., Davies, K.J.A., 2002. Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress. *FEBS Lett.* 532, 103–106.
- Bota, D.A., Ngo, J.K., Davies, K.J.A., 2005. Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death. *Free Radic. Biol. Med.* 38, 665–677.
- Botos, I., Melnikov, E.E., Cherry, S., Tropea, J.E., Khalatova, A.G., Rasulova, F., Dauter, Z., Maurizi, M.R., Rotanova, T.V., Wlodawer, A., Gustchina, A., 2004. The catalytic domain of *Escherichia coli* Lon protease has a unique fold and a Ser-Lys dyad in the active site. *J. Biol. Chem.* 279, 8140–8148.
- Bratic, A., Larsson, N., 2013. The role of mitochondria in aging. *J. Clin. Invest.* 123, 951–957.
- Bulteu, A.-L., Bayot, A., 2011. Mitochondrial proteases and cancer. *Biochim. Biophys. Acta* 1807, 595–601.
- Bulteu, A.-L., Szweda, L.I., Friguet, B., 2006. Mitochondrial protein oxidation and degradation in response to oxidative stress and aging. *Exp. Gerontol.* 41, 653–657.
- Campello, S., Strappazzon, F., Cecconi, F., 2014. Mitochondrial dismissal in mammals, from protein degradation to mitophagy. *Biochim. Biophys. Acta* 1837, 451–460.
- Chaabane, W., User, S.D., El-Gazzah, M., Jaksik, R., Sajjadi, E., Rzeszowska-Wolny, J., Los, M.J., 2013. Autophagy, apoptosis, mitoptosis and necrosis: interdependence between those pathways and effects on cancer. *Arch. Immunol. Ther. Exp.* 61, 43–58.
- Chao, J.-R., Parganas, E., Boyd, K., Hong, C.Y., Opferman, J.T., Ihle, J.N., 2008. Hax1-mediated processing of HtrA2 by Parl allows survival of lymphocytes and neurons. *Nature* 452, 98–102.
- Chistiakov, D.A., Sobenin, I.A., Revin, V.V., Orekhov, A.N., Bobryshev, Y.V., 2014. Mitochondrial aging and age-related dysfunction of mitochondria. *Biomed. Res. Int.* 2014, Article ID 238463.
- Chung, C.H., Goldberg, A.L., 1981. The product of the lon (capR) gene in *Escherichia coli* is the ATP-dependent protease, protease La. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 78, 4931–4935.
- Cilenti, L., Ambivvero, C.T., Ward, N., Alnemri, E.S., Germain, D., Zervos, A.S., 2014. Inactivation of Omi/HtrA2 protease leads to the deregulation of mitochondrial Mulan E3 ubiquitin ligase and increased mitophagy. *Biochim. Biophys. Acta* 1843, 1295–1307.
- Civitarese, A.E., MacLean, P.S., Carling, S., Kerr-Bayles, L., McMillan, R.P., Pierce, A., Becker, T.C., Moro, C., Finlayson, J., Lefort, N., Newgard, C.B., Mandarino, L., Cefalu, W., Walder, K., Collier, G.R., Hulver, M.W., Smith, S.R., Ravussin, E., 2010. Regulation of skeletal muscle oxidative capacity and insulin signaling by the mitochondrial rhomboid protease PARL. *Cell Metab.* 11, 412–426.
- Delaval, E., Perichon, M., Friguet, B., 2004. Age-related impairment of mitochondrial matrix aconitase and ATP-stimulated protease in rat liver and heart. *Eur. J. Biochem.* 271, 4559–4564.
- Dukan, S., Farewell, A., Ballesteros, M., Taddei, F., Radman, M., Nyström, T., 2000. Protein oxidation in response to increased transcriptional or translational errors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 97, 5746–5749.
- Durieux, J., Wolff, S., Dillin, A., 2011. The cell non-autonomous nature of electron transport chain-mediated longevity. *Cell* 144, 79–91.
- Erjavec, N., Bayot, A., Gareil, M., Camougrand, N., Nyström, T., Friguet, B., Bulteu, A.-L., 2013. Deletion of the mitochondrial Pim1/Lon protease in yeast results in accelerated aging and impairment of the proteasome. *Free Radic. Biol. Med.* 56, 9–16.
- Farout, L., Friguet, B., 2006. Proteasome function in aging and oxidative stress: implications in protein maintenance failure. *Antioxid. Redox Signal.* 8, 205–216.
- Fischer, F., Weil, A., Hamann, A., Osiewacz, H.D., 2013. Human CLPP reverts the longevity phenotype of a fungal ClpP deletion strain. *Nat. Commun.* 4, 1397.
- Frank, M., Duvezin-Caubet, S., Koob, S., Occhipinti, A., Jagasia, R., Petcherski, A., Ruonala, M.O., Priault, M., Salin, B., Reichert, A.S., 2012. Mitophagy is triggered by mild oxidative stress in a mitochondrial fission dependent manner. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 2297–2310.
- Fredriksson, Å., Ballesteros, M., 2005. Defense against protein carbonylation by DnaK/DnaJ and proteases of the heat shock regulon. *J. Bacteriol.* 187, 4207–4213.
- Friguet, B., Bulteu, A.-L., Petropoulos, I., 2008. Mitochondrial protein quality control: implications in ageing. *Biotechnol. J.* 3, 757–764.
- Fukuda, R., Zhang, H., Kim, J., Shimoda, L., Dang, C.V., Semenza, G.L., 2007. HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells. *Cell* 129, 111–122.
- Gakh, O., Cavadini, P., Isaya, G., 2002. Mitochondrial processing peptidases. *Biochim. Biophys. Acta* 1592, 63–77.
- García-Nafria, J., Ondrovicová, G., Blagova, E., Levdivikov, V.M., Bauer, J.A., Suzuki, C.K., Kutejova, E., Wilkinson, A.J., Wilson, K.S., 2010. Structure of the catalytic domain of the human mitochondrial Lon protease: proposed relation of oligomer formation and activity. *Protein Sci.* 19, 987–999.
- Gerdes, F., Tatsuta, T., Langer, T., 2012. Mitochondrial AAA proteases – towards a molecular understanding of membrane-bound proteolytic machines. *Biochim. Biophys. Acta* 1823, 49–55.
- Gispert, S., Parganlija, D., Klinkenberg, M., Dröse, S., Wittig, I., Mittelbronn, M., Grzmil, P., Koob, S., Hamann, A., Walter, M., Büchel, F., Adler, T., Hrabě de Angelis, M., Busch, D.H., Zell, A., Reichert, A.S., Brandt, U., Osiewacz, H.D., Jendrach, M., Auburger, G., 2013. Loss of mitochondrial peptidase Clpp leads to infertility, hearing loss plus growth retardation via accumulation of CLPX, mtDNA and inflammatory factors. *Hum. Mol. Genet.* 22, 4871–4887.
- Goo, H.-G., Rhim, H., Kang, S., 2014. HtrA2/Omi influences the stability of LON protease 1 and prohibitin, proteins involved in mitochondrial homeostasis. *Exp. Cell Res.* 328, 456–465.
- Gottesman, S., Gottesman, M., Shaw, J., Pearson, M., 1981. Protein degradation in *E. coli*: the lon mutation and bacteriophage lambda N and cII protein stability. *Cell* 24, 225–233.

- Guillon, B., Bulteau, A.-L., Wattenhofer-Donzé, M., Schmucker, S., Friguet, B., Puccio, H., Drapier, J.C., Bouton, C., 2009. Frataxin deficiency causes upregulation of mitochondrial Lon and ClpP proteases and severe loss of mitochondrial Fe-S proteins. *FEBS J.* 276, 1036–1047.
- Gur, E., Sauer, R.T., 2008. Recognition of misfolded proteins by Lon, a AAA(+) protease. *Genes Dev.* 22, 2267–2277.
- Gur, E., Sauer, R.T., 2009. Degrons in protein substrates program the speed and operating efficiency of the AAA+ Lon proteolytic machine. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 106, 18503–18508.
- Hammerling, B.C., Gustafsson, Å.B., 2014. Mitochondrial quality control in the myocardium: cooperation between protein degradation and mitophagy. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 75, 122–130.
- Hansen, J., Corydon, T.J., Palmfeldt, J., Dürr, A., Fontaine, B., Nielsen, M.N., Christensen, J.H., Gregersen, N., Bross, P., 2008. Decreased expression of the mitochondrial matrix proteases Lon and ClpP in cells from a patient with hereditary spastic paraplegia (SPG13). *Neuroscience* 153, 474–482.
- Haynes, C.M., Petrova, K., Benedetti, C., Yang, Y., Ron, D., 2007. ClpP mediates activation of a mitochondrial unfolded protein response in *C. elegans*. *Dev. Cell* 13, 467–480.
- Haynes, C.M., Ron, D., 2010. The mitochondrial UPR – protecting organelle protein homeostasis. *J. Cell Sci.* 123, 3849–3855.
- Heo, J., Livnat-Ievanon, N., Taylor, E.B., Jones, K.T., Ring, J., Xie, J., Brodsky, J.L., Madeo, F., Gygi, S.P., Ashrafi, K., Glickman, M.H., Rutter, J., 2010. A stress-responsive system for mitochondrial protein degradation. *Mol. Cell* 40, 465–480.
- Hill, R.B., Pellegrini, L., 2010. The PARL family of mitochondrial rhomboid proteases. *Semin. Cell Dev. Biol.* 21, 582–592.
- Hill, S., Van Remmen, H., 2014. Mitochondrial stress signaling in longevity: a new role for mitochondrial function in aging. *Redox Biol.* 2, 936–944.
- Hinnerwisch, J., Fenton, W.A., Furtak, K.J., Farr, G.W., Horwich, A.L., 2005. Loops in the central channel of ClpA chaperone mediate protein binding, unfolding, and translocation. *Cell* 121, 1029–1041.
- Hoshino, A., Okawa, Y., Ariyoshi, M., Kaimoto, S., Uchihashi, M., Fukai, K., Iwai-Kanai, E., Matoba, S., 2014. Oxidative post-translational modifications develop LONP1 dysfunction in pressure overload heart failure. *Circ. Heart Fail.* 7, 500–509.
- Houtkooper, R.H., Mouchiroud, L., Ryu, D., Moulann, N., Katsyuba, E., Knott, G., Williams, R.W., Auwerx, J., 2013. Mitochondrial protein imbalance as a conserved longevity mechanism. *Nature* 497, 451–457.
- Ishii, Y., Amano, F., 2001. Regulation of SulA cleavage by Lon protease by the C-terminal amino acid of SulA, histidine. *Biochem. J.* 358, 473–480.
- Jenkinson, E.M., Rehman, A.U., Walsh, T., Clayton-Smith, J., Lee, K., Morell, R.J., Drummond, M.C., Khan, S.N., Naeem, M.A., Rauf, B., Billington, N., Schultz, J.M., Urquhart, J.E., Lee, M.K., Berry, A., Hanley, N.A., Mehta, S., Cilliers, D., Clayton, P.E., Kingston, H., Smith, M.J., Warner, T.T., University of Washington Center for Mendelian Genomics, Black, G.C., Trump, D., Davis, J.R., Ahmad, W., Leal, S.M., Riazuddin, S., King, M.C., Friedman, T.B., Newman, W.G., 2013. Perrault syndrome is caused by recessive mutations in CLPP, encoding a mitochondrial ATP-dependent chambered protease. *Am. J. Hum. Genet.* 92, 605–613.
- Jennings, L.D., Lun, D.S., Médard, M., Licht, S., 2008. ClpP hydrolyzes a protein substrate processively in the absence of the ClpA ATPase: mechanistic studies of ATP-independent proteolysis. *Biochemistry* 47, 11536–11546.
- Jensen, M.B., Jasper, H., 2014. Mitochondrial proteostasis in the control of aging and longevity. *Cell Metab.* 20, 214–225.
- Jin, S., Youle, R., 2013. The accumulation of misfolded proteins in the mitochondrial matrix is sensed by PINK1 to induce PARK2/Parkin-mediated mitophagy of polarized mitochondria. *Autophagy* 9, 1750–1757.
- Jovaisaite, V., Mouchiroud, L., Auwerx, J., 2014. The mitochondrial unfolded protein response, a conserved stress response pathway with implications in health and disease. *J. Exp. Biol.* 217, 137–143.
- Kasashima, K., Sumitani, M., Endo, H., 2012. Maintenance of mitochondrial genome distribution by mitochondrial AAA+ protein ClpX. *Exp. Cell Res.* 318, 2335–2343.
- Kaser, M., Kambacheld, M., Kisters-Woike, B., Langer, T., 2003. Oma1, a novel membrane-bound metallopeptidase in mitochondria with activities overlapping with the m-AAA protease. *J. Biol. Chem.* 278, 46414–46423.
- Kondadi, A.K., Wang, S., Montagner, S., Kladt, N., Korwitz, A., Martinelli, P., Herholz, D., Baker, M.J., Schauss, A.C., Langer, T., Rugarli, E.L., 2014. Loss of the m-AAA protease subunit AFG 3L2 causes mitochondrial transport defects and tau hyperphosphorylation. *EMBO J.* 33, 1011–1027.
- Koppen, M., Langer, T., 2007. Protein degradation within mitochondria: versatile activities of AAA proteases and other peptidases. *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 42, 221–242.
- Kotiadis, V.N., Duchon, M.R., Osellame, L.D., 2014. Mitochondrial quality control and communications with the nucleus are important in maintaining mitochondrial function and cell health. *Biochim. Biophys. Acta* 1840, 1254–1265.
- Kress, W., Maglica, Z., Weber-Ban, E., 2009. Clp chaperone-proteases: structure and function. *Res. Microbiol.* 160, 618–628.
- Kwong, J.Q., Beal, M.F., Manfredi, G., 2006. The role of mitochondria in inherited neurodegenerative diseases. *J. Neurochem.* 97, 1659–1675.
- Lee, C., Klopp, R., Weindrich, R., Prolla, T., 1999. Gene expression profile of aging and its retardation by caloric restriction. *Science* 285, 1390–1393.
- Lee, I., Suzuki, C.K., 2008. Functional mechanics of the ATP-dependent Lon protease – lessons from endogenous protein and synthetic peptide substrates. *Biochim. Biophys. Acta* 1784, 727–735.
- Lionaki, E., Tavernarakis, N., 2013. Oxidative stress and mitochondrial protein quality control in aging. *J. Proteomics* 92, 181–194.
- Liu, T., Lu, B., Lee, I., Ondrovicová, G., Kutejová, E., Suzuki, C.K., 2004. DNA and RNA binding by the mitochondrial Lon protease is regulated by nucleotide and protein substrate. *J. Biol. Chem.* 279, 13902–13910.
- Lu, B., Lee, J., Nie, X., Li, M., Morozov, Y., Venkatesh, S., Bogenhagen, D.F., Temiakov, D., Suzuki, C.K., 2013. Phosphorylation of human TFAM in mitochondria impairs DNA binding and promotes degradation by the AAA+ Lon protease. *Mol. Cell* 49, 121–132.
- Lu, B., Yadav, S., Shah, P.G., Liu, T., Tian, B., Puksza, S., Villaluna, N., Kutejová, E., Newlon, C.S., Santos, J.H., Suzuki, C.K., 2007. Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance. *J. Biol. Chem.* 282, 17363–17374.
- Luce, K., Osiewacz, H.D., 2009. Increasing organismal healthspan by enhancing mitochondrial protein quality control. *Nat. Cell Biol.* 11, 852–858.
- Luce, K., Weil, A., Osiewacz, H.D., 2010. Mitochondrial protein quality control systems in aging and disease. *Adv. Exp. Med. Biol.* 694, 108–125.
- Luciakova, K., Sokolikova, B., Chloupkova, M., Nelson, B., 1999. Enhanced mitochondrial biogenesis is associated with increased expression of the mitochondrial ATP-dependent Lon protease. *FEBS Lett.* 444, 186–188.
- Matsushima, Y., Kaguni, L.S., 2012. Matrix proteases in mitochondrial DNA function. *Biochim. Biophys. Acta* 1819, 1080–1087.
- Morrow, G., Samson, M., Michaud, S., Tanguay, R.M., 2004a. Overexpression of the small mitochondrial Hsp22 extends *Drosophila* life span and increases resistance to oxidative stress. *FASEB J.* 18, 598–599.
- Morrow, G., Battistini, S., Zhang, P., Tanguay, R.M., 2004b. Decreased lifespan in the absence of expression of the mitochondrial small heat shock protein Hsp22 in *Drosophila*. *J. Biol. Chem.* 279, 43382–43385.
- Nair, S., 2003. Role of the *Streptococcus agalactiae* ClpP serine protease in heat-induced stress defence and growth arrest. *Microbiology* 149, 407–417.
- Ngo, J.K., Davies, K.J.A., 2009. Mitochondrial Lon protease is a human stress protein. *Free Radic. Biol. Med.* 46, 1042–1048.
- Ngo, J.K., Pomatto, L.C.D., Bota, D.A., Koop, A.L., Davies, K.J.A., 2011. Impairment of lon-induced protection against the accumulation of oxidized proteins in senescent wi-38 fibroblasts. *J. Gerontol. A* 66, 1178–1185.
- Ngo, J.K., Pomatto, L.C.D., Davies, K.J.A., 2013. Upregulation of the mitochondrial Lon protease allows adaptation to acute oxidative stress but dysregulation is associated with chronic stress, disease, and aging. *Redox Biol.* 1, 258–264.
- Nolden, M., Ehes, S., Koppen, M., Bernacchia, A., Rugarli, E.L., Langer, T., 2005. The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria. *Cell* 123, 277–289.
- Nyström, T., 2005. Role of oxidative carbonylation in protein quality control and senescence. *EMBO J.* 24, 1311–1317.
- Osiewacz, H.D., Bernhardt, D., 2013. Mitochondrial quality control: impact on aging and lifespan. *Gerontology* 59, 413–420.
- Osman, C., Wilmes, C., Tatsuta, T., Langer, T., 2007. Prohibitins interact genetically with Atp23, a novel processing peptidase and chaperone for the F1Fo-ATP synthase. *Mol. Biol. Cell* 18, 627–635.
- Owusu-Ansah, E., Song, W., Perrimon, N., 2013. Muscle mitohormesis promotes longevity via systemic repression of insulin signaling. *Cell* 155, 699–712.
- Pellegrino, M.W., Nargund, A.M., Haynes, C.M., 2013. Signaling the mitochondrial unfolded protein response. *Biochim. Biophys. Acta* 1833, 410–416.
- Polgar, L., 2005. The catalytic triad of serine peptidases. *Cell. Mol. Life Sci.* 62, 2161–2172.
- Potting, C., Wilmes, C., Engmann, T., Osman, C., Langer, T., 2010. Regulation of mitochondrial phospholipids by Ups1/PRELI-like proteins depends on proteolysis and Mdm35. *EMBO J.* 29, 2888–2898.
- Pulliam, D.A., Deepa, S.S., Liu, Y., Hill, S., Lin, A.-L., Bhattacharya, A., Shi, Y., Sloane, L., Viscomi, C., Zeviani, M., Van Remmen, H., 2014. Complex IV-deficient Surf1(–/–) mice initiate mitochondrial stress responses. *Biochem. J.* 462, 359–371.
- Quiros, P.M., Español, Y., Acín-Pérez, R., Rodríguez, F., Bárcena, C., Watanabe, K., Calvo, E., Loureiro, M., Fernández-García, M.S., Fueyo, A., Vázquez, J., Enríquez, J.A., López-Ortín, C., 2014. ATP-dependent Lon protease controls tumor bioenergetics by reprogramming mitochondrial activity. *Cell Rep.* 8, 542–556.
- Raisner, R.M., Madhani, H.D., 2008. Genomewide screen for negative regulators of siruoin activity in *Saccharomyces cerevisiae* reveals 40 loci and links to metabolism. *Genetics* 179, 1933–1944.
- Ray, P.D., Huang, B.-W., Tsuji, Y., 2012. Reactive oxygen species (ROS) homeostasis and redox regulation in cellular signaling. *Cell. Signal.* 24, 981–990.
- Redmann, M., Dodson, M., Boyer-Guittaut, M., Darley-Usmar, V., Zhang, J., 2014. Mitophagy mechanisms and role in human diseases. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 53, 127–133.
- Richard, V.R., Leonov, A., Beach, A., Burstein, M.T., Koupaki, O., Gomez-Perez, A., Levy, S., Pluska, L., Mattie, S., Rafesh, R., Iouk, T., Sheibani, S., Greenwood, M., Vali, H., Titorenko, V.I., 2013. Macromitophagy is a longevity assurance process that in chronologically aging yeast limited in calorie supply sustains functional mitochondria and maintains cellular lipid homeostasis. *Aging (Milano)* 5, 234–269.
- Rotanova, T.V., Melnikov, E.E., Khalatova, A.G., Makhovskaya, O.V., Botos, I., Wlodawer, A., Gustchina, A., 2004. Classification of ATP-dependent proteases Lon and comparison of the active sites of their proteolytic domains. *Eur. J. Biochem.* 271, 4865–4871.
- Roudiak, S.G., Shrader, T.E., 1998. Functional role of the N-terminal region of the Lon protease from *Mycobacterium smegmatis*. *Biochemistry* 37, 11255–11263.
- Rudyak, S.G., Brenowitz, M., Shrader, T.E., 2001. Mg<sup>2+</sup>-linked oligomerization modulates the catalytic activity of the Lon (La) protease from *Mycobacterium smegmatis*. *Biochemistry* 40, 9317–9323.

- Seo, A.Y., Joseph, A.-M., Dutta, D., Hwang, J.C.Y., Aris, J.P., Leeuwenburgh, C., 2010. New insights into the role of mitochondria in aging: mitochondrial dynamics and more. *J. Cell Sci.* 123, 2533–2542.
- Sherman, M., Goldberg, A., 2001. Cellular defenses against unfolded proteins: a cell biologist thinks about neurodegenerative diseases. *Neuron* 29, 15–32.
- Shetty, R.A., Ikonne, U.S., Forster, M.J., Sumien, N., 2014. Coenzyme Q10 and  $\alpha$ -tocopherol reversed age-associated functional impairments in mice. *Exp. Gerontol.* 58C, 208–218.
- Sickmann, A., Reinders, J., Wagner, Y., Joppich, C., Zahedi, R., Meyer, H.E., Schönfisch, B., Perschil, I., Chacinska, A., Guiard, B., Rehling, P., Pfanner, N., Meisinger, C., 2003. The proteome of *Saccharomyces cerevisiae* mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 100, 13207–13212.
- Soubannier, V., Rippstein, P., Kaufman, B.A., Shoubridge, E.A., McBride, H.M., 2012. Reconstitution of mitochondria derived vesicle formation demonstrates selective enrichment of oxidized cargo. *PLoS One* 7, e52830.
- Stahlberg, H., Kutejová, E., Suda, K., Wolpensinger, B., Lustig, A., Schatz, G., Engel, A., Suzuki, C.K., 1999. Mitochondrial Lon of *Saccharomyces cerevisiae* is a ring-shaped protease with seven flexible subunits. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 96, 6787–6790.
- Taylor, E.B., Rutter, J., 2011. Mitochondrial quality control by the ubiquitin-proteasome system. *Biochem. Soc. Trans.* 39, 1509–1513.
- Thomas, R.E., Andrews, L.A., Burman, J.L., Lin, W.-Y., Pallanck, L.J., 2014. PINK1-Parkin pathway activity is regulated by degradation of PINK1 in the mitochondrial matrix. *PLoS Genet.* 10, e1004279.
- Ugarte, N., Petropoulos, I., Friguet, B., 2010. Oxidized mitochondrial protein degradation and repair in aging and oxidative stress. *Antioxid. Redox Signal.* 13, 539–549.
- Van Dyck, L., Van Pearce, D.A., Sherman, F., 1994. PIM1 encodes a mitochondrial ATP-dependent protease that is required for mitochondrial function in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *J. Biol. Chem.* 269, 238–242.
- Van Dyck, L., Neupert, W., Langer, T., 1998. The ATP-dependent PIM1 protease is required for the expression of intron-containing genes in mitochondria. *Genes Dev.* 12, 1515–1524.
- Vande Walle, L., Lamkanfi, M., Vandenabeele, P., 2008. The mitochondrial serine protease Htra2/Omi: an overview. *Cell Death Differ.* 15, 453–460.
- Vieux, E.F., Wohlever, M.L., Chen, J.Z., Sauer, R.T., Baker, T.A., 2013. Distinct quaternary structures of the AAA+ Lon protease control substrate degradation. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 110, E2002–E2008.
- VonJanowsky, B., Knapp, K., Major, T., Krayl, M., Guiard, B., Voos, W., 2005. Structural properties of substrate proteins determine their proteolysis by the mitochondrial AAA+ protease Pim1. *Biol. Chem.* 386, 1307–1317.
- Wang, N., Gottesman, S., Willingham, M., Gottesman, M., Maurizi, M.R., 1993. A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease. *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90, 11247–11251.
- Wang, C.-H., Wu, S.-B., Wu, Y.-T., Wei, Y.-H., 2013. Oxidative stress response elicited by mitochondrial dysfunction: implication in the pathophysiology of aging. *Exp. Biol. Med.* 238, 450–460.
- Wang, J., Hartling, J.A., Flanagan, J.M., 1997. The structure of ClpP at 2.3 Å resolution suggests a model for ATP-dependent proteolysis. *Cell* 91, 447–456.
- Weaver, L., Froehlich, J., Amasino, R., 1999. Chloroplast-targeted ERD1 protein declines but its mRNA increases during senescence in Arabidopsis. *Plant Physiol.* 119, 1209–1216.
- Weil, A., Luce, K., Dröse, S., 2011. Unmasking a temperature-dependent effect of the *P. anserina* i-AAA protease on aging and development. *Cell Cycle* 10, 4280–4290.
- Wiedemann, N., Frazier, A.E., Pfanner, N., 2004. The protein import machinery of mitochondria. *J. Biol. Chem.* 279, 14473–14476.
- Wohlever, M.L., Baker, T.A., Sauer, R.T., 2014. Roles of the N domain of the AAA+ Lon protease in substrate recognition, allosteric regulation and chaperone activity. *Mol. Microbiol.* 91, 66–78.
- Yaguchi, T., Aida, S., Kaul, S.C., Wadhwa, R., 2007. Involvement of mortalin in cellular senescence from the perspective of its mitochondrial import, chaperone, and oxidative stress management functions. *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 1100, 306–311.
- Yu, A.Y.H., Houry, W.A., 2007. ClpP: a distinctive family of cylindrical energy-dependent serine proteases. *FEBS Lett.* 581, 3749–3757.

# **Bibliographie générale**



- Al-Furoukh, N., A. Ianni, H. Nolte, S. Holper, M. Kruger, S. Wanrooij, and T. Braun. 2015. 'ClpX stimulates the mitochondrial unfolded protein response (UPRmt) in mammalian cells', *Biochim Biophys Acta*, 1853: 2580-91.
- Ali, S., and G. P. McStay. 2018. 'Regulation of Mitochondrial Dynamics by Proteolytic Processing and Protein Turnover', *Antioxidants (Basel)*, 7.
- Allen, J. F. 2015. 'Why chloroplasts and mitochondria retain their own genomes and genetic systems: Colocation for redox regulation of gene expression', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 112: 10231-8.
- Altman, B. J., Z. E. Stine, and C. V. Dang. 2016. 'From Krebs to clinic: glutamine metabolism to cancer therapy', *Nat Rev Cancer*, 16: 619-34.
- Ambivero, C. T., L. Cilenti, S. Main, and A. S. Zervos. 2014. 'Mulan E3 ubiquitin ligase interacts with multiple E2 conjugating enzymes and participates in mitophagy by recruiting GABARAP', *Cell Signal*, 26: 2921-9.
- Andreyev, A.Y.; Kushnareva, Y.E.; Starkov, A.A. 2005. 'Mitochondrial metabolism of reactive oxygen species', *Biochemistry (Mosc.)*, 70: 200-14.
- Anwar, M. R., A. Saldana-Caboverde, S. Garcia, and F. Diaz. 2018. 'The Organization of Mitochondrial Supercomplexes is Modulated by Oxidative Stress In Vivo in Mouse Models of Mitochondrial Encephalopathy', *Int J Mol Sci*, 19.
- Aon, M. A., B. A. Stanley, V. Sivakumaran, J. M. Kembro, B. O'Rourke, N. Paolocci, and S. Cortassa. 2012. 'Glutathione/thioredoxin systems modulate mitochondrial H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> emission: an experimental-computational study', *J Gen Physiol*, 139: 479-91.
- Arduino, D. M., and F. Perocchi. 2018. 'Pharmacological modulation of mitochondrial calcium homeostasis', *J Physiol*.
- Artal-Sanz, M., and N. Tavernarakis. 2009. 'Prohibitin and mitochondrial biology', *Trends Endocrinol Metab*, 20: 394-401.
- Azadmanesh, J., and G. E. O. Borgstahl. 2018. 'A Review of the Catalytic Mechanism of Human Manganese Superoxide Dismutase', *Antioxidants (Basel)*, 7.
- Bakala, Hilaire, Evelyne Delaval, Maud Hamelin, Jeanne Bismuth, Caroline Borot-Laloi, Bruno Corman, and Bertrand Friguet. 2003. 'Changes in rat liver mitochondria with aging', *European Journal of Biochemistry*, 270: 2295-302.
- Baker, M.J.; Palmer, C.S.; Stojanovski, D. 2014. 'Mitochondrial protein quality control in health and disease', *British Journal of Pharmacology*, 171.

- Baqri, R. M., A. V. Pietron, R. H. Gokhale, B. A. Turner, L. S. Kaguni, A. W. Shingleton, S. Kunes, and K. E. Miller. 2014. 'Mitochondrial chaperone TRAP1 activates the mitochondrial UPR and extends healthspan in *Drosophila*', *Mech Ageing Dev*, 141-142: 35-45.
- Barbour, J. A., and N. Turner. 2014. 'Mitochondrial stress signaling promotes cellular adaptations', *Int J Cell Biol*, 2014: 156020.
- Batandier, C., B. Guigas, D. Demaille, M. Y. El-Mir, E. Fontaine, M. Rigoulet, and X. M. Leverve. 2006. 'The ROS production induced by a reverse-electron flux at respiratory-chain complex 1 is hampered by metformin', *J Bioenerg Biomembr*, 38: 33-42.
- Bayot, A., M. Gareil, L. Chavatte, M. P. Hamon, C. L'Hermitte-Stead, F. Beaumatin, M. Priault, P. Rustin, A. Lombes, B. Friguet, and A. L. Bulteau. 2014. 'Effect of Lon protease knockdown on mitochondrial function in HeLa cells', *Biochimie*, 100: 38-47.
- Bayot, A., M. Gareil, A. Rogowska-Wrzesinska, P. Roepstorff, B. Friguet, and A. L. Bulteau. 2010. 'Identification of novel oxidized protein substrates and physiological partners of the mitochondrial ATP-dependent Lon-like protease Pim1', *J Biol Chem*, 285: 11445-57.
- Beck, R.; Dejeans, N.; Glorieux, C.; Pedrosa, R.C.; Vasquez, D.; Valderrama, J.A.; Calderon, P.B.; Verrax, J. 2001. 'Molecular Chaperone Hsp90 as a Target for Oxidant-Based Anticancer Therapies', *Current medical chemistry*, 18: 2816-25.
- Bender A, Hajieva P, Moosmann B. 2008. 'Adaptive antioxidant methionine accumulation in respiratory chain complexes explains the use of a deviant genetic code in mitochondria', *PNAS*.
- Benischke, A. S., C. Hemion, J. Flammer, and A. Neutzner. 2014. 'Proteasome-mediated quality control of S-nitrosylated mitochondrial proteins', *Mitochondrion*, 17: 182-6.
- Bernard, C. 1865. *Introduction à la médecine expérimentale*.  
 ———. 1878. *Leçons sur les phénomènes de la vie communs aux animaux et aux plantes*.
- Bezawork-Geleta, A., E. J. Brodie, D. A. Dougan, and K. N. Truscott. 2015. 'LON is the master protease that protects against protein aggregation in human mitochondria through direct degradation of misfolded proteins', *Sci Rep*, 5: 17397.
- Bjorkholm, P., A. M. Ernst, E. Hagstrom, and S. G. Andersson. 2017. 'Why mitochondria need a genome revisited', *FEBS Lett*, 591: 65-75.
- Bleier, L., and S. Drose. 2013. 'Superoxide generation by complex III: from mechanistic rationales to functional consequences', *Biochim Biophys Acta*, 1827: 1320-31.

- Bohovyeh, I., G. Donaldson, S. Christianson, N. Zahayko, and O. Khalimonchuk. 2014. 'Stress-triggered activation of the metalloprotease Oma1 involves its C-terminal region and is important for mitochondrial stress protection in yeast', *J Biol Chem*, 289: 13259-72.
- Bonham-Carter, O., J. Pedersen, and D. Bastola. 2014. 'A content and structural assessment of oxidative motifs across a diverse set of life forms', *Comput Biol Med*, 53: 179-89.
- Boos, F., M. Wollin, and J. M. Herrmann. 2016. 'Methionine on the rise: how mitochondria changed their codon usage', *EMBO J*, 35: 2066-67.
- Bota, D. A., and K. J. Davies. 2002. 'Lon protease preferentially degrades oxidized mitochondrial aconitase by an ATP-stimulated mechanism', *Nat Cell Biol*, 4: 674-80.
- Bota, D. A., and K. J. Davies. 2016. 'Mitochondrial Lon protease in human disease and aging: Including an etiologic classification of Lon-related diseases and disorders', *Free Radic Biol Med*, 100: 188-98.
- Bota, D. A., J. K. Ngo, and K. J. Davies. 2005. 'Downregulation of the human Lon protease impairs mitochondrial structure and function and causes cell death', *Free Radic Biol Med*, 38: 665-77.
- Bota, D.A.; Van Remmen, H.; Davies, K. 2002. 'Modulation of Lon protease activity and aconitase turnover during aging and oxidative stress', *FEBS Letters*, 532: 103-6.
- Bragoszewski, P., M. Turek, and A. Chacinska. 2017. 'Control of mitochondrial biogenesis and function by the ubiquitin-proteasome system', *Open Biol*, 7
- Brand, M. D. 2016. 'Mitochondrial generation of superoxide and hydrogen peroxide as the source of mitochondrial redox signaling', *Free Radic Biol Med*, 100: 14-31.
- Bravo-Sagua, R., V. Parra, C. Lopez-Crisosto, P. Diaz, A. F. Quest, and S. Lavandero. 2017. 'Calcium Transport and Signaling in Mitochondria', *Compr Physiol*, 7: 623-34.
- Buetler, T.M.; Krauskopf, A.; Rugg, U.T. 2004. 'Role of Superoxide as a Signaling Molecule', *News in physiological sciences*, 19: 120-3.
- Bulteau, A. L., L. I. Szweda, and B. Friguet. 2006. 'Mitochondrial protein oxidation and degradation in response to oxidative stress and aging', *Exp Gerontol*, 41: 653-7.
- Bulteau, A. L., P. Verbeke, I. Petropoulos, A. F. Chaffotte, and B. Friguet. 2001. 'Proteasome inhibition in glyoxal-treated fibroblasts and resistance of glycated glucose-6-phosphate dehydrogenase to 20 S proteasome degradation in vitro', *J Biol Chem*, 276: 45662-8.
- Byun, K., Y. Yoo, M. Son, J. Lee, G. B. Jeong, Y. M. Park, G. H. Salekdeh, and B. Lee. 2017. 'Advanced glycation end-products produced systemically and by macrophages: A common contributor to inflammation and degenerative diseases', *Pharmacol Ther*, 177: 44-55.

- Cannon, W.B. 1929. 'Organisation for physiological homeostasis', *Physiological review*, 9: 399-431.
- Carletti, J. V., A. Correia-Branco, C. R. Silva, N. Andrade, L. O. P. Silva, and F. Martel. 2018. 'The effect of oxidative stress induced by tert-butylhydroperoxide under distinct folic acid conditions: An in vitro study using cultured human trophoblast-derived cells', *Reprod Toxicol*, 77: 33-42.
- Carrard, Géraldine, Marc Dieu, Martine Raes, Olivier Toussaint, and Bertrand Friguet. 2003. 'Impact of ageing on proteasome structure and function in human lymphocytes', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 35: 728-39.
- Carrard, G.; Bulteau, A.L.; Petropoulos, I.; Friguet, B. 2002. 'Impairment of proteasome structure and function in aging', *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology*, 34: 1461-74.
- Castro, J. P., T. Jung, T. Grune, and W. Siems. 2017. '4-Hydroxynonenal (HNE) modified proteins in metabolic diseases', *Free Radic Biol Med*, 111: 309-15.
- Cattaruzza, M., and M. Hecker. 2008. 'Protein carbonylation and decarboxylation: a new twist to the complex response of vascular cells to oxidative stress', *Circ Res*, 102: 273-4.
- Cedikova, M.; Pitule, P.; Kripnerova, M.; Markova, M.; Kuncova, J. 2016. 'Multiple Roles of Mitochondria in Aging Processes', *physiological research*, 65 (suppl. 5): 519-31.
- Cervellati, Rinaldo, and Emanuela Greco. 2016. 'In vitro Antioxidant Activity of Ubiquinone and Ubiquinol, Compared to Vitamin E', *Helvetica Chimica Acta*, 99: 41-45.
- Chao, J. R., E. Parganas, K. Boyd, C. Y. Hong, J. T. Opferman, and J. N. Ihle. 2008. 'Hax1-mediated processing of HtrA2 by Parl allows survival of lymphocytes and neurons', *Nature*, 452: 98-102.
- Chen, Q., E. J. Vazquez, S. Moghaddas, C. L. Hoppel, and E. J. Lesnefsky. 2003. 'Production of reactive oxygen species by mitochondria: central role of complex III', *J Biol Chem*, 278: 36027-31.
- Cheng, C. W., C. Y. Kuo, C. C. Fan, W. C. Fang, S. S. Jiang, Y. K. Lo, T. Y. Wang, M. C. Kao, and A. Y. Lee. 2013. 'Overexpression of Lon contributes to survival and aggressive phenotype of cancer cells through mitochondrial complex I-mediated generation of reactive oxygen species', *Cell Death Dis*, 4: e681.
- Chistiakov, D.A.; Sobenin, I.A.; Revin, V.V.; Orekhov A.N.; Bobryshev, Y.V. 2014. 'Mitochondrial Aging and Age-Related Dysfunction of mitochondria', *BioMed Research International*, 2014: 1-7.

- Civitarese, A. E., P. S. MacLean, S. Carling, L. Kerr-Bayles, R. P. McMillan, A. Pierce, T. C. Becker, C. Moro, J. Finlayson, N. Lefort, C. B. Newgard, L. Mandarino, W. Cefalu, K. Walder, G. R. Collier, M. W. Hulver, S. R. Smith, and E. Ravussin. 2010. 'Regulation of skeletal muscle oxidative capacity and insulin signaling by the mitochondrial rhomboid protease PARL', *Cell Metab*, 11: 412-26.
- Conrad, M., M. Schneider, A. Seiler, and G. W. Bornkamm. 2007. 'Physiological role of phospholipid hydroperoxide glutathione peroxidase in mammals', *Biol Chem*, 388: 1019-25.
- Cooper, S. J. 2008. 'From Claude Bernard to Walter Cannon. Emergence of the concept of homeostasis', *Appetite*, 51: 419-27.
- Crewe, C., C. Schafer, I. Lee, M. Kinter, and L. I. Szweda. 2017. 'Regulation of Pyruvate Dehydrogenase Kinase 4 in the Heart through Degradation by the Lon Protease in Response to Mitochondrial Substrate Availability', *J Biol Chem*, 292: 305-12.
- Davies, K. J. 2016. 'Adaptive homeostasis', *Mol Aspects Med*, 49: 1-7.
- de Alteriis, E., F. Carteni, P. Parascandola, J. Serpa, and S. Mazzoleni. 2018. 'Revisiting the Crabtree/Warburg effect in a dynamic perspective: a fitness advantage against sugar-induced cell death', *Cell Cycle*: 1-43.
- Del Carpio, A. 2014. 'The good, the bad, and the HeLa ', *The Berkeley Science Review*: 14-17.
- Delaval, E., M. Perichon, and B. Friguet. 2004. 'Age-related impairment of mitochondrial matrix aconitase and ATP-stimulated protease in rat liver and heart', *Eur J Biochem*, 271: 4559-64.
- Delwing-de Lima, D., M. Frohlich, L. Dalmedico, J. G. Aurelio, D. Delwing-Dal Magro, E. M. Pereira, and A. T. Wyse. 2017. 'Galactose alters markers of oxidative stress and acetylcholinesterase activity in the cerebrum of rats: protective role of antioxidants', *Metab Brain Dis*, 32: 359-68.
- Demine, S., N. Reddy, P. Renard, M. Raes, and T. Arnould. 2014. 'Unraveling biochemical pathways affected by mitochondrial dysfunctions using metabolomic approaches', *Metabolites*, 4: 831-78.
- Desler, C., T. L. Hansen, J. B. Frederiksen, M. L. Marcker, K. K. Singh, and L. Juel Rasmussen. 2012. 'Is There a Link between Mitochondrial Reserve Respiratory Capacity and Aging?', *J Aging Res*, 2012: 192503.
- Detienne, G., W. De Haes, L. Mergan, S. L. Edwards, L. Temmerman, and S. Van Bael. 2018. 'Beyond ROS clearance: Peroxiredoxins in stress signaling and aging', *Ageing Res Rev*, 44: 33-48.

- Ding, Q; Zhu, H. 2015. 'Alteration of Proteasome System in Aging and Aging-Associated Disorders', *International Journal of Drug Development and Research*, 7: 27-30.
- Distler, A. M., J. Kerner, and C. L. Hoppel. 2008. 'Proteomics of mitochondrial inner and outer membranes', *Proteomics*, 8: 4066-82.
- Dudek, J., P. Rehling, and M. van der Laan. 2013. 'Mitochondrial protein import: common principles and physiological networks', *Biochim Biophys Acta*, 1833: 274-85.
- Edmondson, D.E. 2014. 'Hydrogen Peroxide Produced by Mitochondrial Monoamine Oxidase Catalysis, biological implications.pdf', *Current Pharmaceutical Design*, 20: 155-60.
- Erjavec, N., A. Bayot, M. Gareil, N. Camougrand, T. Nystrom, B. Friguet, and A. L. Bulteau. 2013. 'Deletion of the mitochondrial Pim1/Lon protease in yeast results in accelerated aging and impairment of the proteasome', *Free Radic Biol Med*, 56: 9-16.
- Forman, H.J. 2008. 'Hydrogen peroxide, The good the bad and the ugly'.
- Fredriksson, A., M. Ballesteros, S. Dukan, and T. Nystrom. 2005. 'Defense against protein carbonylation by DnaK/DnaJ and proteases of the heat shock regulon', *J Bacteriol*, 187: 4207-13.
- Friguet, B., A. L. Bulteau, and I. Petropoulos. 2008. 'Mitochondrial protein quality control: implications in ageing', *Biotechnol J*, 3: 757-64.
- Friguet, Bertrand, and Luke I. Szwed. 1997. 'Inhibition of the multicatalytic proteinase (proteasome) by 4-hydroxy-2-nonenal cross-linked protein', *FEBS Letters*, 405: 21-25.
- Friguet, B.; Bulteau, A.L.; Chondrogianni, N.; Conconi, M.; Petropoulos, I. 2000. 'Protein degradation by the proteasome and its implications in aging', *Annals New York Academy of Sciences*, 908: 143-54.
- Friguet, B.; Stadtman, E.R.; Szwed, L. 1994. 'Modification of glucose-6-phosphate dehydrogenase by 4-hydroxy-2-nonenal. Formation of cross-linked protein that inhibits the multicatalytic protease', *The Journal of Biological Chemistry*, 269.
- Fukuda, R., H. Zhang, J. W. Kim, L. Shimoda, C. V. Dang, and G. L. Semenza. 2007. 'HIF-1 regulates cytochrome oxidase subunits to optimize efficiency of respiration in hypoxic cells', *Cell*, 129: 111-22.
- Gardès-Abert, M.; Bonnefont-Roussel D.; Abedinzadeh Z.; Jore D. 2003. 'Espèces réactives de l'oxygène, comment l'oxygène peut-il devenir toxique ?', *L'actualité chimique*: 91-96.
- Gerdes, F., T. Tatsuta, and T. Langer. 2012. 'Mitochondrial AAA proteases--towards a molecular understanding of membrane-bound proteolytic machines', *Biochim Biophys Acta*, 1823: 49-55.

- Gergondey, R., C. Garcia, C. H. Marchand, S. D. Lemaire, J. M. Camadro, and F. Auchere. 2017. 'Modulation of the specific glutathionylation of mitochondrial proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae* under basal and stress conditions', *Biochem J*, 474: 1175-93.
- Gispert, S., D. Parganlija, M. Klinkenberg, S. Drose, I. Wittig, M. Mittelbronn, P. Grzmil, S. Koob, A. Hamann, M. Walter, F. Buchel, T. Adler, M. Hrabe de Angelis, D. H. Busch, A. Zell, A. S. Reichert, U. Brandt, H. D. Osiewacz, M. Jendrach, and G. Auburger. 2013. 'Loss of mitochondrial peptidase Clpp leads to infertility, hearing loss plus growth retardation via accumulation of CLPX, mtDNA and inflammatory factors', *Hum Mol Genet*, 22: 4871-87.
- Go, Y. M., and D. P. Jones. 2017. 'Redox theory of aging: implications for health and disease', *Clin Sci (Lond)*, 131: 1669-88.
- Goldstein, D. S., and I. J. Kopin. 2007. 'Evolution of concepts of stress', *Stress*, 10: 109-20.
- Goo, H. G., H. Rhim, and S. Kang. 2014. 'HtrA2/Omi influences the stability of LON protease 1 and prohibitin, proteins involved in mitochondrial homeostasis', *Exp Cell Res*, 328: 456-65.
- Gottlieb, R. A., and D. Bernstein. 2016. 'Mitochondrial remodeling: Rearranging, recycling, and reprogramming', *Cell Calcium*, 60: 88-101.
- Grabacka, M., M. Pierzchalska, M. Dean, and K. Reiss. 2016. 'Regulation of Ketone Body Metabolism and the Role of PPARalpha', *Int J Mol Sci*, 17.
- Greggio, C., P. Jha, S. S. Kulkarni, S. Lagarrigue, N. T. Broskey, M. Boutant, X. Wang, S. Conde Alonso, E. Ofori, J. Auwerx, C. Canto, and F. Amati. 2017. 'Enhanced Respiratory Chain Supercomplex Formation in Response to Exercise in Human Skeletal Muscle', *Cell Metab*, 25: 301-11.
- Guillon, B., A. L. Bulteau, M. Wattenhofer-Donze, S. Schmucker, B. Friguet, H. Puccio, J. C. Drapier, and C. Bouton. 2009. 'Frataxin deficiency causes upregulation of mitochondrial Lon and ClpP proteases and severe loss of mitochondrial Fe-S proteins', *FEBS J*, 276: 1036-47.
- Gur, E.; Sauer, R.T. 2009. 'Degrons in protein substrates program the speed and operating efficiency of the AAA+ Lon proteolytic machine', *PNAS*, 106: 18503-8.
- Haase, M., and G. Fitze. 2016. 'HSP90AB1: Helping the good and the bad', *Gene*, 575: 171-86.
- Hammerling, B. C., and A. B. Gustafsson. 2014. 'Mitochondrial quality control in the myocardium: cooperation between protein degradation and mitophagy', *J Mol Cell Cardiol*, 75: 122-30.
- Hamon, M. P., A. L. Bulteau, and B. Friguet. 2015. 'Mitochondrial proteases and protein quality control in ageing and longevity', *Ageing Res Rev*, 23: 56-66.

- Handy, D. E., and J. Loscalzo. 2012. 'Redox regulation of mitochondrial function', *Antioxid Redox Signal*, 16: 1323-67.
- Handy, Diane E., Edith Lubos, Yi Yang, John D. Galbraith, Neil Kelly, Ying-Yi Zhang, Jane A. Leopold, and Joseph Loscalzo. 2009. 'Glutathione Peroxidase-1 Regulates Mitochondrial Function to Modulate Redox-dependent Cellular Responses', *Journal of Biological Chemistry*, 284: 11913-21.
- Hansen, J., T. J. Corydon, J. Palmfeldt, A. Durr, B. Fontaine, M. N. Nielsen, J. H. Christensen, N. Gregersen, and P. Bross. 2008. 'Decreased expression of the mitochondrial matrix proteases Lon and ClpP in cells from a patient with hereditary spastic paraplegia (SPG13)', *Neuroscience*, 153: 474-82.
- Hansen, J. M., Y. M. Go, and D. P. Jones. 2006. 'Nuclear and mitochondrial compartmentation of oxidative stress and redox signaling', *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 46: 215-34.
- Hauck, A. K., and D. A. Bernlohr. 2016. 'Oxidative stress and lipotoxicity', *J Lipid Res*, 57: 1976-86.
- Heo, J. M., N. Livnat-Levanon, E. B. Taylor, K. T. Jones, N. Dephoure, J. Ring, J. Xie, J. L. Brodsky, F. Madeo, S. P. Gygi, K. Ashrafi, M. H. Glickman, and J. Rutter. 2010. 'A stress-responsive system for mitochondrial protein degradation', *Mol Cell*, 40: 465-80.
- Hill, S., and H. Van Remmen. 2014. 'Mitochondrial stress signaling in longevity: a new role for mitochondrial function in aging', *Redox Biol*, 2: 936-44.
- Hirst, J. 2013. 'Mitochondrial complex I', *Annu Rev Biochem*, 82: 551-75.
- Hohn, T. J., and T. Grune. 2014. 'The proteasome and the degradation of oxidized proteins: part III-Redox regulation of the proteasomal system', *Redox Biol*, 2: 388-94.
- Hori, O., F. Ichinoda, T. Tamatani, A. Yamaguchi, N. Sato, K. Ozawa, Y. Kitao, M. Miyazaki, H. P. Harding, D. Ron, M. Tohyama, M. Stern D, and S. Ogawa. 2002. 'Transmission of cell stress from endoplasmic reticulum to mitochondria: enhanced expression of Lon protease', *J Cell Biol*, 157: 1151-60.
- Hoshi, T.; Heinemann, S. 2001. 'Regulation of cell function by methionine oxidation and reduction', *Journal of Physiology*, 531.1: 1-11.
- Houten, S. M., S. Violante, F. V. Ventura, and R. J. Wanders. 2016. 'The Biochemistry and Physiology of Mitochondrial Fatty Acid beta-Oxidation and Its Genetic Disorders', *Annu Rev Physiol*, 78: 23-44.
- Howard-Flanders, P.; Simson, E.; Theriot, L. 1964. 'A locus that controls filament formation and sensitivity to radiation in e coli K-12', *Genetics*, 49: 237-46.



- Ide, T.; Tsutsui, H.; Hayashidani, S.; Kang, D.; Suematsu, N.; Nakamura, K.; Utsumi, H.; Hamasaki, N.; Takeshita, A. 2001. 'Mitochondrial DNA damage and dysfunction associated with oxidative stress in failing hearts after myocardial infarction', *Circulation Research*, 88: 529-35.
- Islam, M. T. 2017. 'Oxidative stress and mitochondrial dysfunction-linked neurodegenerative disorders', *Neurol Res*, 39: 73-82.
- Itoh, K.; Ye, P.; Matsumiya, T.; Tanji, K.; Ozaki, T. 2015. 'Emerging functional cross-talk between the Keap1-Nrf2 system and mitochondria', *Journal of clinical biochemistry and nutrition*, 56: 91-7.
- Javadov, S., and A. V. Kuznetsov. 2013. 'Mitochondria: the cell powerhouse and nexus of stress', *Front Physiol*, 4: 207.
- Jones, P. 2006. 'Redefining Oxidative Stress.', *Antioxidants & Redox Signaling*, 8: 1865-79.
- Karnkowska, A., V. Vacek, Z. Zubacova, S. C. Treitli, R. Petrzelkova, L. Eme, L. Novak, V. Zarsky, L. D. Barlow, E. K. Herman, P. Soukal, M. Hroudova, P. Dolezal, C. W. Stairs, A. J. Roger, M. Elias, J. B. Dacks, C. Vlcek, and V. Hampl. 2016. 'A Eukaryote without a Mitochondrial Organelle', *Curr Biol*, 26: 1274-84.
- Kemp, M., Y. M. Go, and D. P. Jones. 2008. 'Nonequilibrium thermodynamics of thiol/disulfide redox systems: a perspective on redox systems biology', *Free Radic Biol Med*, 44: 921-37.
- Kil, I. S., K. W. Ryu, S. K. Lee, J. Y. Kim, S. Y. Chu, J. H. Kim, S. Park, and S. G. Rhee. 2015. 'Circadian Oscillation of Sulfiredoxin in the Mitochondria', *Mol Cell*, 59: 651-63.
- Kim, J. R., S. M. Lee, S. H. Cho, J. H. Kim, B. H. Kim, J. Kwon, C. Y. Choi, Y. D. Kim, and S. R. Lee. 2004. 'Oxidation of thioredoxin reductase in HeLa cells stimulated with tumor necrosis factor-alpha', *FEBS Lett*, 567: 189-96.
- Kim, S., and H. Koh. 2017. 'Role of FOXO transcription factors in crosstalk between mitochondria and the nucleus', *J Bioenerg Biomembr*, 49: 335-41.
- Koch, J. R., and F. X. Schmid. 2014. 'Mia40 targets cysteines in a hydrophobic environment to direct oxidative protein folding in the mitochondria', *Nat Commun*, 5: 3041.
- König, J.; Ott, C.; Hugo, M.; Jung, T.; Bulteau, A.L.; Grune, T.; Höhn, A. 2017. 'Mitochondrial contribution to lipofuscin formation', *Redox biology*, 11: 673-81.
- Krick, S.; Shi, S.; Ju, W.; Faul, C.; Tsai, S.; Mundel, P.; Böttinger, E.P. 2008. 'Mpv17l protects against mitochondrial oxidative stress and apoptosis by activation of Omi-HtrA2 protease', *PNAS*, 105: 14106-11.

- Kuo, C. Y., Y. C. Chiu, A. Y. Lee, and T. L. Hwang. 2015. 'Mitochondrial Lon protease controls ROS-dependent apoptosis in cardiomyocyte under hypoxia', *Mitochondrion*, 23: 7-16.
- Lackie, R. E., A. Maciejewski, V. G. Ostapchenko, J. Marques-Lopes, W. Y. Choy, M. L. Duennwald, V. F. Prado, and M. A. M. Prado. 2017. 'The Hsp70/Hsp90 Chaperone Machinery in Neurodegenerative Diseases', *Front Neurosci*, 11: 254.
- Lambert, A. J., and M. D. Brand. 2009. 'Reactive oxygen species production by mitochondria', *Methods Mol Biol*, 554: 165-81.
- Lane, N., and W. Martin. 2010. 'The energetics of genome complexity', *Nature*, 467: 929-34.
- Lauridsen, C., and S. K. Jensen. 2012. 'alpha-Tocopherol incorporation in mitochondria and microsomes upon supranutritional vitamin E supplementation', *Genes Nutr*, 7: 475-82.
- Le Boulch, M., E. K. Ahmed, A. Rogowska-Wrzesinska, M. A. Baraibar, and B. Friguet. 2018. 'Proteome oxidative carbonylation during oxidative stress-induced premature senescence of WI-38 human fibroblasts', *Mech Ageing Dev*, 170: 59-71.
- Lee, H. J., K. Chung, H. Lee, K. Lee, J. H. Lim, and J. Song. 2011. 'Downregulation of mitochondrial Lon protease impairs mitochondrial function and causes hepatic insulin resistance in human liver SK-HEP-1 cells', *Diabetologia*, 54: 1437-46.
- Liang, S., Y. Yu, P. Yang, S. Gu, Y. Xue, and X. Chen. 2009. 'Analysis of the protein complex associated with 14-3-3 epsilon by a deuterated-leucine labeling quantitative proteomics strategy', *J Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci*, 877: 627-34.
- Liao, X., C. Huang, D. Zhang, J. Wang, J. Li, H. Jin, and C. Huang. 2017. 'Mitochondrial catalase induces cells transformation through nucleolin-dependent Cox-2 mRNA stabilization', *Free Radic Biol Med*, 113: 478-86.
- Lomonosova, E., and G. Chinnadurai. 2008. 'BH3-only proteins in apoptosis and beyond: an overview', *Oncogene*, 27 Suppl 1: S2-19.
- Lu, B., J. Lee, X. Nie, M. Li, Y. I. Morozov, S. Venkatesh, D. F. Bogenhagen, D. Temiakov, and C. K. Suzuki. 2013. 'Phosphorylation of human TFAM in mitochondria impairs DNA binding and promotes degradation by the AAA+ Lon protease', *Mol Cell*, 49: 121-32.
- Lu, B., S. Yadav, P. G. Shah, T. Liu, B. Tian, S. Puksza, N. Villaluna, E. Kutejova, C. S. Newlon, J. H. Santos, and C. K. Suzuki. 2007. 'Roles for the human ATP-dependent Lon protease in mitochondrial DNA maintenance', *J Biol Chem*, 282: 17363-74.
- Luce, K., and H. D. Osiewacz. 2009. 'Increasing organismal healthspan by enhancing mitochondrial protein quality control', *Nat Cell Biol*, 11: 852-8.

- Luce, K.; Weil, A.C.; Osiewacz, H.D. 2010. 'Mitochondrial protein quality control systems in aging and disease', *Advances in experimental medicine and biology*, 694: 108-25.
- Mailloux, R. J., and J. R. Treberg. 2016. 'Protein S-glutathionylation links energy metabolism to redox signaling in mitochondria', *Redox Biol*, 8: 110-8.
- Mailloux, R. J., J. Y. Xuan, S. McBride, W. Maharsy, S. Thorn, C. E. Holterman, C. R. Kennedy, P. Rippstein, R. deKemp, J. da Silva, M. Nemer, M. Lou, and M. E. Harper. 2014. 'Glutaredoxin-2 is required to control oxidative phosphorylation in cardiac muscle by mediating deglutathionylation reactions', *J Biol Chem*, 289: 14812-28.
- Malka F, Lombes A, Rojo M. 2004. 'Organisation et dynamique du compartiment mitochondrial', *Morphologie*, 88: 13-18.
- Matsushima, Y., Y. Goto, and L. S. Kaguni. 2010. 'Mitochondrial Lon protease regulates mitochondrial DNA copy number and transcription by selective degradation of mitochondrial transcription factor A (TFAM)', *Proc Natl Acad Sci U S A*, 107: 18410-5.
- McAnuff, M. A., G. R. Rettig, and K. G. Rice. 2007. 'Potency of siRNA versus shRNA mediated knockdown in vivo', *J Pharm Sci*, 96: 2922-30.
- Meyer, J. N., T. C. Leuthner, and A. L. Luz. 2017. 'Mitochondrial fusion, fission, and mitochondrial toxicity', *Toxicology*, 391: 42-53.
- Michel, F., D. Bonnefont-Rousselot, E. Mas, J. Draï, and P. Therond. 2008. 'Biomarkers of lipid peroxidation: analytical aspects', *Ann Biol Clin (Paris)*, 66: 605-20.
- Miller, W. L. 2013. 'Steroid hormone synthesis in mitochondria', *Mol Cell Endocrinol*, 379: 62-73.
- Mitchell, P. 1961. 'Coupling of phosphorylation to electron and hydrogen transfer by a chemi-osmotic type of mechanism', *Nature*, 191: 144-8.
- Moehle, E. A., K. Shen, and A. Dillin. 2018. 'Mitochondrial Proteostasis in the Context of Cellular and Organismal Health and Aging', *J Biol Chem*.
- Murphy, M. P. 2009. 'How mitochondria produce reactive oxygen species', *Biochem J*, 417: 1-13.
- Murphy, M. P. 2016. 'Understanding and preventing mitochondrial oxidative damage', *Biochem Soc Trans*, 44: 1219-26.
- Ngo, J. K., and K. J. Davies. 2009. 'Mitochondrial Lon protease is a human stress protein', *Free Radic Biol Med*, 46: 1042-8.
- Ni, H. M., J. A. Williams, and W. X. Ding. 2015. 'Mitochondrial dynamics and mitochondrial quality control', *Redox Biol*, 4: 6-13.

- Nolden, M., S. Ehses, M. Koppen, A. Bernacchia, E. I. Rugarli, and T. Langer. 2005. 'The m-AAA protease defective in hereditary spastic paraplegia controls ribosome assembly in mitochondria', *Cell*, 123: 277-89.
- Odunuga, O. O., V. M. Longshaw, and G. L. Blatch. 2004. 'Hop: more than an Hsp70/Hsp90 adaptor protein', *Bioessays*, 26: 1058-68.
- Papadopoulos, V., and W. L. Miller. 2012. 'Role of mitochondria in steroidogenesis', *Best Pract Res Clin Endocrinol Metab*, 26: 771-90.
- Patron, M., H. G. Sprenger, and T. Langer. 2018. 'm-AAA proteases, mitochondrial calcium homeostasis and neurodegeneration', *Cell Res*, 28: 296-306.
- Pawar, Sushama, and Manmohini Jadhav. 2017. 'Effect of Bacoside a on Lipid Peroxidation in D-Galactose Induced Aging Mice', *International Journal of Pharmacy and Pharmaceutical Sciences*, 9: 12.
- Peleh, V., J. Riemer, A. Dancis, and J. M. Herrmann. 2014. 'Protein oxidation in the intermembrane space of mitochondria is substrate-specific rather than general', *Microb Cell*, 1: 81-93.
- Peter, B., C. L. Waddington, M. Olahova, E. W. Sommerville, S. Hopton, A. Pyle, M. Champion, M. Ohlson, T. Siibak, Z. M. A. Chrzanowska-Lightowlers, R. W. Taylor, M. Falkenberg, and R. N. Lightowlers. 2018. 'Defective mitochondrial protease LonP1 can cause classical mitochondrial disease', *Hum Mol Genet*, 27: 1743-53.
- Pinti, M., L. Gibellini, S. De Biasi, M. Nasi, E. Roat, J. E. O'Connor, and A. Cossarizza. 2011. 'Functional characterization of the promoter of the human Lon protease gene', *Mitochondrion*, 11: 200-6.
- Polo, M., F. Alegre, A. B. Moragrega, L. Gibellini, A. Marti-Rodrigo, A. Blas-Garcia, J. V. Esplugues, and N. Apostolova. 2017. 'Lon protease: a novel mitochondrial matrix protein in the interconnection between drug-induced mitochondrial dysfunction and endoplasmic reticulum stress', *Br J Pharmacol*, 174: 4409-29.
- Pomatto, L. C., R. Raynes, and K. J. Davies. 2017. 'The peroxisomal Lon protease LonP2 in aging and disease: functions and comparisons with mitochondrial Lon protease LonP1', *Biol Rev Camb Philos Soc*, 92: 739-53.
- Potting, C., C. Wilmes, T. Engmann, C. Osman, and T. Langer. 2010. 'Regulation of mitochondrial phospholipids by Ups1/PRELI-like proteins depends on proteolysis and Mdm35', *EMBO J*, 29: 2888-98.
- Quinlan, C. L., A. L. Orr, I. V. Perevoshchikova, J. R. Treberg, B. A. Ackrell, and M. D. Brand. 2012. 'Mitochondrial complex II can generate reactive oxygen species at high rates in both the forward and reverse reactions', *J Biol Chem*, 287: 27255-64.

- Quiros, P. M. 2018. 'Determination of Aconitase Activity: A Substrate of the Mitochondrial Lon Protease', *Methods Mol Biol*, 1731: 49-56.
- Quiros, P. M., Y. Espanol, R. Acin-Perez, F. Rodriguez, C. Barcena, K. Watanabe, E. Calvo, M. Loureiro, M. S. Fernandez-Garcia, A. Fueyo, J. Vazquez, J. A. Enriquez, and C. Lopez-Otin. 2014. 'ATP-dependent Lon protease controls tumor bioenergetics by reprogramming mitochondrial activity', *Cell Rep*, 8: 542-56.
- Redmann, M., G. A. Benavides, W. Y. Wani, T. F. Berryhill, X. Ouyang, M. S. Johnson, S. Ravi, K. Mitra, S. Barnes, V. M. Darley-Usmar, and J. Zhang. 2018. 'Methods for assessing mitochondrial quality control mechanisms and cellular consequences in cell culture', *Redox Biol*, 17: 59-69.
- Ren, X., L. Zou, X. Zhang, V. Branco, J. Wang, C. Carvalho, A. Holmgren, and J. Lu. 2017. 'Redox Signaling Mediated by Thioredoxin and Glutathione Systems in the Central Nervous System', *Antioxid Redox Signal*, 27: 989-1010.
- Rep, M.; van Dijl, J.M.; Suda, K.; Schatz, G.; Grivell, L.A.; Suzuki, C.K. 1996. 'Promotion of mitochondrial membrane complex assembly by a proteolytically inactive yeast Lon', *Science*, 274: 103-6.
- Roger, A. J., S. A. Munoz-Gomez, and R. Kamikawa. 2017. 'The Origin and Diversification of Mitochondria', *Curr Biol*, 27: R1177-R92.
- Roy, J., J. M. Galano, T. Durand, J. Y. Le Guennec, and J. C. Lee. 2017. 'Physiological role of reactive oxygen species as promoters of natural defenses', *FASEB J*, 31: 3729-45.
- Sack, M. N. 2011. 'Mitofusin function is dependent on the distinct tissue and organ specific roles of mitochondria', *J Mol Cell Cardiol*, 51: 881-2.
- Selye, H. 1976. 'Forty years of stress research, principal remaining problems and misconceptions', *CMA Journal*, 115: 53-56.
- Sepuri, N. B. V., R. Angireddy, S. Srinivasan, M. Guha, J. Spear, B. Lu, H. K. Anandatheerthavarada, C. K. Suzuki, and N. G. Avadhani. 2017. 'Mitochondrial LON protease-dependent degradation of cytochrome c oxidase subunits under hypoxia and myocardial ischemia', *Biochim Biophys Acta*, 1858: 519-28.
- Sharma, L.K.; Lu, J.; Bai, Y. 2009. 'Mitochondrial Respiratory Complex I, Structure, Function and Implication in Human Diseases', *Current medical chemistry*, 16: 1266-77.
- Shwe, T., W. Pratchayasakul, N. Chattipakorn, and S. C. Chattipakorn. 2018. 'Role of D-galactose-induced brain aging and its potential used for therapeutic interventions', *Exp Gerontol*, 101: 13-36.
- Sies, H. 2015. 'Oxidative stress: a concept in redox biology and medicine', *Redox Biol*, 4: 180-3.

- Sies, H., C. Berndt, and D. P. Jones. 2017. 'Oxidative Stress', *Annu Rev Biochem*, 86: 715-48.
- Siolas, D., C. Lerner, J. Burchard, W. Ge, P. S. Linsley, P. J. Paddison, G. J. Hannon, and M. A. Cleary. 2005. 'Synthetic shRNAs as potent RNAi triggers', *Nat Biotechnol*, 23: 227-31.
- Skonieczna, M., T. Hejmo, A. Poterala-Hejmo, A. Cieslar-Pobuda, and R. J. Buldak. 2017. 'NADPH Oxidases: Insights into Selected Functions and Mechanisms of Action in Cancer and Stem Cells', *Oxid Med Cell Longev*, 2017: 9420539.
- Stiller, S. B., J. Hopker, S. Oeljeklaus, C. Schutze, S. G. Schrempp, J. Vent-Schmidt, S. E. Horvath, A. E. Frazier, N. Gebert, M. van der Laan, M. Bohnert, B. Warscheid, N. Pfanner, and N. Wiedemann. 2016. 'Mitochondrial OXA Translocase Plays a Major Role in Biogenesis of Inner-Membrane Proteins', *Cell Metab*, 23: 901-8.
- Straub, S. P., S. B. Stiller, N. Wiedemann, and N. Pfanner. 2016. 'Dynamic organization of the mitochondrial protein import machinery', *Biol Chem*, 397: 1097-114.
- Strauss, K. A., R. N. Jinks, E. G. Puffenberger, S. Venkatesh, K. Singh, I. Cheng, N. Mikita, J. Thilagavathi, J. Lee, S. Sarafianos, A. Benkert, A. Koehler, A. Zhu, V. Trovillion, M. McGlincy, T. Morlet, M. Deardorff, A. M. Innes, C. Prasad, A. E. Chudley, I. N. Lee, and C. K. Suzuki. 2015. 'CODAS syndrome is associated with mutations of LONP1, encoding mitochondrial AAA+ Lon protease', *Am J Hum Genet*, 96: 121-35.
- Sugiura, A., G. L. McLelland, E. A. Fon, and H. M. McBride. 2014. 'A new pathway for mitochondrial quality control: mitochondrial-derived vesicles', *EMBO J*, 33: 2142-56.
- Tahara, E. B., F. D. Navarete, and A. J. Kowaltowski. 2009. 'Tissue-, substrate-, and site-specific characteristics of mitochondrial reactive oxygen species generation', *Free Radic Biol Med*, 46: 1283-97.
- Tait, S. W., and D. R. Green. 2008. 'Caspase-independent cell death: leaving the set without the final cut', *Oncogene*, 27: 6452-61.
- Tanase, M., A. M. Urbanska, V. Zolla, C. C. Clement, L. Huang, K. Morozova, C. Follo, M. Goldberg, B. Roda, P. Reschiglian, and L. Santambrogio. 2016. 'Role of Carbonyl Modifications on Aging-Associated Protein Aggregation', *Sci Rep*, 6: 19311.
- Tarrago, L., E. Laugier, M. Zaffagnini, C. Marchand, P. Le Marechal, N. Rouhier, S. D. Lemaire, and P. Rey. 2009. 'Regeneration mechanisms of Arabidopsis thaliana methionine sulfoxide reductases B by glutaredoxins and thioredoxins', *J Biol Chem*, 284: 18963-71.
- Taylor, E. B., and J. Rutter. 2011. 'Mitochondrial quality control by the ubiquitin-proteasome system', *Biochem Soc Trans*, 39: 1509-13.

- Teixeira, P. F., and E. Glaser. 2013. 'Processing peptidases in mitochondria and chloroplasts', *Biochim Biophys Acta*, 1833: 360-70.
- Terluk, M. R., R. J. Kapphahn, L. M. Soukup, H. Gong, C. Gallardo, S. R. Montezuma, and D. A. Ferrington. 2015. 'Investigating mitochondria as a target for treating age-related macular degeneration', *J Neurosci*, 35: 7304-11.
- Thomas, R. E., L. A. Andrews, J. L. Burman, W. Y. Lin, and L. J. Pallanck. 2014. 'PINK1-Parkin pathway activity is regulated by degradation of PINK1 in the mitochondrial matrix', *PLoS Genet*, 10: e1004279.
- Thornton, C., A. Jones, S. Nair, A. Aabdien, C. Mallard, and H. Hagberg. 2017. 'Mitochondrial dynamics, mitophagy and biogenesis in neonatal hypoxic-ischaemic brain injury', *FEBS Lett*.
- Thrash, J. C., A. Boyd, M. J. Huggett, J. Grote, P. Carini, R. J. Yoder, B. Robbertse, J. W. Spatafora, M. S. Rappe, and S. J. Giovannoni. 2011. 'Phylogenomic evidence for a common ancestor of mitochondria and the SAR11 clade', *Sci Rep*, 1: 13.
- Van Dyck, L.; Neupert, W.; Langer, T. 1998. 'The ATP-dependent PIM1 protease is required for the expression of intron-containing genes in mitochondria', *Genes and development*, 12: 1515-24.
- Vanhooren, V.; Navarrete Santos, A.; Voutetakis, K.; Petropoulos, I.; Libert, C.; Simm, A.; Gonos, E.S.; Friguet, B. 2015. 'Protein modification and maintenance systems as biomarkers of ageing', *Mechanisms of ageing and development*, 151: 71-84.
- Vistoli, G., D. De Maddis, A. Cipak, N. Zarkovic, M. Carini, and G. Aldini. 2013. 'Advanced glycoxidation and lipoxidation end products (AGEs and ALEs): an overview of their mechanisms of formation', *Free Radic Res*, 47 Suppl 1: 3-27.
- Voos, W. 2009. 'Mitochondrial protein homeostasis: the cooperative roles of chaperones and proteases', *Res Microbiol*, 160: 718-25.
- Wang, C., and R. J. Youle. 2009. 'The role of mitochondria in apoptosis\*', *Annu Rev Genet*, 43: 95-118.
- Wang, N.; Gottesman, S.; Willingham, M.C.; Gottesman, M.M.; Maurizi, M.R. 1993. 'A human mitochondrial ATP-dependent protease that is highly homologous to bacterial Lon protease', *Proc Natl Acad Sci U S A.*, 90: 11247-51.
- Wani, R., A. Nagata, and B. W. Murray. 2014. 'Protein redox chemistry: post-translational cysteine modifications that regulate signal transduction and drug pharmacology', *Front Pharmacol*, 5: 224.

- Weil, A., K. Luce, S. Drose, I. Wittig, U. Brandt, and H. D. Osiewacz. 2011. 'Unmasking a temperature-dependent effect of the P. anserina i-AAA protease on aging and development', *Cell Cycle*, 10: 4280-90.
- Weissbach, H., L. Resnick, and N. Brot. 2005. 'Methionine sulfoxide reductases: history and cellular role in protecting against oxidative damage', *Biochim Biophys Acta*, 1703: 203-12.
- Wenz, L. S., L. Opalinski, M. H. Schuler, L. Ellenrieder, R. Ieva, L. Bottinger, J. Qiu, M. van der Laan, N. Wiedemann, B. Guiard, N. Pfanner, and T. Becker. 2014. 'The presequence pathway is involved in protein sorting to the mitochondrial outer membrane', *EMBO Rep*, 15: 678-85.
- Wiley, C. D., and J. Campisi. 2016. 'From Ancient Pathways to Aging Cells-Connecting Metabolism and Cellular Senescence', *Cell Metab*, 23: 1013-21.
- Wiley, C. D., M. C. Velarde, P. Lecot, S. Liu, E. A. Sarnoski, A. Freund, K. Shirakawa, H. W. Lim, S. S. Davis, A. Ramanathan, A. A. Gerencser, E. Verdin, and J. Campisi. 2016. 'Mitochondrial Dysfunction Induces Senescence with a Distinct Secretory Phenotype', *Cell Metab*, 23: 303-14.
- Winterbourn, C. C. 2015. 'Are free radicals involved in thiol-based redox signaling?', *Free Radic Biol Med*, 80: 164-70.
- Witkin, E.M. 1947. 'Genetics of resistance to radiation in Escherichia coli', *Genetics*, 32: 221-48.
- Wong, C. M., G. Bansal, L. Marcocci, and Y. J. Suzuki. 2012. 'Proposed role of primary protein carbonylation in cell signaling', *Redox Rep*, 17: 90-4.
- Wong, H. S., P. A. Dighe, V. Mezera, P. A. Monternier, and M. D. Brand. 2017. 'Production of superoxide and hydrogen peroxide from specific mitochondrial sites under different bioenergetic conditions', *J Biol Chem*, 292: 16804-09.
- Wu, Yu-Ting, Shi-Bei Wu, and Yau-Huei Wei. 2014. 'Metabolic Reprogramming of Human Cells in Response to Oxidative Stress: Implications in the Pathophysiology and Therapy of Mitochondrial Diseases', *Current Pharmaceutical Design*, 20: 5510-26.
- Xu, Z., K. Graham, M. Foote, F. Liang, R. Rizkallah, M. Hurt, Y. Wang, Y. Wu, and Y. Zhou. 2013. '14-3-3 protein targets misfolded chaperone-associated proteins to aggresomes', *J Cell Sci*, 126: 4173-86.
- Yakes, F.M.; Van Houten, B. 1997. 'Mitochondrial DNA damage is more extensive and persists longer than nuclear DNA damage in human cells following oxidative stress', *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 94: 514-19.
- Youle, R. J., and A. M. van der Bliek. 2012. 'Mitochondrial fission, fusion, and stress', *Science*, 337: 1062-5.



- Zachar, I., and E. Szathmary. 2017. 'Breath-giving cooperation: critical review of origin of mitochondria hypotheses: major unanswered questions point to the importance of early ecology', *Biol Direct*, 12: 19.
- Zhang, S., X. Zeng, M. Ren, X. Mao, and S. Qiao. 2017. 'Novel metabolic and physiological functions of branched chain amino acids: a review', *J Anim Sci Biotechnol*, 8: 10.
- Zhou, T. B., Y. H. Qin, F. Y. Lei, W. F. Huang, and G. P. Drummen. 2013. 'Prohibitin is associated with antioxidative protection in hypoxia/reoxygenation-induced renal tubular epithelial cell injury', *Sci Rep*, 3: 3123.
- Zhou, X.; Teper, D.; Andrade, M.O.; Zhang, T.; Chen, S.; Song, W.Y.; Wang, N. 2018. 'A Phosphorylation Switch on Lon Protease Regulates Bacterial Type III Secretion System in Host', *American society for microbiology*, 9: 1-17.
- Zurita Rendon, O.; Shoubridge, E.A. . 2018. ' LONP1 is required for maturation of a subset of mitochondrial proteins and its loss elicits an integrated stress response', *bioRxiv*.

## **Résumé**

Principal producteur d'énergie de la cellule eucaryote, la mitochondrie est également une source majeure d'espèces réactives de l'oxygène et une cible privilégiée des dommages oxydatifs causés aux protéines. Pour faire face à ces mécanismes impliqués dans le vieillissement et un nombre important de pathologies, la mitochondrie dispose de systèmes de maintenance des protéines parmi lesquels la protéase Lon. L'objectif de cette thèse a été de préciser le rôle de cette protéase localisée dans la matrice mitochondriale et particulièrement impliquée dans l'homéostasie des protéines mitochondriales et l'élimination des protéines oxydées. Cette étude a été menée sur des cellules HeLa transformées de manière à pouvoir significativement diminuer l'expression de Lon. Nos résultats montrent qu'une absence de Lon affecte l'homéostasie protéique en élevant les niveaux de protéines carbonylées. Nous avons par ailleurs identifié un certain nombre de protéines présentant une variation des niveaux d'expression et des modifications oxydatives en absence de Lon. La fonction mitochondriale est elle aussi perturbée par une sous expression de Lon puisque celle-ci s'accompagne d'une baisse de l'activité de la chaîne respiratoire. De plus, un peu plus du tiers des protéines affectées par une défaillance en Lon sont mitochondriales et environ la moitié d'entre elles interviennent dans deux domaines : le métabolisme énergétique et le contrôle qualité des protéines. La fragmentation du réseau mitochondrial et de potentielles atteintes à l'intégrité de l'ADN mitochondrial notées dans les cellules sans Lon sont d'autres arguments en faveur d'une dysfonction mitochondriale. Enfin l'impact d'une déficience en Lon sur l'homéostasie protéique et la fonction mitochondriale peut être modulé par la source de carbone à la disposition des cellules puisqu'il varie selon que le milieu de culture est supplémenté en glucose ou en galactose.

Mots clés : protéase Lon, homéostasie protéique, oxydation protéique, dysfonction mitochondriale, métabolisme énergétique

## **Importance of the mitochondrial Lon protease on the maintenance of protein homeostasis and mitochondrial function**

### **Abstract**

As the main energy producer of the eukaryotic cell, mitochondria are also a major source of reactive oxygen species and a prime target for oxidative damage to proteins. To cope with these mechanisms involved in ageing and a large number of pathologies, the mitochondrion has protein maintenance systems among which the Lon protease. The objective of this thesis was to clarify the role of this protease localized in the mitochondrial matrix and particularly involved in mitochondrial proteins homeostasis and the elimination of oxidized proteins. This study was conducted on transformed HeLa cells so that Lon expression could be significantly reduced. Our results show that lack of Lon affects protein homeostasis by elevating carbonyl protein levels. We have also identified a number of proteins with varying levels of expression and oxidative changes in the absence of Lon. The mitochondrial function is also disturbed by Lon down expression as this is accompanied by a decrease in the activity of the respiratory chain. In addition, slightly more than a third of the proteins affected by Lon failure are mitochondrial and about half of them are involved in two areas: energy metabolism and protein quality control. Mitochondrial network fragmentation and potential mitochondrial DNA integrity damages noted in Lon-free cells are further arguments in favor of mitochondrial dysfunction. Finally, the impact of Lon deficiency on protein homeostasis and mitochondrial function can be modulated by the carbon source available to the cells since it varies according to whether the culture medium is supplemented with glucose or galactose.

Keywords: Lon protease, protein homeostasis, protein oxydation, mitochondrial dysfunction, energy metabolism