



**HAL**  
open science

# Étude des protéines de la famille “ clustered mitochondria ” (CLU) dans les cellules animales et chez les plantes : rôle dans la biogenèse mitochondriale

Mickaële Hemono

► **To cite this version:**

Mickaële Hemono. Étude des protéines de la famille “ clustered mitochondria ” (CLU) dans les cellules animales et chez les plantes : rôle dans la biogenèse mitochondriale. Sciences agricoles. Université de Strasbourg, 2021. Français. NNT : 2021STRAJ009 . tel-03738057

**HAL Id: tel-03738057**

**<https://theses.hal.science/tel-03738057>**

Submitted on 25 Jul 2022

**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.

*ÉCOLE DOCTORALE DES SCIENCES DE LA VIE ET DE LA SANTE*

UPR 2357, Institut de biologie moléculaire des plantes, CNRS

**THÈSE** présentée par :

**Mickaële HEMONO**

soutenue le : **19 avril 2021**

pour obtenir le grade de : **Docteur de l'université de Strasbourg**

Discipline/ Spécialité : Aspects moléculaires et cellulaires de la biologie

**Étude des protéines de la famille « clustered mitochondria » (CLU) dans les cellules animales et les plantes : rôle dans la biogenèse mitochondriale**

**THÈSE dirigée par :**

**Pr. DUCHENE Anne-Marie**

Professeur, université de Strasbourg

**CO-ENCADRANT :**

**Dr. NGONDO Patryk**

Maitre de conférences, université de Strasbourg

**RAPPORTEURS :**

**Dr. MERRET Rémy**

Chargé de recherche, CNRS, Perpignan

**Pr. BETHUNE Julien**

Professeur, Hamburg university of applied sciences

**EXAMINATEUR :**

**Dr. ENTELIS Nina**

Directeur de recherche, CNRS, Strasbourg







# REMERCIEMENTS

Je remercie les membres de mon jury : le docteur Rémy MERRET, le professeur Julien BETHUNE et le docteur Nina ENTELIS pour avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse.

Je remercie particulièrement le professeur Anne-Marie DUCHENE de m'avoir acceptée en thèse sous sa supervision. Je ne sais pas ce qui l'a convaincu de me choisir moi plutôt que quelqu'un d'autre mais je la remercie. Je la remercie pour sa disponibilité et pour son aide lors de nos conversations partout où nous nous trouvions (souvent au niveau des escaliers). J'ai beaucoup appris sous sa supervision et je la remercie pour ça et aussi pour m'avoir aidée à organiser mon planning pour que même dans les conditions où la thèse est la plus compliquée pour un doctorant (comme lors de la rédaction par exemple) cela se soit bien passé. Merci beaucoup.

Je remercie également le docteur Patryk NGONDO qui a été mon superviseur pour la partie mammifère de mon étude mais pas seulement. Il a été très présent quand j'avais besoin d'aide que ce soit pour les expériences, pour comprendre nos résultats chez les mammifères et chez les plantes. Pour tout cela, et pour tout le reste, je le remercie.

Je voudrais également remercier tous les membres de l'équipe : Laurence et Thalia pour leurs interventions enrichissantes notamment lors des labmeetings. Merci à tous mes camarades thésards, post doctorants et ingénieurs passé et présent : Marjorie, Herrade, Lauriane, Audrey, Jeanne et Kevin pour leur soutien et pour les bons moments que nous avons passés dans le laboratoire et aussi lors de soirées à rire. Merci pour votre soutien.

Merci encore à Thalia et aussi à Élodie qui m'ont aidée lors des expériences. Merci à elles.

Je remercie les personnes des différentes plateformes de l'IBMP et de l'IBMC qui ont participé à la réalisation de mes expériences : Sandrine et Malek de la plateforme de séquençage de l'IBMP ainsi que Philippe, Lauriane et Johanna de la plateforme de spectrométrie de masse de l'IBMC.

Je remercie également toutes les personnes de l'IBMP, j'ai adoré travailler pendant 4 ans dans cet institut dans ce cadre accueillant. Merci à tous.

Enfin, je remercie ma famille, d'avoir toujours été là pour moi. Même si je suis à 1000 km. Mes parents, mes frères et tous les autres membres de ma famille. Merci.



## Déclaration sur l'honneur *Declaration of Honour*

J'affirme être informé que le plagiat est une faute grave susceptible de mener à des sanctions administratives et disciplinaires pouvant aller jusqu'au renvoi de l'Université de Strasbourg et passible de poursuites devant les tribunaux de la République Française.

Je suis conscient(e) que l'absence de citation claire et transparente d'une source empruntée à un tiers (texte, idée, raisonnement ou autre création) est constitutive de plagiat.

**Au vu de ce qui précède, j'atteste sur l'honneur que le travail décrit dans mon manuscrit de thèse est un travail original et que je n'ai pas eu recours au plagiat ou à toute autre forme de fraude.**

*I affirm that I am aware that plagiarism is a serious misconduct that may lead to administrative and disciplinary sanctions up to dismissal from the University of Strasbourg and liable to prosecution in the courts of the French Republic.*

*I am aware that the absence of a clear and transparent citation of a source borrowed from a third party (text, idea, reasoning or other creation) is constitutive of plagiarism.*

***In view of the foregoing, I hereby certify that the work described in my thesis manuscript is original work and that I have not resorted to plagiarism or any other form of fraud.***

**Nom : HEMONO                      Prénom : Mickaele**

**Ecole doctorale : ED414**

**Laboratoire : Institut de Biologie Moléculaire des Plantes (IBMP-UPR 2357)**

**Date : 22/06/2021**



# TABLE DES MATIERES

|  |    |
|--|----|
| REMERCIEMENTS .....  | 1  |
| TABLE DES MATIERES .....   | 2  |
| LISTE DES ABBREVIATIONS .....  | 9  |
| INTRODUCTION .....   | 14 |
| 1. Localisation des ARNm .....   | 15 |
| 1.1. Fonction de la localisation des ARNm. ....  | 15 |
| 1.2. Régulation de la localisation des ARNm. ....  | 17 |
| 2. Localisation mitochondriale des ARNm. ....  | 18 |
| 2.1. Les mitochondries. ....   | 18 |
| 2.1.1. Structure.....  | 18 |
| 2.1.2. Fonctions. ....   | 20 |
| 2.1.2.1. Production d'énergie.....   | 20 |
| 2.1.2.2. Autres fonctions mitochondriales.....   | 21 |
| 2.1.3. Import des protéines. ....  | 22 |
| 2.2. Localisation mitochondriale des ARNm.....   | 24 |
| 2.2.1. Chez la levure. ....  | 24 |
| 2.2.1.1. Etudes globales de l'adressage des ARNm à la surface des mitochondries.....   | 24 |
| 2.2.1.2. Rôle des 3' UTR dans l'adressage mitochondrial des ARNm. ....   | 26 |
| 2.2.1.3. Rôle de la protéine Puf3p.....  | 27 |
| 2.2.1.4. Rôle de la traduction dans l'adressage d'ARNm à la mitochondrie. ....   | 31 |
| 2.2.1.5. Rôle des complexes TOM dans la localisation mitochondriale des ARNm.....  | 34 |
| 2.2.1.6. Rôle de COPI dans la localisation mitochondriale des ARNm. ....   | 36 |
| 2.2.1.7. Adressage d'ARNm et fonctions.....  | 37 |
| 2.2.1.8. Conclusion : complexité et diversité des mécanismes d'adressage des ARNm à la surface mitochondriale chez la levure. .... | 40 |
| 2.2.2. Chez la drosophile. ....  | 41 |
| 2.2.2.1. Adressage d'ARNm cytosoliques à la surface des mitochondries.....   | 42 |
| 2.2.2.2. Rôle des protéines MDI et Larp.....   | 42 |
| 2.2.2.3. Rôle de PINK1.....  | 43 |
| 2.2.2.4. Rôle de la traduction localisée à la surface mitochondriale. ....   | 45 |
| 2.2.2.5. Conclusion.....   | 46 |
| 2.2.3. Chez les plantes.....   | 47 |
| 2.2.3.1. Première mise en évidence d'un adressage d'ARNm cytosolique à la surface mitochondriale chez les plantes.....             | 47 |
| 2.2.3.2. Analyse globale de la localisation de MITO ARNm à la surface mitochondriale. ....   | 48 |



|            |   |    |
|------------|---|----|
| 2.2.3.3.   | Rôle de l'adressage mitochondrial des ARNm cytosoliques. ....   | 49 |
| 2.2.3.4.   | Facteurs protéiques impliqués dans l'adressage mitochondrial des ARNm. ....   | 51 |
| 2.2.3.5.   | Signaux <i>cis</i> d'adressage mitochondrial des MITO ARNm. ....  | 52 |
| 2.2.3.5.1. | Signaux dans la 3'UTR (3' untranslated region). ....  | 52 |
| 2.2.3.5.2. | Signaux dans la 5'UTR. ....   | 53 |
| 2.2.3.6.   | Conclusion. ....  | 55 |
| 2.2.4.     | Chez les mammifères. ....   | 55 |
| 2.2.4.1.   | Analyse globale de la localisation mitochondriale des ARNm chez l'Homme. ....   | 55 |
| 2.2.4.2.   | Quelques exemples d'ARNm localisés à la surface mitochondriale. ....  | 57 |
| 2.2.4.2.1. | Exemple de l'ARNm de la <i>B-F1-Atpase</i> . ....   | 57 |
| 2.2.4.2.2. | Exemple des ARNm <i>GAPDH</i> et <i>K-RAS</i> . ....  | 58 |
| 2.2.4.2.3. | Exemple des ARNm <i>TMEM126A</i> et <i>UQCRC1</i> . ....  | 58 |
| 2.2.4.2.4. | Exemple des ARNm <i>OXA1</i> , <i>ACO2</i> , <i>NDUFV1</i> , <i>NDUFV2</i> , <i>ATP5b</i> , <i>COX2</i> , <i>AK2</i> , <i>ALDH2</i> ,<br><i>SOD2</i> , <i>COX10</i> et <i>UQCRF1</i> . .... | 59 |
| 2.2.4.2.5. | Exemple des ARNm codant pour des protéines de la phosphorylation oxydative<br>(OXPHOS). ....  | 60 |
| 2.2.4.3.   | Signaux importants pour la localisation mitochondriale des ARNm. ....   | 60 |
| 2.2.4.4.   | Rôle de la localisation mitochondriale des ARNm. ....   | 62 |
| 2.2.4.5.   | Traduction à la surface mitochondriale. ....  | 63 |
| 2.2.4.6.   | Facteurs protéiques impliqués dans la localisation mitochondriale des ARNm. ....  | 67 |
| 2.2.4.6.1. | Rôle de YB-1. ....  | 67 |
| 2.2.4.6.2. | Rôle de G3BP1. ....   | 68 |
| 2.2.4.6.3. | Rôle des protéines de la famille AKAP. ....   | 69 |
| 2.2.4.6.4. | Rôle du complexe d'import mitochondrial TOM. ....   | 71 |
| 2.2.4.6.5. | Rôle du cytosquelette. ....   | 72 |
| 2.2.4.7.   | Conclusion. ....  | 72 |
| 2.2.5.     | Conclusion générale. ....   | 73 |
| 3.         | Les protéines de la famille CLU (Clustered mitochondria). ....  | 76 |
| 3.1.       | Organisation générale des protéines de la famille CLU. ....   | 76 |
| 3.2.       | Homologie des protéines de la famille CLU. ....   | 76 |
| 3.3.       | Fonction des domaines de CLU : exemple de Clueless chez la drosophile. ....   | 77 |
| 3.4.       | Fonction des protéines de la famille CLU. ....  | 78 |
| 3.4.1.     | La protéine CluA chez <i>Dictyostelium discoideum</i> . ....  | 78 |
| 3.4.1.1.   | Rôle de CluA sur l'organisation mitochondriale. ....  | 78 |
| 3.4.1.2.   | Rôle du cytosquelette dans la fonction mitochondriale de CluA. ....   | 79 |
| 3.4.1.3.   | Rôle de la distribution du RE dans la fonction mitochondriale de CluA. ....   | 81 |



|            |   |     |
|------------|---|-----|
| 3.4.1.4.   | Rôle de CluA dans les processus de fusion et de fission mitochondriale.....                   | 82  |
| 3.4.2.     | La protéine FRIENDLY (ou FMT) chez <i>Arabidopsis thaliana</i> .....                          | 83  |
| 3.4.2.1.   | Rôle de FMT sur l'organisation mitochondriale. ....   | 83  |
| 3.4.2.2.   | Localisation et modification de la protéine FMT.....  | 84  |
| 3.4.2.3.   | Lien entre FMT et le cytosquelette. ....  | 85  |
| 3.4.2.4.   | Rôle de FMT dans l'association des mitochondries les unes avec les autres.....                | 85  |
| 3.4.2.5.   | Rôle de FMT dans les processus de fusion mitochondriale. ....                                 | 86  |
| 3.4.2.6.   | Rôle de FMT dans la mitophagie.....   | 86  |
| 3.4.2.7.   | Paralogues de FMT (REC). ....   | 87  |
| 3.4.2.8.   | Conclusion.....   | 87  |
| 3.4.3.     | La protéine Clueless chez la drosophile.....  | 88  |
| 3.4.3.1.   | La protéine Clueless. ....  | 88  |
| 3.4.3.1.1. | Localisation. ....  | 88  |
| 3.4.3.1.2. | Fonction de liaison aux ARNm. ....  | 89  |
| 3.4.3.2.   | Rôle mitochondrial de Clueless.....   | 90  |
| 3.4.3.2.1. | Sur les mitochondries. ....   | 90  |
| 3.4.3.2.2. | Sur le réseau mitochondrial.....  | 91  |
| 3.4.3.3.   | Lien entre Clueless et les microtubules. ....   | 92  |
| 3.4.3.4.   | Partenaires protéiques de Clueless.....   | 93  |
| 3.4.3.4.1. | Lien entre Clueless et la mitochondrie. ....  | 93  |
| 3.4.3.4.2. | Lien entre Clueless et la traduction à la surface mitochondriale.....                         | 93  |
| 3.4.3.4.3. | Lien entre Clueless et le complexe PINK1-Parkin. ....   | 94  |
| 3.4.3.5.   | Conclusion sur Clueless.....  | 98  |
| 3.4.4.     | La protéine Clu1p chez la levure. ....  | 99  |
| 3.4.4.1.   | La protéine Clu1p.....  | 99  |
| 3.4.4.2.   | Rôle de Clu1p sur le réseau mitochondrial. ....   | 99  |
| 3.4.4.3.   | Lien entre Clu1p et la traduction. ....   | 99  |
| 3.4.4.4.   | Clu1p se lie aux ARNm. ....   | 100 |
| 3.4.4.5.   | Conclusion.....   | 101 |
| 3.4.5.     | La protéine CLUH chez les mammifères.....   | 101 |
| 3.4.5.1.   | Localisation de CLUH.....   | 101 |
| 3.4.5.2.   | Rôle de CLUH.....   | 102 |
| 3.4.5.2.1. | Sur le réseau mitochondrial.....  | 102 |
| 3.4.5.2.2. | Sur les mitochondries. ....   | 103 |
| 3.4.5.3.   | CLUH lie les ARNm codant pour des protéines mitochondriales et influence leur stabilité. .... | 105 |



|                             |  |     |
|-----------------------------|--|-----|
| 3.4.5.4.                    | Lien entre CLUH et la traduction.....                                    | 107 |
| 3.4.5.5.                    | Rôle des granules de CLUH. ....  | 109 |
| 3.4.5.6.                    | Conclusion.....  | 111 |
| 3.5.                        | Conclusion générale : les protéines de la famille CLU. ....              | 112 |
| MATERIELS ET METHODES ..... |  | 114 |
| 1.                          | Matériels.....   | 115 |
| 1.1.                        | Cellules de mammifères.....  | 115 |
| 1.2.                        | Matériel végétal. ....   | 115 |
| 1.3.                        | Souches bactériennes.....  | 116 |
| 1.4.                        | Vecteurs.....  | 116 |
| 1.4.1.                      | Vecteurs pour la transfection de cellules humaines.....                  | 116 |
| 1.4.2.                      | Vecteurs pour la transformation de plantes.....                          | 117 |
| 1.4.2.1.                    | Vecteurs donneurs.....   | 117 |
| 1.4.2.2.                    | Vecteurs de destination.....   | 117 |
| 1.5.                        | Anticorps.....   | 118 |
| 1.6.                        | Oligonucléotides.....  | 118 |
| 1.7.                        | Outils informatiques.....  | 119 |
| 1.8.                        | Microscopie.....   | 119 |
| 2.                          | Méthodes.....  | 119 |
| 2.1.                        | Transformation des organismes.....                                       | 119 |
| 2.1.1.                      | Transformation d' <i>Escherichie coli</i> . ....                         | 119 |
| 2.1.2.                      | Transformation d' <i>Agrobacterium tumefaciens</i> . ....                | 120 |
| 2.1.3.                      | Transformation des plantes.....  | 120 |
| 2.1.3.1.                    | Transformation transitoire.....  | 120 |
| 2.1.3.1.1.                  | <i>Nicotiana benthamiana</i> . ....                                      | 120 |
| 2.1.3.1.2.                  | <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....                                       | 121 |
| 2.1.3.2.                    | Transformation stable : Floral Dip de <i>Arabidopsis thaliana</i> . .... | 121 |
| 2.1.4.                      | Transfection/transduction des cellules de mammifères.....                | 122 |
| 2.1.4.1.                    | Transfection des cellules de mammifères par la méthode PEI. ....         | 122 |
| 2.1.4.2.                    | Transduction des cellules de mammifères.....                             | 123 |
| 2.2.                        | Culture des eucaryotes.....  | 123 |
| 2.2.1.                      | Plantes.....   | 123 |
| 2.2.1.1.                    | Culture liquide.....   | 123 |
| 2.2.1.2.                    | Culture solide.....  | 124 |
| 2.2.2.                      | Cellules de mammifères.....  | 124 |
| 2.2.2.1.                    | Décongélation.....   | 124 |



|          |  |     |
|----------|--|-----|
| 2.2.2.2. | Passage.....   | 125 |
| 2.2.2.3. | Congélation.....   | 125 |
| 2.3.     | Techniques relatives aux ADN.....  | 125 |
| 2.3.1.   | Extraction d'ADN génomique.....  | 125 |
| 2.3.1.1. | Plantes.....   | 125 |
| 2.3.1.2. | Cellules de mammifères.....  | 126 |
| 2.3.2.   | PCR.....   | 127 |
| 2.3.3.   | Clonage par la technologie Gateway®.....                                 | 127 |
| 2.3.3.1. | Réaction BP.....   | 128 |
| 2.3.3.2. | Réaction LR.....   | 128 |
| 2.3.4.   | Clonage par la technologie Gibson.....                                   | 129 |
| 2.3.5.   | Criblage de colonies par PCR.....  | 129 |
| 2.3.6.   | Préparation de l'ADN plasmidique.....                                    | 130 |
| 2.3.7.   | Séquençage de l'ADN.....   | 130 |
| 2.4.     | Techniques relatives à l'ARN.....  | 130 |
| 2.4.1.   | Extraction des ARN.....  | 130 |
| 2.4.2.   | Traitement DNase.....  | 131 |
| 2.4.3.   | Rétrotranscription des ARN.....  | 131 |
| 2.4.4.   | qPCR.....  | 132 |
| 2.5.     | Techniques relatives aux protéines.....                                  | 132 |
| 2.5.1.   | Extraction des protéines.....  | 132 |
| 2.5.1.1. | Plantes.....   | 132 |
| 2.5.1.2. | Cellules de mammifères.....  | 133 |
| 2.5.2.   | Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).....                | 134 |
| 2.5.3.   | Immunoblot de type Westernblot.....                                      | 135 |
| 2.5.3.1. | Transfert des protéines sur membrane.....                                | 135 |
| 2.5.3.2. | Fixation des anticorps.....  | 135 |
| 2.5.3.3. | Révélation de la fixation des anticorps.....                             | 136 |
| 2.5.3.4. | Coloration des protéines et séchage des membranes.....                   | 136 |
| 2.6.     | Isolement de mitochondries.....  | 136 |
| 2.6.1.   | A partir de plantules d' <i>Arabidopsis thaliana</i> .....               | 137 |
| 2.6.2.   | A partir des inflorescences de plantes <i>Arabidopsis thaliana</i> ..... | 138 |
| 2.6.3.   | Cellules de mammifères.....  | 139 |
| 2.7.     | Isolement de polysomes sur cellules de mammifères.....                   | 139 |
| 2.8.     | Recherche de partenaires protéiques.....                                 | 139 |
| 2.8.1.   | Co-Immunoprécipitation.....  | 139 |



|                            |   |     |
|----------------------------|---|-----|
| 2.8.1.1.                   | Plantes. ....   | 140 |
| 2.8.1.2.                   | Cellules de mammifères. ....  | 141 |
| 2.8.2.                     | BioID. ....   | 141 |
| 2.8.2.1.                   | Plantes. ....   | 142 |
| 2.8.2.2.                   | Cellules de mammifères. ....  | 143 |
| 2.9.                       | Immunofluorescence (IF) des cellules de mammifères. ....  | 144 |
| 2.10.                      | Immuno-précipitation des ARN (RIP) à partir de cellules de mammifères. ....                             | 144 |
| 2.11.                      | Étude de l'activité mitochondriale. ....  | 146 |
| 2.11.1.                    | Respiration chez les plantes. ....  | 146 |
| 2.11.2.                    | Production d'ATP chez les mammifères. ....  | 146 |
| OBJECTIF DE LA THESE ..... |   | 148 |
| RESULTATS .....            |   | 149 |
| 1.                         | Étude du rôle de CLUH chez les mammifères. ....   | 150 |
| 1.1.                       | Inactivation de CLUH dans les cellules de mammifères. ....  | 150 |
| 1.1.1.                     | Dans les cellules HCT 116 (Humain). ....  | 150 |
| 1.1.2.                     | Dans les cellules souches mES E14 (souris). ....  | 152 |
| 1.2.                       | Les interagants de CLUH. ....   | 154 |
| 1.2.1.                     | Génération des lignées utilisées pour la recherche des interagants de CLUH. ....                        | 154 |
| 1.2.1.1.                   | Dans les cellules HCT 116 (Humain). ....  | 154 |
| 1.2.1.2.                   | Dans les cellules mES E14 (Souris). ....  | 156 |
| 1.2.2.                     | Les interagants stables de CLUH. ....   | 156 |
| 1.2.3.                     | Les interagants transitoires de CLUH. ....  | 158 |
| 1.2.4.                     | CLUH s'associe avec lui-même indépendamment de la présence d'ARN. ....                                  | 160 |
| 1.3.                       | CLUH est une protéine cytosolique. ....   | 160 |
| 1.4.                       | CLUH est lié aux MITO ARNm. ....  | 162 |
| 1.4.1.                     | CLUH affecte l'expression de certains MITO ARNm. ....   | 162 |
| 1.4.2.                     | CLUH se lie aux MITO ARNm. ....   | 162 |
| 1.4.3.                     | L'absence de CLUH n'a pas d'effet sur la stabilité des MITO ARNm. ....                                  | 163 |
| 1.5.                       | Rôle de CLUH dans la traduction. ....   | 164 |
| 1.5.1.                     | CLUH est associé à la traduction cytosolique. ....  | 165 |
| 1.5.2.                     | CLUH n'est pas impliqué dans l'association des MITO ARNm avec les polysomes dans le cytosol. ....       | 167 |
| 1.5.3.                     | Le taux des protéines mitochondriales n'est pas affecté par l'absence de CLUH chez les mammifères. .... | 169 |
| 1.6.                       | Rôle de CLUH dans la localisation mitochondriale des MITO ARNm et de leur traduction. ....              | 170 |



|          |   |     |
|----------|---|-----|
| 1.6.1.   | Les MITO ARNm semblent être localisés dans la fraction mitochondriale de manière plus importante en absence de CLUH. .... | 171 |
| 1.6.2.   | CLUH pourrait être impliqué dans la régulation de la traduction localisée à la surface mitochondriale. ....               | 172 |
| 1.6.2.1. | CLUH n'est pas présent dans les polysomes de la fraction mitochondriale. ....   | 172 |
| 1.6.2.2. | La traduction des MITO ARNm à la surface mitochondriale semble être plus importante en absence de CLUH. ....              | 173 |
| 1.7.     | Conclusion / discussion sur CLUH. ....  | 174 |
| 1.7.1.   | L'inactivation de CLUH impacte les fonctions mitochondriales. ....  | 174 |
| 1.7.2.   | CLUH interagit avec le complexe SPAG5-KNSTRN. ....  | 175 |
| 1.7.3.   | Localisation dynamique de CLUH. ....  | 176 |
| 1.7.4.   | CLUH est associé à la traduction. ....  | 176 |
| 1.7.5.   | CLUH n'affecte pas la stabilité des MITO ARNm testés lors de notre étude. ....  | 177 |
| 1.7.6.   | CLUH serait impliqué dans la régulation de la traduction localisée des MITO ARNm...                                       | 178 |
| 1.7.7.   | Conclusion. ....  | 179 |
| 2.       | Rôle de Friendly (FMT) chez <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....  | 180 |
| 2.1.     | Article 2. ....   | 180 |
| 2.2.     | Conclusion et discussion sur FMT. ....  | 207 |
| 2.2.1.   | Inactivation de FMT et développement des plantes chez <i>Arabidopsis thaliana</i> . ....                                  | 207 |
| 2.2.2.   | L'absence de la protéine FMT impacte les fonctions mitochondriales. ....  | 208 |
| 2.2.3.   | FMT a une localisation dynamique. ....  | 209 |
| 2.2.4.   | FMT est lié à la traduction à la surface mitochondriale. ....   | 210 |
| 2.2.5.   | FMT semble impliqué dans la localisation mitochondriale des MITO ARNm. ....   | 210 |
| 2.2.6.   | Conclusion. ....  | 211 |
|          | DISCUSSION FINALE .....   | 213 |
|          | ANNEXE (ARTICLE 1) .....  | 220 |
|          | BIBLIOGRAPHIE .....   | 245 |



# LISTE DES ABBREVIATIONS

3'UTR : 3' untranslated region.

3HA : 3 fois l'étiquette hémagglutinine.

5'UTR : 5' untranslated region.

ADN ou DNA : acide desoxyribonucléique.

ADNmt ou mtDNA : ADN mitochondrial.

ADP : adenosine di-phosphate.

AKAP : A-kinase-anchoring protein.

ALDH18A1 : delta-1-pyrroline-5-carboxylate synthase (mitochondriale).

AOX : alternative oxydase.

ARN ou RNA : acide ribonucléique.

ARNg : ARN guide.

ARNm ou mRNA : ARN messenger.

ARNt : ARN de transfert.

ARNr : ARN ribosomique.

ATP : adenosine tri-phosphate.

ATP5A : ATP synthase subunit alpha (mitochondriale).

BC ou CB : bleu de Coomassie.

BioID : biotin dependant identification assay.

CCCP : carbonylcyanure *m*-chlorophénylhydrazone.

CDS : séquence codante.

CJs : cristae junctions.

Cyt c : cytochrome c.

CLIP : cross-linking immunoprecipitation.



CLU : clustered mitochondria.

Clu1p : CLU chez la levure.

CluA : CLU chez l'amibe *dictyostelium discoideum*.

Clueless : CLU chez la drosophile.

CLUH : CLU humaine.

Co-IP : co-immunopurification.

CRISPR-Cas9 : clustered regularly interspaced short palindromic repeats – Cas9.

DO : densité optique.

DUF 727 : domain of unknown function 727.

EMS : ethyl methane sulphonate.

FADH2 : flavine adénine dinucléotide.

FMT : FRIENDLY.

G3BP1 : ras GTPase-activating protein-binding protein 1.

GAPDH : glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase.

GDP : guanosine di-phosphate.

GFP : green fluorescent protein.

GLS : glutaminase kidney isoform (mitochondriale).

GTP : guanosine tri-phosphate.

GUS : beta-glucuronidase.

H<sup>+</sup> : proton.

HBSS : milieu faible en glucose, sans sérum ni acides aminées, provoquant des carences nutritives.

HCT 116 : lignée cellulaire issue d'un carcinome colorectal humain.

HEK293T et HEK293 : cellules de rein embryonnaire humain.

HITS-CLIP : High-throughput sequencing of RNA isolated by CLIP.

HSP : heat shock proteins.



HSPA9 : mitochondrial HSP A9.

HSPD1 : mitochondrial HSP 60kDa.

IARS2 : isoleucine-tRNA ligase (mitochondriale).

IF : immunofluorescence.

IM : membrane mitochondriale interne.

IMMT : MICOS complex subunit MIC60.

KD : knock-down.

KNSTRN : small kinetochore-associated protein.

KO : knock-out.

LARP : la related protein.

LRPPRC : leucine-rich PPR motif-containing protein (mitochondriale).

MAR : ribosomes associés à la fraction mitochondriale.

MARF : mitochondrial assembly regulatory factor.

MBP : myelin basic protein.

mCLUH : mouse CLUH (CLUH version souris).

mEB 10 jours E14 ou mEB E14 : cellules souches de souris après 10 jours de différenciation en corps embryotaire.

MEFs : lignée cellulaire issue de fibroblastes embryonnaire de souris.

mES-E14 : cellules souches de souris.

mito : mitochondrie.

MITO ARNm : ARNm d'origine nucléaire codant pour des protéines mitochondriales.

MLR : localisation mitochondriale des ARNm.

MSCs : cellules souches mésenchymateuses.

MTCO2 : cytochrome c oxydase subunit 2 (mitochondriale).

MTOC : centre d'organisation des microtubules.



MTS : signal d'adressage mitochondrial.

NAC : nascent chain-associated complex.

NADH, H<sup>+</sup> : nicotinamide adénine dinucléotide.

NADPH : nicotinamide adénine dinucléotide phosphate.

NBs : neuroblastes.

NDUFS1 : NADH-ubiquinone oxydoreductase 75 kDa subunit (mitochondriale).

NGS : next generation sequencing.

NLS : signal d'export nucléaire.

Non-MLR : ARNm non adressés à la mitochondrie.

O<sub>2</sub> : dioxygène.

OM : membrane mitochondriale externe.

ORF : cadre ouvert de lecture.

OXPPOS : phosphorylation oxydative.

PCR : polymerase chain reaction.

Pi : phosphate inorganique.

PINK1 : pten-induced kinase 1.

PPR : pentatricopeptide repeats domain.

qPCR : quantitative PCR.

RBP : RNA binding protein.

RE : réticulum endoplasmique.

Ribo-seq : analyse des ARNm associés aux ribosomes par séquençage.

RIP : immun-oprécipitation des ARN.

RNAi : ARN interference.

RNC : ribosome-nascent chain complex.

ROS : espèces réactives de l'oxygène.



RPL : 60S ribosomal protein.

RPS : 40S ribosomal protein.

RT-qPCR : reverse transcriptase-qPCR.

SAM : sorting and assembly machinery.

Seq : séquençage.

SGs : granules de stress.

SPAG5 : sperm-associated antigen 5.

SRP : signal recognition particle.

St : *Solanum tuberosum*.

SUB1 : activated RNA polymerase II transcriptional coactivator p15 (nucléaire).

T-DNA : AND de transfert.

TIM : translocase of the inner membrane.

TOM : translocase of the outer membrane.

tot : total.

TPR : tetratricopeptide repeat domain.

UA : unite d'absorbance.

uAUG : upstream AUG.

Ub : ubiquinone.

UCP : uncoupling protein.

uORF : upstream ORF.

UV : ultraviolet.

VDAC : voltage-dependant anion channel.

VWA8 : von Willebrand factor A domain-containing protein 8 (mitochondriale).

WT : sauvage.

YB-1 : Y-box binding protein 1.



# INTRODUCTION



Ma thèse s'est déroulée dans l'équipe « métabolisme et trafic des ARN dans la cellule végétale » sous la supervision du professeur Anne Marie DUCHENNE et du docteur Patryk N'GONDO. La thématique abordée par mon équipe concerne notamment le trafic des ARN entre le cytosol et la mitochondrie.

Dans ce thème, les études précédentes ont mis en évidence des ARNm présents à la surface mitochondriale chez les plantes. Initialement, nous cherchions à mettre en évidence les facteurs *trans* impliqués dans la localisation de ces ARNm à la surface mitochondriale. Pour cela, nous avons initié l'étude des protéines de la famille « clustered mitochondria » (CLU), une famille de protéines cytosoliques importante pour la biogenèse mitochondriale.

Ces problématiques expliquent les recherches effectuées dans mon introduction. En effet, la première partie de mon introduction concerne la localisation des ARNm à la surface mitochondriale et la seconde partie de mon introduction concerne les protéines de la famille CLU.

## 1. Localisation des ARNm.

Le fonctionnement des cellules eucaryotes nécessite une localisation subcellulaire de nombreuses macromolécules ou complexes de macromolécules dans des zones ou compartiments spécifiques de la cellule. Cette localisation est importante pour le développement, la différenciation mais aussi pour le fonctionnement physiologique des cellules. L'un des mécanismes mis en place par la cellule pour permettre la localisation asymétrique des protéines est la localisation des ARNm.

### 1.1. Fonction de la localisation des ARNm.

La localisation subcellulaire des ARNm est généralement liée à une régulation de la traduction de ces ARNm. Le couplage de ces deux processus, localisation et transduction, permet :

- **Une restriction spatiale de l'expression des gènes** : L'expression localisée des protéines de la cellule est importante lors du développement ainsi que pour la polarisation des cellules et des organismes. Par exemple, la localisation des ARNm



*Bicoid*, *oskar* et *nanos* permet la localisation des protéines correspondantes et la formation de l'axe antéro-postérieur dans des oocytes de drosophile. En effet, l'ARNm *Bicoid* est localisé dans la partie antérieure de l'oocyte, contrairement aux ARNm *oskar* et *nanos* qui sont localisés dans la partie postérieure (Suter, 2018). Une restriction spatiale de l'expression de certains gènes permet également la polarisation des cellules et leur migration. Ainsi, dans le cas des fibroblastes et des cellules épithéliales, la localisation de l'ARNm  $\beta$ -actin et la modulation de son expression au niveau des adhérences focales (point d'ancrage et d'échanges entre les cellules et entre les cellules et la matrice extracellulaire) permet la régulation spatio-temporelle de l'expression de la protéine correspondante et des propriétés adhésives, donc de la migration de ces cellules (Ryder and Lerit, 2018).

- **Une réponse plus rapide à un stimulus** : Une localisation subcellulaire de certains ARNm peut être mise en place pour permettre à la cellule de répondre dans un temps très court à une stimulation. C'est notamment le cas des neurones qui utilisent cette stratégie pour optimiser la transmission de l'influx nerveux dans les synapses. Dans ce type cellulaire, certaines études ont montré que les ARNm *calmodulin kinase II $\alpha$* , *Arc*,  $\beta$ -actin et les ARNm des récepteurs aux glutamates sont localisés dans les dendrites neuronales sous une forme inapte à la traduction. Ce n'est que suite à l'arrivée d'un influx neuronal que la traduction de ces ARNm est possible, ce qui permet la stabilisation sous la forme active de la synapse (Kejiou and Palazzo, 2017).
- **Une économie d'énergie** : La localisation spécifique d'une protéine est un processus nécessitant de l'énergie. Le transport d'une seule molécule d'ARNm, pouvant être traduit en de nombreuses copies de la même protéine, est donc une stratégie économique permettant la localisation subcellulaire des protéines.
- **Restreindre la toxicité de l'expression d'une protéine mal localisée** : Dans certains cas, l'expression d'une protéine peut être toxique pour la cellule si cette protéine se retrouve dans le mauvais compartiment cellulaire. Pour éviter cela, la cellule a mis en place une stratégie de localisation des ARNm comme c'est le cas pour l'ARNm de la protéine MBP (Myelin basic protein). Cette protéine est impliquée dans la compaction des membranes pour la formation de la gaine de myéline autour des axones de neurones. Cette protéine ayant une interaction très forte avec les membranes, il est

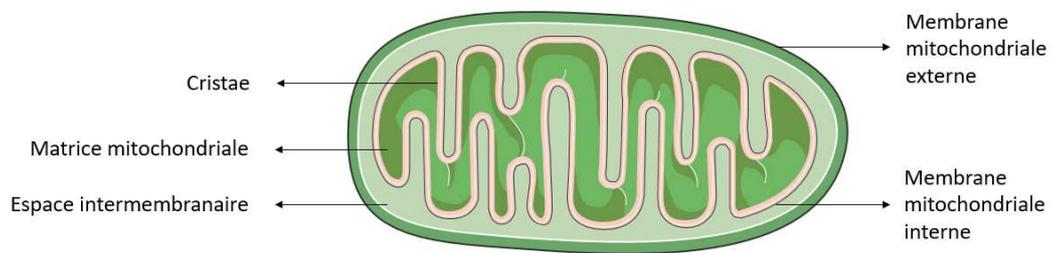


nécessaire de localiser sa traduction, grâce à la localisation spécifique de son ARNm, au niveau de la zone de formation de la myéline des axones (Suter, 2018).

- **La régulation spatiale de l'assemblage de complexes protéiques.** Dans le cas de la formation de complexes protéiques comme par exemple des complexes transmembranaires ou le cytosquelette, les ARNm codant pour les sous unités de ces complexes peuvent être localisés au lieu d'assemblage de ces complexes pour augmenter leur efficacité d'assemblage. C'est notamment le cas de l'ARNm  $\beta$ 2B-tubulin au niveau de l'extrémité plus du microtubule. De plus, la traduction localisée de ces protéines réduit les risques de modification post-traductionnelle et d'oxydation aléatoire, ce qui facilite la prise en charge des protéines par des protéines chaperonnes qui aident à l'assemblage des complexes protéiques (Lin and Holt, 2007; Suter, 2018).

## 1.2. Régulation de la localisation des ARNm.

La localisation des ARNm à un site spécifique implique de multiples étapes telles que l'export nucléaire, le transport, l'inhibition de la traduction durant l'adressage ou encore l'ancrage de ces ARNm au lieu de destination dans certains cas. Ces différentes étapes nécessitent la reconnaissance de l'ARNm par les protéines qui vont le prendre en charge. Cette reconnaissance nécessite la présence d'éléments appelés éléments « cis » présents sur l'ARNm qui sont reconnus par des protéines capables de se lier aux ARNm. Ces protéines sont appelées facteurs « trans » et sont des protéines de liaison aux ARN (RNA binding protein, RBP). Les éléments « cis » présents sur les ARNm sont appelés « éléments de localisation » ou « zipcode » et sont majoritairement retrouvés dans les régions non traduites (untranslated region, UTR), principalement la 3'UTR. Les RBP impliquées dans la localisation des ARNm peuvent avoir de multiples fonctions comme la localisation elle-même via le recrutement d'un système de transport, ou la régulation de la traduction pour maintenir l'ARNm sous forme silencieuse durant le transport. Ces différentes étapes de la localisation des ARNm sont soumises à une régulation qui va déterminer l'avenir de chaque ARNm (Martin and Ephrussi, 2009).



**Figure 1 : Structure mitochondriale.**

La mitochondrie est composée de deux membranes : la membrane mitochondriale externe et la membrane mitochondriale interne. Ces deux membranes délimitent deux espaces : l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. L'invagination de la membrane mitochondriale interne crée des structures appelées cristae.

## 2. Localisation mitochondriale des ARNm.

### 2.1. Les mitochondries.

#### 2.1.1. Structure.

La mitochondrie est un organite présent dans les cellules eucaryotes. Cet organite est issu de l'endosymbiose d'une bactérie de type alpha-protéobactérie et d'une Archeae de l'embranchement Asgard. La taille des mitochondries varie au cours du cycle cellulaire. Chez l'Homme, les mitochondries font entre 0.75 et 3  $\mu\text{m}^2$ . La mitochondrie est composée d'une double membrane permettant la distinction de 5 compartiments différents : La membrane mitochondriale externe (OM), la membrane mitochondriale interne (IM), l'espace intermembranaire entre l'OM et l'IM, les cristae formés par l'invagination de l'IM, et la matrice mitochondriale entourée de l'IM (figure 1) (Cogliati et al., 2016).

L'OM est poreuse et permet le passage de divers ions, métabolites, nucléotides et autres molécules grâce à la présence de porines tels que les VDACS (voltage-dependent anion channel). Les molécules plus grandes telles que les protéines traversent l'OM à travers une autre translocase : le complexe TOM (Translocase of the Outer Membrane). L'IM au contraire de l'OM est une membrane imperméable aux ions, ce qui génère un potentiel électrochimique d'environ -180mV entre l'espace intermembranaire et la matrice mitochondriale. L'IM étant imperméable aux ions, aux molécules et aux protéines, le passage à travers cette membrane nécessite des protéines de transports spécifiques comme cela est le cas avec les complexes TIM (translocase of the inner membrane) impliqués dans l'import des protéines. L'IM est le lieu de la phosphorylation oxydative (OXPHOS) qui utilise différents complexes pour créer un potentiel électrochimique nécessaire à la formation d'énergie sous forme d'ATP (adenosine tri-phosphate) grâce à un complexe d'ATP synthase lui aussi présent dans l'IM. L'IM est aussi composé de protéines importantes pour la fusion et la fission mitochondriale. La matrice mitochondriale contient le génome mitochondrial (ADNmt) qui porte peu de gènes (37 dont 13 codant pour des protéines chez l'Homme, et 60 dont 33 codant pour des protéines chez *Arabidopsis thaliana*). Cette matrice mitochondriale est donc le lieu de la réplication, la transcription et la traduction du génome mitochondrial ainsi que de nombreuses réactions enzymatiques telles que celles impliquées dans le cycle de Krebs ou la beta-oxydation. Le composé majoritaire de l'espace intermembranaire est le cytochrome c impliqué dans la respiration cellulaire et l'apoptose. L'IM forme des invaginations appelées cristae permettant

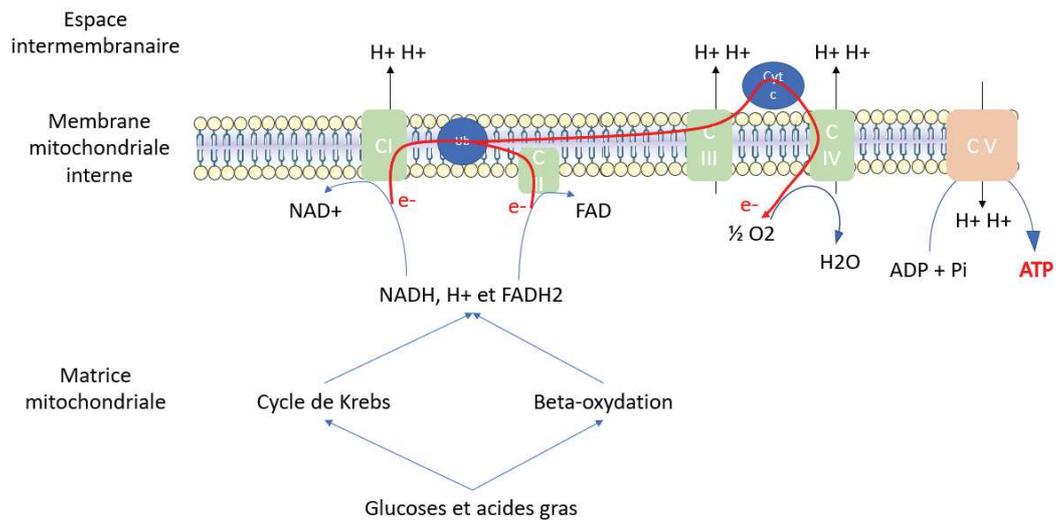


l'extension de l'IM et ainsi l'augmentation de la capacité de production d'énergie de la mitochondrie. Ces cristae sont dépendants de la demande énergétique. Ainsi, chez les mammifères, des tissus à forte demande énergétique tels que les muscles contiennent des mitochondries avec des cristae très développés alors qu'ils sont moins développés dans des tissus ayant une faible demande énergétique tel que dans le foie (Cogliati et al., 2016).

Les mitochondries forment un réseau très développé dans le cytoplasme des cellules eucaryotes. L'organisation de ce réseau est différente en fonction des organismes et des tissus cellulaires (Dard et al., 2020). En effet, ce réseau mitochondrial peut être réticulé chez l'Homme (Dard et al., 2020) ou composé de mitochondries rondes et distinctes chez les plantes (Logan, 2007).

La régulation de ce réseau mitochondrial est effectuée par des cycles de fusion (rassemblement de deux mitochondries pour n'en former qu'une) et de fission (division d'une mitochondrie pour en former deux). Ces cycles de fusions et de fissions impliquent différents facteurs protéiques présents dans les mitochondries et notamment des GTPase : Opa1 et des mitofusines pour la fusion et Drp1 pour la fission chez les mammifères. Chez les plantes, la régulation de ce réseau mitochondrial est aussi assurée par des cycles de fusion et de fission. La fission mitochondriale est régulée par des dynamin-like protéines telles que Drp3a, Drp3b, Drp1c et Drp1e. La fusion mitochondriale, quant à elle, est aussi présente chez les plantes, néanmoins les protéines impliquées dans ce mécanisme n'ont pas été identifiées (Logan, 2006).

La régulation du réseau mitochondrial est aussi dépendante de l'autophagie des mitochondries défectueuses par une voie spécifique des mitochondries : la mitophagie. Cette mitophagie est médiée par une voie de signalisation Pten-induced kinase 1 (PINK1)/Parkin (voir paragraphe 2.2.2.3.) qui est activée suite à la dépolarisation des mitochondries (notamment la rupture du gradient électrochimique de l'IM) chez les mammifères (Mishra and Chan, 2016). Chez les plantes, il y a des preuves expérimentales de mitophagies, néanmoins son mécanisme n'est pas élucidé. En effet, il n'existe pas d'homologue de certains composants clés de ce mécanisme chez les plantes notamment les homologues de PINK1 et Parkin (Broda et al., 2018).



**Figure 2 : La mitochondrie est le siège principal de production d'énergie.**

Les nutriments tels que les glucoses ou les acides gras permettent la production de composés intermédiaire réduit (NADH, H<sup>+</sup> et FADH<sub>2</sub>) dans la matrice mitochondriale grâce au cycle de Krebs et à la beta-oxydation. Ces composés réduits sont utilisés par l'OXPHOS. Les électrons de NADH, H<sup>+</sup> et FADH<sub>2</sub> sont pris en charge par les complexes I et II (CI et CII) respectivement puis transférés à l'ubiquinone (Ub) qui transfère ces électrons au complexe III (CIII). C'est le cytochrome c (cyt c) qui transfère les électrons du complexe III au complexe IV (CIV) où l'accepteur final de ces électrons est O<sub>2</sub>. Le passage de ces électrons permet le passage des protons (H<sup>+</sup>) de la matrice mitochondriale à l'espace intermembranaire par les complexes I, III et IV. Cette force protonotrice est utilisée par le complexe V (CV ou ATP synthase) pour produire de l'ATP à partir d'adénosine diphosphate (ADP) et d'un phosphate inorganique (Pi).

## **2.1.2. Fonctions.**

### **2.1.2.1. Production d'énergie.**

Les nutriments tels que les glucoses et les acides gras sont transformés en métabolites intermédiaires ce qui permet la production de composés réduits : NADH, H<sup>+</sup> (nicotinamide adénine dinucléotide) et FADH<sub>2</sub> (flavine adénine dinucléotide) par le cycle de Krebs ou la beta-oxydation dans la matrice mitochondriale. Ces composés intermédiaires sont utilisés par l'OXPPOS pour créer un gradient électrochimique nécessaire à la production d'ATP par l'ATP synthase. L'OXPPOS est composé de 5 complexes protéiques (les complexes I, II, III, IV qui crée le gradient électrochimique et le complexe V qui produit de l'ATP) et de deux transporteurs mobiles d'électrons (l'ubiquinone et le cytochrome c). Les électrons de NADH, H<sup>+</sup> sont pris en charge par le complexe I et les électrons de FADH<sub>2</sub> sont pris en charge par le complexe II. Les électrons pris en charge par les complexes I et II sont ensuite transférés dans l'ubiquinone qui les transportent jusqu'au complexe III. Ensuite, le cytochrome c permet le transfert des électrons entre le complexe III et le complexe IV où l'accepteur final des électrons sera O<sub>2</sub>. Chaque passage d'électrons à travers l'un des complexes (I, III et IV) de l'OXPPOS permet le passage de protons (H<sup>+</sup>) de la matrice jusqu'à l'espace intermembranaire. Ce passage de protons permet la création d'un gradient électrochimique qui est une force protomotrice permettant l'activation du complexe V et la production d'ATP (Cogliati et al., 2016) (figure 2).

Les complexes de l'OXPPOS impliqués dans la production d'énergie étaient déjà présents dans les bactéries. Cela implique une grande conservation de ce mécanisme à travers les espèces. Néanmoins, chez les plantes, il existe, en plus des complexes principaux de l'OXPPOS, des protéines additionnelles formant des voies alternatives du transport des électrons. Ces voies alternatives sont l'oxydase alternative ou AOX, la NAD(P)H déhydrogénase de type II et la voie alternative des transporteurs de protons UCP (uncoupling protein). Les deux premières voies sont alternatives de l'OXPPOS et l'UCP perturbe le potentiel membranaire mitochondrial conduisant à la production d'ATP. Ces trois voies sont activées en réponse à des stress biotiques et abiotiques (Colombatti et al., 2014). L'AOX est une ubiquinol - oxygène oxydoréductase qui remplit une fonction similaire aux complexes III et IV sans participer à la formation du gradient électrochimique nécessaire au fonctionnement du complexe V et à la production d'énergie (Meyer et al., 2019). L'AOX joue un rôle crucial lors des stress en diminuant la production d'espèces réactives de l'oxygène (ROS) issues de la phosphorylation oxydative. En effet, n'étant pas impliquée dans la création du gradient



électrochimique, l'AOX est cruciale pour prévenir l'excès d'électron qui crée les ROS suite à de fortes demandes en énergie lors de stress (Liberatore et al., 2016).

#### **2.1.2.2. Autres fonctions mitochondriales.**

Les mitochondries ne sont pas seulement importantes pour la production d'énergie. Les mitochondries, comme le réticulum endoplasmique (RE), servent de réserve de calcium pour la cellule et participent à la régulation fine de la concentration d'ions calcium dans la cellule. Ces ions calcium sont importants pour orchestrer des réponses cellulaires dépendantes du calcium telles que la transcription de certains gènes ou la régulation de la mort cellulaire (Pivovarova and Andrews, 2010). De plus, des études bioénergétiques ont démontré que l'absorption du calcium par la mitochondrie avait un rôle dans la régulation du métabolisme mitochondrial et de la production d'ATP principalement dans les tissus musculaires chez les mammifères (Dard et al., 2020).

La mitochondrie joue également un rôle essentiel dans la mort cellulaire principalement lors de l'apoptose. Lors de l'apoptose, l'intégrité de la membrane plasmique est maintenue jusqu'à ce que les différents fragments de cellules soient éliminés par phagocytose. Durant l'apoptose, l'OM est perméabilisée (grâce à la formation de pores dans l'OM par la protéine Bax) ce qui influence le potentiel de membrane et aboutit à la sortie de différentes molécules telles que le cytochrome c dans le cytosol. Ce cytochrome c active une voie de signalisation des caspases induisant une apoptose de la cellule (Estaquier et al., 2012). Chez les plantes, cette voie d'apoptose implique l'interaction de Bax et VDAC ce qui permet la sortie du cytochrome c et des facteurs pro-apoptotiques permettant l'apoptose (Colombatti et al., 2014).

De plus, la mitochondrie est impliquée dans la biosynthèse de l'hème. L'hème est un complexe macrocyclique qui est un groupement prosthétique (groupement inorganique maintenu dans une structure protéique) de beaucoup de protéines impliquées dans des processus d'oxydo-réduction. Ces hèmes sont présents dans des protéines impliquées dans la respiration, la photosynthèse, le métabolisme et le transport de l'oxygène. La biosynthèse de l'Hème s'effectue en partie dans la mitochondrie à travers la modification de l'acide aminé glycine associé au succinylcoenzyme A lors de 8 étapes enzymatiques (Dard et al., 2020). Ce



rôle de la mitochondrie dans la biosynthèse de l'hème n'est pas conservé chez les plantes. Chez les plantes, cette biosynthèse a lieu dans le chloroplaste. Néanmoins, d'après certaines études, les enzymes impliquées dans les trois dernières étapes de la biosynthèse (sur les douze étapes) pourraient avoir une localisation double dans le chloroplaste et dans la mitochondrie. cela suggère une localisation mitochondriale possible des dernières étapes de la biosynthèse de l'hème (Tanaka and Tanaka, 2007).

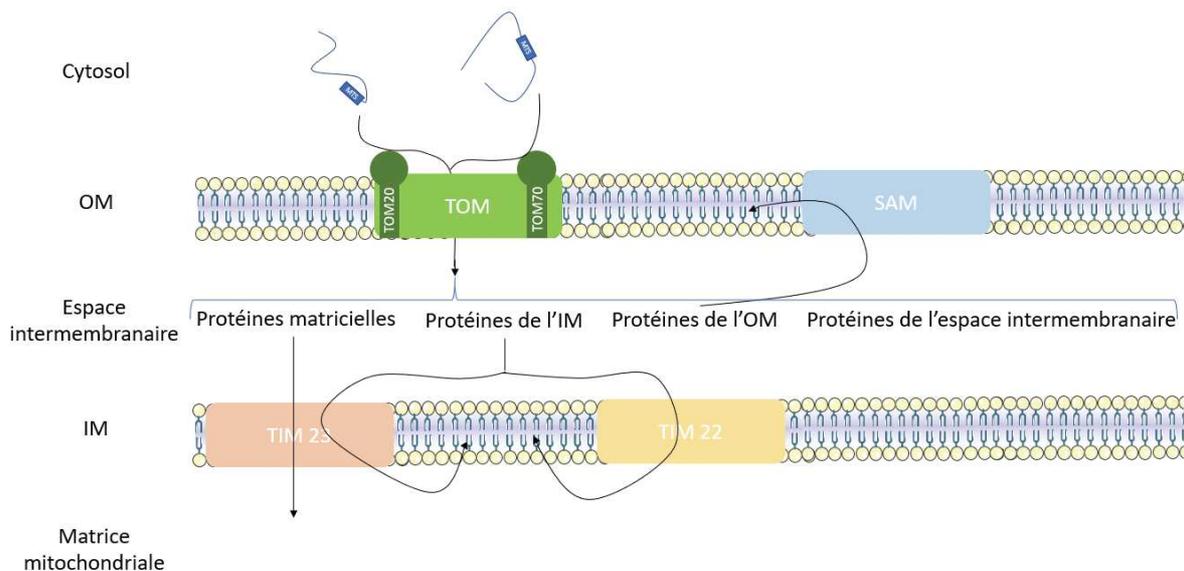
Les étapes initiales de la production des hormones stéroïdes s'effectuent dans la mitochondrie au niveau de l'IM. Les hormones stéroïdes, indispensables chez les mammifères, sont produites à partir de cholestérol. (Dard et al., 2020).

La mitochondrie est aussi impliquée dans la réponse immunitaire. En effet, suite à une infection bactérienne, l'une des réponses immunitaires des cellules permet la production de ROS par les mitochondries ce qui augmente la dégradation intra-cellulaire des bactéries (Tiku et al., 2020).

Enfin, la mitochondrie est la cible de nombreuses cascades de signalisation induites par des stress permettant la régulation de l'activité mitochondriale et l'adaptation des cellules à ces stress (Andréasson et al., 2019).

### **2.1.3. Import des protéines.**

Peu de protéines sont codées par l'ADNmt. La quasi-totalité des protéines mitochondriales sont donc codées par le génome nucléaire. Les protéines mitochondriales sont traduites dans le cytosol puis acheminées vers la mitochondrie à l'aide de différentes chaperonnes avant d'être importées. Ce mécanisme d'import mitochondrial est appelé import post-traductionnel. Les chaperonnes sont des protéines de la famille des Heat shock proteins (Hsp), dont les protéines Hsp70 et Hsp90. Ces Hsp prennent en charge les protéines mitochondriales en cours de traduction au niveau des ribosomes cytosoliques et assurent un adressage correct ainsi qu'un maintien sous la forme « dépliée » (unfolded) des protéines. Cette forme dépliée est nécessaire à l'import mitochondrial mais aussi à la protection des cellules pour lesquelles ces protéines mitochondriales sont toxiques hors de la mitochondrie (Bykov et al., 2020).



**Figure 3 : L'import des protéines mitochondriales.**

Les protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire sont importées dans la mitochondrie grâce à la translocase TOM. La plupart des protéines mitochondriales contiennent un signal d'adressage mitochondrial (MTS) présent en N-terminale ou en interne. Ce MTS permet la reconnaissance par Tom20 pour le MTS en N-terminale ou par Tom70 pour le MTS interne et permet le passage des protéines mitochondriales à travers le complexe TOM. Les protéines matricielles entrent dans la matrice mitochondriale grâce à leur passage à travers le complexe TIM 23. Les protéines de l'IM passent à travers les translocases TIM 23 et TIM 22. Enfin, les protéines de l'OM s'assemblent dans l'OM grâce au complexe SAM.

Pour assurer l'entrée des protéines mitochondriales dans les mitochondries, la cellule eucaryote a mis en place une machinerie complexe d'import mitochondrial. La plupart des protéines mitochondriales possèdent des signaux d'adressage mitochondriaux (MTS) que ce soit une préséquence chargée positivement et formant une hélice alpha en N-terminale de la protéine ou un MTS interne constituant une hélice hydrophobe. La préséquence mitochondriale est clivée dans la matrice suite à l'import de la protéine à travers le complexe TOM (Baker et al., 2007; Pfanner et al., 2019).

Quatre translocases fonctionnent pour l'import mitochondrial. Quasiment toutes les protéines mitochondriales doivent passer l'OM avant d'aller vers leur lieu de fonction que ce soit l'OM, l'IM, l'espace intermembranaire ou la matrice mitochondriale. La première translocase est donc le complexe TOM (sauf pour certaines protéines de l'OM qui s'insèrent directement dans l'OM grâce au complexe MIM (Mitochondrial Import complex) (Doan et al., 2020)). Les protéines destinées à la matrice mitochondriale passent ensuite par la translocase TIM23, Tim23 étant le facteur central de cette translocase. Pour les protéines mitochondriales destinées à l'IM, celles-ci passent à travers TIM23 (s'il y a qu'un seul segment transmembranaire en C-terminale de la protéine) ou TIM22 (s'il y a plusieurs segments transmembranaires ou un segment transmembranaire interne). Enfin, les protéines à destination de l'OM contenant des feuilletts bêta, passent par le complexe SAM (sorting and assembly machinery) (Baker et al., 2007; Pfanner et al., 2019) (figure 3).

Le complexe TOM chez les mammifères est constitué de deux récepteurs : Tom20 et Tom70, d'un organisateur central Tom22, du canal de la translocase Tom40 et de protéines impliquées dans la formation du complexe TOM notamment les protéines Tom6 et Tom7. Les protéines mitochondriales contenant une préséquence sont reconnues par le récepteur Tom20 alors les protéines mitochondriales contenant un MTS interne sont reconnues par le récepteur Tom70 (Bykov et al., 2020), avant d'être dirigées vers le pore du complexe : Tom40 (figure 3). Chez les plantes, la plupart des composants du complexe TOM sont conservés. Il existe, néanmoins, quelques différences. L'une des plus importantes est l'absence du récepteur Tom70. D'après certaines études, la protéine de la membrane externe mitochondriale OM64 pourrait être le récepteur des protéines contenant un MTS interne. L'autre différence est l'existence d'une protéine Tom20 très différente de la protéine Tom20 chez les levures et les mammifères, bien qu'ayant la même fonction de récepteur. Cette



différence pourrait être liée à l'existence du chloroplaste chez les plantes qui nécessitent une adaptation du complexe TOM pour l'import spécifique des protéines mitochondriales. De la même manière, il existe, chez les plantes uniquement, une protéine du complexe TOM appelée Tom9, qui est une version tronquée de Tom22, et qui serait elle aussi liée à la présence du chloroplaste et à la nécessité d'une spécification de l'import mitochondrial (Murtha et al., 2014).

## 2.2. Localisation mitochondriale des ARNm.

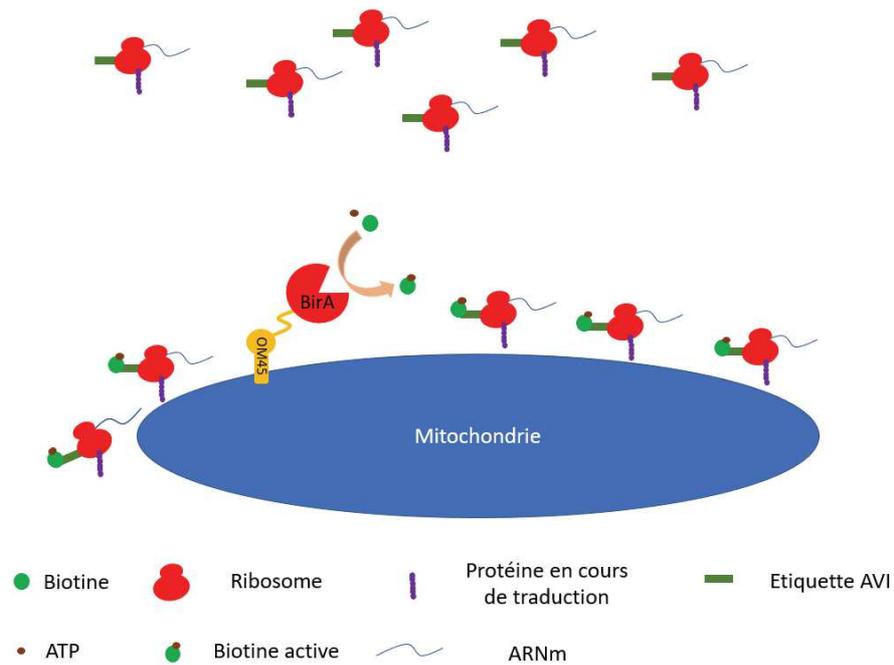
La localisation des ARNm est l'une des stratégies de la cellule pour assurer la bonne localisation des protéines à leur lieu d'action (voir paragraphe 1.). Cette localisation spécifique a été observée chez les levures, les drosophiles, les plantes et les mammifères au niveau des mitochondries pour les ARNm d'origine nucléaire codant pour des protéines mitochondriales (MITO ARNm). De la même manière, des ribosomes présents à la surface mitochondriale ont été mis en évidence à la surface de l'OM. L'ensemble de ces observations, qui seront détaillées dans les paragraphes suivants, mettent en évidence l'existence d'une voie d'adressage mitochondriale alternative : un adressage cotraductionnel des protéines mitochondriales. Selon ce modèle, les ARNm sont adressés à la surface mitochondriale où ils seront traduits et importés dans la mitochondrie (Bykov et al., 2020).

### 2.2.1. Chez la levure.

#### 2.2.1.1. Etudes globales de l'adressage des ARNm à la surface des mitochondries.

Plusieurs analyses globales ont été réalisées chez la levure. Les deux premières ont été réalisées dans la même équipe et sont basées sur une purification de mitochondries suivies d'une analyse sur puce à ADN (Marc et al., 2002) (Saint-Georges et al., 2008). La dernière approche (Williams, 2014) repose sur le marquage spécifique des ribosomes à la surface des mitochondries, leur purification, et la détermination des fragments d'ARN associés à ces ribosomes.

L'équipe de Marc *et al* (Marc et al., 2002) a séparé la fraction cytosolique de la fraction mitochondriale, isolé des polysomes à partir de ces deux fractions, puis réalisé une analyse



**Figure 4 : Expérience de « proximity-specific ribosome profiling ».**

La Biotine ligase BirA active la biotine en présence d'ATP. Cette biotine active peut ainsi se lier de manière covalente (biotinyler) une séquence spécifique AVI. L'ancrage mitochondrial de BirA ainsi que la fusion de l'étiquette AVI avec le ribosome permettent une biotinylation spécifique des ribosomes présents à la surface mitochondriale.

sur puce à ADN en s'intéressant plus particulièrement aux MITO ARNm. En comparant le taux de chacun des ARNm dans la fraction totale et la fraction mitochondriale, il est possible de déterminer lesquelles sont associés à la mitochondrie. Cette analyse globale de Marc *et al* a identifié 423 MITO ARNm dont la moitié aurait une localisation mitochondriale. Ces MITO ARNm ont été appelés MLR pour "localisation mitochondriale des ARNm". La localisation mitochondriale de 6 de ces MLR a ensuite été confirmée *in vivo*. De plus, cette adressage semble dépendant de signaux présents dans la 3'UTR des ARNm (Marc et al., 2002).

Une autre étude globale a analysé l'adressage mitochondrial de MITO ARNm. L'étude de Saint-Georges *et al* (Saint-Georges et al., 2008) a effectué une analyse sur puce à ADN à partir d'ARNm rétro-transcrits et purifiés provenant de fractions cytoplasmiques ou mitochondriales. En s'intéressant aux 794 MITO ARNm codés par le génome de la levure, cette étude a mis en évidence une localisation mitochondriale pour 480 de ces MITO ARNm, soit 60% des MITO ARNMs, ce qui est en accord avec les résultats de Marc *et al* (Marc et al., 2002).

La dernière étude globale de Williams *et al* (Williams et al., 2014) a utilisé une technique de « proximity-specific ribosome profiling » pour étudier les ARNm traduits à la surface mitochondriale. Cette technique utilise une biotine ligase, BirA, synthétisée en fusion avec OM45, une protéine de la membrane externe des mitochondries. La protéine BirA se retrouve donc ancrée à la surface mitochondriale. BirA est capable de biotinyler une séquence de 15 acides aminés appelée AVI. Le second partenaire de l'outil est donc une protéine du ribosome cytosolique, RPL16, fusionnée à AVI. Cette technique permet de marquer les ribosomes présents à proximité de la mitochondrie, de les purifier, et d'analyser les ARNm associés aux ribosomes par séquençage d'ARN (Ribo-seq) (figure 4). Cette technique a permis d'identifier 551 ARNm dont 87% sont des MITO ARNm. Dans une 1<sup>ère</sup> expérience, seulement 156 MITO ARNm traduits à la surface mitochondriale ont été identifiés, et la plupart de ces MITO ARNm codent pour des protéines de l'IM. Une 2<sup>nde</sup> expérience a été réalisée en présence de cycloheximide, qui bloque le ribosome en cours de traduction et le stabilise en association avec son ARNm. L'ajout de cycloheximide permettrait d'augmenter le temps de présence des ribosomes à la surface des mitochondries. L'ajout de cycloheximide a ainsi permis d'identifier 265 MITO ARNm traduits à la surface mitochondriale, dont les 156 ARNm précédemment détectés. En absence de cycloheximide, 27% des ARNm codant pour des protéines matricielles ont été identifiés à la surface des mitochondries, contre 67% en présence de cycloheximide. Ce nouvel enrichissement n'est pas observé pour les protéines de l'OM et de l'espace



intermembranaire. Ces résultats suggèrent qu'une majorité de protéines de l'IM et de la matrice mitochondriale sont traduites à la surface mitochondriale. Que ce soit pour leur intégration dans l'IM ou pour leur fonction dans la matrice mitochondriale, les protéines de ces deux compartiments nécessitent des structures particulières telles que des structures hydrophobes pour les protéines de l'IM qui expliqueraient leur traduction à la surface mitochondriale pour éviter une toxicité cellulaire de ces protéines.

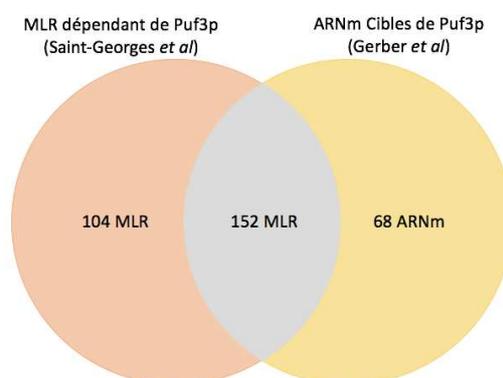
En conclusion, ces études globales montrent que de très nombreuses protéines mitochondriales d'origine nucléaire sont traduites à la surface des mitochondries.

### **2.2.1.2. Rôle des 3' UTR dans l'adressage mitochondrial des ARNm.**

En s'intéressant particulièrement à deux MLR (les ARNm de ATP2 et de ATM), Margeot *et al* ont mis en évidence le rôle de la 3'UTR dans la localisation mitochondriale des MITO ARNm (Margeot, 2002).

Margeot *et al* ont montré que les 250 premiers nucléotides de la 3'UTR (sur 639 nucléotides) ainsi que la séquence codant pour le MTS de l'ARNm ATP2 étaient nécessaires et suffisants pour l'adressage à la surface mitochondriale de cet ARNm.

Lors de l'import mitochondrial, le MTS d'une protéine mitochondriale est clivée. La protéine Atp2 existe donc sous deux formes : une forme précurseur avant l'import mitochondrial de 62kDa et une forme mature (sans le MTS) dans la mitochondrie de 55kDa. En isolant les fractions mitochondriales de levures sauvages ou transformées avec la protéine Atp2 codée par un ARNm contenant la 3'UTR de ADH1 (ATP2-3'UTR<sub>ADH1</sub>, ADH1 code pour l'alcool-déshydrogénase, une protéine cytosolique). Cette étude a montré une absence d'import de la protéine codée par l'ARNm de ATP2 modifié (ATP2-3'UTR<sub>ADH1</sub>) alors que la quasi-totalité des protéines Atp2 sauvages sont importées (Margeot, 2002). Ces résultats ont été confirmés grâce à l'analyse de la fonction mitochondriale (capacité à croître sur milieu glycérol) de levures sauvages ou *atp2* (absence d'expression de ATP2) transformées avec l'ORF (cadre ouvert de lecture) d'ATP2 seule ou l'ORF d'ATP2 fusionnée à sa 3'UTR. Seules les levures sauvages et *atp2* transformées avec l'ORF ATP2 fusionnée à sa 3'UTR ont une fonction mitochondriale normale. Ces résultats montrent l'importance de la 3'UTR de ATP2 et donc la localisation mitochondriale de l'ARNm dans la fonction mitochondriale. Des résultats similaires ont été obtenus avec l'ARNm de ATM1 (Margeot, 2002).



**Figure 5 : La fixation des MLR par Puf3p permet la localisation mitochondriale de ces MLR.**

Parmi les 256 MLR dépendants de Puf3p (en orange) d'après l'étude de Saint-George *et al*, 152 (en gris) sont aussi considérés comme liés à la protéine Puf3p d'après l'étude de Gerber *et al* (en jaune).

Ces résultats mettent en évidence l'importance de l'adressage des ARNm à la surface mitochondriale, puisque l'altération des signaux d'adressages présents dans les 3'UTR des ARNm de ATP2 et de ATM1 aboutit à une perte de l'adressage des ARNm, une baisse de l'import des protéines correspondantes, et une déficience de la chaîne respiratoire mitochondriale.

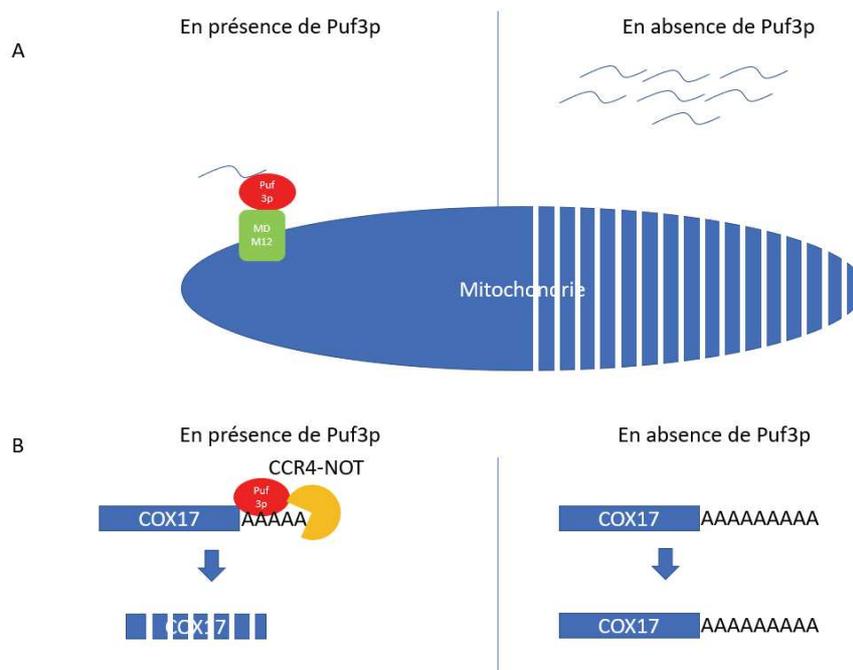
### **2.2.1.3. Rôle de la protéine Puf3p.**

L'analyse globale de l'adressage mitochondrial des MITO ARNm menée par Saint-Georges *et al* (Saint-Georges et al., 2008)(voir paragraphe 2.2.1.1.) a été réalisée dans deux lignées de levures : une lignée sauvage et une lignée mutée pour Puf3p (une RBP). La localisation mitochondriale des MLR est perdue pour 256 des 480 MLR en absence de Puf3p. Les MLR semblent donc être divisés en deux catégories : une première catégorie comprenant 256 MLR pour lesquels l'adressage est dépendant de leur association avec Puf3p, et une deuxième catégorie comprenant 224 MLR qui semblent avoir un adressage indépendant de Puf3p.

Par ailleurs, Gerber *et al* (Gerber et al., 2004) ont identifié les ARNm interagissant avec Puf3p, en utilisant une lignée exprimant Puf3p fusionnée à l'étiquette TAP. Après purification de la protéine, 220 ARNm associés ont été identifiés sur puce à ADN. L'analyse de ces ARNm associés à Puf3p montre la présence d'une séquence consensus qui est le motif de liaison de Puf3p. Il s'agit de la séquence CNUGUAAAUA souvent en 3'UTR des ARNm ainsi qu'une cytosine en position -2 des ARNm (Saint-Georges et al., 2008; Zhu et al., 2009).

Les analyses de Saint-Georges et de Gerber se recoupent. Parmi les 256 MLR dépendant de Puf3p identifiés par Saint Georges *et al* (Saint-Georges et al., 2008), 152 sont aussi des cibles de Puf3p d'après Gerber *et al* (Gerber et al., 2004) (figure 5), et les autres portent le motif de liaison à Puf3p d'après Zhu *et al* (Zhu et al., 2009). De plus, aucun des 224 MLR indépendant de Puf3p de l'étude de Saint-Georges *et al* n'est retrouvé comme interagissant de Puf3p dans l'étude de Gerber *et al*.

Enfin, l'analyse *in silico* des MLR associés à Puf3p montre que les protéines codées par ces ARNm sont souvent impliquées dans la synthèse protéique, la régulation de la traduction, l'assemblage des complexes respiratoires. Cela suggérerait un rôle de Puf3p dans les étapes précoces de la biogenèse mitochondriale (Saint-Georges et al., 2008).



**Figure 6 : Puf3p est importante pour la régulation et la localisation des MITO ARNm à la mitochondrie.**

- A) Puf3p permet la localisation des MITO ARNm à la surface mitochondriale possiblement grâce à son interaction avec MDM12. Une absence de Puf3p pourrait conduire à une surexpression des MITO ARNm qui serait délétère pour la mitochondrie.
- B) Puf3p conduit à la déadénylation du MITO ARNm COX17 grâce à son interaction avec le complexe CCR4-NOT ce qui permet la dégradation de l'ARNm.

Différentes études permettent de mieux comprendre le rôle de Puf3p. Puf3p possède un domaine PUM-HD correspondant à la répétition de 8 domaines Pumilio. Ce domaine est un domaine caractéristique des protéines de la famille PUF et serait un domaine de liaison à l'ARN comme l'ont montré Zamore *et al* (Zamore et al., 1997) par northwestern blot sur différentes portions de la protéine Pumilio chez l'humain et la drosophile.

Garcia-Rodriguez *et al* (García-Rodríguez et al., 2007) ont analysé la localisation de Puf3p dans la cellule. Des analyses de microscopie montrent que Puf3p co-localise avec les mitochondries. Cette protéine a également été retrouvée dans des extraits mitochondriaux, et la protéine apparaît présente à la surface des mitochondries. Par des expériences de doubles hybrides, Garcia-Rodriguez *et al* (García-Rodríguez et al., 2007) ont observé une interaction entre Puf3p et MDM12, une protéine mitochondriale faisant partie du complexe ERMES connectant la mitochondrie au RE. Cette interaction fait intervenir la partie C terminale de la protéine Puf3p. L'interaction entre Puf3p et MDM12 a été confirmée par microscopie et par Co-immunopurification (Co-IP) contre MDM12 (García-Rodríguez et al., 2007) (figure 6A et 8).

Lee *et al* (Lee et al., 2010) ont réalisé des expériences de "pulse-chase" sur l'ARNm de COX17, et déterminé la taille de la queue polyA de l'ARNm de COX17. Cela permet d'analyser la vitesse de déadénylation de l'ARNm de Cox17, qui apparaît réduite en absence de Puf3p, mais aussi en absence de CCR4. CCR4 est une protéine faisant partie du complexe CCR4-NOT qui est la voie majeure de déadénylation chez la levure (Tucker et al., 2002). Des expériences de Co-IP contre Puf3p ont permis de mettre en évidence l'interaction de cette protéine avec la plupart des membres du complexe CCR4-NOT. De plus, cette interaction Puf3p/CCR4-NOT semble indépendante d'une interaction avec un ARNm et nécessite la partie C terminale de Puf3p. Ces résultats montrent que Puf3p est importante pour la régulation de la stabilité et de la dégradation du MITO ARNm COX17, et qu'elle stimule la déadénylation des ARNm en association avec le complexe CCR4-NOT (Lee et al., 2010). Cette association entre Puf3p et le complexe CCR4-NOT semble faire intervenir la moitié C-Terminale de Puf3p (figure 6B).

Lapointe *et al* (Lapointe et al., 2018) ont analysé le rôle de Puf3p dans la régulation des MITO ARNm présents à la surface mitochondriale grâce à l'analyse de plusieurs études globales, et se sont particulièrement intéressés à la voie de synthèse du Coenzyme Q. Les ARNm ciblés par Puf3p ont été déterminés en utilisant deux méthodes d'analyse globale : une expérience de HITS-CLIP (High-throughput sequencing of RNA isolated by crosslinking



immunoprecipitation) et une expérience de « RNA tagging ». La technique de HITS-CLIP nécessite un crosslink aux ultraviolets (UV) ce qui permet de fixer les interactions protéines-ARN. Par la suite, la protéine d'intérêt (ici Puf3p) est immunopurifiée (CLIP) et les ARN associés à cette protéine sont séquencés par Next Generation Sequencing (NGS). La deuxième technique utilisée est le « RNA tagging ». Cette technique d'analyse consiste à fusionner la protéine d'intérêt (ici Puf3p) avec une poly(U) polymérase (PUP-2) qui va ajouter des U aux ARNm associés à Puf3p. Les ARNm sont ensuite extraits et les ARNm associés à Puf3p sont séquencés par des techniques de NGS grâce à la présence de leur poly(U). Cette technique a l'avantage de n'utiliser ni crosslink ni purification des complexes ARN-protéines. Ces deux méthodes ont permis de mettre en évidence 269 ARNm liés à Puf3p. L'analyse *in silico* de ces 269 ARNm montre la présence d'une séquence de reconnaissance de Puf3p dans la 3'UTR de 81% de ces ARNm.

Une analyse protéomique des lignées sauvages et mutantes *puf3p* a ensuite été réalisée. Parmi les 6607 protéines identifiées par spectrométrie de masse, 165 sont codées par des ARNm liés par Puf3p, dont 91 ont une expression augmentée de plus de 25% en absence de Puf3p sur milieu de fermentation. Ces 91 protéines sont appelées cibles *cis* de Puf3p, car leur ARNm est lié à Puf3p. En plus des 91 cibles *cis*, Puf3p semble aussi avoir 49 cibles *trans*. Ces cibles *trans* sont des protéines dont l'expression est affectée par l'absence de Puf3p sans que les ARNm codant pour ces protéines ne soient liés à Puf3p. Les 49 cibles *trans* de Puf3p sont importantes pour la respiration mitochondriale. L'analyse *in silico* des cibles *cis* et *trans* de Puf3p montre que les cibles *cis* sont importantes pour la biogenèse des différents complexes mitochondriaux alors que les cibles *trans* sont des sous-unités (dont certaines sont codées par le génome mitochondrial) de ces complexes mitochondriaux. Ces résultats suggèrent que Puf3p serait impliquée dans une voie de régulation post-transcriptionnelle de la synthèse des protéines mitochondriales. Cette régulation pourrait permettre une coordination des programmes de traductions mitochondriales et cytoplasmiques pour l'assemblage des complexes protéiques mitochondriaux tels que l'OXPPOS ou le complexe de synthèse du coenzyme Q (Lapointe et al., 2018) (figure 6A).

En effet, en cultivant des lignées sauvages et mutantes *puf3p* en présence de précurseur de Coenzyme Q, une altération de la synthèse de Coenzyme Q est observée en absence de Puf3p, et est restaurée en insérant une version sauvage de Puf3p dans cette lignée mutante. Puf3p est donc importante pour la voie de synthèse du Coenzyme Q. Dans leur



analyse globale, Lapointe *et al* (Lapointe et al., 2018) ont identifié 3 ARNm codant pour des acteurs de la synthèse de Coenzyme Q (COQ2, COQ5 et COQ6) parmi les ARNm liés à Puf3p, et COQ5 fait partie des 91 cibles *cis* de Puf3p. Ces résultats suggèrent que Puf3p est importante pour la synthèse de Coenzyme Q via la régulation de COQ5.

La protéine Puf3p semblant importante pour la localisation et la régulation des MITO ARNm, Jiang *et al* (Jiang et al., 2010) ont analysé la présence de cette protéine et ses fonctions dans différentes espèces de levures. Dans un premier temps, cette étude a mis en évidence des orthologues de Puf3p dans 42 espèces de levures et observée une conservation du domaine Pum-HD composé de 8 domaines Pumilio, bien que certains de ces 8 domaines soient moins bien conservés que les autres. Cette étude a de plus mis en évidence une conservation du motif de liaison à Puf3p présent dans la 3'UTR d'ARNm chez ces 42 espèces de levures. Cette étude montre cependant que le motif de liaison à Puf3p n'est enrichi dans les MITO ARNm seulement dans une partie des espèces de levures : la sous division *Saccharomycotina*. Ces résultats suggèrent donc une absence de conservation du rôle de Puf3p dans la localisation et la régulation des MITO ARNm en dehors de la sous division *Saccharomycotina*.

En conclusion, Puf3p semble être impliquée dans la localisation mitochondriale de certains MITO ARNm. En effet, parmi les 480 MITO ARNm localisés à la surface mitochondriale, 256 ont une localisation mitochondriale dépendante de Puf3p (Saint-Georges et al., 2008). Ces ARNm associés à Puf3p codent pour des fonctions impliquées dans les étapes précoces de la biogenèse mitochondriale, et seraient régulés par Puf3p pour éviter une accumulation des protéines codées par ces ARNm qui serait délétère pour la cellule (Lapointe et al., 2018; Saint-Georges et al., 2008) (figure 6). Puf3p est retrouvée associée à la mitochondrie, et serait en interaction avec Mdm12 (une protéine du complexe ERMES) et le complexe CCR4-NOT (impliqué dans la déadénylation des ARNm) (García-Rodríguez et al., 2007; Lee et al., 2010). L'association de Puf3p et du complexe CCR4-NOT serait importante pour la fonction de Puf3p qui semble être impliquée dans la déadénylation des ARNm avec lesquelles elle est associée (Lee et al., 2010)

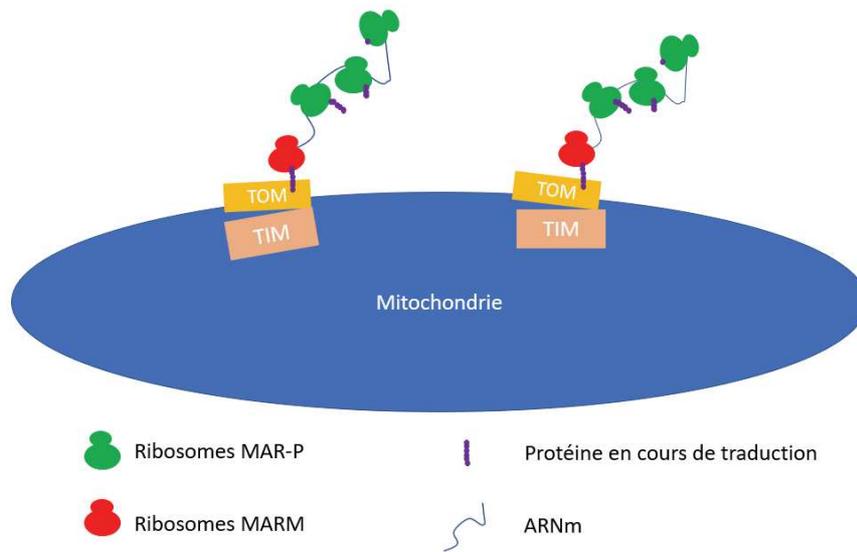


#### **2.2.1.4. Rôle de la traduction dans l'adressage d'ARNm à la mitochondrie.**

Suite à la découverte de ribosomes à la surface des mitochondries (Gold et al., 2017; Kellems et al., 1975), l'hypothèse d'un adressage co-translationnel de certaines protéines mitochondriales a été émise. Dans cette voie d'adressage, les MITO ARNm seraient localisés à la surface mitochondriale où ils pourront être traduits. Cette hypothèse a été confirmée par la mise en évidence de MITO ARNm à la surface mitochondriale et par le fait que la traduction soit importante pour l'adressage d'une partie de ces MITO ARNm présent à la surface mitochondriale (Lesnik et al., 2014; Saint-Georges et al., 2008).

Les premières études réalisées sur l'observation de ribosomes à la surface des mitochondries ont été réalisées par Kellems *et al* dans les années 70. Grâce à l'observation de mitochondries purifiées par microscopie électronique, Kellems *et al* ont mis en évidence la présence de ribosomes à la surface externe des mitochondries, principalement dans des conditions de croissance et donc de multiplication des levures, et essentiellement au niveau des points de jonction entre la membrane interne et externe mitochondriale (Kellems et al., 1975).

Ce n'est que bien plus tard que les ribosomes à la surface des mitochondries ont été de nouveau analysés, par cryo-tomographie électronique (Gold et al., 2017). Cette étude a analysé des mitochondries de levure purifiées. La tomographie électronique est une microscopie électronique particulière dans laquelle différentes images d'un même complexe dans différentes orientations permettent la reconstitution 3D du complexe. Les images de cryo-tomographies obtenues mettent en évidence des ribosomes à la surface des mitochondries, et montrent que les ribosomes ne sont pas également répartis sur la surface mitochondriale mais regroupés en cluster. Deux populations de ribosomes associés à la fraction mitochondriale (MAR) sont identifiées. La première fraction appelée MAR-M est se situe à la surface de la mitochondrie alors qu'une deuxième fraction de ribosomes appelée MAR-P se trouve plus éloignée de la surface mitochondriale. L'analyse des ribosomes de la fraction MAR-M a mis en évidence une orientation conservée de ces ribosomes, avec le tunnel de sortie de la protéine en cours de traduction orienté vers la surface mitochondriale. Les ribosomes de la fraction MAR-P ne montrent pas d'orientation spécifique. Le traitement des mitochondries avec une ribonucléase A qui dégrade les ARNm a mis en évidence une réduction de 55% du nombre de ribosomes associés à la surface mitochondriale. Cette réduction



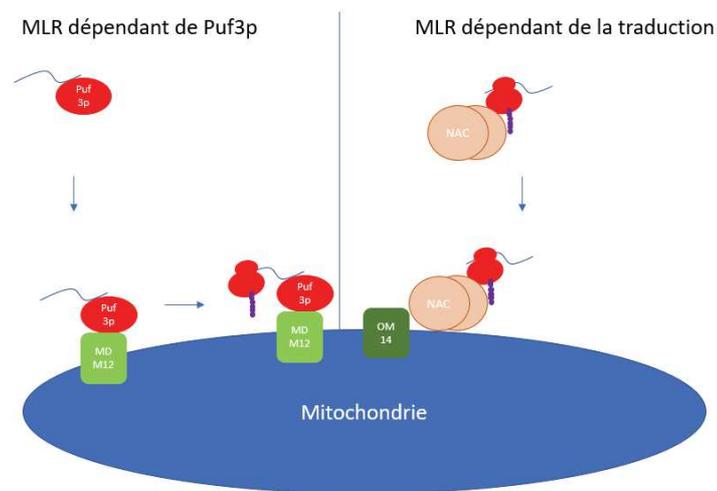
**Figure 7 : les ribosomes sont associés à la surface mitochondriale.**

Les ribosomes sont regroupés en clusters autour de Cristae Junction's (CJs) (lieux de jonction entre la membrane interne et externe mitochondriale ou on trouve des complexes d'imports TOM et TIM (voir paragraphe 2.2.1.5.)). Ces clusters sont constitués de ribosomes MAR-M associés à TOM grâce à la présence d'une MTS sur la protéine en cours de formation et de ribosomes MAR-P associées au ribosomes MAR-M grâce à leur interaction avec le même ARNm.

correspond principalement à des ribosomes de la fraction MAR-P. Ces résultats suggèrent que les ribosomes de la fraction MAR-P, donc pas directement présents à la surface mitochondriale, sont des polysomes associés à des ribosomes de la fraction MAR-M grâce à leur association au même ARNm (figure 7).

Saint-Georges *et al* (Saint-Georges et al., 2008) ont aussi étudié le rôle de la traduction dans la localisation mitochondriale des MLR. Pour cela, des cellules ont été incubées en présence de puromycine (inhibiteur de la synthèse protéique qui dissocie le ribosome) ou de cycloheximide. En présence de puromycine, 71% des MLR perdent leur localisation mitochondriale, ce qui suggère qu'une traduction active est requise pour la localisation mitochondriale de la majorité des MLR. En présence de cycloheximide, 135 MLR perdent leur localisation mitochondriale alors que 40 MLR semblent enrichis à la mitochondrie. Ce qui est intéressant, c'est que les 135 MLR ayant perdu leur localisation mitochondriale semblent coder pour des protéines importantes pour l'assemblage du ribosome mitochondrial et des complexes respiratoires. De plus, la plupart de ces 135 MLR ont la particularité de posséder un motif de liaison à Puf3p. Il existe donc différentes voies d'adressages pour les MLR : une voie fortement dépendante de Puf3p et de la traduction, une voie partiellement dépendante de Puf3 et de la traduction, et une voie indépendante de Puf3 et peu dépendante de la traduction.

Lesnik *et al* (Lesnik et al., 2014) se sont intéressés au complexe NAC ("nascent chain-associated complex") dans la localisation mitochondriale des MLR. Le complexe NAC est connu pour être important pour l'import des protéines dans le RE et pourrait aussi agir sur l'import mitochondrial via son interaction avec les mitochondries (George et al., 1998). Il existerait 2 types de dimère NAC, un hétérodimère  $\alpha$  (egd2)/ $\beta$ 1 (egd1) impliqué dans la spécificité de l'adressage au RE et un hétérodimère  $\alpha$ / $\beta$ 2 (btt1) qui s'associe à des ribosomes en cours de traduction de protéines mitochondriales (Del Alamo et al., 2011). L'adressage au RE des protéines en cours de synthèse se fait par la voie « Signal Recognition Particle » (SRP). Cette voie coordonne le ciblage endoplasmique des protéines sécrétées et membranaires vers le translocon (ou canal de translocation des protéines), et permet le passage des protéines en cours de synthèse du compartiment cytosolique vers le RE. Dans ce processus d'adressage vers le RE, NAC semble avoir une grande importance. En effet, NAC inhibe les contacts aspécifiques entre le RE et un ribosome impliqué dans la traduction d'une protéine sans peptide signal. NAC pourrait donc se lier sur tous les ribosomes en cours de traduction et



**Figure 8 : Il existe deux voies d'adressages des MLR.**

La localisation des MLR est dépendante d'au moins deux voies différentes. Une voie dépendante de Puf3p. L'ARNm est pris en charge par Puf3p pour rejoindre la mitochondrie possiblement grâce à l'interaction de Puf3p avec Mdm12. Cette localisation va permettre la traduction de ces MLR. Une deuxième voie d'adressage des MLR semble dépendante de la traduction du MLR dans le cytosol où il est pris en charge par NAC ce qui permet son adressage grâce à l'interaction de NAC avec Om14.

inhiber ainsi leur fixation sur le translocon. Pour l'adressage au RE, l'hypothèse serait qu'il y a une compétition entre SRP et NAC au niveau de la fixation sur le ribosome, et qu'en présence d'un peptide signal, SRP aurait plus d'affinité pour le ribosome que NAC et pourrait ainsi le prendre en charge (Gamerding et al., 2015).

L'étude de Lesnik *et al* (Lesnik et al., 2014) a utilisé une technique de complémentation protéique chez la levure ce qui a mis en évidence une interaction entre NAC et Om14. Cette interaction a été confirmée par Co-IP contre Om14 qui met en évidence l'association de Om14 avec la sous-unité  $\alpha$  de NAC. De plus, en l'absence de Om14, l'association entre la mitochondrie et NAC semble rompue. Ces résultats suggèrent que NAC peut être associé à la mitochondrie et cela grâce à son interaction avec Om14. En mettant en contact des ribosomes purifiés avec des mitochondries purifiées, Lesnik *et al* (Lesnik et al., 2014) ont mis en évidence une augmentation de l'association des ribosomes avec la mitochondrie en présence de Om14. Enfin, une cinétique de l'import mitochondrial de la protéine mitochondriale Mdh1 montre un import co-translationnel de Mdh1 dépendant de Om14 et de son interaction avec NAC. NAC pourrait donc permettre la localisation mitochondriale de certains MLR de manière co-translationnelle, via son association avec Om14 et des ribosomes (figure 8).

Une étude de Tsuboi *et al* (Tsuboi et al., 2020) a analysé l'implication de la traduction dans la localisation mitochondriale des MITO ARNm TIM50 et ATP3, deux ARNm connus pour être adressés à la mitochondrie (Saint-Georges et al., 2008). L'étude de Tsuboi *et al* montre l'importance de la présence de la séquence codant pour un MTS dans la séquence de l'ARNm TIM50 pour son adressage mitochondrial. Ce résultat suggère que la présence d'un MTS en cours de traduction est importante pour la localisation mitochondriale de certains MITO ARNm dont l'ARNm TIM50. L'adressage des ARNm TIM50 et ATP3 sont différents. En effet, la localisation mitochondriale de l'ARNm TIM50 est constante que ce soit dans les levures produisant de l'ATP par la fermentation ou celles produisant de l'ATP grâce à l'OXPPOS (production d'ATP mitochondriale). Cela n'est pas le cas de l'ARNm ATP3 qui semble être localisé à la surface mitochondriale seulement dans les levures ayant une production d'ATP mitochondriale (voir paragraphe 2.2.1.7.). Cela implique que le MTS de ATP3 n'a pas le même effet sur l'adressage mitochondrial de l'ARNm correspondant que le MTS de TIM50. Quand cette étude a voulu vérifier la localisation des ARN marqués par microscopie confocale, des résultats surprenants ont montré que c'était la CDS (séquence codante) et non le MTS qui était impliquée dans cette différence d'adressage entre les ARNm ATP3 et TIM50. En effet, il

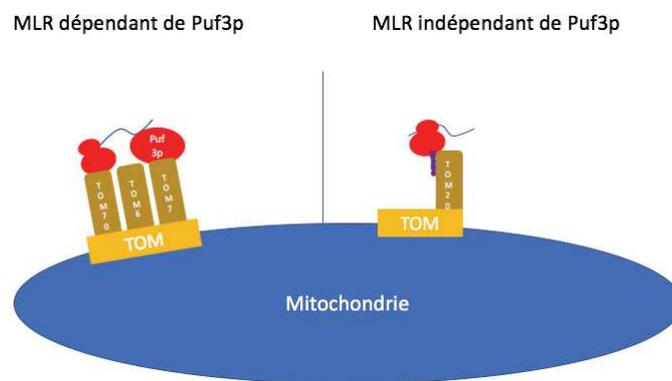


y a plusieurs prolines dans la CDS de TIM50 qui implique un ralentissement de la traduction (« ribosome stalling »). Ce ralentissement de la traduction permettrait un allongement du temps de traduction ce qui laisserait plus de temps à la mitochondrie pour reconnaître le MTS en cours de traduction et augmenterait la localisation mitochondriale de l'ARNm TIM50 en cours de traduction. L'ensemble de ces résultats suggère que la traduction est importante pour la localisation mitochondriale de certains MITO ARNm (Tsuboi et al., 2020).

#### **2.2.1.5. Rôle des complexes TOM dans la localisation mitochondriale des ARNm.**

L'association de certains MITO ARNm à la surface des mitochondries est dépendante des complexes d'import mitochondriaux de la membrane externe TOM et notamment les deux protéines réceptrices du complexe TOM (TOM20 et TOM70) (Gadir et al., 2011). La localisation mitochondriale de ces MITO ARNm serait dépendante de la présence d'un MTS sur la protéine codée par le MITO ARNm, MTS reconnu par le complexe TOM. Le rôle du complexe TOM est associé à la traduction et est important pour la localisation mitochondriale des MITO ARNm (Eliyahu et al., 2010; Gold et al., 2017).

Gadir *et al* (Gadir et al., 2011) ont analysé la localisation de 24 MITO ARNm et le rôle de la traduction dans cet adressage. Par microscopie confocale, 3 catégories de MITO ARNm ont été observées: 7 MITO ARNm (ATM1, ATP2, ATP10, CYB2, COX10, MDM10 et OXA1) sont fortement associés à la mitochondrie, 14 MITO ARNm (ACN9, ATP3, CAT5, CIT, COQ4, DNM1, GGC1, IMG1, MRPL32, OM45, PHB2, RSM25, SDH2 et SSC1) ont une association modérée avec la mitochondrie, et 3 MITO ARNm (CBS1, CYC3 et FIS1) ne semblent pas être associés à la mitochondrie. En absence de Puf3p, les MLR ATP2, OXA1, IMG1 et RSM25 perdent leur localisation mitochondriale. Ces résultats suggèrent une dépendance de Puf3p pour la localisation de ces MLR, ce qui est cohérent avec la présence d'un site de liaison à Puf3p sur ces ARNm. Gadir *et al* ont aussi montré que la localisation mitochondriale des MLR ATP2 et OXA1 était réduite en absence de Tom70, Tom7 (et Tom6 pour OXA1) mais pas de Tom20. Par contre les ARN SSC1 ET COQ4, qui ne présentent pas de motif de liaison à Puf3p, ont un adressage mitochondrial réduit en absence de Tom20. Tom70 est impliqué dans la réception des protéines ayant un MTS interne et Tom6 et Tom7 sont des sous-unités impliquées dans la formation des complexes TOM mais ne sont pas indispensables pour la reconnaissance du



**Figure 9 : La localisation mitochondriale des MLR est dépendante du complexe d'import mitochondrial TOM.**

De nombreux MLR nécessitent l'intervention du complexe TOM pour leur localisation mitochondriale. Néanmoins, deux voies différentes semblent exister. Une voie dépendante de Puf3p et des sous-unités Tom70, 6 et 7 et une voie indépendante de Puf3p et dépendante de la sous-unité Tom20.

MTS par le complexe TOM. La sous-unité Tom20 permettrait, elle, la reconnaissance du MTS en N terminale (voir paragraphe 2.1.2.). Ces résultats suggèrent que certains MLR sont dépendants du complexe d'import TOM pour leur localisation mitochondriale. Néanmoins, il y aurait une différence entre les MLR dépendants de Puf3p et les autres (figure 9). Ces résultats suggèrent un adressage différent des MLR en fonction de la destination mitochondriale de la protéine codée par ces MLR.

Une étude de Eliyahu *et al* (Eliyahu et al., 2010) a analysé plus précisément le rôle de Tom20, l'une des sous-unités du complexe TOM dans l'adressage des MLR. Sur des mitochondries purifiées, cette étude a analysé l'association des ARNm ACO1, CCP1, MRPL9, MRPL35 et IDP1 avec la fraction mitochondriale. Elle a observé une baisse de la localisation mitochondriale pour ces 5 MLR en absence de Tom20. Les mêmes expériences en absence de Tom7 ont été réalisées et ne montrent pas d'altération de la localisation mitochondriale des MLR. Cela suggère que ce n'est pas le complexe TOM mais bien l'une de ses sous-unités (Tom20) qui est importante pour la localisation de ces MLR. En présence de puromycine, un inhibiteur de la traduction, la localisation de ces MLR semble être, elle aussi, altérée. Ce résultat suggère également un rôle de la traduction dans la localisation de certain MLR.

L'étude de Eliyahu *et al* a analysé le rôle de la séquence codant pour le MTS dans la localisation mitochondriale d'un MITO ARNm dépendant de Tom20 à la surface mitochondriale : l'ARNm Su9 (la sous-unité 9 du complexe F0 de l'ATPase). Cette étude a fusionné la séquence codant pour le MTS de Su9 ou la 3'UTR de l'ARNm BCS1 (contenant le signal de reconnaissance de Puf3p) à l'ARNm de la GFP (green fluorescent protein). Grâce à cela, Eliyahu *et al* montrent que l'ARNm de la GFP est localisé à la mitochondrie en présence de ces différents signaux et que l'absence de Tom20 affecte la localisation de l'ARNm de la GFP fusionnée au MTS de Su9 principalement, et qu'elle a un effet léger sur l'adressage de l'ARNm de la GFP fusionnée à la 3'UTR de BCS1. Ces résultats montrent que Tom20 est importante pour la localisation de certains MITO ARNm, et serait principalement impliquée dans l'adressage des MLR indépendants de Puf3p (figure 9).

L'étude de Gold *et al* (Gold et al., 2017) a également fait deux expériences de Co-IP contre deux sous-unités de complexe TOM : Tom22 et Tom40. Ces deux Co-IP mettent en évidence l'association du ribosome cytosolique avec Tom22 ou Tom40, et donc avec le complexe d'import mitochondrial TOM. En traitant les cellules avec du Carbonylcyanure *m*-chlorophénylhydrazone (CCCP) qui dissipe le gradient électrochimique des mitochondries,



l'étude de Gold *et al* montre une réduction de l'association des ribosomes avec la surface mitochondriale. Les précurseurs de protéines mitochondriales contiennent un MTS. L'import dépendant de la présence d'un MTS est connu pour nécessiter une différence de potentiel électrochimique pour leur import. La baisse de ribosomes à la surface mitochondriale en présence de CCCP (en absence d'import mitochondrial possible grâce à la présence d'un MTS) suggère que la présence d'un MTS et l'import mitochondrial est nécessaire à la localisation des ribosomes à la surface mitochondriale. Pour tester cette hypothèse, Gold *et al* ont traité les mitochondries avec de l'hydroxylamine (NH<sub>2</sub>OH), un agent permettant la libération de la protéine en cours de traduction hors du ribosome. Un traitement au NH<sub>2</sub>OH réduit de 66% la présence de ribosomes à la surface mitochondriale. Ces résultats suggèrent que les ribosomes cytosoliques sont présents à la surface mitochondriale grâce à la présence d'un MTS sur la protéine en cours de synthèse, qui est prise en charge par le complexe TOM. En conclusion, cette étude de Gold *et al* a mis en évidence la localisation de ribosomes à la surface mitochondriale qui serait liée à l'association de la protéine en cours de traduction avec le complexe d'import mitochondrial TOM. Enfin, cette étude a mis en évidence un regroupement des ribosomes et des complexes TOM à au niveau des CJs (Cristae Junctions) (Gold et al., 2017) (figure 7).

#### **2.2.1.6. Rôle de COPI dans la localisation mitochondriale des ARNm.**

COPI est impliqué dans le turn over des vésicules de transport entre le RE et l'appareil de Golgi, et aurait aussi une fonction dans l'adressage de certains MITO ARNm à la surface mitochondriale et notamment l'ARNm OXA1 (Zabzhinsky et al., 2016).

Les protéines destinées à la sécrétion extracellulaire sont importées dans le RE avant d'être transportées par des vésicules recouvertes de COPII jusqu'à l'appareil de Golgi. Les vésicules recouvertes de COPI sont quant à elles envoyées de l'appareil de Golgi jusqu'au RE pour maintenir un équilibre protéique et membranaire entre ces deux compartiments cellulaires. COPI est un complexe composé d'une GTPase Arf1 et d'un complexe heptamérique appelé coatomer. Ce coatomer est constitué des protéines Sec33, Sec26, Sec27, Sec21, Ret2, Sec28 et Ret3 (Popoff et al., 2011; Zabzhinsky et al., 2016).

A l'aide d'expériences de "single molecule FISH", l'étude de Zabzhinsky *et al* a montré une baisse de la localisation mitochondriale de l'ARNm de OXA1 en absence de Sec26 (ou



d'autres sous-unités des vésicules de transport COPI), ainsi que la relocalisation de cet ARNm vers le RE. En l'absence de Sec26, la protéine Oxa1 est, elle aussi, relocalisée dans le RE, et une défaillance mitochondriale est observée. Ces défaillances sont similaires à celles observées suite à l'inactivation du complexe ERMES connectant le RE à la mitochondrie. D'autres MLR (ARNm de OXA1, CBS1, FIS1, IMG1, RSM25 et MDM10) perdent également leur localisation mitochondriale en absence de Sec26, donc lors de l'inactivation de COPI. Ces résultats suggèrent que les vésicules de transport COPI sont importantes pour la localisation de certains MLR et pour l'import mitochondrial des protéines codées par ces MLR. Enfin, en analysant la localisation de l'ARNm de OXA1 dépourvu de la séquence codant pour le MTS, cette étude a mis en évidence l'importance du MTS et donc de la traduction dans l'adressage de ce MLR à la surface mitochondriale. En conclusion, COPI joue un rôle dans l'adressage de certain MLR à la mitochondrie, de manière dépendante de la traduction. De plus, cette localisation est importante pour l'import des protéines codées par ces MLR (Zabzhinsky et al., 2016).

#### **2.2.1.7. Adressage d'ARNm et fonctions.**

Différentes études ont essayé de comprendre pourquoi certains ARNm étaient associés à la surface des mitochondries, en fonction du type d'ARNm et de la fonction de la protéine codée.

L'étude de Marc *et al* (Marc et al., 2002) a tout d'abord mis en évidence l'origine procaryotique de la majorité des MLR. En effet, 50% des MITO ARNm ont un homologue bactérien et sont considérés comme ayant une origine procaryotique. L'analyse *in silico* de ces MITO ARNm montre une majorité de MITO ARNm d'origine procaryotique dans les classes les plus adressées à la mitochondrie. L'origine procaryotique des MLR a été confirmée par les travaux de Garcia *et al* (Garcia et al., 2007). Cette étude a analysé la localisation de 112 MITO ARNm: 62 sont associés aux polysomes cytosoliques (ARNm non adressés à la mitochondrie (non-MLR)) et 50 sont associés aux polysomes de la fraction mitochondriale (MLR). L'analyse des MLR a montré que 48 sur les 50 MLR ont une origine procaryotique, contre 9 sur 62 pour les non-MLR. Garcia *et al* (Garcia et al., 2007) ont analysé les différents complexes mitochondriaux tels que l'ATP synthase et les complexes TOM et TIM d'import mitochondriaux. L'assemblage de ces différents complexes nécessite des protéines issues de MLR et de non-MLR. Il semblerait que les protéines issues des MLR (et d'origines



procaryotiques) soient impliquées dans des étapes précoces de la formation de ces différents complexes. Les auteurs suggèrent que la localisation mitochondriale des MLR serait utilisée pour la régulation spatio-temporelle de la formation des complexes mitochondriaux.

L'étude de Lelandais *et al* (Lelandais et al., 2009) a analysé la localisation de certains MITO ARNm en fonction de l'activité mitochondriale. Lelandais *et al* ont utilisé les données de puce à ADN de Tu *et al* (Tu et al., 2005), dans laquelle l'expression des gènes de levures a été analysée toutes les 25 minutes pendant 300 minutes, sur des cultures de levures synchronisées (soit 36 analyses sur puce à ADN et cela sur 3 cycles métaboliques consécutifs). L'étude de Lelandais *et al* s'est intéressée aux 626 MITO ARNm ayant une expression périodique dans l'analyse de Tu *et al*, et à la périodicité de leur expression. La moitié des gènes de levure (soit 3552 gènes) ont une expression périodique, alors que pour la sous-population des MITO ARNm, la périodicité d'expression concerne 86% des gènes. Quelle est le rôle de cette périodicité d'expression dans la fonction mitochondriale ? Dans un premier temps l'étude de Lelandais *et al* a classé les 626 MITO ARNm en sous-groupes en fonction de leur périodicité d'expression. 6 sous-groupes de MITO ARNm nommés de A à F ont ainsi été mis en évidence. Par exemple, les sous-groupes A (262 MITO ARNm) et B (77 MITO ARNm) ont un pic d'expression au début du cycle métabolique (avec le sous-groupe A qui s'exprime avant le sous-groupe B). Ces différents MITO ARNm ont, également, été classés en 7 groupes fonctionnels : machinerie de traduction, régulation de la traduction, facteurs d'assemblage, import protéique, complexe de la chaîne respiratoire, cycle de Krebs et synthèse des acides aminés. L'analyse de regroupement entre ces deux classifications (sous-groupes A à F et classification fonctionnelle) met en évidence un lien entre le profil d'expression des MITO ARNm et leurs fonctions. En effet, les MITO ARNm du sous-groupe A sont principalement des facteurs d'assemblages, des facteurs de la machinerie de la traduction et de la régulation de la traduction alors que les MITO ARNm du sous-groupe B sont annotés complexes de la chaîne respiratoire. Ces deux sous-groupes A et B semblent donc être importants pour faciliter la construction des complexes, avec la nécessité d'exprimer des facteurs d'assemblages avant les protéines des complexes respiratoires.

L'étude de Lelandais *et al* a ensuite analysé le lien entre la localisation des MITO ARNm et leur périodicité d'expression. Pour cela, cette étude a comparé les MITO ARNm présents dans les sous-groupes A à F avec les MITO ARNm de classe I, II et III de l'étude de Saint-Georges *et al* (Saint-Georges et al., 2008). Les MITO ARNm de classe I et II sont localisés à la surface



mitochondriale (les MITO ARNm de la classe I sont dépendants de Puf3p) et les MITO ARNm de la classe III ne sont pas localisés à la surface mitochondriale. Une majorité de MITO ARNm de classe I se retrouve dans le sous-groupe A (183 sur les 262 MITO ARNm de ce groupe). La distribution des MITO ARNm des classes II et III est moins spécifique. Ces résultats mettent en évidence une coordination entre la périodicité de l'expression des MITO ARNm et leur lieu de traduction.

L'analyse de la 3'UTR des MITO ARNm des sous-groupes A à F met en évidence la présence d'un motif de liaison à Puf3p pour 80% des MITO ARNm du sous-groupe A, ce qui est cohérent avec le fait que la majorité des MITO ARNm localisés à la mitochondrie et dépendants de Puf3p se retrouvent dans ce sous-groupe. Les MITO ARNm du sous-groupe A seraient donc localisés à la surface de la mitochondrie de façon dépendante de Puf3p et seraient impliqués dans les premières étapes de la biogenèse mitochondriale. Pour vérifier cette hypothèse, 9 lignées de levures portant une délétion d'un des MITO ARNm de fonction inconnue du sous-groupe A ont été analysées. La capacité à croître sur milieu non fermentable (donc respiration obligatoire) et à assembler les complexes III et IV (grâce à l'analyse des spectres des cytochromes) a été étudiée pour ces 9 lignées. Sept de ces lignées montrent des problèmes de croissance sur milieu non fermentable et des altérations du spectre des cytochromes, mettant en évidence des dysfonctions au niveau de l'assemblage des complexes respiratoires. Ces 7 MITO ARNm du sous-groupe A seraient donc importants pour les phases initiales de la biogenèse mitochondriale.

En conclusion, l'étude de Lelandais *et al* (Lelandais et al., 2009) suggère une régulation post transcriptionnelle des MITO ARNm au cours d'un cycle métabolique, faisant intervenir la localisation de ces ARNm et la protéine Puf3.

L'étude de Tsuboi *et al* analyse la localisation mitochondriale de 3 MITO ARNm : les ARNm TIM50, ATP3 et TOM22 (Tsuboi et al., 2020). Des approches de microscopie confocale montrent que ces différents MITO ARN ont des comportements différents au niveau de leur localisation mitochondriale. L'ARNm TIM50 est localisé à la surface mitochondriale en conditions de fermentation et de respiration, alors que l'ARNm TOM22 n'est jamais retrouvé à la surface mitochondriale (Tsuboi et al., 2020). Ces résultats sont cohérents avec les études précédentes où l'ARNm TIM50 est un MLR, mais pas l'ARNm TOM22 (Saint-Georges et al., 2008). En condition de fermentation, l'ARNm ATP3 ne semble pas localisé à la surface mitochondriale, mais il se retrouve à la surface mitochondriale en condition de respiration. La



localisation mitochondriale de l'ARNm ATP3 s'accompagne d'une augmentation de la traduction et de la stabilité de cet ARNm, ce qui aboutit à l'augmentation du taux de protéines ATP3 quand les besoins mitochondriaux le demandent. En conclusion, cette étude de Tsuboi *et al* met en évidence l'importance de l'adressage mitochondriale pour le fonctionnement des mitochondries en fonction des demandes cellulaires (Tsuboi et al., 2020).

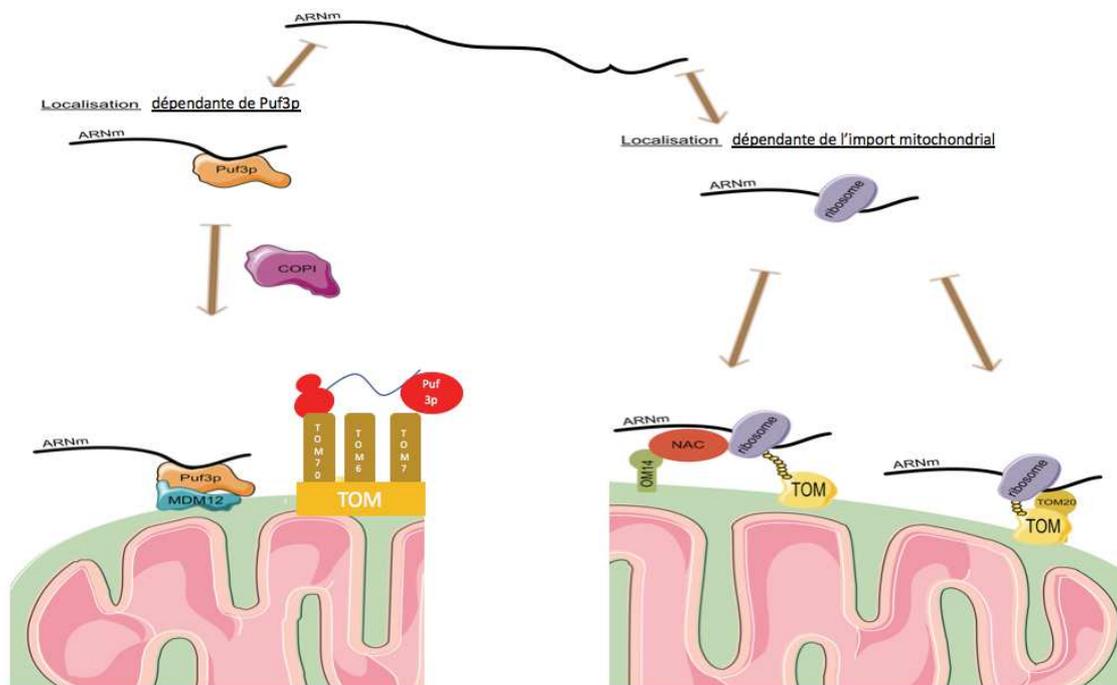
#### **2.2.1.8. Conclusion : complexité et diversité des mécanismes d'adressage des ARNm à la surface mitochondriale chez la levure.**

Trois analyses globales ont permis d'identifier des MITO ARNm à la surface mitochondriale. Cela concernerait la moitié des 423 MITO ARNm pour Marc et al (Marc et al., 2002), et 480 des 794 MITO ARNm pour Saint-Georges *et al* (Saint-Georges et al., 2008). Williams *et al* (Williams et al., 2014) ont identifié 265 sur 479 MITO ARNm associés à la mitochondrie en présence de cycloheximide. Ces MITO ARNm localisés à la surface mitochondriale ont été appelés MLR.

Marc *et al* (Marc et al., 2002) et Margeot *et al* (Margeot, 2002) ont mis en évidence le rôle des 3'UTR dans la localisation mitochondriale de certains MLR. Margeot *et al* (Margeot, 2002) ont également montré l'importance de la localisation mitochondriale des MLR pour l'import des protéines codées par ces ARNm, puisqu'en absence de localisation mitochondriale de l'ARNm de ATP2, il y a une absence d'import mitochondriale de la protéine correspondante.

Plusieurs études ont également mis en évidence la présence de ribosomes à la surface externe des mitochondries (Gold et al., 2017; Kellems et al., 1975), qui dépendraient du complexe NAC et de OM14 et permettraient une traduction localisée de certains MLR (Gold et al., 2017; Kellems et al., 1975; Lesnik et al., 2014; Saint-Georges et al., 2008).

Un autre facteur *trans* mis en évidence est la protéine Puf3p, une RBP liée de manière préférentielle aux MITO ARNm grâce à la présence sur ceux-ci d'un motif spécifique de liaison (Gerber et al., 2004; Zhu et al., 2009). Les ARNm associés à Puf3p semblent impliqués dans les étapes précoces de la biogenèse mitochondriale, et seraient régulés par Puf3 pour éviter une accumulation cytosolique délétère des protéines codées par ces ARNm (Lapointe et al., 2018; Saint-Georges et al., 2008). De plus, la localisation de certains MLR nécessite la présence du complexe TOM (Eliyahu et al., 2010; Gadir et al., 2011; Gold et al., 2017). Enfin, un dernier



**Figure 10 : Localisation des ARNm à la surface mitochondriale chez la levure.**

Des MITO ARNm et des ribosomes sont présents à la surface mitochondriale chez la levure. Cette localisation mitochondriale semble impliquer différentes voies, non exclusives : des voies dépendantes de la traduction, de Puf3p et COPI ou de NAC et Om14. En effet parmi les différentes voies d'adressage mitochondriale des MITO ARNm mis en évidence : l'une semble dépendante de Puf3p et de COPI avec présence à la surface mitochondriale médiée par Mdm12 et/ou les sous-unités Tom6, Tom7 et Tom70 du complexe TOM (voie dépendante de Puf3p). L'autre semble dépendante de l'import avec plusieurs voies d'adressage possible que ce soit par l'intermédiaire de la sous unité Tom20 du complexe TOM ou par l'intermédiaire de Om14 et NAC (voie dépendante de l'import mitochondrial).

facteur important pour la localisation mitochondriale de certains MLR est COPI (Zabzhinsky et al., 2016) (figure 10).

Il est à noter que la localisation des ARNm de OXA1, FIS1 et CBS1 a été analysée dans deux études différentes (Gadir et al., 2011; Zabzhinsky et al., 2016). L'étude de Gadir *et al* met en évidence le rôle de Puf3p dans la localisation mitochondriale de l'ARNm de OXA1, alors que Zabzhinsky *et al* montrent le rôle de COPI dans cette localisation. Ces résultats ne sont pas nécessairement contradictoires mais suggèrent que Puf3p et COPI travaillent dans une même voie pour l'adressage d'un certain nombre de MITO ARNm à la surface mitochondriale. Pour les ARNm FIS1 et CBS1, ces deux études montrent une absence de localisation mitochondriale pour Gadir *et al* alors qu'il s'agit de MLR pour Zabzhinsky *et al*. Ces différences de localisation peuvent être expliquées par la différence de sensibilité des techniques utilisées. En effet Gadir *et al* ont utilisé de la microscopie confocale, alors que Zabzhinsky *et al* ont analysé l'association d'ARNm avec des fractions de mitochondries purifiées.

Enfin, plusieurs études se sont intéressées à la fonction de l'adressage mitochondrial des ARNm chez la levure. Dans certains cas, l'adressage de l'ARNm semble influencer l'import de la protéine (Margeot, 2002). D'autres études mettent en évidence un lien entre adressage de l'ARNm et origine procaryotique ou eucaryotique du gène (Marc et al., 2002) (Garcia et al., 2007). Finalement, l'adressage des ARNm semble associé à certaines fonctions impliquées dans les étapes précoces de la biogenèse mitochondriale (Garcia et al., 2007). Ainsi, Lelandais *et al* (Lelandais et al., 2009) proposent une régulation spatiotemporelle de l'expression des MITO ARNm au début du cycle métabolique de la levure. Les facteurs de traduction et d'assemblages codés par les MLR seraient exprimés en premier, pour permettre la formation des complexes mitochondriaux, donc le bon fonctionnement des mitochondries au cours du cycle de vie de la levure.

### **2.2.2. Chez la drosophile.**

Il y a peu d'informations connues sur l'adressage d'ARNm à la surface des mitochondries chez la drosophile. Néanmoins, quelques études récentes montreraient un rôle de MDI, de La related protein (Larp) et de PINK1, une serine/thréonine kinase mitochondriale dans ce phénomène.



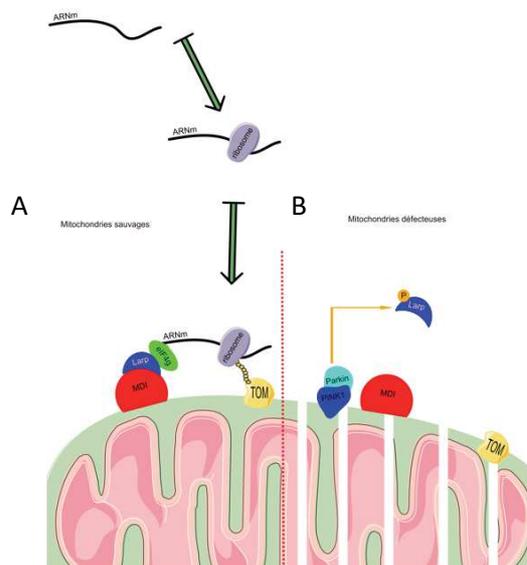
### **2.2.2.1. Adressage d'ARNm cytosoliques à la surface des mitochondries.**

Aucune étude globale n'a été réalisée chez la drosophile à ce jour. Cependant quelques ARNm ont été identifiés à la surface des mitochondries. Gehrke et ses collègues (Gehrke et al., 2015) ont ainsi mis en évidence la localisation à la surface des mitochondries de 2 MITO ARNm : l'ARNm C-I-30 codant pour la sous-unité de 30kDa du complexe I de la chaîne respiratoire mitochondriale, et l'ARNm Oscp codant pour la sous unité OSCP du complexe V de la chaîne respiratoire mitochondriale (voir ci-dessous, 2.2.2.3.). En utilisant des analogues de la méthionine, Zhang *et al* (Zhang et al., 2016) ont également pu montrer une traduction cytosolique à la surface des mitochondries (voir ci-dessous, 2.2.2.2.).

### **2.2.2.2. Rôle des protéines MDI et Larp.**

L'étude de Zang *et al* (Zhang et al., 2016) porte sur la protéine MDI et son rôle dans l'adressage des MITO ARNm à la surface mitochondriale. MDI est une protéine de la famille des protéines "A-Kinase-Anchoring Protein" (AKAP) possédant un MTS. La localisation de MDI à la surface des mitochondries, et plus particulièrement au niveau de l'OM, a été mise en évidence par des analyses sur des mitochondries isolées. Une Co-IP contre MDI a permis d'isoler 15 protéines en complexes avec MDI. Parmi ces 15 protéines, 13 sont impliquées dans la traduction telles que des sous-unités du ribosome cytosolique ou eIF4G. Les 3 protéines les plus abondantes sont eIF4G, Larp et la polyA binding protein (PABP). Ces résultats suggèrent que MDI est impliquée dans la traduction cytosolique en association avec Larp.

L'association entre MDI et Larp a été confirmée par une autre Co-IP sur des extraits d'ovaires de drosophile. L'observation de la localisation de Larp dans des cellules de drosophile montre une co-localisation avec les mitochondries, bien que cette protéine ne soit pas annotée comme étant mitochondriale. Cette co-localisation est abolie dans un mutant *mdi* (absence d'expression de MDI). Ces résultats suggèrent que MDI est importante pour l'adressage mitochondrial de Larp. D'après des études précédentes, Larp interagirait avec PABP et eIF4G pour stabiliser les ARNm et stimuler leur traduction (Tcherkezian et al., 2014). Cela suggère que MDI-Larp pourrait promouvoir la traduction à la surface mitochondriale.



**Figure 11 : Localisation des ARNm à la surface des mitochondries chez la drosophile.**

Les travaux de (Zhang et al., 2016, 2019) suggèrent

- A) Les MITO ARNm sont adressés à la surface mitochondriale grâce à Larp et à son association avec MDI.
- B) Dans le cas d'une défaillance mitochondriale, PINK1 phosphoryle Larp ce qui la rend inapte à localiser des ARNm à la surface mitochondriale.

Par des expériences d'incorporation d'analogue de méthionine (homopropargylglycine (HPG), Zhang *et al* (Zhang et al., 2016) ont pu visualiser la synthèse des protéines naissantes dans des cellules d'ovaires de drosophile. Ils ont ainsi observé un marquage HPG fort au niveau des mitochondries. Ce marquage met en évidence une traduction à la surface mitochondriale. Des expériences similaires, en présence d'un autre analogue de méthionine (L-azidohomoalanine), ont ensuite été réalisées dans des cellules sauvages et des cellules *mdi*. Ces expériences montrent donc une inhibition de la synthèse protéique cytosolique associée à la surface mitochondriale en absence de MDI, ce qui confirme un rôle de MDI pour la traduction à la surface mitochondriale.

L'analyse du protéome d'oocyte mature de drosophile sauvage et mutante *mdi* montre que 65 protéines sont sous-exprimées en absence de MDI, dont 64 protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire. Parmi ces protéines, il y a 21 protéines ribosomales mitochondriales (par exemple mRPL19) et 23 protéines de la chaîne de transport d'électron (par exemple COX4). Le taux de protéines mRPL19 et COX4 a été analysé dans une lignée cellulaire *mdi* exprimant une protéine de fusion Larp-Tom20. Cette construction permet l'ancrage de Larp au niveau de la membrane mitochondriale malgré l'absence de MDI. L'ancrage mitochondrial de Larp restaure le taux sauvage des deux protéines mRPL19 et COX4.

L'ensemble des résultats de cette étude de Zhang *et al* (Zhang et al., 2016) montre que MDI recrute Larp à la surface mitochondriale, ce qui permet une traduction cytosolique localisée de différentes protéines mitochondriales codées par le génome nucléaire (figure 11A).

### **2.2.2.3. Rôle de PINK1.**

Deux publications mettent en évidence le rôle de la protéine PINK1 dans la localisation mitochondriale des MITO ARNm et leur traduction localisée (Gehrke et al., 2015; Zhang et al., 2019). PINK1 est une protéine kinase Serine/Thréonine.

PINK1 a été bien étudiée dans les cellules de mammifères. PINK1 est recruté à la surface de mitochondries défectueuses où il va recruter Parkin (une ubiquitine ligase E3) à la surface mitochondriale grâce à la phosphorylation de Parkin. Ce recrutement est important



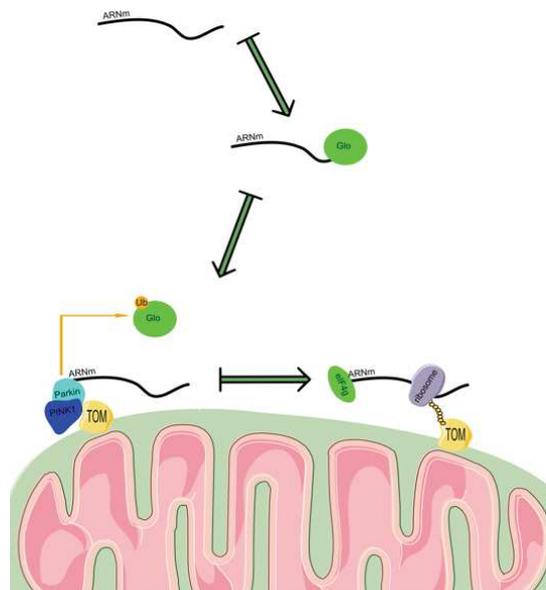
pour l'induction de la mitophagie des mitochondries défectueuses (Narendra et al., 2008, 2010).

Cette localisation mitochondriale de PINK1 dans les mitochondries défectueuses a été confirmée par Zhang *et al* (Zhang et al., 2019). Ils ont également montré que la présence de PINK1 à la surface des mitochondries inhibe la traduction cytosolique à la surface mitochondriale. De plus, une analyse protéomique d'oocytes de drosophile où PINK1 est à la surface mitochondriale met en évidence une sous-expression de 136 protéines comparée aux oocytes sauvages (Zhang et al., 2019). 70% de ces protéines avaient été précédemment trouvées comme étant sous-exprimées en absence de MDI (Zhang et al., 2016). Ceci suggère un rôle inhibiteur de PINK1 sur la traduction associée à MDI. Ce rôle inhibiteur pourrait être lié à la phosphorylation de Larp par PINK1 qui inhiberait son association avec MDI et donc la traduction à la surface mitochondriale (Zhang et al., 2019) (figure 11B).

Contrairement à l'étude de Zhang *et al* (Zhang et al., 2019), l'étude de Gehrke *et al* (Gehrke et al., 2015) semble montrer une fonction différente de PINK1 dans la localisation des MITO ARNm à la mitochondrie. Cette étude montre que le taux de deux protéines mitochondriales codées par des MITO ARNm C-I 30, et Oscp est réduit dans un mutant *pink1* (absence d'expression de PINK1) alors que le taux de trois protéines mitochondriales codées par le génome mitochondrial n'est pas affecté par cette mutation.

Le taux d'expression des ARNm correspondant aux protéines mitochondriales C-I-30 et Oscp n'est pas altéré dans un extrait total. En revanche l'analyse de fractions mitochondriales montre que le taux d'association des 2 ARNm avec la mitochondrie semble altéré en absence de PINK1. Ce taux de localisation est aussi altéré dans des mitochondries sauvages traitées à la RNAses A, ce qui n'est pas le cas pour les ARNm codés par le génome mitochondrial. Ces résultats suggèrent donc une localisation à la surface de la mitochondrie de 2 MITO ARNm (C-I-30 et Oscp), localisation altérée en absence de PINK1 (Gehrke et al., 2015).

Des observations microscopiques montrent la présence de ribosomes cytosoliques à la surface des mitochondries. De plus, l'analyse de polysomes dans les fractions cytosoliques et mitochondriales indique que les MITO ARNm régulés par PINK1 sont plus engagés dans la traduction dans la fraction mitochondriale que dans la fraction cytosolique. Ceci suggère une traduction plus active de ces ARNm à la surface mitochondriale (Gehrke et al., 2015).



**Figure 12 : Localisation des ARNm dépendant de PINK1 chez la drosophile.**

D'après (Gehrke et al., 2015), PINK1 permet le recrutement des ARNm C-I-30 et Oscp à la surface mitochondriale, dans un état traductionnel inactif. L'ubiquitylation du facteur de répression Glo par Parkin permet la traduction de ces ARNm et l'import des protéines correspondantes.

Différentes observations suggèrent que PINK1 est impliqué dans la localisation des ARNm à la surface des mitochondries. PINK1 semble s'accrocher directement aux ARNm, interagir avec Tom20, et contrôler la traduction des ARNm. Ainsi, après un stress mitochondrial, une Co-IP dirigée contre Tom20 montre une association avec PINK1. Cette association entre Tom20 et PINK1 est ARN-dépendante (Gehrke et al., 2015).

Une expérience de chromatographie montre par ailleurs l'association de PINK1 avec la CAP en 5' des ARNm mais aussi avec eIF4G, un composant du complexe d'initiation de la traduction capable de se lier à la CAP. Une autre expérience d'IP ARN montre l'association de PINK1 avec les MITO ARNm C-I 30 et Oscp dans des fractions mitochondriales (Gehrke et al., 2015).

Enfin, différents répresseurs traductionnels, comme Pum (protéine de la famille Pumilio) ou Glo, ont également été identifiés associés aux ARNm dans certaines conditions. L'inhibition de Glo par RNAi (ARN interférence) restaure le phénotype du mutant PINK1. De plus, en absence de PINK1 ou de Parkin, il y a plus de Glo présents dans la fraction mitochondriale.

Le modèle proposé par Gehrke *et al* est le suivant : Certains MITO ARNm, maintenus dans un stade traductionnellement inactif, sont adressés à la surface des mitochondries grâce à PINK1 et Tom20. Là, la répression par Pum et Glo est levée, et les ARNm peuvent interagir avec des initiateurs de la traduction comme eIF4G. La levée de la répression passerait en particulier par l'ubiquitinylation de Glo par PINK1/Parkin (figure 12).

Ce contrôle par PINK1 apparaît tissu dépendants : l'effet de la mutation de PINK1 est observé dans les muscles du thorax et le cerveau mais pas dans les intestins. Ce modèle semble toutefois en opposition avec les travaux de Zhang et al (Zhang et al., 2019), qui ont montré que la présence de PINK1 à la surface des mitochondries inhibe la traduction cytosolique associée aux mitochondries.

#### **2.2.2.4. Rôle de la traduction localisée à la surface mitochondriale.**

L'analyse de la transmission des mitochondries dans les oocytes de drosophile par Zhang et al (Zhang et al., 2019) montre que l'absence de PINK1 aboutit à une augmentation



de la transmission de mitochondries défectueuses dans les oocytes de drosophiles. D'un autre côté, l'inhibition de MDI aboutit aussi à une transmission de mitochondries défectueuses dans les oocytes de drosophiles (Zhang et al., 2016), ce qui suggère un rôle de la localisation de certains MITO ARNm et de leur traduction à la surface des mitochondries dans la régulation de la transmission des mitochondries saines dans les oocytes de drosophiles.

En effet, PINK1 serait importante pour la transmission à la génération suivante des mitochondries saines. L'association de PINK1 aux mitochondries défectueuses inhiberait la traduction localisée à la surface des mitochondries, grâce à la phosphorylation de Larp par PINK1, ce qui inhibe le complexe MDI-Larp (figure 11) (Zhang et al., 2016, 2019).

#### **2.2.2.5. Conclusion.**

Chez la drosophile, la localisation des MITO ARNm semble être dépendante de la traduction. D'après les études décrites dans le paragraphe précédent, cette localisation implique la protéine PINK1. Il y a deux modèles opposés concernant la fonction de PINK1 dans la traduction localisée des protéines mitochondriales. Gehrke *et al* (Gehrke et al., 2015) montrent que PINK1 aide à la traduction à la surface de la mitochondrie, et Zhang *et al* (Zhang et al., 2016, 2019) montrent que PINK1 est localisée à la surface des mitochondries défectueuses pour inhiber la traduction localisée grâce à son rôle dans l'inhibition de Larp et MDI (par phosphorylation de Larp). Ces deux rôles de PINK1 ne sont pas forcément antagonistes. En effet, la différence de fonction peut être dépendante des ARNm ciblés puisque Gehrke *et al* (Gehrke et al., 2015) travaillent principalement avec 2 des ARNm codant pour des sous-unités de la chaîne respiratoire, alors que Zhang *et al* (Zhang et al., 2016, 2019) montre un rôle de MDI, Larp et PINK1 sur un plus grand nombre de protéines mitochondriales, comme les sous-unités du mitoribosome ou de la chaîne de transfert d'électron. La différence pourrait aussi être dépendante du tissu analysé puisque Gehrke *et al* travaillent sur des drosophiles et notamment les muscles, thorax, cerveau et intestins alors que les études de Zhang *et al* portent sur des oocytes, des ovaires et cellules scheider 2 (lignée embryonnaire) de drosophiles.



### **2.2.3. Chez les plantes.**

#### **2.2.3.1. Première mise en évidence d'un adressage d'ARNm cytosolique à la surface mitochondriale chez les plantes.**

La première mise en évidence d'ARNm localisés à la surface mitochondriale chez les plantes a été réalisée par Michaud *et al* (Michaud et al., 2010). L'étude des MITO ARNm s'est faite grâce à la purification de mitochondries à partir de tubercules de *Solanum tuberosum* (St, pomme de terre). L'association mitochondriale de 17 ARNm a été étudiée, en comparant la quantité d'ARNm dans les fractions mitochondriale et totale. Parmi ces 17 ARNm, il y a 8 MITO ARNm, 3 ARNm codant pour des protéines adressées à la mitochondrie et au chloroplaste (adressage double), 2 ARNm codant pour des protéines chloroplastiques et 4 ARNm codant pour des protéines cytosoliques. Les 2 ARNm codant pour des protéines chloroplastiques sont considérés comme étant de la contamination et ont donc servi de références non-adressées.

Cette étude a mis en évidence 6 ARNm adressés à la surface mitochondriale (les ARNm CS, PDH-E1alpha, eIF4E1, SUCLA2, MDH et GAPDH). Parmi ces 6 MLR, 4 sont des MITO ARNm (les ARNm CS, PDH-E1alpha, SUCLA2 et MDH), ce qui implique que seulement une partie des MITO ARNm sont localisés à la surface mitochondriale.

Les deux autres ARNm adressés codent pour des protéines cytosoliques (GAPDH et eIF4E1). L'ARNm glyceraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) code pour une enzyme de la glycolyse. Chez les plantes, les enzymes de la glycolyse semblent être associées à la mitochondrie comme l'a montré l'étude de Giegé *et al* (Giegé et al., 2003) via l'analyse protéomique de mitochondries purifiées d'*Arabidopsis thaliana*. Giegé *et al* ont trouvé 7 des 10 enzymes de la glycolyse associées à la fraction mitochondriale. L'adressage de l'ARNm GAPDH met donc en évidence une localisation mitochondriale indépendante de la présence d'un MTS sur la protéine codée par cet ARNm.

Le deuxième ARNm cytosolique adressé code pour le facteur d'initiation de la traduction cytosolique eIF4E1. La localisation de l'ARNm de eIF4E1 a été précédemment étudiée par Nicolai *et al* (Nicolai et al., 2007). Cette étude a mis en évidence l'import de l'ARNm eIF4E1 dans le stroma des chloroplastes de 4 plantes supérieures (*Arabidopsis thaliana*, *Nicotiana tabacum*, *Lactusa sativa* (laitue) et *Spinacia oleracea* (épinard)). L'analyse



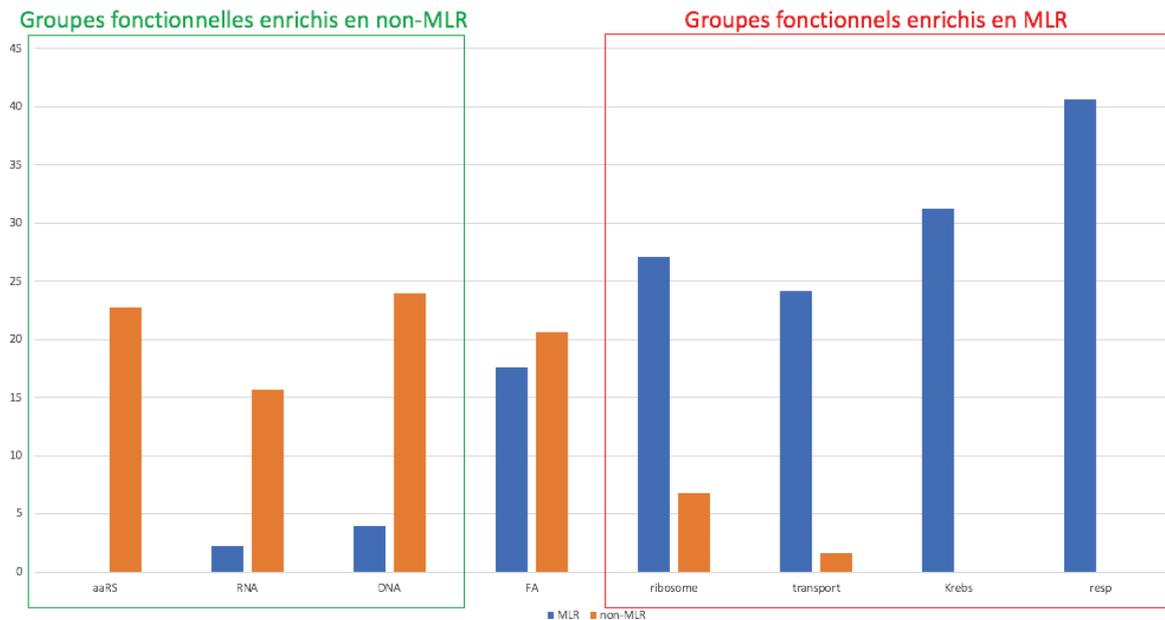
par microscopie confocale de eIF4E1 montre une localisation nucléaire et cytosolique mais ne montre pas de colocalisation de la protéine de fusion eIF4E1-GFP avec les chloroplastes. Ces résultats suggèrent que l'ARNm eIF4E1 est importé dans le chloroplaste et que cette importation aurait un rôle de régulation de la traduction du facteur d'initiation eIF4E1. La détection de l'ARNm eIF4E1 dans une fraction mitochondriale, observée par Michaud *et al* (Michaud et al., 2010), met en évidence une localisation double de cet ARNm. Cet ARNm serait cependant plutôt à la surface des mitochondries, mais pas importé (résultat non publié).

Les 8 MITO ARNm étudiés chez les plantes (ARNm MDH, SUCLA2, PDH-E1alpha, CS, PDH-E2, IDH, ATP5m et RPL12m) ont été comparés à leur orthologue chez la levure (Marc et al., 2002). Les 4 MLR de plantes sont également MLR chez la levure, et l'ARNm ATP5m est non-MLR dans les 2 organismes. Pour les autres, il est difficile de conclure s'il s'agit d'une différence entre organismes ou d'une différence de protocole d'extraction, puisque le protocole de *St* est plus stringent que celui de levure. Il y a néanmoins une assez bonne corrélation entre les MLR chez la levure (Marc et al., 2002) et les MLR testés chez les plantes.

### **2.2.3.2. Analyse globale de la localisation de MITO ARNm à la surface mitochondriale.**

La seule analyse globale des ARNm localisés à la surface mitochondriale chez les plantes a été réalisée par Vincent *et al* (Vincent et al., 2017). Cette étude a analysé les MITO ARNm adressés à la mitochondrie. Pour cela, Vincent *et al* ont effectué une expérience de RNA-seq sur des mitochondries purifiées de *St* et sur des extraits totaux. Une analyse différentielle des ARNm présents dans les fractions totales et mitochondriales a ensuite été réalisée permettant de déterminer un enrichissement dans la fraction mitochondriale. Enfin, les différents MITO ARNm ont été annotés, en se basant sur des recherches d'orthologie entre *St* et *Arabidopsis thaliana*. Grâce à cela, 1924 MITO ARNm ont été mis en évidence.

En prenant comme seuil une p-value ajustée ( $p\text{-adj}$ ) < 0.05, 15% des 1924 MITO ARNm sont des MLR, et 15% sont des non-MLR. Les critères utilisés pour déterminer les classes MLR et non-MLR apparaissent toutefois très stringents, puisque des ARNm déjà identifiés comme MLR, comme l'ARNm MDH (Michaud et al., 2010) (voir paragraphe 2.2.3.1.) n'étaient pas pris en compte. Vincent *et al* ont donc modifié les paramètres d'analyse et créé deux nouvelles



**Figure 13 : La localisation mitochondriale des MITO ARNm est dépendante des fonctions des protéines codées par ces MITO ARNm.**

Les protéines impliquées dans la traduction (mitoribosomes), dans le transport, dans le cycle de Krebs et dans la respiration sont majoritairement codées par des MITO ARNm enrichis à la surface mitochondriale (MLR), cadre rouge. Les protéines impliquées dans l'aminoacylation des ARNt, dans le métabolisme des ARN et de l'ADN, ou les protéines PPR sont codées par des MITO ARNm principalement localisés dans le cytosol (non-MLR), cadre vert. Figure adaptée de Vincent *et al* (Vincent et al., 2017).

classes de MITO ARNm. Les MITO ARNm "likely-MLR" ont un enrichissement dans la fraction mitochondriale supérieure à 1,25 fois plus que dans la fraction totale. Les MITO ARNm "likely-non-MLR" ont un enrichissement dans la fraction totale supérieur à 1,25 fois plus que dans la fraction mitochondriale. Ces nouveaux paramètres ont permis de mettre en évidence 32% de likely-MLR et 28% de likely-non-MLR. Les MITO ARNm restant sont considérés comme ayant un adressage ambigu.

### **2.2.3.3. Rôle de l'adressage mitochondrial des ARNm cytosoliques.**

Une classification des 1924 MITO ARNm par Vincent *et al* (Vincent et al., 2017) a permis la formation de 8 classes d'ARNm en lien avec la fonction des protéines codées par ces MITO ARNm. Vincent *et al* (Vincent et al., 2017) ont alors analysé le pourcentage de MLR et de non-MLR dans chacun des 8 groupes fonctionnels. Cette étude a mis en évidence un enrichissement des MLR dans les MITO ARNm codant pour des protéines du mitoribosome, du transport, du cycle de Krebs et de la respiration. Au contraire, les MITO ARNm codant pour des protéines impliquées dans l'aminoacylation des ARN de transfert (ARNt), dans le métabolisme des ARN et de l'ADN, et les protéines PPR (sous-famille de protéines de liaison à l'ARN possédant un domaine "Pentatricopeptide Repeats") ne semblent pas être localisés à la surface mitochondriale. Par exemple, parmi les protéines impliquées dans la respiration, 40% sont codées par des MLR et 0% sont codées par des non-MLR (figure 13). Cette étude de Vincent *et al* suggère donc que l'adressage mitochondrial de l'ARNm serait important pour certaines fonctions mitochondriales comme la traduction, l'import, et le métabolisme énergétique des mitochondries.

Une 2<sup>nde</sup> étude s'est intéressée aux ARNm de VDAC3 chez *Arabidopsis thaliana*. (Michaud et al., 2014a). En effet, deux isoformes de l'ARNm VDAC3 existent. Une version ayant une 3'UTR courte (cUTR) et une version ayant une extension de 140 nucléotides dans la 3'UTR, appelée aUTR et suffisante pour la localisation mitochondriale de la version longue de l'ARNm VDAC3 (voir paragraphe 2.2.3.5.1.) (figure 14). Le mutant *vdac3* (absence d'expression de VDAC3) n'ayant pas de phénotype dans des conditions normales de culture, l'étude de Michaud *et al* (Michaud et al., 2014a) a utilisé un mutant *vdac1* (absence d'expression de VDAC1) ayant un phénotype net. L'absence de VDAC1 aboutit à des feuilles de rosettes et

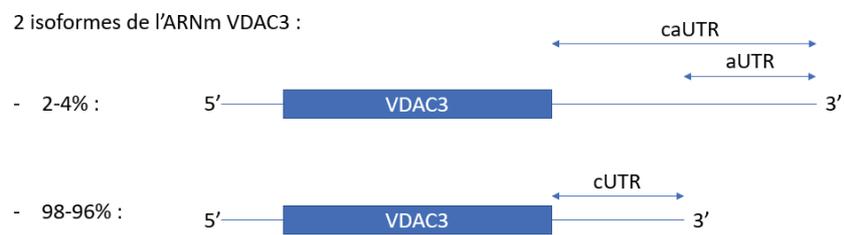


feuilles caulinaires déformées, des problèmes de développement et une réduction de la fertilité. Ce phénotype au niveau de la plante est associé à une réduction du nombre de mitochondries et à une augmentation de leur taille. Le mutant *vdac1* a été transformé avec les constructions VDAC3-cUTR (l'ORF de VDAC3 est fusionnée à la version courte de la 3'UTR de VDAC3) et VDAC3-aUTR (l'ORF de VDAC3 est fusionnée à l'extension de 140 nucléotides trouvée dans la version longue de la 3'UTR de VDAC3). L'ARNm VDAC3-aUTR est retrouvé adressé à la mitochondrie, mais pas l'ARNm VDAC3-cUTR. Les deux lignées de plantes *vdac1* complémentées avec VDAC3-cUTR ou VDAC3-aUTR montrent une restauration du phénotype sauvage au niveau de la plante. Au niveau des mitochondries, seules les plantes complémentées avec VDAC3-cUTR permettent une restauration du nombre et de la taille des mitochondries. Les plantes transformées avec VDAC3-aUTR montrent une diminution de la taille des mitochondries (alors qu'elles étaient plus grandes dans le mutant *vdac1* que dans la plante sauvage) et une augmentation du nombre de mitochondries (alors qu'elles étaient moins abondantes dans *vdac1*). Ces résultats suggèrent que les deux versions de l'ARNm, donc la différence d'adressage, ont un effet différent sur le phénotype mitochondrial. L'étude de Michaud *et al* (Michaud et al., 2014a) a ensuite analysé la quantité de protéines VDAC3 intégrées dans la membrane mitochondriale. Pour cela, des fractions mitochondriales obtenues sur les deux lignées *vdac1* complémentées avec VDAC3 ont été traitées à la protéinase K, qui dégrade les protéines mais n'entre pas dans les mitochondries (les protéines cytosoliques ou ancrées à la surface mitochondriale sont dégradées, et les protéines intra-mitochondriales et les parties transmembranaires sont intactes). Le taux de protéines VDAC3 importées dans les mitochondries est le même dans les 2 lignées VDAC3-cUTR ou VDAC3-aUTR. La différence de phénotype n'est donc pas liée à une différence d'import mitochondrial de la protéine VDAC3. Ces résultats suggèrent que la localisation mitochondriale de l'ARNm VDAC3-aUTR n'a pas d'influence sur l'efficacité d'import de la protéine VDAC3.



#### **2.2.3.4. Facteurs protéiques impliqués dans l'adressage mitochondrial des ARNm.**

Michaud *et al* (Michaud et al., 2014b) ont mis en évidence des facteurs protéiques impliqués dans la localisation mitochondriale des ARNm par des expériences *in vitro*. Dans cette étude, des mitochondries de *St* purifiées sont incubées avec un transcrit de GAPDH radiomarké, puis les mitochondries sont de nouveau purifiées. L'analyse par Northern blot de ces mitochondries montre que le transcrit de GAPDH peut se fixer à la mitochondrie. Les mitochondries ont ensuite été traitées avec de l'EDTA (acide éthylènediaminetétraacétique) ou de la puromycine qui permettent d'enlever les ribosomes cytosoliques présents à la surface mitochondriale. En absence des ribosomes cytosoliques, le transcrit GAPDH semble être davantage associé à la surface mitochondriale. Ces résultats suggèrent que certains MLR sont localisés à la surface mitochondriale indépendamment de la traduction, et que les ribosomes pourraient masquer des sites de fixation des MLR à la mitochondrie. Michaud *et al* (Michaud et al., 2014b) ont ensuite recherché les facteurs mitochondriaux responsables de l'association des MLR avec la mitochondrie. Pour cela, les mitochondries sont pré-incubées avec des anticorps contre des protéines de la surface mitochondriale telle que des composants du complexe TOM (voir paragraphe 1.2.) ou les protéines VDAC (voir paragraphe 2.1.1.1.). L'anticorps bloque la protéine cible, ce qui permet d'analyser le rôle de chacune d'entre elles dans l'association du transcrit GAPDH avec la mitochondrie. Les résultats de cette expérience mettent en évidence le rôle des sous-unités du complexe TOM dans l'adressage des MLR à la surface mitochondriale. Parmi les sous-unités du complexe TOM, Tom20 est l'un des récepteurs du complexe. Un traitement protéinase K sur des mitochondries purifiées élimine la sous-unité Tom20 mais pas l'accrochage du transcrit GAPDH, ce qui suggère que le complexe TOM est important pour la localisation des MLR, bien que cela soit indépendant de Tom20.



**Figure 14 : 2 isoformes de VDAC3.**

L'ARNm de VDAC3 existe sous deux isoformes, une forme courte avec une 3'UTR constitutive (cUTR) et une forme longue avec l'ajout d'une extension alternative de la 3'UTR (aUTR) ce qui forme une 3'UTR longue (caUTR). Figure inspirée de Michaud *et al* (Michaud et al., 2014a).

### **2.2.3.5. Signaux cis d'adressage mitochondrial des MITO ARNm.**

#### 2.2.3.5.1. Signaux dans la 3'UTR (3' untranslated region).

Les travaux de Michaud *et al* (Michaud et al., 2014a) sur l'ARNm codant pour la protéine mitochondriale VDAC3 ont montré l'existence de 2 isoformes différentes de l'ARNm en fonction de la taille de leur 3'UTR (région en aval du codon STOP de l'ARNm). L'une mesure 206 nucléotides et est appelée UTR constitutive (cUTR), et l'autre mesure 346 nucléotides et est appelée caUTR. Cette caUTR est différente de la cUTR car elle contient une extension de 140 nucléotides appelée UTR alternative (aUTR) en 3' du cUTR (figure 14). L'analyse par RT-qPCR (reverse-transcriptase quantitative polymerase chain reaction) montre une abondance différente des deux isoformes, avec la version longue qui ne représente que 2 à 4 % des ARNm totaux de VDAC3 (figure 14).

L'analyse de la présence des deux isoformes de l'ARNm de VDAC3 sur des mitochondries purifiées de cellules d'*Arabidopsis thaliana* montre une association 3 fois plus importante pour la version longue VDAC3-caUTR que pour la version courte VDAC3-cUTR de cette ARNm. Michaud *et al* (Michaud et al., 2014a) ont transformé *Arabidopsis thaliana* avec des gènes codant pour des ARNm de VDAC3 avec la caUTR, la cUTR ou la aUTR (figure 14). Les ARNm isoformes avec les séquences caUTR et aUTR sont associés à la mitochondrie contrairement à la version cUTR. Ces résultats ont été confirmés en expression transitoire chez *Nicotiana benthamiana* par une expérience de localisation des ARN marqués par microscopie confocale. Les constructions VDAC3-aUTR, MDH, mais aussi RPL12p-aUTR colocalisent avec les mitochondries. Ces résultats montrent que la séquence aUTR est suffisante pour adresser un ARNm à la surface mitochondriale.

Un autre ARNm MLR, MDH (Michaud et al., 2010), a été étudié par Vincent *et al* (Vincent et al., 2017). La technique de localisation des ARN marqué par microscopie confocale a mis en évidence que l'absence de 3'UTR de MDH aboutit à une réduction de la colocalisation mitochondriale de cet ARNm.

Ces deux études mettent en évidence le rôle de la 3'UTR dans la localisation de certains MLR (Michaud et al., 2014a; Vincent et al., 2017).



**Figure 15 : Éléments nucléotidiques consensus des MITO ARNm non adressés à la mitochondrie.**

La présence d'un AUG en amont de l'AUG initiateur (uAUG) initie un ORF en amont de l'AUG initiateur (uORF) qui peut être chevauchant avec l'ORF de l'ARNm (o-uORF). Inspirée de Vincent *et al* (Vincent et al., 2017).

#### 2.2.3.5.2. Signaux dans la 5'UTR.

L'étude *in silico* des différents MITO ARNm par Vincent *et al* (Vincent et al., 2017) montre qu'il n'y a pas de corrélation entre l'adressage des MITO ARNm et la présence de séquences MTS, d'hélices transmembranaires, ou l'hydrophobicité de la protéine codée. L'analyse de la taille et la composition des 5'UTR des différents MITO ARNm a ensuite été réalisée. Cette analyse a mis en évidence une différence de taille entre les 5'UTR des MLR et des non-MLR (157 nucléotides pour les non-MLR contre 119 nucléotides pour les MLR). Il n'y a pas de différence en composition nucléotidique entre les 5'UTR des MLR et des non-MLR. Par contre, il y a une différence de fréquences de certains triplets nucléotidiques. En effet le triplet AUG semble être enrichi dans les 5'UTR des non-MLR. Il n'y a aucun AUG en amont du site d'initiation de la traduction (upstream AUG ou uAUG) dans 25% des MLR, contre 7% seulement dans les non-MLR. Ces résultats suggèrent un lien entre la présence d'un uAUG et la localisation des MITO ARNm à la surface mitochondriale. En effet, plus il y a de uAUG dans la 5'UTR des MITO ARNm, moins ceux-ci sont adressés à la surface mitochondriale. Ces uAUG peuvent être utilisés comme sites d'initiation de nouvelles phases de lectures qui seraient en amont du site principal d'initiation de la traduction, et qui sont appelées Upstream ORF (uORFs) (figure 15). L'étude de Vincent *et al* (Vincent et al., 2017) a montré que la présence d'une uORF chevauchant le site principal d'initiation de la traduction (o-uORF) avait un effet de répression de la localisation mitochondriale des ARNm (figure 15). Ces résultats ont été vérifiés *in vivo* par microscopie confocale. Différentes ARNm ont été utilisés, MDH (MLR), RPL12p (non-MLR) et eEF1alpha. L'ARNm de eEF1alpha code pour un facteur d'élongation de la traduction, et contient une o-uORF. Les localisations au niveau des mitochondries pour l'ARNm MDH et dans le cytosol pour RPL12p ont été confirmées. L'ARNm de eEF1alpha a une localisation cytosolique, en accord avec des travaux antérieurs (Michaud et al., 2010).

La mutation de l'uAUG de eEF1alpha en AUC, qui abolit l'o-uORF, permet une localisation mitochondriale de l'ARNm. Les 5'UTR sauvage ou mutée de eEF1alpha (c'est-à-dire avec ou sans o-uORF) ont également été clonées en amont de l'ORF de MDH. La localisation mitochondriale de MDH fusionnée à la 5'UTR de eEF1alpha muté n'est pas affectée. Au contraire, l'ARNm de MDH fusionné à la 5'UTR sauvage de eEF1alpha diminue la colocalisation de cet ARNm avec les mitochondries. Les o-uORF affectent donc l'adressage mitochondrial des ARNm.



La présence d'uORF a souvent été étudiée, et notamment dans l'étude de Zhang *et al* (Zhang et al., 2018). Zhang *et al* ont étudié 2 gènes chez *Arabidopsis thaliana* (les gènes AtBRI1 et AtVTC2) et 2 gènes chez la laitue (les gènes LsGGP1 et LsGGP2). Chez *Arabidopsis thaliana*, AtBRI1 code pour un récepteur de phytohormone et AtVTC2 code pour une enzyme de la voie de synthèse de l'acide ascorbique. Chez les laitues, LsGGP1 et LsGGP2 sont deux orthologues (homologies : 70%) de AtVTC2 et sont probablement impliqués dans la même voie. Des protoplastes d'*Arabidopsis thaliana* et de laitue ont été transfectés avec un système rapporteur luciférase fusionné aux 5'UTR AtBRI1 et AtVTC2 chez *Arabidopsis thaliana* et LsGGP1 et LsGGP2 chez la laitue. Les 5'UTR fusionnées au système luciférase sont soit sauvages, soit mutées au niveau de l'initiation de l'uORF (délétion à cheval sur l'uORF ou modification de uAUG en uAAA), soit mutées avant l'uORF. Il y a donc 4 constructions pour chaque gène analysé. L'analyse de ces différentes constructions montre, pour l'ensemble des 4 gènes testés, une augmentation de l'expression de la luciférase et donc de la traduction de ces gènes suite à la mutation de leur uORF. Par exemple, la délétion à cheval sur l'uORF augmente la traduction du gène correspondant d'un facteur 2.65 pour AtVTC2 et 8.33 pour LsGGP2, par rapport à la construction avec la 5'UTR sauvage. Le système Clustered Regularly Interspaced Short Palindromic Repeats-Cas9 (CRISPR-Cas9) a ensuite été utilisé pour muter les 5'UTR de ces 4 gènes chez *Arabidopsis thaliana* et la laitue. Ainsi, dans le cas de AtVTC2 chez *Arabidopsis thaliana*, la délétion de l'uAUG par le système CRISPR-Cas9 aboutit à l'augmentation de la production d'acide ascorbique (70% d'acides ascorbiques en plus par rapport au sauvage). Cette étude montre donc que les uORF sont impliquées dans la régulation de la traduction et inhibent la traduction de leur ORF principale située en aval.

L'étude de Vincent *et al* a aussi analysé l'effet de ces uORF (et des uAUG) sur la traduction grâce à l'utilisation du système rapporteur GUS (Vincent et al., 2017). Pour cela, l'ORF de la beta-glucuronidase (GUS) a été fusionnée à la 5'UTR de eEF1alpha sauvage (uAUG-GUS) ou à la 5'UTR de eEF1alpha mutée (l'uAUG est muté en uAUC, uAUC-GUS). Ces différentes constructions ont été transfectées dans des cellules d'*Arabidopsis thaliana*. L'expression de la GUS est 2.7 fois supérieure dans la construction uAUC-GUS par rapport à uAUG-GUS. Ces résultats montrent que la présence d'un uAUG et donc d'une uORF inhibe la traduction. Ces résultats suggèrent qu'il y a donc un lien entre la traduction de certains MITO ARNm et leur localisation à la surface mitochondriale.



### **2.2.3.6. Conclusion.**

Chez les plantes, environ 32% des MITO ARNm semblent être localisés à la surface mitochondriale. Cette localisation mitochondriale semble être dépendante des fonctions des protéines codées par ces MITO ARNm puisque les MLR semblent codées pour des protéines mitochondriales impliquées dans la traduction mitochondriale (mitoribosome), le transport, le cycle de Krebs et la respiration mitochondriale (Vincent et al., 2017). La localisation mitochondriale de ces MLR semble être dépendante de séquences présentes dans la 3'UTR comme c'est le cas des ARNm VDAC3 et MDH (Michaud et al., 2010, 2014a). Il y aurait également une corrélation entre l'absence de uAUGs dans la 5'UTR des MLR et l'efficacité de localisation mitochondriale et de traduction des MLR (Vincent et al., 2017). La première étude de la localisation mitochondriale de certains ARNm chez la plante a mis en évidence une localisation mitochondriale pour certains ARNm codant pour des protéines cytosoliques comme c'est le cas pour les ARNm GAPDH et eIF4E1. Ces ARNm semblent avoir une fonction proche de la mitochondrie ce qui expliquerait leur localisation (Michaud et al., 2010). Enfin, une étude *in vitro* de l'adressage mitochondrial de l'ARNm GAPDH a mis en évidence une localisation mitochondriale de cette ARNm indépendante des ribosomes et donc de la traduction mais dépendante du complexe TOM (une sous-unité autre que Tom20) (Michaud et al., 2014b).

### **2.2.4. Chez les mammifères.**

#### **2.2.4.1. Analyse globale de la localisation mitochondriale des ARNm chez l'Homme.**

Une étude de Fazal *et al* (Fazal et al., 2019) a utilisé une technique «d'APEX2-RNA sequencing» ou APEX-Seq pour déterminer les ARNm présents à la surface mitochondriale. L'APEX2 est une peroxydase ascorbique issue du soja qui catalyse l'oxydation de la Biotine-phénol (BP). Le radical-BP se lie covalamment aux protéines et aux ARNm. L'ajout de peroxyde d'hydrogène (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) pendant 1minute (maximum) combiné à la demi-vie très courte du radical-BP (<1ms) permet la biotinylation des ARNm et des protéines présents dans un rayon de quelques nanomètres de l'APEX2 seulement. Cette restriction spatiale va permettre de déterminer quels ARNm sont présents à la surface mitochondriale. Pour cela, des cellules



HEK293T (cellules de rein embryonnaire humain) sont transformées avec une construction APEX2 fusionnée à la partie C-terminale de la protéine MAVS (mitochondrial antiviral signaling protein). MAVS est une protéine intégrée à la surface externe de la mitochondrie grâce à un domaine transmembranaire présent dans sa partie C-terminale, et est impliquée dans la réponse antivirale (Jacobs and Coyne, 2013). Cette protéine de fusion permet l'ancrage à la surface mitochondriale de l'APEX2 (APEX2-OMM). La transformation de cellules HEK293T avec la protéine APEX2 fusionnée à un signal d'export nucléaire (NES) sert de contrôle négatif et permet l'enrichissement des ARNm cytosoliques. De plus, Fazal *et al* ont également analysé les ARNm enrichis à la surface du RE grâce à l'utilisation d'une construction APEX2 présente à la surface du RE.

Fazal *et al* ont identifié 1024 ARNm enrichis à la surface mitochondriale (MLR). L'analyse de ces 1024 ARNm montre un enrichissement des MITO ARNm par rapport aux ARNm codants pour des protéines non mitochondriales ou non-sécrétées. Parmi les 1024 ARNm trouvés enrichis à la surface mitochondriale, 719 ARNm sont aussi trouvés enrichis à la surface du RE. Seuls 306 ARNm sont spécifiques de la surface mitochondriale. Ces résultats suggèrent que la localisation mitochondriale des ARNm est au niveau des sites de contacts entre le RE et la mitochondrie.

Une deuxième expérience a été l'analyse des ARNm localisés à la surface mitochondriale en présence de cycloheximide ou de puromycine (des inhibiteurs de la traduction) (voir paragraphe 2.2.4.5.). Cette étude a mis en évidence 1902 ARNm à la surface mitochondriale. La comparaison de ces 1902 ARNm avec la base de données des gènes codants pour des protéines mitochondriales : MitoCarta2.0 montre 328 MITO ARNm présents à la surface mitochondriale.. Il y a 1158 MITO ARNm dans la base de données MitoCarta2.0. L'ensemble de ces résultats suggère que 28 % des MITO ARNm sont des MLR.



#### **2.2.4.2. Quelques exemples d'ARNm localisés à la surface mitochondriale.**

##### **2.2.4.2.1. Exemple de l'ARNm de la $\beta$ -F1-ATPase.**

Une étude de Egea *et al* (Egea et al., 1997) a utilisé des foies de rat à différents stades de développement (foetal, néo-natal et adulte) pour analyser, par microscopie électronique, la localisation de 2 MITO ARNm. Ces 2 MITO ARNm sont les ARNm  $\beta$ -F1-ATPase et  $\alpha$ -F1-ATPase.

Pour l'ARNm  $\beta$ -F1-ATPase, les images de microscopie électronique montrent la formation de regroupements de cet ARNm dans la cellule. L'analyse des images de microscopie électronique montre l'association de certains de ces regroupements d'ARNm  $\beta$ -F1-ATPase (21%) dans le cytoplasme avec des structures denses en électrons de 0.15 $\mu$ m de diamètre pouvant correspondre à des mitochondries. Dans le noyau, 75% des ARNm  $\beta$ -F1-ATPase sont aussi retrouvés en regroupements dont certains sont au niveau des pores nucléaires. Ces résultats montrent la localisation des ARNm  $\beta$ -F1-ATPase à un moment précis, ce qui permet de mettre en évidence différentes localisations de l'ARNm au cours de sa maturation : dans le noyau durant la transcription puis au niveau des pores nucléaires pour son passage avant d'être trouvé dans le cytosol libre (en cours de localisation) ou associé à la mitochondrie.

Pour l'ARNm  $\alpha$ -F1-ATPase, les analyses de microscopie électronique montrent une localisation dispersée dans le cytosol avec un regroupement d'ARNm rarement observé (5% des particules contre 21% pour l'ARNm  $\beta$ -F1-ATPase). Ce résultat est similaire à la localisation de l'ARNm  $\beta$ -actine qui est retrouvé dispersé dans le cytosol.

Ces résultats mettent en évidence deux localisations différentes pour les MITO ARNm. L'ARNm  $\beta$ -F1-ATPase est retrouvé associé à la surface mitochondriale alors que l'ARNm  $\alpha$ -F1-ATPase est dispersé dans le cytosol. Les deux localisations différentes pourraient être un moyen, pour la cellule, de limiter la formation du complexe hors de la mitochondrie. L'analyse protéique de foies de rat soumis à un fractionnement subcellulaire met en évidence la présence du précurseur de la  $\alpha$ -F1-ATPase dans la fraction post-mitochondriale (fraction cytoplasmique sans la fraction mitochondriale). Une fraction du précurseur de  $\alpha$ -F1-ATPase n'est donc pas associée à la mitochondrie ce qui suggère un import post-traductionnel de cette protéine.



#### 2.2.4.2.2. Exemple des ARNm *GAPDH* et *K-RAS*.

L'étude de Santangelo *et al* (Santangelo et al., 2005) a utilisé une méthode de « balise moléculaire » pour visualiser la localisation de deux ARNm : les ARNm *GAPDH* et *K-RAS* dans des cellules HDF (lignée cellulaire issue de fibroblaste). Ces ARNm codent pour des protéines cytosoliques ayant une fonction à proximité des mitochondries. L'ARN *GAPDH* code pour l'enzyme Glycéraldéhyde 3-phosphate déshydrogénases impliquée dans la glycolyse et l'ARNm *K-RAS* code pour une GTPase ancrée dans les membranes cytoplasmiques principalement et impliquée dans la réponse des cellules aux stimuli environnementaux et notamment l'induction de la mitophagie.

La technique de « balise moléculaire » utilise les molécules fluorescentes Cy3 et Cy5 pour marquer des sondes ARN et visualiser *in cellulo* les ARNm. L'analyse des images de microscopie confocale met en évidence une localisation mitochondriale pour les ARNm *GAPDH* et *K-RAS*. Ces ARNm codent pour des protéines cytosoliques ayant une fonction à proximité des mitochondries. La localisation mitochondriale de leurs ARNm pourrait permettre une traduction localisée au niveau du lieu d'action de ces protéines.

#### 2.2.4.2.3. Exemple des ARNm *TMEM126A* et *UQCRC1*.

L'étude de Hanein *et al* (Hanein et al., 2013) a étudié la localisation de l'ARNm et de la protéine *TMEM126A*, une protéine de fonction inconnue qui serait impliquée dans certaines neuropathies optiques (LHON) dans des cellules SH-SY5Y (lignée cellulaire issue de neuroblaste humain). Cette étude utilise une technique de FISH quantitative pour déterminer la localisation de l'ARNm *TMEM126A* grâce à l'utilisation d'une sonde antisens fluorescente (marquée avec Cy3) contre cet ARNm. Cette technique a aussi été utilisée contre les ARNm *UQCRC1* (un ARNm dont l'orthologue chez la levure est un MLR (Marc et al., 2002)) et *GAPDH*. L'ARNm *GAPDH* est dispersé dans le cytosol au contraire des ARNm *UQCRC1* et *TMEM126A* qui se retrouvent à proximité des mitochondries. Une analyse des distances a été réalisée. L'ARNm de la *GAPDH* se retrouve, en moyenne, à une distance de 272 nm des mitochondries contre 127 nm pour l'ARNm *TMEM126A* et 163 nm pour l'ARNm *UQCRC1*. Ces résultats suggèrent que l'ARNm *TMEM126A* a une localisation mitochondriale (MLR) comme l'ARNm *UQCRC1* au contraire de l'ARNm *GAPDH*.



La localisation non mitochondriale de l'ARNm *GAPDH* est contradictoire par rapport à l'étude de Santangelo *et al* qui retrouve l'ARNm *GAPDH* associé aux mitochondries par une méthode similaire utilisant aussi une sonde antisens de l'ARNm *GAPDH* fusionné à Cy3 (Santangelo *et al.*, 2005). La différence de localisation pourrait être due aux tissus puisque l'étude de Hanein *et al* a travaillé sur des cellules issues de neuroblastes alors que l'étude de Santangelo *et al* a travaillé sur des cellules issues de fibroblastes. L'autre hypothèse, qui me semble la plus probable, est que l'ARNm *GAPDH* puisse avoir une localisation mitochondriale mais moins importante que les ARNm *TMEM126A* et *UQCRC1* dans l'étude de Hanein *et al*. L'étude d'un autre ARNm ayant une localisation cytosolique confirmée permettrait de résoudre cette question dans l'étude de Hanein *et al*.

#### 2.2.4.2.4. Exemple des ARNm *OXA1*, *ACO2*, *NDUFV1*, *NDUFV2*, *ATP5b*, *COX2*, *AK2*, *ALDH2*, *SOD2*, *COX10* et *UQCRF1*.

Une étude de Sylvestre *et al* (Sylvestre *et al.*, 2003) a analysé les ARNm associés aux polysomes des fractions mitochondriales et totales dans les cellules HeLa. Les MITO ARNm *ACO2*, *NDUFV1*, *NDUFV2*, *ATP5b*, *AK2*, *ALDH2*, *SOD2*, *COX10* et *UQCRF1* semblent être associés à la fraction mitochondriale contrairement au MITO ARNm *COX6c* qui se retrouve dans la fraction cytosolique. L'analyse des ARNm associés aux polysomes des fractions mitochondriales et totales chez les cellules HeLa et les levures met en évidence une localisation mitochondriale chez ces deux organismes pour l'ARNm *OXA1*, ainsi qu'une localisation mitochondriale pour les ARNm *COX3* et *ATP2* chez les levures et *COX2* et *ATP5b* dans les cellules HeLa. Ces résultats suggèrent une conservation de la distribution subcellulaire de certains MITO ARNm chez les levures et les cellules humaines.



#### 2.2.4.2.5. Exemple des ARNm codant pour des protéines de la phosphorylation oxydative (OXPHOS).

L'étude de Matsumoto *et al* (Matsumoto et al., 2012) a analysé la localisation mitochondriale de 27 ARNm codant pour des protéines de l'OXPHOS. Pour cela, cette étude a analysé l'association des ARNm avec des ribosomes issus de fractions mitochondriales ou totales dans des cellules Jurkat (lymphocyte humain). 13 de ces 27 ARNm sont trouvés enrichis dans les ribosomes associés à la fraction mitochondriale : le taux d'association de ces 13 ARNm avec la fraction mitochondriale est supérieur à 80% (référence : ARNm d'origine mitochondriale). Il s'agit des ARNm *ATP5G2*, *SDHD*, *COX6B2*, *SDHC*, *UQCRC1*, *ATP5A1*, *NDUFV2*, *NDUFA10*, *ATP5D*, *ATP5G1*, *COX17*, *CYC1* et *COX15*. Les 14 autres ARNm ne semblent pas être associés à la fraction mitochondriale car leur taux d'association est en dessous de 60%. Il s'agit des ARNm *UQCRH*, *COX5A*, *ATP5C1*, *NDUFB8*, *NDUFB2*, *SDHB*, *NDUFA9*, *NDUFA1*, *UQCRC1*, *ATPAF2*, *NDUFS7*, *NDUFV1*, *SCO1* et *SDHA*. Ces résultats mettent en évidence deux populations de MITO ARNm différentes en fonction de la localisation des ARNm.

Dans cette étude, deux ARNm semblent avoir une localisation cytosolique alors qu'elle est mitochondriale dans une autre étude. Il s'agit de l'ARNm *UQCRC1* qui est mitochondrial dans l'étude de Hanein *et al* (Hanein et al., 2013) et de l'ARNm *NDUFV1* qui a une localisation mitochondriale dans l'étude de Sylvestre *et al* (Sylvestre et al., 2003). Les différences observées pour ces deux ARNm pourraient s'expliquer par la différence de protocoles d'analyse utilisés ou une différence de tissus étudiés. En effet, Matsumoto *et al* ont étudié l'association d'ARNm avec une fraction mitochondriale par qRT-PCR dans des cellules Jurkat (lymphocyte humain) et Sylvestre *et al* par Northern blot dans des cellules HeLa, tandis que Hanein *et al* ont analysé la localisation des ARNm par microscopie confocale grâce à l'utilisation de sondes fluorescentes dans des cellules SH-SY5Y.

#### **2.2.4.3. Signaux importants pour la localisation mitochondriale des ARNm.**

L'étude de Kaltimbacher *et al* (Kaltimbacher, 2006) a analysé l'importance de la 3'UTR et de la séquence codant pour le MTS dans la localisation mitochondriale d'un ARNm. Pour cela, Kaltimbacher *et al* ont étudié la localisation mitochondriale de l'ARNm chimérique *ATP6* (normalement codé par le génome mitochondrial). L'ORF de l'ARNm *ATP6* mitochondrial a été



modifié pour permettre sa traduction dans le cytosol (les codons AUA ont été modifiés en AUG et les codons UGA en UGG). Cet ORF modifiée a ensuite été fusionnée à la séquence du MTS de l'ARNm de *SOD2* (MTS-ATP6) ou à la séquence du MTS et de la 3'UTR de l'ARNm *SOD2* (MTS-ATP6-UTR). Cette expérience a mis en évidence la localisation mitochondriale de l'ARNm *ATP6* endogène (codé par le génome mitochondrial), de l'ARNm *SOD* et des deux ARNm *ATP6* de fusion contrairement à l'ARNm *COX6c* qui est cytosolique. 84.6% des ARNm *MTS-ATP6-UTR* sont associés à la fraction mitochondriale contre 72.4% pour les ARNm *MTS-ATP6*. Cette étude de Kaltimbacher *et al* (Kaltimbacher, 2006) suggère donc l'importance de la séquence codant pour le MTS dans la localisation mitochondriale des MITO ARNm et met en évidence l'importance de la 3'UTR dans cette localisation des MITO ARNm.

Chez les levures, l'absence de Oxa1p produit des déficiences mitochondriales, Oxa1p étant impliqué dans l'insertion de protéines dans la membrane interne des mitochondries. La transformation de levures *oxa1*, mutées le gène *OXA1*, avec la version humaine de *OXA1* (*hOXA1*) par Sylvestre *et al* (Sylvestre *et al.*, 2003) restaure les fonctions mitochondriales, ce qui suggère une fonction conservée de cette protéine dans les mitochondries humaines et de levures. En transformant les levures *oxa1* avec une version entière (*hOXA1+MTS*) ou une version sans la séquence codant pour le MTS (*hOXA1-MTS*), Sylvestre *et al* mettent en évidence une restauration de la croissance sur milieu glycérol avec ces deux versions de *hOXA1*. Néanmoins, l'ajout de *hOXA1-MTS* aboutit à une croissance plus importante des levures sur milieu glycérol que l'ajout de *hOXA1+MTS*. La localisation des deux formes de l'ARNm *hOXA1* a été analysée grâce à l'étude des ARNm issus des polysomes des fractions mitochondriales et totales. Les deux versions de l'ARNm *hOXA1* sont retrouvées dans la fraction mitochondriale. Néanmoins, la version longue (*hOXA1+MTS*) semble avoir une fraction encore libre dans le cytosol plus importante que la version courte (*hOXA1-MTS*). Ces résultats suggèrent que la présence du MTS n'est pas nécessaire à la localisation mitochondriale de l'ARNm *hOXA1*. Ces deux formes de *hOXA1* ne contiennent pas la 5'UTR de l'ARNm *hOXA1* ce qui suggère que la 5'UTR n'est pas impliquée, non plus, dans la localisation de l'ARNm.

Sylvestre *et al* ont ensuite transformé les levures *oxa1* avec deux versions de l'ARNm *hOXA1* : une version entière (*hOXA1+3'UTR*) et une version sans 3'UTR (*hOXA1-3'UTR*) où la 3'UTR de *hOXA1* est remplacée par la 3'UTR de l'ARNm *PKG1* codant pour une protéine



cytosolique. L'absence de la 3'UTR de *hOXA1* dans l'ARNm (*hOXA1-3'UTR*) ne permet pas la croissance des levures sur un milieu glycérol contrairement à la version entière de l'ARNm *hOXA1* (*hOXA1+3'UTR*). L'étude de Sylvestre *et al* a ensuite analysé la localisation des ARNm grâce à la technique de la localisation des ARN marqués par microscopie confocale et a montré que la 3'UTR et plus précisément les 137 derniers nucléotides de la 3'UTR (la 3'UTR de l'ARNm *hOXA1* fait 237 nucléotides) permet la localisation mitochondriale de cet ARNm. Ces résultats suggèrent que le signal permettant la localisation de l'ARNm *hOXA1* à la surface mitochondriale se trouve au niveau des 137 derniers nucléotides de la 3'UTR de cet ARNm. Le fait que l'absence de la 3'UTR de *hOXA1* ne permet pas la restauration des fonctions mitochondriales de la levure *oxa1* suggère que la localisation mitochondriale de l'ARNm *hOXA1* grâce à la 3'UTR est importante pour un import correct de la protéine hOXA1 à la mitochondrie.

L'étude de Fazal *et al* (Fazal et al., 2019) a mis en évidence deux groupes d'ARNm localisés à la surface mitochondriale : un groupe ayant une localisation dépendante de la traduction et du complexe TOM et un groupe dont la localisation mitochondriale est indépendante de la traduction (voir paragraphe 2.2.4.5. et 2.2.4.6.4.). La présence d'un MTS est prédictive pour la localisation mitochondriale des ARNm dépendant de la traduction. Pour les ARNm localisés à la surface mitochondriale indépendamment de la traduction, l'analyse *in silico* met en évidence l'enrichissement de la séquence polyA : AAUAAA dans la 3'UTR des ARNm. La comparaison entre ces deux groupes d'ARNm localisés à la surface mitochondriale met en évidence des ARNm ayant une 3'UTR et une queue polyA plus courte pour les ARNm indépendants de la traduction par rapport à ceux qui dépendent de la traduction pour leur adressage.

#### **2.2.4.4. Rôle de la localisation mitochondriale des ARNm.**

L'analyse *in silico* des 1024 MITO ARNm localisés à la surface mitochondriale par Fazal *et al* (voir paragraphe 2.2.4.1.) ne révèle pas de lien entre la fonction ou la localisation des protéines codées par ces ARNm et leur localisation mitochondriale (Fazal et al., 2019).

L'analyse de la localisation des protéines de fusion ATP6 (MTS-ATP6 et MTS-ATP6-UTR) par microscopie confocale par Kaltimbacher *et al* (Kaltimbacher, 2006) montre une



colocalisation entre les deux ATP6 de fusion et la sous unité alpha de l'ATP synthase. Ces protéines apparaissent sous forme ponctuelle dans les cellules, probablement au niveau des mitochondries (l'ATP synthase est mitochondriale). La protéine de fusion ATP6 existe sous deux formes : une forme précurseur avec le MTS, et une forme mature où le MTS a été clivé suite à l'import mitochondrial. La quantification de la forme importée et maturée montre que la protéine MTS-ATP6-UTR est 1.8 fois plus abondante dans les mitochondries que la protéine maturée MTS-ATP6. La 3'UTR serait donc importante pour augmenter la quantité de protéines importées dans la mitochondrie.

L'analyse *in silico* des MLR par l'étude de Matsumoto *et al* (Matsumoto et al., 2012) met en évidence une forte hydrophobicité pour 6 des 13 protéines codées par ces MITO ARNm (avec 2 ou plus domaines transmembranaires par protéine). D'un autre côté, aucune des 14 protéines codées par des MITO ARNm localisés dans le cytosol ne contiennent de domaines transmembranaires. Ces résultats suggèrent que les protéines hydrophobes de l'OXPPOS qui sont insérées dans la membrane interne sont traduites à la surface mitochondriale et directement importées. La localisation mitochondriale des MITO ARNm pourrait donc être importante pour l'import et la traduction des protéines hydrophobes.

#### **2.2.4.5. Traduction à la surface mitochondriale.**

L'étude de Crowley et Payne (Crowley and Payne, 1998) a analysé la présence de ribosomes à la surface mitochondriale. Les mitochondries purifiées ainsi que les ribosomes purifiés sont incubés ensemble, puis les complexes ribosomes-mitochondries sont re-purifiés. La différence d'absorbance à 260nm (absorbance des acides nucléiques) entre la fraction de mitochondries purifiées et la fraction de mitochondries associées aux ribosomes permet de suivre cette association. Cette expérience met en évidence la fixation de ribosomes sur des mitochondries avec un ribosome par 1.7 fg de mitochondries.

Cette étude a ensuite analysé l'importance des ribonucléotides pour l'interaction entre les ribosomes et les mitochondries. Pour cela, les ribosomes et les mitochondries sont incubés ensemble en présence ou en absence d'ATP, de GTP (guanosine tri-phosphate) ou de GDP (guanosine di-phosphate) avant d'isoler les complexes ribosomes-mitochondries. L'association des ribosomes avec les mitochondries est faiblement inhibée en présence d'ATP



et de GDP. En revanche, l'ajout de GTP inhibe fortement l'association entre ribosomes et mitochondries. Ces résultats suggèrent que le GTP joue un rôle dominant dans l'association des ribosomes à la mitochondrie. La production de Pi a été analysée par Crowley et Payne. Des mitochondries purifiées seules ou associées aux ribosomes ne mettent pas en évidence de production de Pi. Cependant, l'ajout de GTP aboutit à une production de Pi de 20nmol/min/mg de mitochondries avec les mitochondries seules, et 85nmol/min/mg de mitochondries en présence de ribosomes. Ces résultats ne sont pas retrouvés suite à l'ajout d'ATP, ce qui implique que ce phénomène est dépendant du GTP. Comme l'activité GTPase des ribosomes a été inhibée lors de leur purification, l'hydrolyse du GTP est dépendante de l'association de ces ribosomes avec les mitochondries. Ces résultats suggèrent que le récepteur des ribosomes à la surface des mitochondries est dépendant du GTP, et que l'hydrolyse du GTP est importante pour inhiber l'interaction ribosomes-mitochondries (Crowley and Payne, 1998).

Cette étude a aussi analysé le rôle du GTP dans la liaison de ribosomes en cours de traduction avec les mitochondries. Pour cela, des mitochondries purifiées ont été incubées avec des ribosomes en cours de traduction de la luciférase (ribo-luc) ou de l'ARNm MDH (ribo-MDH), un MLR) en présence ou non de GTP ou de GDP. En présence d'une protéine mitochondriale en cours de traduction dans le ribosome (ribo-MDH), l'interaction du ribosome avec la mitochondrie ne semble pas affectée par la présence de GTP ou de GDP. Les ribosomes en cours de traduction d'une protéine non-mitochondriale (ribo-luc) se comportent comme des ribosomes libres et sont sensibles au GTP. Ces résultats suggèrent que la présence d'un MTS sur la protéine en cours de traduction empêche le relargage du ribosome sous l'effet du GTP, et permet la formation d'un complexe mitochondrie-ribosome en cours de traduction plus stable (Crowley and Payne, 1998).

En conclusion, l'étude de Crowley et Payne (Crowley and Payne, 1998) met en évidence une association des ribosomes avec les mitochondries qui est inhibée par un facteur présent sur les mitochondries via l'hydrolyse du GTP. Les ribosomes en cours de traduction d'une protéine mitochondriale semblent, quant à eux, insensibles à ce mécanisme de régulation. Cela implique que l'hydrolyse du GTP à la surface mitochondriale est un mécanisme de régulation de la spécificité de l'interaction des ribosomes avec la mitochondrie.

L'étude de Mackenzie et Payne (MacKenzie and Payne, 2004) a analysé l'association de ribosomes en cours de traduction avec des mitochondries. Pour cela, cette étude a purifié



des ribosomes en cours de traduction (RNC) de l'ARNm *MDH* ou de l'ARNm *LUCIFERASE*. Ces résultats suggèrent que le nombre de ribosomes fixés à la mitochondrie est saturable, ce qui implique un nombre limité de site de fixation pour les ribosomes cytosoliques à la surface mitochondriale (MacKenzie and Payne, 2004). De plus, la liaison du ribosome avec la mitochondrie est plus spécifique si le ribosome est en cours de traduction. La présence de la protéine en cours de traduction est importante pour la liaison des ribo-MDH à la mitochondrie. Néanmoins, le ribosome est le composant d'interaction principal avec la mitochondrie (MacKenzie and Payne, 2004). Enfin, les protéines présentes à la surface mitochondriale sont importantes pour la fixation de 60% des ribosomes à la surface mitochondriale (MacKenzie and Payne, 2004).

Les études de Crowley et Payne (Crowley and Payne, 1998) et de Mackenzie et Payne (MacKenzie and Payne, 2004) montre donc que les ribosomes peuvent s'associer aux mitochondries. De plus, cette association serait plus stable s'il s'agit de ribosomes en cours de traduction de protéines mitochondriales.

L'étude de Vardi-Oknin et Arava (Vardi-Oknin and Arava, 2019) a analysé la traduction à la surface mitochondriale grâce à l'utilisation d'une technique de marquage de ribosome de proximité (ribosome-proximity labeling) (voir paragraphe 2.2.1.1. et figure 4). Un traitement au cycloheximide met en évidence une augmentation de 70% des ribosomes présents à la surface mitochondriale. Après la purification des ribosomes cytosoliques présents à la surface mitochondriale, les ARNm en cours de traduction sont analysés. Huit ARNm ont été étudiés : les MITO ARNm *ATP5b*, *MDH2*, *CI-30*, *COX6c*, *PiC*, et *ANT1*, ainsi que l'ARNm  $\beta$ -*ACT* codant pour une protéine cytosolique. Les résultats montrent un enrichissement des MITO ARNm dans la fraction des ribosomes à la surface mitochondriale mais pas de l'ARNm  $\beta$ -*ACT*. L'étude de Vardi-Oknin et Arava suggèrent donc qu'il y a des ribosomes à la surface mitochondriale et que ces ribosomes sont impliqués dans la traduction des protéines mitochondriales.

L'étude de Fazal *et al* a aussi analysé l'implication de la traduction dans la localisation mitochondriale des ARNm (Fazal et al., 2019). Pour cela, les cellules HEK293T transformées avec l'APEX2-OMM et l'APEX2-NES (voir paragraphe 2.2.4.1.) ont été traitées avec du cycloheximide ou de la puromycine. Le cycloheximide et la puromycine sont des inhibiteurs de la traduction qui bloquent le ribosome tout en préservant son association avec l'ARNm pour le cycloheximide ou dissocient le ribosome et l'ARNm pour la puromycine. Après un traitement au cycloheximide, une augmentation du nombre d'ARNm localisés à la surface



mitochondriale est observée en même temps qu'une augmentation de la valeur d'enrichissement pour les ARNm trouvés précédemment enrichis en absence de cycloheximide (comme c'est le cas pour les ARNm *HSPA9* (mitochondria heatshock protein A9) et *MUT* (methylmalonyl-coA mutase) par exemple). Ces résultats suggèrent une localisation mitochondriale des ARNm liée à leur traduction.

L'analyse des ARNm localisée à la surface mitochondriale en absence et en présence de cycloheximide par le logiciel TargetP permet de déterminer l'importance de la présence d'un MTS pour la localisation de l'ARNm. Cette étude a mis en évidence un score TargetP plus haut pour les ARNm localisés à la surface mitochondriale en présence de cycloheximide (par rapport à toutes les autres conditions). Ces résultats suggèrent qu'un groupe d'ARNm localisés à la surface mitochondriale dépend de la traduction et de la présence d'un MTS (Fazal et al., 2019).

Le groupe des ARNm présents à la surface mitochondriale en présence de puromycine est différent du groupe d'ARNm présents à la surface mitochondriale en présence de cycloheximide. L'analyse par TargetP ne met pas en évidence d'enrichissement de la présence d'un MTS dans ces ARNm. Ces résultats suggèrent donc une localisation mitochondriale indépendante de la traduction et de la présence d'un MTS sur la protéine en cours de traduction pour ce groupe d'ARNm. L'analyse fonctionnelle de ces ARNm montre l'enrichissement des ARNm codants pour les protéines du mitoribosome tel que l'ARNm *MRPS18B* et de la phosphorylation oxydative tel que l'ARNm *NDUFB10*. Ces deux complexes nécessitent la coordination du génome mitochondrial et du génome nucléaire pour leur formation.

Enfin, les ARNm enrichis à la surface mitochondriale en présence de CCCP, qui abolit le potentiel transmembranaire, sont similaires à ceux enrichis à la surface mitochondriale en présence de puromycine. Ces ARNm sont donc indépendants du fonctionnement du complexe TOM pour leur localisation mitochondriale (voir paragraphe 2.2.4.6.4.).

L'étude de Fazal *et al* a donc mis en évidence deux groupes d'ARNm localisés à la surface mitochondriale : un groupe dont l'adressage est dépendant de la traduction, de la présence d'un MTS en cours de traduction et du complexe TOM comprenant 1412 ARNm, et un groupe dont l'adressage est indépendant de la traduction et des complexes TOM comprenant 490 ARNm.



Une étude de Gabrovsek a aussi mis en évidence une traduction à la surface mitochondriale. Pour cela, cette étude a utilisé la méthode « SURface SEnsing of Translation (SUnSET) » sur des fractions mitochondriales de cellules humaines HEK293T. Cette méthode utilise la puromycine qui s'incorpore lors de la traduction pour visualiser la traduction cytosolique. Cette expérience met en évidence une traduction cytosolique à la surface mitochondriale (Gabrovsek et al., 2020).

#### **2.2.4.6. Facteurs protéiques impliqués dans la localisation mitochondriale des ARNm.**

##### **2.2.4.6.1. Rôle de YB-1.**

L'étude de Matsumoto *et al* a analysé l'importance de la protéine YB-1 (Y-Box binding protein 1) dans la régulation de la localisation des MITO ARNm (Matsumoto et al., 2012). La protéine YB-1 aurait de multiples rôles dans la cellule grâce à son interaction avec les ARNm et l'ADN. En effet, cette protéine serait impliquée dans la réparation de l'ADN, dans la régulation de la transcription, de la maturation des ARNm et dans la régulation de la traduction (Lyabin et al., 2014). L'analyse immunohistochimique de cellules HeLa a mis en évidence une localisation cytosolique de la protéine YB-1 avec une colocalisation mitochondriale pour une fraction de ces protéines. Un fractionnement subcellulaire met en évidence une association de 10% des protéines YB-1 avec la fraction mitochondriale. Le traitement protéinase K de ces mitochondries réduit le signal de YB-1 présent dans la fraction mitochondriale, ce qui suggère une localisation à la surface mitochondriale. Une immunopurification des ARN associés à YB-1 dans des cellules Jurkat (lymphocyte humain) a été réalisée par Matsumoto *et al* (Matsumoto et al., 2012). Certains ARNm de l'O<sub>2</sub>PHOS tel que les ARNm *CYC1*, *NDUFA10*, *ATP5G1* et *COX17* sont associés à YB-1. Ces 4 ARNm ont précédemment été retrouvés associés à la surface mitochondriale (Matsumoto et al., 2012) (voir paragraphe 2.2.4.2.5.). Ces résultats suggèrent que les ARNm associés à la surface mitochondriale co-localisent avec la mitochondrie grâce à leur association avec YB-1 et que ce facteur est important pour la régulation de leur stabilité et de leur traduction.



#### 2.2.4.6.2. Rôle de G3BP1.

Ortega *et al* (Ortega et al., 2010) ont analysé l'ARNm  $\beta$ -F1-ATPase et les facteurs protéiques impliqués dans sa régulation. Cet ARNm, déjà analysé par Egea *et al*, a une localisation mitochondriale (Egea et al., 1997). Ortega *et al* ont synthétisé *in vitro* la 3'UTR de l'ARNm  $\beta$ -F1-ATPase avant de l'incuber avec un extrait protéique de cellules HEK293T. Suite à un pontage aux UV, la 3'UTR de l'ARNm  $\beta$ -F1-ATPase est trouvée associée à 6 protéines. Une deuxième approche de purification de complexes ARN-protéines a ensuite été développée. Il n'y a pas de protéines associées à l'ORF de l'ARNm  $\beta$ -F1-ATPase. En revanche, 9 protéines sont trouvées associées à la 3'UTR de l'ARNm  $\beta$ -F1-ATPase. Ces 9 protéines sont toutes des RBP et semblent être impliquées dans différentes étapes du métabolisme des ARN.

Ortega *et al* se sont ensuite focalisés sur 3 de ces protéines : IMP1, G3BP1 et NPM1. L'ARNm  $\beta$ -F1-ATPase semble être seulement associé à la protéine G3BP1. Cette interaction a été confirmée par immunoprécipitation des ARNm avec la version endogène de G3BP1, et par FISH sur l'ARNm  $\beta$ -F1-ATPase fusionné à Cy5. La protéine G3BP1 est une endonucléase dépendante de la phosphorylation impliquée dans la régulation de la dégradation des ARNm grâce à son activité endonucléase entre les nucléotides cytosines et adénine (Tourrière et al., 2001). Cette protéine est aussi l'un des composants des granules de stress (SGs) (Tourrière et al., 2003). Les SGs sont des lieux de stockages des ARNm dans le cytosol formé suite à un stress cellulaire. Ces SGs ont un rôle dans la régulation des ARNm.

La localisation des complexes G3BP1-ARNm  $\beta$ -F1-ATPase a ensuite été étudiée grâce à une technique de split-YFP par Ortega *et al* (Ortega et al., 2010). Ce système permet la confirmation de l'association entre la protéine G3BP1 et l'ARNm  $\beta$ -F1-ATPase et la localisation de ce complexe. Ces complexes semblent former des regroupements en petits et grands granules dans le cytoplasme, ce qui suggère deux localisations différentes. La surexpression de la G3BP1 fusionnée à une étiquette FLAG dans des cellules HEK293T montre aussi une localisation de G3BP1 sous forme de deux types de granules dans le cytoplasme. Les grands granules semblent colocalisés avec les granules de stress contrairement aux petits granules de G3BP1. La technique de split-YFP a aussi été utilisée en présence d'un marqueur mitochondrial, et met en évidence la colocalisation des deux types de granules avec la mitochondrie. L'expérience de split-YFP a également été réalisée avec ou sans la 3'UTR de l'ARNm  $\beta$ -F1-ATPase. La reconstitution de la YFP n'est possible qu'en présence de la 3'UTR de



l'ARNm  $\beta$ -F1-ATPase. Ces résultats suggèrent que G3BP1 interagit avec l'ARNm grâce à son interaction avec un motif présent dans la 3'UTR de l'ARNm  $\beta$ -F1-ATPase et que ce motif est important pour la localisation du complexe.

L'étude de Ortega *et al* a analysé la fonction de G3BP1. La surexpression de G3BP1 ne semble pas modifier le taux d'ARNm  $\beta$ -F1-ATPase, ce qui suggère que cette protéine n'est pas impliquée dans la stabilité de l'ARNm  $\beta$ -F1-ATPase. Néanmoins, la surexpression de G3BP1 semble réduire la quantité de protéine  $\beta$ -F1-ATPase. La protéine G3BP1 serait donc impliquée dans le contrôle de la traduction de  $\beta$ -F1-ATPase. Une purification de monosomes suivie d'une extraction des ARN associés montre une baisse de la quantité d'ARNm  $\beta$ -F1-ATPase associés aux ribosomes en présence de G3BP1, alors que l'absence de cette protéine augmente la quantité d'ARNm  $\beta$ -F1-ATPase associés aux ribosomes. Ces résultats suggèrent que G3BP1, en se fixant sur la 3'UTR de l'ARNm, inhiberait l'association entre l'ARNm  $\beta$ -F1-ATPase et le ribosome, et aurait un rôle de répression de la traduction. La fonction de cette protéine pourrait être importante pour limiter la traduction cytosolique de l'ARNm avant que celui-ci n'ait rejoint la surface mitochondriale (Ortega et al., 2010).

#### 2.2.4.6.3. Rôle des protéines de la famille AKAP.

Une étude de Ginsberg *et al* (Ginsberg et al., 2003) a analysé le rôle de la protéine AKAP121 dans la localisation des MITO ARNm à la surface mitochondriale. La protéine AKAP121 (A kinase anchor protein 121) est impliquée dans la régulation d'un grand nombre de fonctions mitochondriales chez le rat. Cette protéine sert d'ancrage mitochondrial pour différentes molécules signal tel que la protéine PKA (la protéine kinase A). L'ancrage mitochondrial de la PKA permet la phosphorylation de substrats présents à la surface mitochondriale (Czachor et al., 2016). AKAP121 comporte un domaine de liaison aux ARN, le domaine KH. Le domaine KH est un domaine de liaison aux ARNm simple brin composé de deux hélices  $\alpha$  séparées par un feuillet  $\beta$  présent dans un grand nombre de régulateurs de l'expression des gènes (Nicastro et al., 2015). Cette protéine de rat se lie à la surface mitochondriale. La protéine AKAP121 impliquée dans un grand nombre de fonctions mitochondriales étant présentes à la surface mitochondriale et capable de lier les ARNm, l'analyse de son rôle dans l'ancrage mitochondrial d'ARNm a été étudié par Ginsberg *et al* (Ginsberg et al., 2003).



Cette étude de Ginsberg *et al* montre que le domaine KH sous forme phosphorylée est nécessaire à la fixation de l'ARNm *Fo-f* et qu'il y a au moins deux domaines phosphorylés par PKA dans le domaine KH dont l'un (la sérine 585) est connu. La phosphorylation du domaine KH sur la sérine 585 est importante pour la fixation de l'ARNm *Fo-f* au domaine KH de la protéine AKAP121.

Ginsberg *et al* ont montré que AKAP121 se liait à la 3'UTR des ARNm *Fo-f* et *MnSOD* grâce à la présence d'une structure secondaire spécifique reconnue par le domaine KH de AKAP121.

Ces résultats suggèrent que la protéine AKAP121 se lie à la 3'UTR des ARNm *Fo-f* et *MnSOD* quand elle est phosphorylée par PKA (reconnaissance de leur structure). Cette association permet la localisation mitochondriale de ces ARNm et l'import mitochondriale des protéines codées par ces ARNm.

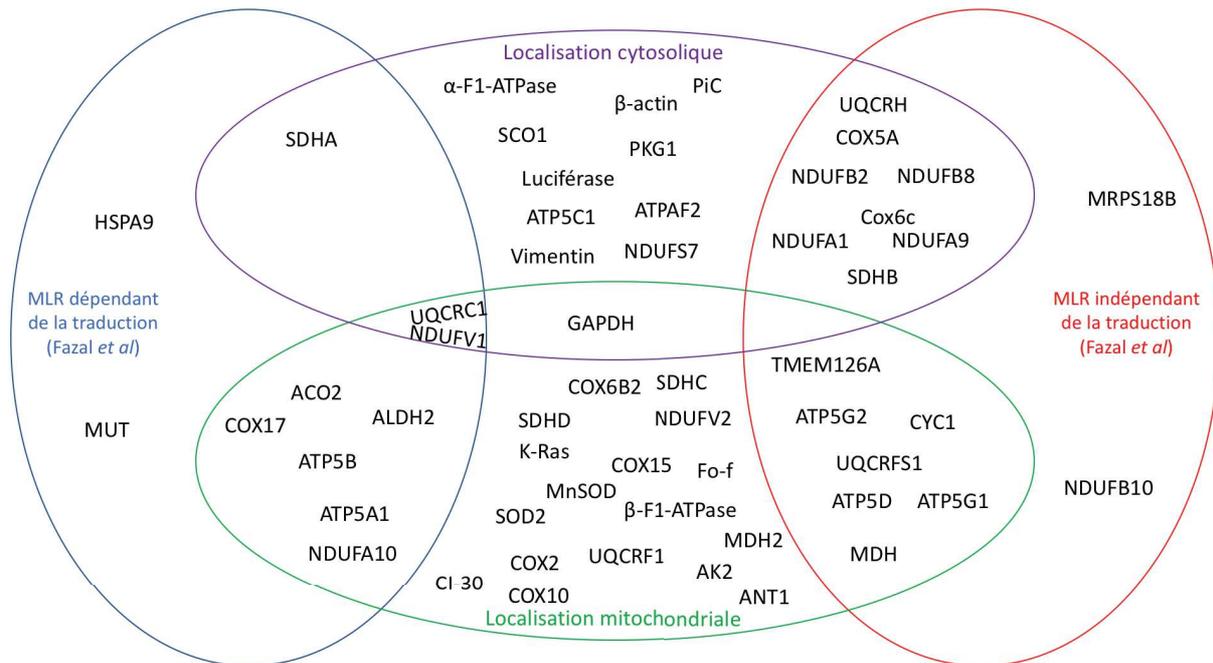
Chez l'Homme, une autre protéine de la famille des protéines AKAP : la protéine dAKAP1 (dual-specificity protein kinase A anchoring protein 1) semble aussi impliquée dans la localisation à la traduction des MITO ARNm à la surface mitochondriale (Gabrovsek *et al.*, 2020). Dans les cellules HEK293T, la protéine dAKAP1 est capable de lier 258 ARNm dont 57 MITO ARNm. Parmi ces MITO ARNm, on retrouve des MITO ARNm codant pour les protéines du cycle de Krebs. De plus, une expérience de Co-IP met en évidence son association avec plusieurs protéines dont des protéines impliquées dans la traduction. De la même manière, l'analyse de la traduction à la surface mitochondriale en absence de dAKAP1 met en évidence une réduction de la traduction à la surface mitochondriale. L'ensemble de ces résultats suggère que la protéine dAKAP1 est impliquée dans la localisation et la traduction des MITO ARNm à la surface mitochondriale chez l'Homme. Enfin, l'absence de cette protéine ayant un impact sur le fonctionnement des complexes mitochondriaux comme les complexes I et II de l'OXPPOS, cela suggère que le rôle de dAKAP1 dans la traduction à la surface mitochondriale est important pour la régulation de la fonction mitochondriale (Gabrovsek *et al.*, 2020).



#### 2.2.4.6.4. Rôle du complexe d'import mitochondrial TOM.

L'étude de Vardi-Oknin et Arava (Vardi-Oknin and Arava, 2019) a analysé le rôle des récepteurs du complexe TOM (voir paragraphe 2.1.2.) dans la traduction des ARNm à la surface mitochondriale. Pour cela, l'expression de la protéine TOM70 a été inhibée par RNA interférence, puis une expérience de marquage des ribosomes à proximité de la mitochondrie a été réalisée (voir 2.2.1.1.). En absence de TOM70, il y a plus de marquage des ribosomes et donc plus de ribosomes à la surface mitochondriale. L'analyse des ARNm en cours de traduction de ces ribosomes cytosoliques présents à la surface mitochondriale montre une baisse pour les ARNm *PiC*, *ANT1*, *ADH5* et *ATP5a* et un enrichissement pour les ARNm *ATP5b*, *MDH2*, *CI-30*, *COX6c*, *OGDH* et *OPA1*. Les ARNm *PiC* et *ANT1* codent pour des protéines avec des domaines transmembranaires dont l'import est dépendant de TOM70 alors que les ARNm *ATP5b*, *MDH2*, *CI-30* et *COX6c* codent pour des protéines qui contiennent un MTS hydrophobe en N-terminal et dont l'import est dépendant de TOM20. On observe donc une baisse de la traduction à la surface mitochondriale des protéines dont l'import est médié par TOM70, et une augmentation de la traduction des protéines dont l'import est médié par TOM20. Ceci pourrait s'expliquer par un mécanisme de compensation de TOM20. Enfin, ces résultats suggèrent que l'import des protéines codées par les ARNm *ADH5* et *ATP5a* est médié par TOM70. Cette étude suggère donc un rôle de TOM70 et de TOM20 dans l'association des ribosomes cytosoliques avec la surface mitochondriale (Vardi-Oknin and Arava, 2019).

L'étude de Fazal *et al* a aussi analysé l'implication du complexe d'import mitochondrial TOM dans la localisation des ARNm à la surface mitochondriale (Fazal et al., 2019). Pour cela, les cellules HEK293T transformées avec l'APEX2-OMM et l'APEX2-NES ont été traitées avec du CCCP (voir 2.2.4.1.). Le CCCP abolit le potentiel de membrane de la mitochondrie, ce qui inhibe le fonctionnement de certains complexes dépendant de ce potentiel tel que le complexe TOM. Les ARNm enrichis à la surface mitochondriale en présence de CCCP sont similaires à ceux enrichis à la surface mitochondriale en présence de puromycine. L'étude de Fazal *et al* a donc mis en évidence un groupe d'ARNm localisés à la surface mitochondriale donc l'adressage semble dépendant du complexe TOM et de la traduction (en lien avec le paragraphe 2.2.4.5.).



**Figure 16 : Représentation schématique de la localisation des ARNm chez les mammifères.**

Les différentes études de la localisation des ARNm à la surface mitochondriale ont mis en évidence 22 non-MLR (entourés en violet) et 37 MLR (entourés en vert). Ces résultats ont été comparés aux données globales issues de l'étude de Fazal *et al* qui met en évidence deux groupes d'ARNm localisés à la surface mitochondriale (entourés en bleu ou en rouge).

#### 2.2.4.6.5. Rôle du cytosquelette.

Pour analyser le rôle du cytosquelette dans l'adressage des ARNm à la surface mitochondriale, Fazal *et al* ont traité les cellules HEK293T APEX-OMM et APEX-NES au nodocazole (un inhibiteur de la polymérisation des microtubules). Cela aboutit à une baisse de l'adressage principalement pour les ARNm localisés à la surface mitochondriale de manière dépendante de la traduction. Ces résultats suggèrent que ce groupe d'ARNm est dépendant du cytosquelette et en particulier des microtubules pour leur localisation mitochondriale (Fazal et al., 2019).

#### **2.2.4.7. Conclusion.**

Chez les mammifères, un certain nombre d'études ont porté sur l'analyse de petites populations d'ARNm et sur leur adressage à la surface mitochondriale. Une seule étude a été réalisée à l'échelle du génome pour déterminer les ARNm présents à la surface mitochondriale.

Les études de (Egea et al., 1997; Hanein et al., 2013; Matsumoto et al., 2012; Santangelo et al., 2005; Sylvestre et al., 2003) ont mis en évidence une localisation mitochondriale pour 37 ARNm dont 35 MITO ARNm (37 MLR), et une localisation cytosolique pour 22 ARNm dont 16 MITO ARNm (non-MLR). Trois ARNm dont deux MITO ARNm ont une localisation ambiguë (GAPDH, UQCRC1 et NDFV1) (voir paragraphe 2.2.4.2.3. et 2.2.4.2.5.).

L'analyse de Fazal *et al* a mis en évidence deux groupes d'ARNm localisés à la surface mitochondriale : un groupe de 1412 ARNm dont la localisation mitochondriale est dépendante de la traduction, des complexes TOM et du cytosquelette et un groupe de 490 ARNm dont la localisation mitochondriale est indépendante de la traduction (Fazal et al., 2019) (voir paragraphe 2.2.4.5., 2.2.4.6.4. et 2.2.4.6.5.).

Si on compare les différentes études, des points communs mais aussi des divergences sont observés (figure 16). Parmi les 35 MITO ARNm MLR, 8 ont une localisation dépendante de la traduction et 7 ont une localisation indépendante de la traduction. Ce qui est surprenant, c'est que parmi les 16 MITO ARNm non-MLR, 8 semblent faire partie du groupe des ARNm localisés à la surface mitochondriale de manière indépendante de la traduction et 1 semble



faire partie du groupe des ARNm localisés à la surface mitochondriale de manière dépendante de la traduction, d'après l'étude de Fazal *et al* (figure 16). Ces résultats pourraient s'expliquer par l'utilisation de techniques différentes pour déterminer les ARNm adressés ou pas (préparation de fractions mitochondriales, analyses microscopiques, marquage et purification des ribosomes à la surface des mitochondries, marquage des ARNm à la surface mitochondriale, etc ... ), mais également l'utilisation de matériel biologique différent ( lignées cellulaires HeLa, HEK293T, Jurkat (lymphocyte humain), issues de fibroblaste, issues de neuroblaste, foies de rat, etc ...).

Les études de Kaltimbacher *et al* (Kaltimbacher, 2006) et Sylvestre *et al* (Sylvestre et al., 2003) ont mis en évidence l'importance de la 3'UTR et de la séquence codant pour le MTS dans la localisation mitochondriale des ARNm. Dans la 3'UTR, il semblerait que les signaux d'adressage mitochondriaux soient une structure de l'ARNm (Ginsberg et al., 2003) dans le cas des ARNm *Fo-f* et *MnSOD*, et la séquence spécifique de polyadénylation AAUAAA pour les MLR indépendant de la traduction (Fazal et al., 2019).

Hormis la traduction et le complexe TOM, peu de facteurs protéiques ont été mis en évidence pour intervenir dans la localisation des ARNm à la surface mitochondriale. YB-1 permettrait l'association des ARNm *CYC1*, *NDUFA10*, *ATP5G1* et *COX17* à la surface mitochondriale (Matsumoto et al., 2012). G3BP1 serait impliquée dans la régulation de la traduction de l'ARNm  $\beta$ -*F1-ATPase* possiblement pour permettre sa traduction localisée (Ortega et al., 2010). Enfin, il y aurait les protéines de la famille AKAP : AKAP121, impliquée dans la localisation mitochondriale des ARNm *Fo-f* et *MnSOD* grâce à la reconnaissance spécifique d'une structure présent dans la 3'UTR de ces ARNm (Ginsberg et al., 2003), et dAKAP1 impliqué dans la régulation de la traduction à la surface mitochondriale de 57 MITO ARNm (Gabrovsek et al., 2020).

### **2.2.5. Conclusion générale.**

Des études d'analyses globales ont mis en évidence des ARNm localisés à la surface mitochondriale chez les levures, les plantes et les mammifères (Fazal et al., 2019; Marc et al., 2002; Saint-Georges et al., 2008; Vincent et al., 2017; Williams et al., 2014). Chez la levure, il semble y avoir un adressage mitochondrial pour environ la moitié des MITO ARNm : la moitié



de 423 MITO ARNm chez Marc *et al* (Marc *et al.*, 2002), 480 sur 794 MITO ARNm chez Saint-Georges *et al* (Saint-Georges *et al.*, 2008) et 265 sur 479 MITO ARNm selon Williams *et al* (Williams *et al.*, 2014). Chez les plantes, l'étude de Vincent *et al* a mis en évidence une localisation mitochondriale pour 32% des MITO ARNm (Vincent *et al.*, 2017). Enfin, chez les mammifères, l'étude de Fazal *et al* a mis en évidence la localisation mitochondriale de 28% des MITO ARNm (Fazal *et al.*, 2019). L'ensemble de ces résultats mettent en évidence une localisation mitochondriale conservée entre les organismes allant du tiers à la moitié des MITO ARNm.

Différentes hypothèses pourraient expliquer la localisation des MITO ARNm à la surface mitochondriale. Chez les levures, plusieurs résultats suggèrent que la localisation mitochondriale des MITO ARNm serait liée à l'origine procaryotique des gènes correspondants (Garcia *et al.*, 2007). L'origine procaryotique ne serait pas la seule explication de cet adressage. Une autre hypothèse est que la localisation mitochondriale des MLR servirait à la régulation spatio-temporelle de la formation des complexes mitochondriaux (Garcia *et al.*, 2007; Lelandais *et al.*, 2009). Chez la drosophile, la localisation des MITO ARNm et leur traduction localisée seraient impliquées dans la transmission des mitochondries d'une génération à l'autre, notamment au niveau des oocytes de drosophile (Zhang *et al.*, 2016, 2019). Chez les plantes, les MLR semblent être dépendants de la fonction des protéines codées par ces MLR. En effet, les MITO ARNm codants pour les protéines du mitoribosome, ou impliquées dans le transport, le cycle de Krebs et la respiration semblent être localisés à la surface mitochondriale (Vincent *et al.*, 2017). Chez les mammifères, l'étude de Matsumoto *et al* a mis en évidence la présence de domaines transmembranaires enrichis dans les protéines codées par les MLR. Cela suggère que la localisation de MITO ARNm à la surface mitochondriale servirait à éviter un mauvais adressage des protéines codées par ces MITO ARNm (Matsumoto *et al.*, 2012).

La localisation mitochondriale des MITO ARNm nécessite la présence de différents signaux sur les ARNm. Que ce soit chez les levures, les plantes ou les mammifères, un des éléments déterminant de la localisation mitochondriale semble être dans la 3'UTR des MITO ARNm (Fazal *et al.*, 2019; Kaltimbacher, 2006; Margeot, 2002; Michaud *et al.*, 2014a; Sylvestre *et al.*, 2003; Vincent *et al.*, 2017).

D'autres signaux ont été mis en évidence pour influencer la localisation des MITO ARNm à la surface mitochondriale. Chez la levure, la séquence codant pour le MTS semble être, elle



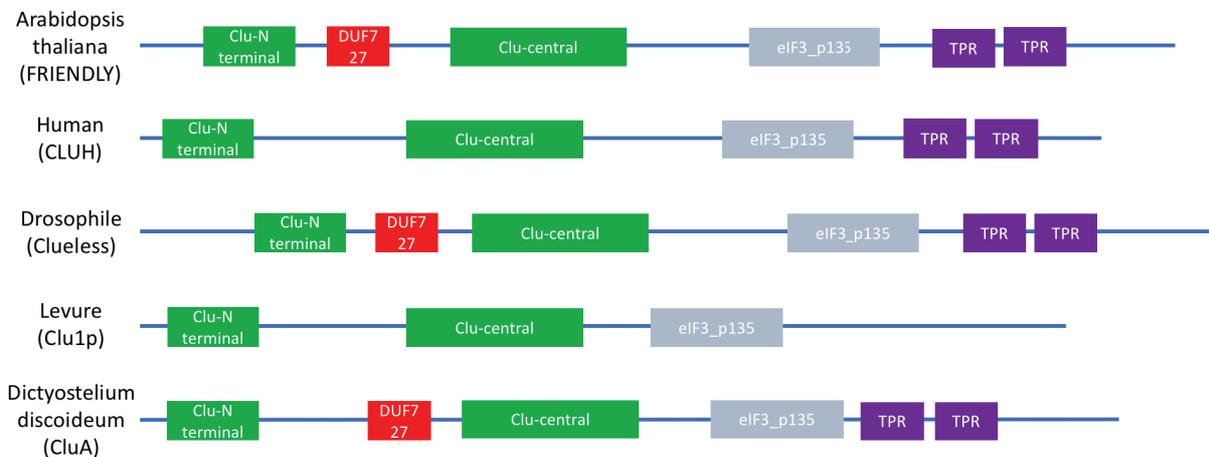
aussi, importante pour la localisation de certains ARNm (Margeot, 2002). Des signaux ont également été identifiés au niveau de la 5'UTR chez les plantes. En effet, il y a une corrélation entre l'absence de uAUGs dans la 5'UTR et la localisation à la surface mitochondriale des MITO ARNm (Vincent et al., 2017). Dans ce cas, l'effet des uAUGs serait lié à l'efficacité de la traduction.

En plus de signaux sur les MITO ARNm, l'adressage mitochondrial des MLR nécessite la présence de différents facteurs. Chez les levures, plusieurs facteurs semblent être impliqués dans la localisation des MLR. L'un des plus importants semble être Puf3p qui serait impliquée dans la localisation de la moitié des MLR (Saint-Georges et al., 2008). Cette voie d'adressage mitochondriale des MITO ARNm impliquerait également d'autres facteurs tels que COPI (Zabehinsky et al., 2016) ou des facteurs présents à la surface mitochondriale tels que Mdm12 (García-Rodríguez et al., 2007), les sous-unités Tom7, Tom5 et Tom70 du complexe TOM (Gadir et al., 2011). Certains MITO ARNm localisés à la surface mitochondriale seraient dépendants de leur association avec le ribosome (Saint-Georges et al., 2008; Williams et al., 2014), cela a été montré suite à la mise en évidence de ribosomes présents à la surface mitochondriale (Gold et al., 2017; Kellems et al., 1975). Cette association des ribosomes en cours de traduction de protéines mitochondriales nécessite l'intervention de facteurs mitochondriaux que ce soit Om14 et NAC (Lesnik et al., 2014) ou la sous-unité Tom20 du complexe TOM (Eliyahu et al., 2010; Gadir et al., 2011). Chez les drosophiles, peu d'informations sont connues sur la localisation des MITO ARNm à la surface mitochondriale. Néanmoins, les facteurs MDI, LARP et PINK1 semblent être impliqués dans ce phénomène (Gehrke et al., 2015; Zhang et al., 2016, 2019). Chez les plantes, l'une des sous-unités de complexe TOM autre que la sous-unité Tom20 semble être importante pour la localisation mitochondriale des ARNm comme cela a été démontré avec l'ARNm GAPDH (Michaud et al., 2014b). Chez les mammifères, l'adressage de certains ARNm est dépendant de la traduction, du complexe TOM (notamment Tom20 et Tom70 (Vardi-Oknin and Arava, 2019)) et du cytosquelette. La localisation mitochondriale d'autres ARNm est indépendante de la traduction (Fazal et al., 2019). D'autres facteurs ont aussi été mis en évidence chez les mammifères tels que la protéine YB-1 (Matsumoto et al., 2012), G3BP1 (Ortega et al., 2010) ou AKAP121 (Ginsberg et al., 2003).



**Figure 17 : Les domaines des protéines de la famille CLU.**

Représentation schématique des protéines de la famille CLU d'après Pfam. Les protéines de la famille CLU contiennent 5 domaines différents : un domaine Clu-N terminal et central, un domaine DUF 727, un domaine eIF3\_p135 et un domaine TPR.



**Figure 18 : Alignement des protéines de la famille CLU.**

Représentations schématiques des protéines de la famille CLU alignées d'après leurs séquences protéiques. Chaque domaine protéique (déterminé d'après Pfam) est positionné de manière relative par rapport au début de la séquence.

### 3. Les protéines de la famille CLU (Clustered mitochondria).

Toutes les protéines de la famille CLU se caractérisent par leur rôle dans la répartition des mitochondries dans le cytosol.

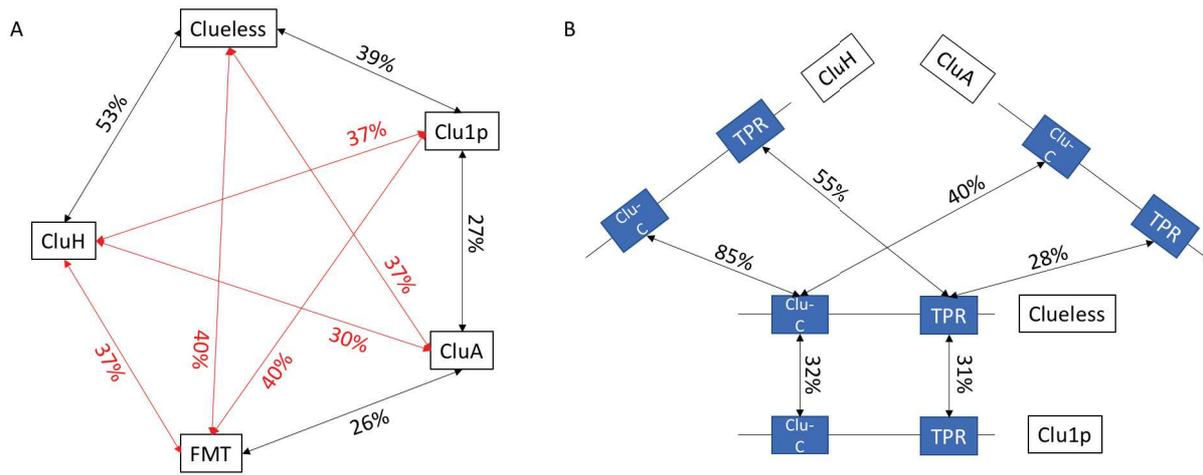
#### 3.1. Organisation générale des protéines de la famille CLU.

D'après les bases de données, les protéines de la famille CLU partagent les mêmes domaines. D'après Pfam, il y a 5 domaines trouvés dans les protéines de la famille CLU : un domaine Clu-N terminal, un domaine DUF 727, un domaine Clu central, un domaine eIF3\_p135 et plusieurs domaines tetratricopeptid repeat domaine (TPR) en C terminal (figure 17).

Les domaines CLU-N terminal, CLU central et eIF3\_p135 sont des domaines spécifiques des protéines de la famille CLU bien que leurs fonctions soient encore inconnues. Le domaine DUF 727 (ou Domain of Unknown Function) est aussi un domaine protéique de fonction inconnue. Enfin, l'un des seuls domaines des protéines CLU dont la fonction est connue est le domaine TPR. Le domaine TPR est un domaine constitué de répétition d'un motif de 34 acides aminés formant une structure « hélice-boucle-hélice », répété entre 2 et 20 fois, trouvé dans un grand nombre de protéines, et impliqué dans l'interaction protéine-protéine. Les répétitions des domaines TPR permettent de créer un réseau antiparallèle d'hélices alpha. Cette structure présente deux faces : une face concave et une face convexe qui sont toutes les deux impliquées dans l'interaction protéine-protéine, bien que la face concave soit la plus impliquée (Bakkum and Hill, 2017).

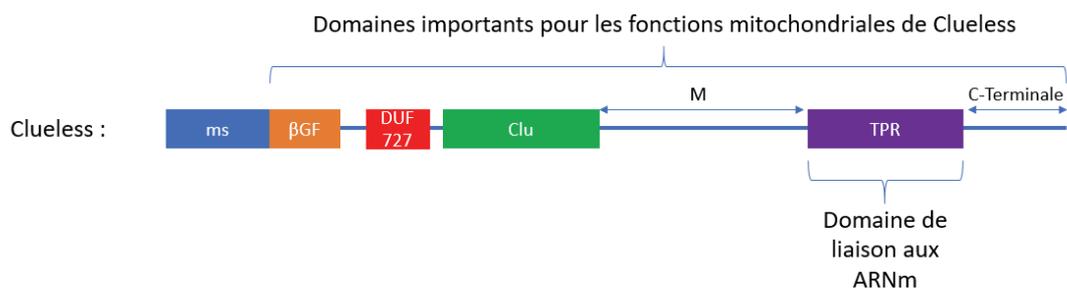
#### 3.2. Homologie des protéines de la famille CLU.

Ces 5 domaines semblent présents dans les protéines de la famille CLU chez *Dictyostelium discoideum* (CluA), chez *Arabidopsis thaliana* (FRIENDLY ou FMT), chez la drosophile (Clueless), chez les mammifères (CLUH) et chez la levure (Clu1p). Ces domaines sont plus ou moins conservés selon les espèces (figure 18). En effet, chez les mammifères et notamment chez l'Homme, il ne semble pas y avoir de domaine DUF 727 dans la protéine CLUH. De la même manière, la protéine Clu1p chez les levures ne possède pas de domaine DUF 727 ni de domaines TPR (figure 18). Ces résultats sont issus des données PFAM. Pour la



**Figure 19 : Homologie des protéines de la famille CLU.**

- A) Les différentes protéines de la famille CLU sont similaires entre elles et partagent différents pourcentages d'identité.
- B) Ces protéines CLU partagent deux domaines : un domaine CLU central (Clu-C) et un domaine TPR d'interaction protéine-protéine. Les flèches noires correspondent aux résultats issus de la bibliographie et les flèches rouges correspondent aux résultats obtenus suite à l'analyse d'homologie des séquences protéiques codant pour ces différentes protéines issues d'une analyse needle (EMBOSS).



**Figure 20 : Représentation schématique de la protéine Clueless chez la drosophile.**

L'analyse *in silico* de la protéine Clueless a mis en évidence la présence de 5 domaines dans la protéine Clueless dont seul le Domaine TPR (Tetratricopetid repeat) a une fonction connue de liaison protéine-protéine. Chez Clueless, les domaines βGF, DUF727, Clu et TPR ainsi que les parties M et C-terminale de Clueless sont importants pour la fonction mitochondriale de cette protéine. De plus, le domaine TPR est aussi impliqué dans la fonction de liaison aux ARNm de Clueless. Figure inspirée de Sen et al (Sen et al., 2015).

protéine Clu1p, l'analyse de la base de données PFAM ne met pas en évidence de domaines TPR en C terminale de la protéine. Mais la base de données Uniprot montre la présence de 3 domaines TPR en C terminale de la protéine Clu1p. De la même manière, l'étude de Sheard *et al* montre la présence de domaines TPR en C terminale de Clu1P et compare son homologie avec le domaine TPR de Clueless chez la drosophile (Sheard et al., 2020). Enfin, l'analyse des structures protéiques par le logiciel MPI Bioinformatics Toolkit met en évidence la présence de 5 domaines TPR (6 pour Clueless chez la drosophile) en C terminale des protéines de la famille CLU.

Les protéines de la famille CLU ont un certain pourcentage d'identité (figure 19A). De plus, ces protéines de la famille CLU partagent les mêmes domaines dont un domaine CLU central et un domaine TPR en C-terminale. Ces différents domaines font partie des éléments les plus conservés dans la protéine CLU (figure 19B).

### 3.3. Fonction des domaines de CLU : exemple de Clueless chez la drosophile.

La protéine Clueless semble avoir une extension N-terminale de 100 acides aminés qui n'est pas trouvée chez l'Homme (ms, figure 20). Sen *et al* (Sen et al., 2015) ont cherché d'autres domaines présents sur Clueless à partir des données *in silico* et ont mis en évidence la présence, entre l'extension N-terminale (extension ms) et le domaine Clu, de deux domaines potentiels. Il s'agit des domaines DUF 727 et  $\beta$ -GF (beta-Grasp Fold) (figure 20).

Sen et Cox (Sen and Cox, 2016) ont analysé l'importance des différents domaines de Clueless dans l'organisation du réseau mitochondrial. L'absence de Clueless dans le mutant *clu* aboutit à la formation de regroupements de mitochondries dans le cytosol alors que celles-ci sont uniformément réparties dans les cellules des drosophiles sauvages (voir paragraphe 2.3.2.2.) (Cox and Spradling, 2009; Sen et al., 2013, 2015). Sen et Cox ont inhibé l'expression de la protéine Clueless par RNAi dans des cellules S2R+ de drosophiles (lignée cellulaire issue d'un tissu embryonnaire) avant de transfecter ces cellules *clu* avec différentes constructions de Clueless. Les cellules S2R+ *clu* ont été complétées avec Clueless sans l'extension ms de 100 acides aminés en N-terminal ( $\Delta$ ms), sans le domaine *clu* ( $\Delta$ clu) ou sans le domaine TPR ( $\Delta$ TPR). Seules les cellules S2R+ *clu* complétées avec la version  $\Delta$ ms de Clueless permet la restauration du phénotype sauvage, avec la dispersion uniforme des mitochondries dans le



cytosol. Ces résultats suggèrent que le domaine ms n'est pas nécessaire à la fonction mitochondriale de Clueless, contrairement aux domaines clu et TPR. Sen et Cox ont analysé l'effet des différents domaines de Clueless sur le taux de survie des drosophiles adultes et sur leur capacité à produire de l'ATP. Des drosophiles *clu* sont complémentées avec la protéine Clueless dont les différents domaines ont été supprimés un par un :  $\Delta\beta\text{GF}$ ,  $\Delta\text{DUF727}$ ,  $\Delta\text{clu}$ ,  $\Delta\text{M}$ ,  $\Delta\text{TPR}$  et  $\Delta\text{C-terminale}$  (figure 20). Dans le mutant *clu*, le taux de survie moyen des drosophiles est de 4 jours, et ce taux reste le même suite à la complémentation avec les différentes constructions de Clueless ( $\Delta\beta\text{GF}$ ,  $\Delta\text{DUF727}$ ,  $\Delta\text{clu}$ ,  $\Delta\text{M}$ ,  $\Delta\text{TPR}$  et  $\Delta\text{C-terminale}$ ). De la même manière, l'absence de Clueless aboutit à une production d'ATP correspondant à seulement 30% du taux sauvage. Ce taux reste bas suite à la complémentation du mutant *clu* avec les constructions Clueless  $\Delta\beta\text{GF}$ ,  $\Delta\text{DUF727}$ ,  $\Delta\text{clu}$ ,  $\Delta\text{M}$ ,  $\Delta\text{TPR}$  et  $\Delta\text{C-terminale}$ . Ces résultats suggèrent que tous les domaines de Clueless à l'exception du domaine N-terminal ms sont importants pour le développement et les fonctions mitochondriales de la drosophile. Sen et Cox ont aussi analysé l'association de Clueless avec lui-même et sa capacité à former des complexes. Pour cela, des cellules S2R+ ont été transformées avec des versions de Clueless fusionnées à l'étiquette FLAG et à l'étiquette myc puis utilisées en Co-IP. La purification de Clueless fusionnée à l'une des étiquettes permet de purifier la protéine Clueless fusionnée à l'autre étiquette et vice versa. Ces résultats suggèrent une interaction de Clueless avec elle-même. Néanmoins, on ne peut pas savoir si cette interaction est directe ou indirecte, et si Clueless est sous forme de dimère, de tétramère ou de multimère.

### 3.4. Fonction des protéines de la famille CLU.

#### 3.4.1. La protéine CluA chez *Dictyostelium discoideum*.

##### 3.4.1.1. Rôle de CluA sur l'organisation mitochondriale.

L'étude de Zhu *et al* a analysé l'effet de l'inactivation du gène CluA par recombinaison homologue. Pour cela, des cellules DH1 ont été transfectées avec un plasmide linéaire contenant des régions du gène *cluA* bordant un marqueur de sélection. Les cellules *cluA*<sup>-</sup> montrent une croissance ralentie (16h pour un doublement de la population dans les cellules *cluA*<sup>-</sup> contre 12h pour les cellules sauvages), et une augmentation du nombre de cellules multinucléées. Ces résultats suggèrent une déficience de la cytokinèse (processus de division du cytoplasme dans les deux cellules filles lors de la division cellulaire) en absence de la



protéine CluA. Une autre conséquence de l'absence de CluA a été mise en évidence par microscopie en présence de DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole, se lie à l'ADN et marque les noyaux et les mitochondries). Dans les lignées sauvages, les mitochondries sont dispersées uniformément dans le cytoplasme alors que dans les lignées *cluA*<sup>-</sup>, les mitochondries sont regroupées au centre de la cellule. Les cellules *cluA*<sup>-</sup> complémentées avec une version sauvage du gène *cluA* retrouvent une croissance normale et une répartition normale des mitochondries. De plus, l'analyse des cellules *cluA*<sup>-</sup> complémentées avec CluA montre une réduction du nombre de cellules multinucléées. En effet, 45% des cellules sont multinucléées dans la lignée *cluA*<sup>-</sup> contre seulement 10% dans les cellules *cluA*<sup>-</sup> complémentées. Ces résultats suggèrent une restauration de la cytokinèse. L'étude de Zhu *et al* (Zhu et al., 1997) suggère donc que CluA est impliqué dans la cytokinèse et l'organisation du réseau mitochondrial.

#### **3.4.1.2. Rôle du cytosquelette dans la fonction mitochondriale de CluA.**

L'étude de Fields *et al* (Fields et al., 2002) a analysé le rôle du cytosquelette dans la dispersion des mitochondries chez *Dictyostelium discoideum*. L'analyse du réseau de microtubules dans des cellules sauvages et *cluA*<sup>-</sup> par immunofluorescence a permis de mettre en évidence un réseau développé des microtubules depuis le centre d'organisation des microtubules (MTOC) jusqu'à la périphérie des cellules dans les deux lignées cellulaires. Il n'y a donc pas d'altération du réseau de microtubules en dans le mutant *cluA*<sup>-</sup>, ce qui suggère que le regroupement des mitochondries autour du noyau observé en absence de CluA n'est pas lié à une désorganisation du réseau de microtubules. Fields *et al* (Fields et al., 2002) ont utilisé du nocodazole (un inhibiteur de la polymérisation des microtubules) dans des cellules sauvages. Dans ce cas, les microtubules ne s'étendent plus jusqu'à la périphérie des cellules et restent autour du MTOC. Après 30 minutes et 6 heures de traitement au nocodazole, les mitochondries restent dispersées dans le cytoplasme. Ces résultats suggèrent que les microtubules ne sont pas nécessaires au maintien de la dispersion des mitochondries dans le cytoplasme. Néanmoins, ces résultats n'excluent pas le rôle des microtubules dans le positionnement des mitochondries avant l'ajout du nocodazole. Des expériences similaires ont été réalisées sur le réseau d'actine. Dans les cellules sauvages et *cluA*<sup>-</sup>, le réseau d'actine reste enrichi dans la partie corticale des cellules. De plus, l'ajout de cytochalaxine A (un inhibiteur des filaments d'actine) dans les cellules sauvages ne modifie pas la répartition des



mitochondries. Les mitochondries restent dispersées dans le cytoplasme. Le regroupement des mitochondries observé en absence de CluA n'est donc pas lié à un dérèglement du réseau de filaments d'actines.

Le peroxysome, important notamment pour le métabolisme des lipides, est transporté dans la cellule de manière similaire aux mitochondries. Les peroxysomes sont dispersés dans le cytoplasme en présence et en absence de CluA. Ces résultats suggèrent que le regroupement de mitochondries observé en absence de CluA n'est pas dû à une altération du cytosquelette et du transport des organites par celui-ci (Fields et al., 2002).

L'analyse des mouvements des mitochondries par microscopie dans des cellules sauvages vivantes met en évidence de courts mouvements stochastiques qui aboutissent à de petits changements de positions des mitochondries, et parfois des mouvements plus longs et plus rapides qui se dirigent ou qui s'éloignent du MTOC. Ces mouvements longs sont concordants avec des mouvements le long des microtubules. En absence de CluA, les regroupements de mitochondries montrent des déformations et des réarrangements locaux mais les mitochondries elles-mêmes ne semblent pas se déplacer. Seules les mitochondries isolées (hors des regroupements de mitochondries) montrent des mouvements rapides similaires aux mitochondries dans les cellules sauvages (Fields et al., 2002).

Globalement, les travaux de Fields *et al* suggèrent que les fonctions du cytosquelette ne sont pas affectées dans les cellules *cluA<sup>-</sup>*, et que le regroupement des mitochondries en absence de CluA ne semble pas dû à un défaut du cytosquelette.

L'étude de Woods *et al* (Woods et al., 2016) a aussi analysé le rôle du cytosquelette dans l'organisation des mitochondries. Pour cela, des cellules sauvages et *cluA<sup>-</sup>* ont été traitées avec du nocodazole ou avec de la latrunculin-B (un inhibiteur des filaments d'actine). Dans des cellules sauvages, l'inhibition des microtubules ou des filaments d'actines (filament du cytosquelette) n'a pas d'effet sur la distribution des mitochondries. Dans les cellules *cluA<sup>-</sup>*, en revanche, l'inhibition des microtubules et des filaments d'actines modifie l'organisation des mitochondries. En effet, en absence de CluA et de microtubules ou de filaments d'actines, les regroupements de mitochondries semblent plus lâches. Ces résultats suggèrent que les microtubules et les filaments d'actines sont impliqués dans le maintien des mitochondries sous formes regroupées autour du noyau en absence de CluA, bien qu'ils ne soient pas



impliqués dans la dispersion des mitochondries dans les cellules sauvages. L'étude de Woods *et al* a ensuite analysé le rôle du cytosquelette dans la motilité des mitochondries. Pour cela, Woods *et al* ont calculé la vitesse de déplacement des mitochondries à partir d'images de microscopies de cellules sauvages ou *cluA*<sup>-</sup>, en absence ou en présence d'inhibiteurs du cytosquelette. La vitesse des mitochondries est de 0.164 µm/secondes en absence de latrunculin-B contre 0.165 µm/secondes en présence de l'inhibiteur dans les cellules sauvages. Dans les cellules *cluA*<sup>-</sup>, la vitesse de mouvement des mitochondries est de 0.161 µm/secondes en absence d'inhibiteur contre 0.158 µm/secondes en présence de latrunculin-B. Ces résultats suggèrent que ni l'actine ni CluA ne sont impliqués dans la vitesse des mitochondries. En analysant l'effet des microtubules, Woods *et al* ont mis en évidence qu'un traitement au nodocazole induisait une baisse de la vitesse de déplacement des mitochondries de 55% dans les cellules sauvages et de 64% dans les cellules *cluA*<sup>-</sup>. Woods *et al* ont aussi analysé l'effet synergique de l'inhibition concomitante des microtubules et des filaments d'actines dans les cellules sauvages et *cluA*<sup>-</sup>. Dans les cellules sauvages, un traitement avec du nocodazole seul, ou nocodazole et latrunculin-B ne montre pas de différences de vitesse. Dans les cellules *cluA*, au contraire, un traitement au nocodazole et à la latrunculin-B diminue la vitesse des mitochondries jusqu'à 72%. Ces résultats suggèrent que seuls les microtubules ont un rôle dans la vitesse des mitochondries dans les cellules sauvages, mais en absence de CluA, l'actine semble aussi impliquée.

#### **3.4.1.3. Rôle de la distribution du RE dans la fonction mitochondriale de CluA.**

Le RE étant en contact étroit avec les mitochondries, cet organite pourrait être impliqué dans le positionnement des mitochondries dans le cytosol. L'analyse par immunofluorescence du RE dans les cellules sauvages et *cluA*<sup>-</sup> par Fields *et al* (Fields *et al.*, 2002) met en évidence une absence d'altération de la distribution du RE dans le cytosol en absence de CluA. Par contre, cette étude n'exclut pas la possibilité que la perturbation du réseau mitochondrial dans *cluA*<sup>-</sup> serait le résultat d'une perturbation du lien entre le RE et les mitochondries.



#### **3.4.1.4. Rôle de CluA dans les processus de fusion et de fission mitochondriale.**

Fields *et al* (Fields et al., 2002) ont analysé la structure des mitochondries dans les cellules sauvages et *cluA*<sup>-</sup> par microscopie électronique, mais n'ont pas mis en évidence de différences dans l'organisation de la mitochondrie : il y a une matrice dense, de nombreuses crêtes aplaties, une membrane externe et une membrane interne avec des zones de contact entre les deux. Néanmoins, la différence est nette au niveau de l'organisation du réseau mitochondrial entre les cellules sauvages et *cluA*<sup>-</sup>. En effet, alors que les mitochondries sauvages sont distinctes les unes des autres, en absence de CluA, les mitochondries sont regroupées et parfois connectées les unes aux autres par le biais de rétrécissements étroits. L'analyse de ces regroupements met en évidence des mitochondries à divers stades de fusion et de fission que l'on n'observe pas dans des cellules sauvages. Ces résultats suggèrent une altération de la division des mitochondries dans les cellules *cluA*<sup>-</sup>, donc un rôle de CluA dans les processus de fusion et de fission mitochondriales.

Schimmel *et al* (Schimmel et al., 2012) ont observé des cellules sauvages et *cluA*<sup>-</sup> par microscopie confocale. Les images sur des cellules sauvages ont mis en évidence l'existence de phénomènes de fusion et de fission des mitochondries chez *Dictyostelium discoideum*. La quantification de ces événements de fusion et de fission met en évidence une balance de ces deux phénomènes ainsi qu'un taux de fission de 1 événement par minute et un taux de fusion de 0.95 événement par minute. Dans les cellules *cluA*<sup>-</sup>, l'absence de la protéine CluA aboutit à la formation de cluster de mitochondrie. Les phénomènes de fission et de fusion sont réduits avec 0.64 événements de fission par minute et 0.35 événements de fusion par minute, même si la balance entre fusion et fission semble plus ou moins conservée. Cependant ces événements de fusion et fission ne concernent que les mitochondries non clustérisées. Ces résultats suggèrent que la protéine CluA est nécessaire au maintien de la dynamique mitochondriale.

Woods *et al* (Woods et al., 2016) ont également analysé le taux de fusion et de fission dans des cellules sauvages et *cluA*<sup>-</sup>, en présence et en absence d'inhibiteur du cytosquelette. Suite à l'inhibition des microtubules par le nocodazole dans des cellules sauvages, le taux de fission baisse de 85% et le taux de fusion baisse de 81%, alors que l'inhibition des filaments d'actines par la Latrunculin-B semble avoir peu d'effet sur le taux de fusion et de fission (baisse de 14 et 15% respectivement). Ces résultats suggèrent que les microtubules jouent un rôle



majeur dans les mécanismes de fusions et de fissions alors que l'actine ne semble y jouer qu'un rôle mineur. En absence de CluA, les résultats sont similaires. Le traitement au nocodazole baisse le taux de fission de 81% et le taux de fusion de 78%, et un traitement à la latrunculin-B baisse le taux de fission de 17% et le taux de fusion de 20%. Ces résultats suggèrent que le rôle de la protéine CluA sur la fusion et la fission n'est pas lié au cytosquelette. Il ne s'agirait donc par d'une protéine servant d'intermédiaire entre le cytosquelette et les mitochondries dans le processus de division mitochondriale.

### **3.4.2. La protéine FRIENDLY (ou FMT) chez *Arabidopsis thaliana*.**

#### **3.4.2.1. Rôle de FMT sur l'organisation mitochondriale.**

Une étude de Logan *et al* (Logan et al., 2003) a analysé les gènes impliqués dans l'organisation du réseau mitochondrial. Pour cela, des plantules exprimant une protéine GFP importée dans la mitochondrie (mito-GFP) sont traitées à l'éthyl methane sulphonate (EMS), un composé chimique mutagène. L'un des mutants obtenu montre un phénotype de regroupement des mitochondries. Ce mutant est appelé mutant *fmt* pour « friendly mitochondria », et montre des regroupements de dizaines de mitochondries sans altération des chloroplastes. L'analyse des mitochondries présentes dans *fmt* par microscopie électronique ne montre pas de connexion membranaire entre les mitochondries présentes dans les regroupements : les mitochondries sont regroupées mais distinctes les unes des autres. Logan *et al* ont ensuite effectué un croisement de ce mutant *fmt* avec une plante sauvage, et l'analyse génétique de leur descendance met en évidence la mutation d'un unique gène. Ce gène *FMT* code pour une protéine (FMT) qui appartient à la famille des protéines CLU. Le phénotype de regroupement des mitochondries a déjà été observé chez *Dictyostelium discoideum* dans le mutant *cluA*- (gène orthologue de FMT) (voir paragraphe 3.2.1.1.).

Une étude de El Zawily *et al* (El Zawily et al., 2014) a analysé le rôle de FMT dans l'organisation du réseau mitochondrial. Cette étude a comparé la distribution des mitochondries dans des plantules de plantes *Arabidopsis thaliana* mito-GFP sauvages et *fmt* (mutation chimique à l'EMS (Logan et al., 2003)) (voir paragraphe 3.1.2.). Il y a une dispersion uniforme des mitochondries dans le cytosol des cellules de feuilles et de racines de plantules sauvages. Dans les racines et les feuilles des plantes *fmt*, la plupart des mitochondries sont dans des regroupements de dizaines de mitochondries (clusters), mais il y a également



quelques mitochondries isolées qui se distribuent dans le cytosol comme dans les plantes sauvages. Des mitochondries sont considérées comme étant regroupées si le cluster recouvre plus de  $2.5 \mu\text{m}^2$ . Ces clusters ne sont pas observés dans des plantes sauvages. Dans les plantes *fmt*, les clusters font en moyenne  $9.7 \mu\text{m}^2$  dans les cellules de feuilles et  $16.09 \mu\text{m}^2$  dans les cellules de racines. Malgré cette différence de taille, le nombre de clusters est similaire dans les deux tissus. Ces résultats mettent en évidence le rôle de FMT dans l'organisation du réseau mitochondrial. Comme dans l'analyse de Logan *et al* (Logan et al., 2003), El Zawily *et al* (El Zawily et al., 2014) ont aussi analysé les plantes *fmt* par microscopie électronique à transmission: les mitochondries des clusters restent distinctes les unes des autres, et aucune connexion entre mitochondries n'est observée. Une expérience de FRAP (Fluorescence Recoverinf After Photobleaching) a également été réalisée. Si les mitochondries sont connectées, leurs matrices devraient être fusionnées ce qui veut dire que les molécules fluorescentes pourront passer des mitochondries fluorescentes vers les mitochondries dont la fluorescence a été éteinte. Dans cette expérience de FRAP sur des cellules *fmt*, il n'y a pas de retour de la fluorescence dans les 300 secondes suivant le photoblanchiment. Ces résultats confirment la présence de mitochondries distinctes les unes des autres dans les clusters.

#### **3.4.2.2. Localisation et modification de la protéine FMT.**

L'étude de El Zawily *et al* (El Zawily et al., 2014) montre une localisation cytosolique de la protéine FMT, parfois ponctuée, et associée à la mitochondrie. Des tests de colocalisation de la protéine FMT avec d'autres organites tels que le peroxyosome, le RE ou l'appareil de Golgi ont été réalisées chez *Nicotiana tabacum* sans montrer de colocalisation entre FMT et ces organites.

La protéine FMT possède deux sites possibles d'acétylation : la lysine (K) en position 1022 et la lysine en position 1029. L'étude de El Zawily *et al* (El Zawily et al., 2014) a analysé l'impact de l'acétylation de la protéine FMT sur sa fonction. Pour cela, la protéine FMT a été mutée au niveau des sites d'acétylation. Ceux-ci ont été mutés en Arginine (R) qui mime une forme non-acétylée de la protéine ou en glutamine (Q) qui mime une forme acétylée de la protéine FMT. Les deux versions mutées et la version sauvage de FMT sont utilisées pour transformer les plantes *Arabidopsis thaliana fmt* mito-GFP. La complémentation du mutant *fmt* avec la version sauvage de FMT ou avec ses versions non-acétylées (K1022R ou K1029R)



donne des résultats similaires, avec 38 à 46% de cellules ayant un phénotype sauvage (dispersion des mitochondries). Par contre la complémentation des plantes *fmt* avec la protéine FMT acétylée (versions K1022Q et K1029Q) donne des résultats moins bons : 29% de restauration pour K1022Q et 6% pour K1029Q. Ces résultats suggèrent que la fonction de la protéine FMT est régulée par son acétylation au niveau des lysines 1022 et 1029.

#### **3.4.2.3. Lien entre FMT et le cytosquelette.**

L'étude de El Zawily *et al* (El Zawily et al., 2014) a analysé le rôle du cytosquelette dans l'organisation du réseau mitochondrial. Dans les plantes *fmt*, les mitochondries isolées sont en mouvement, de mêmes que les petits regroupements. Néanmoins, les grands clusters mitochondriaux sont peu mobiles. La dépolymérisation des microtubules n'a pas d'effet sur la répartition des mitochondries dans les plantes sauvages. Par contre, suite à la dépolymérisation des filaments d'actines par un traitement à la latrunculin-B, les mitochondries isolées et les petits regroupements deviennent immobiles dans les plantes *fmt* comme dans les plantes sauvages. De plus, la dépolymérisation des filaments d'actines dans des cellules sauvages aboutit à une agrégation des mitochondries, mais pas des autres organites comme le peroxysome ou l'appareil de Golgi. Ceci met en évidence le rôle de l'actine dans la dynamique des clusters.

#### **3.4.2.4. Rôle de FMT dans l'association des mitochondries les unes avec les autres.**

L'étude de El Zawily *et al* (El Zawily et al., 2014) a analysé le temps d'association entre les mitochondries. Chez les plantes, les mitochondries passent par des périodes où elles sont isolées et des périodes plus courtes où elles s'associent les unes aux autres. Ces périodes d'association sont nécessaires pour les phénomènes de fusions et de fissions. L'analyse des images de microscopie de cellules mito-GFP sauvages et *fmt* met en évidence une association entre deux mitochondries de 15 secondes en moyenne dans les cellules sauvages et de 61.5 secondes dans les cellules *fmt*. Un modèle de simulation mathématique des mouvements stochastiques des mitochondries montre que plus le temps d'association est long, plus la probabilité d'observer des clusters est grande. Ces résultats mettent en évidence le rôle de FMT dans la régulation de l'association des mitochondries les unes avec les autres.



#### **3.4.2.5. Rôle de FMT dans les processus de fusion mitochondriale.**

L'étude de El Zawily *et al* (El Zawily et al., 2014) a analysé le rôle de la protéine FMT dans le mécanisme de fusion. La première étape de la fusion est la formation d'un pore dans la membrane interne mitochondriale. Ce pore provoque un changement de potentiel de membrane dans les mitochondries en cours de fusion. Dans les cellules sauvages, il y a 0.12 évènements pour 100 mitochondries par minutes contre 11.14 pour les cellules *fmt*. Ces résultats suggèrent que l'étape initiale de la fusion, représentée par la formation d'un pore, est plus fréquente en absence de la protéine FMT.

#### **3.4.2.6. Rôle de FMT dans la mitophagie.**

Le mécanisme de la mitophagie est bien documenté notamment chez les mammifères (voir paragraphe 2.2.2.3.). Ce mécanisme utilise les protéines PINK1 et Parkin comme des acteurs majeurs de ce phénomène. Chez les plantes, la mitophagie est mal comprise, notamment à cause de l'absence d'orthologues de PINK1 et Parkin dans ses organismes. Une étude de Ma *et al* (Ma et al., 2020) a mis en évidence l'implication de ATG5 et ATG8 deux protéines impliquées dans la macro-autophagie qui permettent aux autophagosomes de prendre en charge les mitochondries défectueuses avant de les diriger vers la vacuole. Cette étude a également analysé l'implication de FMT dans cette mitophagie. Suite à la dépolarisation des membranes mitochondriales grâce à l'ajout de 2,4-dinitrophenol (DNP), la localisation de la protéine FMT semble se modifier pour devenir ponctuelle et colocalisée avec les mitochondries, alors que la protéine était diffuse dans le cytosol dans des conditions normales. De plus, des expériences de pull-down mettent en évidence une association entre FMT et ATG8 suite au traitement par le DNP. Ces résultats suggèrent l'implication de FMT dans la mitophagie chez les plantes. Ces résultats ont été confirmés grâce à l'analyse du mutant *fmt* dans lequel une baisse de la prise en charge des mitochondries défectueuses a été mise en évidence, ce qui conduit à une augmentation de la quantité de mitochondries dépolarisées dans les cellules mutantes (Ma et al., 2020).



#### **3.4.2.7. Paralogues de FMT (REC).**

Une étude de Larkin *et al* (Larkin et al., 2016) a recherché les facteurs protéiques impliqués dans la dynamique des chloroplastes. Par l'analyse de mutants défectueux pour la signalisation « plaste vers noyaux », l'étude de Larkin *et al* a mis en évidence l'existence d'un gène dont l'inhibition réduit le volume du compartiment chloroplastique. Ce facteur de 200kDa est appelé REC1 pour Reduced Chloroplast Coverage 1. Il possède 3 paralogues : deux facteurs de fonctions inconnues : REC2 et REC3 dont l'identité avec REC1 est similaire (52%) et FMT dont l'identité avec REC1 est de 42%. Ces différents paralogues de FMT ne sont présents que dans les organismes photosynthétiques. D'après Larkin *et al*, REC1 se localise dans le noyau et le cytosol. En conclusion, REC1 est une protéine présente à l'extérieur des chloroplastes qui serait impliquée dans la régulation de la taille du compartiment chloroplastique. De plus, ces résultats suggèrent que REC1 et FMT font partie d'une famille de protéines impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique, que ce soit au niveau des mitochondries (FMT) ou des chloroplastes (REC1).

#### **3.4.2.8. Conclusion.**

D'après les études de Logan *et al* (Logan et al., 2003) et de El Zawily *et al* (El Zawily et al., 2014), la protéine de la famille CLU chez les plantes, appelée FRIENDLY ou FMT, est elle aussi impliquée dans l'organisation du réseau mitochondriale. En effet, en absence de FMT, les mitochondries sont regroupées. Néanmoins, celles-ci restent distinctes les unes des autres.

La protéine FMT est diffuse dans le cytosol avec l'observation occasionnelle d'un signal ponctuel parfois associé à la mitochondrie. De plus, l'activité de cette protéine est régulée par l'acétylation des lysines 1022 et 1029 qui inhibe sa fonction mitochondriale (El Zawily et al., 2014). La fonction de FMT dans l'organisation du réseau mitochondrial pourrait avoir un lien avec les filaments d'actines qui sont impliqués dans le mouvement des mitochondries chez les plantes (El Zawily et al., 2014). D'après l'étude de El Zawily *et al* FMT serait impliquée dans la régulation de la fusion mitochondriale ce qui aboutirait à une augmentation du temps d'association entre les mitochondries et donc à la formation de regroupements mitochondriaux en absence de FMT (El Zawily et al., 2014). De plus, une autre étude a montré



une implication de FMT dans les étapes initiales de la mitophagie chez les plantes (Ma et al., 2020).

Chez les organismes photosynthétiques, il existe différents paralogues de FMT dont REC1 qui serait impliqué dans la régulation du compartiment chloroplastique. Cette famille de protéines serait donc impliquée dans la régulation du métabolisme énergétique (Larkin et al., 2016).

### **3.4.3. La protéine Clueless chez la drosophile.**

#### **3.4.3.1. La protéine Clueless.**

##### **3.4.3.1.1. Localisation.**

Les études de Cox et Spradling (Cox and Spradling, 2009) et de Sen *et al* (Sen et al., 2015) ont analysé la localisation de la protéine Clueless par immunofluorescence. La protéine Clueless est présente dans le cytosol, elle y forme parfois des particules. Un double marquage des mitochondries et de Clueless met en évidence l'association de plusieurs mitochondries avec les particules de Clueless et une absence d'entrée de Clueless dans les mitochondries. Cette localisation cytosolique associée à la mitochondrie est aussi retrouvée suite à un fractionnement subcellulaire par Sen *et al*. Clueless est présente dans le culot mitochondrial ainsi que dans le surnageant cytosolique (Sen et al., 2015).

Sen *et al* (Sen et al., 2013) ont analysé l'expression de la protéine Clueless sur des coupes de cerveau de larves au troisième stade de développement larvaire (L3). Clueless est fortement exprimée dans de larges cellules du cerveau central, et co-localise avec Miranda, une protéine spécifique des neuroblastes (NBs, des cellules souches cérébrales). Ceci suggère une expression de Clueless dans les NBs. Clueless y apparaît exprimée dans le cytosol, avec la formation occasionnelle de particules.

Une étude de Sheard *et al* (Sheard et al., 2020) a analysé la localisation et la dynamique de la protéine Clueless. Dans les follicules ovariens fixés ou vivants, la protéine Clueless est cytosolique et forme parfois des particules. Ces particules de Clueless sont plus abondantes dans les follicules ovariens vivants. De plus, l'analyse des images de microscopie confocale en temps réel sur 200 secondes met en évidence des mouvements aléatoires de ces particules et, pour 12% des particules de Clueless, des mouvements de manière dirigée. Dans ce cas, les



particules Clueless sont rapides, avec une vitesse de 1.5  $\mu\text{m}/\text{seconde}$ . Suite à l'inhibition des microtubules, ces particules en mouvement dirigé deviennent immobiles. Ces résultats suggèrent que les mouvements des particules Clueless sont dirigés par les microtubules. L'étude de Sheard *et al* a analysé la colocalisation des particules Clueless avec les différents éléments de la cellule, tels que les mitochondries, les autophagosomes, les P-Bodies, le réticulum endoplasmique et l'appareil de Golgi. Les images de microscopie confocale montrent une colocalisation des particules Clueless avec les mitochondries uniquement, ce qui est cohérent avec les études précédentes (Cox and Spradling, 2009; Sen et al., 2013, 2015). Sheard *et al* (Sheard et al., 2020) ont ensuite analysé l'effet d'un stress nutritif sur la formation des particules Clueless. Des femelles de drosophiles montrent une présence abondante de particules Clueless dans leurs follicules ovariens quand elles sont nourries de levures. Suite à une carence nutritive de 5h, ces femelles de drosophiles ne montrent plus de particules Clueless dans leurs follicules ovariens. Enfin, une reprise de la nourriture pendant 2h montre un retour des particules Clueless. Néanmoins, le taux de protéines Clueless ne change pas en fonction du régime de nutrition de ces drosophiles. Ces résultats suggèrent un grand dynamisme et une réversibilité des granules qui se forment et se dissocient en fonction des conditions. Ces drosophiles femelles ont ensuite été traitées à l'insuline. Le traitement à l'insuline permet d'augmenter la quantité de particules dans les cellules germinales et montre que l'insuline est suffisante pour induire la formation de particules Clueless. Les drosophiles *sod*, mutées pour la superoxyde dismutase (SOD), ont un fort stress oxydatif. Dans ces drosophiles *sod* transformées avec Clueless-GFP, il n'y a pas de particules Clueless. Ces résultats suggèrent que des stress tels qu'un stress oxydatif ou un stress nutritif dissocient les granules de Clueless, contrairement aux granules tels que les granules de stress ou les P-Bodies.

#### 3.4.3.1.2. Fonction de liaison aux ARNm.

Une étude de Sen et Cox (Sen and Cox, 2016) a analysé la capacité de liaison aux ARNm de la protéine Clueless. Un crosslink aux UVs est réalisé, et les ARNm et leurs protéines associées sont récupérés par purification sur des billes couvertes d'oligonucléotides dT (TT)<sub>x</sub>. La protéine Clueless est détectée par western blot dans les éluats, ce qui montre qu'elle pouvait se lier aux ARNm. Cette protéine ne contient aucun domaine connu de liaison aux



ARNm. Sen et Cox (Sen and Cox, 2016) ont donc complété des drosophiles *clu* avec différentes constructions de Clueless dont chaque domaine a été délété un par un :  $\Delta\beta\text{GF}$ ,  $\Delta\text{DUF727}$ ,  $\Delta\text{clu}$ ,  $\Delta\text{M}$ ,  $\Delta\text{TPR}$  et  $\Delta\text{C-terminale}$  (figure 20). Après crosslink aux UVs, les ARNm et leurs protéines associées ont été récupérés sur billes oligo(dT), et Clueless recherchée dans les éluats. Seule la version  $\Delta\text{TPR}$  n'est pas détectée, ce qui suggère que seul le domaine TPR est impliqué dans l'interaction Clueless-ARNm (figure 20). L'étude de Sen et Cox a analysé le profil de sédimentation de Clueless sur un gradient de sucrose à partir d'extraits ovariens de drosophiles sauvages. Clueless sédimente principalement dans les fractions lourdes. Mais un traitement RNase change le profil de sédimentation de Clueless, et Clueless est retrouvée principalement dans les fractions légères. Ces résultats suggèrent une association de Clueless avec les fractions lourdes (ribosomes) dépendante des ARN (Sen and Cox, 2016).

### **3.4.3.2. Rôle mitochondrial de Clueless.**

#### **3.4.3.2.1. Sur les mitochondries.**

Cox et Spradling (Cox and Spradling, 2009) ont analysé les mitochondries de drosophiles sauvages et mutantes *clu* par microscopie électronique à partir des muscles des ailes de drosophiles de 3 jours. Dans le mutant *clu* (d08713), les mitochondries sont plus grosses que la normale avec une réduction du nombre de crêtes mitochondriales. Ces résultats sont aussi observés sur des mitochondries d'ovaires de drosophiles, bien que le phénotype mitochondrial soit moins sévère. Ces résultats suggèrent que Clueless est importante pour la structure et la fonction des mitochondries.

L'étude de Cox et Spradling (Cox and Spradling, 2009) a aussi analysé le rôle de Clueless dans l'expression des protéines mitochondriales. Le taux d'expression de la pyruvate déshydrogénase et du complexe V-alpha a été analysé par western blot sur des extraits de drosophiles adultes sauvages et *clu*. Leur expression est réduite en absence de Clueless. Une analyse des ARNm exprimés dans des follicules ovariens sauvages et *clu* par puce à ADN met en évidence une sous expression de la plupart des ARNm codants pour des protéines impliquées dans la protection contre les ROS, dans la réparation de l'ADN, dans l'apoptose ou dans le métabolisme dans le mutant *clu*.



Une étude de Wang *et al* (Wang et al., 2016) a analysé la morphologie mitochondriale dans les muscles 6 et 7 des larves de drosophiles par microscopie électronique. Dans les muscles de drosophiles sauvages, les mitochondries sont tubulaires avec des crêtes mitochondriales organisées alors qu'elles sont rondes avec des crêtes mitochondriales perturbées dans des muscles de drosophiles *clu* (*clu*<sup>d08713</sup> et *clu*<sup>ΔW</sup> (délétion de la région 5'UTR et du codon initiateur)).

Ces différents travaux montrent que Clueless est importante pour la structure et le fonctionnement des mitochondries.

#### **3.4.3.2.2. Sur le réseau mitochondrial.**

L'étude de Cox et Spradling (Cox and Spradling, 2009) a analysé l'effet de Clueless sur l'organisation du réseau mitochondrial. Pour cela, les mitochondries sont marquées par immunofluorescence dans des follicules ovariens à différents stades de croissance de drosophiles sauvages et mutantes *clu* (d08713). Dans des follicules sauvages, les mitochondries sont regroupées du côté de la partie antérieure du follicule bien qu'il y ait aussi des mitochondries uniformément réparties dans le cytosol. Dans le mutant *clu*, toutes les mitochondries sont regroupées dans la partie antérieure des follicules. Durant la mitose, les mitochondries sont présentes aux deux extrémités des cellules pour se répartir équitablement dans les deux cellules filles chez les drosophiles sauvages. Dans le mutant *clu*, les mitochondries restent regroupées dans une zone de la cellule. Ces résultats suggèrent que la transmission des mitochondries sera inégale lors de la mitose chez le mutant *clu*, ce qui veut dire que l'une des deux cellules va devoir compenser ce manque de mitochondries par une augmentation massive de la réplication mitochondriale. Ces résultats suggèrent que la protéine Clueless est importante pour la ségrégation des mitochondries lors de la division cellulaire.

L'étude de Sen *et al* (Sen et al., 2015) a aussi analysé l'effet de l'absence de Clueless dans des follicules ovariens et dans la lignée cellulaire S2R+. Dans les cellules S2R+ sauvages, 90% des mitochondries sont uniformément réparties dans le cytosol, alors que dans les lignées *clu* RNAi, les mitochondries sont majoritairement regroupées dans 1 à 3 amas par cellule (10% des mitochondries restent dispersées en absence de Clueless). Dans les follicules ovariens, les



résultats de Sen *et al* (Sen et al., 2015) sont les mêmes que ceux de Cox et Spradling (Cox and Spradling, 2009). Les mitochondries sont dispersées uniformément dans le cytosol dans les follicules sauvages et regroupées en de grands amas dans les follicules *clu*. Sen *et al* (Sen et al., 2015) ont surexprimé la version sauvage de Clueless ou CLUH dans des cellules S2R+ ou dans des follicules ovariens *clu* et ont mis en évidence la restauration presque totale du réseau mitochondrial sauvage. En effet, la surexpression de Clueless ou de CLUH dans les cellules S2R+ *clu* aboutit à la dispersion de 80% et 70% des mitochondries, respectivement. Ces résultats mettent en évidence une fonction conservée des protéines de la famille CLU entre l'Homme et la drosophile dans l'organisation du réseau mitochondrial (voir paragraphe 3.2.5.).

Une étude de Sen *et al* (Sen et al., 2013) a analysé le réseau mitochondriale dans des NBs. Dans les NBs sauvages les mitochondries sont abondantes, principalement uniformément réparties dans le cytosol mais ne forment pas de réticulum. En absence de Clueless, les mitochondries sont regroupées de manière similaire aux mitochondries dans les follicules ovariens (Cox and Spradling, 2009). Il y a un ou deux regroupements de mitochondries dans 87% des cellules du mutant *clu*. Sen *et al* ont ensuite analysé le volume de mitochondries dans les NBs sauvages et *clu* et n'ont pas observé de différence du volume des mitochondries entre les deux lignées. Ces résultats mettent en évidence le rôle de Clueless dans la régulation de l'organisation du réseau mitochondrial. Néanmoins, Clueless ne participe pas à la régulation du nombre de mitochondries (volume mitochondrial).

Enfin, une étude de Wang *et al* (Wang et al., 2016) a analysé l'organisation du réseau mitochondrial dans les muscles 6 et 7 des larves de drosophiles par microscopie confocale. Dans les muscles de drosophiles sauvages, les mitochondries ont une organisation tubulaire alors qu'elles forment des regroupements dans des muscles de drosophiles *clu* (d08713 et  $\Delta W$ ).

#### **3.4.3.3. Lien entre Clueless et les microtubules.**

Chez la drosophile, les mitochondries se déplacent le long des microtubules. Cox et Spradling (Cox and Spradling, 2009) ont montré une colocalisation occasionnelle des particules Clueless avec les microtubules. Ces résultats sont cohérents avec les résultats de Sheard *et al* (Sheard et al., 2020) qui montrent l'implication des microtubules dans le mouvement des



particules Clueless (voir paragraphe 3.2.3.1.1.) De plus, l'analyse du réseau de microtubule dans les cellules germinales du mutant *clu*, où le regroupement des mitochondries est le plus important, met en évidence une absence d'altération des microtubules. Le regroupement des mitochondries observé en absence de Clueless n'est donc pas le résultat d'une altération des microtubules. Ces résultats suggèrent que Clueless affecte le mouvement des mitochondries le long des microtubules.

#### **3.4.3.4. Partenaires protéiques de Clueless.**

##### **3.4.3.4.1. Lien entre Clueless et la mitochondrie.**

L'étude de Sen *et al* (Sen et al., 2015) a recherché les partenaires protéiques de Clueless. Cette expérience a permis la mise en évidence de 2 partenaires protéiques de Clueless : une porine (VDAC, Voltage dependent anion channel) et TOM20. VDAC est une protéine intramembranaire de la membrane externe des mitochondries et TOM20 est une protéine ancrée à la surface externe de la mitochondrie et impliquée dans l'import mitochondrial des protéines. Ces résultats de Co-IP ont été confirmés par des Co-IP réciproques. Ces résultats suggèrent la présence de Clueless au niveau de la membrane mitochondriale externe, associée de manière périphérique avec la mitochondrie.

##### **3.4.3.4.2. Lien entre Clueless et la traduction à la surface mitochondriale.**

L'étude de Sen et Cox (Sen and Cox, 2016) a analysé l'interaction entre Clueless et le ribosome par Co-IP. Pour cela, des cellules S2R+ sauvages ont été transfectées avec des versions des protéines RpL7a, RpS4, RpS7 et eIF3g (un facteur d'initiation de la traduction) fusionnées à l'étiquette myc. Les Co-IP contre l'étiquette myc ou contre Clueless montrent l'association entre ces différents facteurs de la traduction et la protéine Clueless. De la même manière, l'ajout d'une étiquette GFP de manière endogène aux protéines RpL30, RpL10Ab et eIF3-S9 dans des cellules S2R+ sauvages a permis de mettre en évidence l'interaction de Clueless avec ces différents facteurs de la traduction. Clueless s'associe à des facteurs de la grande sous-unité du ribosome (RpL7a, RpL30 et RpL10Ab) et de la petite sous-unité (RpS4 et RpS7). Cela suggère l'association de Clueless avec le ribosome entier. Sen et Cox ont également analysé le profil de sédimentation de Clueless sur gradient de sucrose en absence



ou en présence d'EDTA, un agent chélateur d'ions qui permet la dissociation du ribosome. En absence d'EDTA, la protéine Clueless sédimente avec les fractions lourdes, ce qui n'est plus le cas en présence d'EDTA. La sédimentation de Clueless avec la fraction légère avait aussi été observée suite à un traitement RNase (voir paragraphe 3.2.3.1.2.). Ces résultats suggèrent une association de Clueless avec les ribosomes et les ARNm en cours de traduction dans les fractions lourdes. L'étude de Sen et Cox a ensuite analysé la localisation des complexes ribosomes-Clueless. La Co-IP de RpL7a montre l'association de Clueless avec RpL7a uniquement dans la fraction mitochondriale. Ces résultats suggèrent que l'association de Clueless avec les ribosomes en cours de traduction ne se fait qu'à la surface mitochondriale.

#### 3.4.3.4.3. Lien entre Clueless et le complexe PINK1-Parkin.

Suite à une altération des mitochondries, la protéine PINK1 est stabilisée à la surface mitochondriale où elle permet le recrutement de Parkin (E3 ubiquitine ligase), ce qui permet la dégradation des mitochondries défectueuses par mitophagie (voir paragraphe 2.2.2.3.).

Cox et Spradling (Cox and Spradling, 2009) ont les premiers analysé le lien entre la protéine Parkin et la protéine Clueless. Pour cela, les mitochondries ont été analysées dans un mutant *park* par immunofluorescence. En absence de Parkin, les mitochondries forment des clusters. Ce phénotype mitochondrial est similaire au phénotype mitochondrial observé dans un mutant *clu* (voir paragraphe 3.2.3.2.2.). L'analyse de ces mitochondries regroupées par microscopie électronique et par microscopie optique montre que certaines mitochondries sont en anneau et d'autres mitochondries sont anormalement grosses. Le taux de protéine Clueless n'est pas altéré dans le mutant *park*, par contre le nombre de particules Clueless est réduit. Ce résultat est aussi mis en évidence par Wang *et al* (Wang et al., 2016). Les mutants *clu* hétérozygote et *park* hétérozygote montrent un phénotype mitochondrial sauvage, contrairement au double mutant hétérozygote *clu/park* (*clu/+ ; park/+*)(Cox and Spradling, 2009). Cette lignée montre des regroupements de mitochondries dans les cellules des follicules ovariens. Ces résultats suggèrent une interaction génétique entre Clueless et Parkin. Ces résultats ont aussi été observés dans les muscles de drosophiles par Wang *et al* (Wang et al., 2016).



L'étude de Sen *et al* (Sen et al., 2015) a analysé les relations entre Clueless, PINK1 et Parkin. En absence de PINK1, les mitochondries sont regroupées en un grand amas dans le cytosol comme dans le cas des mutants *clu* et *park*, et leur forme en anneau suggère des anomalies de fusion mitochondriale comme dans le mutant *park* mais pas dans le mutant *clu*. Les drosophiles *clu* ont une altération des muscles des ailes de la même manière que les drosophiles *pink1* et *park*. La réduction par RNAi de l'expression de PINK1 ou de Parkin a les mêmes effets que les mutations *pink1* et *park*. Une double réduction de PINK1 et Parkin par RNAi entraîne des altérations musculaires plus fortes. La double inhibition de Clueless et PINK1 ou de Clueless et Parkin aboutit aux mêmes effets sur les muscles des ailes que la double inhibition PINK1 et Parkin. Ces résultats suggèrent une interaction génétique entre Clueless, PINK1 et Parkin. Dans le mutant *park*, comme dans le mutant *pink1*, on observe aussi une réduction du nombre de particules Clueless dans le cytosol des cellules de follicules ovariens, sans que la quantité de protéine Clueless soit altérée.

Sen *et al* (Sen et al., 2015) ont voulu définir le positionnement de Clueless dans la voie PINK1-Parkin. Tout d'abord, des constructions correspondant aux protéines PINK1 ou Parkin fusionnées à Myc sont transfectées dans les cellules S2R+ *clu*\_RNAi, et l'organisation du réseau mitochondrial est analysée. La surexpression de PINK1 ne restaure pas le phénotype mitochondrial (les mitochondries restent regroupées), contrairement à la surexpression de Parkin qui restaure la répartition uniforme des mitochondries dans le cytosol. De la même manière, la surexpression de Clueless dans des muscles *pink1* restaure l'organisation mitochondriale sauvage. Ces résultats suggèrent que Clueless fonctionne après PINK1 mais avant Parkin.

Sen *et al* (Sen et al., 2015) ont aussi analysé les interactions entre Clueless et PINK1 ou Parkin par Co-IP. Dans des conditions normales de culture, Clueless interagit avec PINK1 mais pas avec Parkin. Suite au stress mitochondrial provoqué par l'ajout de CCCP, Clueless interagit avec Parkin. Parkin est une protéine cytosolique qui est recrutée à la surface des mitochondries en conditions de stress grâce à PINK1. Ces résultats suggèrent que dans ces conditions de stress, Clueless forme un complexe avec Parkin à la surface des mitochondries. Pour vérifier si la localisation mitochondriale de PINK1 est aussi nécessaire pour son interaction avec Clueless, Sen *et al* (Sen et al., 2015) ont fait une Co-IP contre la protéine PINK1 délétée pour son signal de localisation mitochondriale ( $\Delta$ MTS-PINK1). Cette délétion aboutit



à la localisation cytosolique de  $\Delta$ MTS-PINK1, mais son interaction avec Clueless est maintenue. L'interaction, directe ou indirecte, entre PINK1 et Clueless est donc indépendante de TOM20 (qui est un interactant de Clueless (voir paragraphe 3.2.3.4.1.) et de PINK1) ou d'un autre facteur de la surface mitochondriale.

Enfin, des cellules S2R+ sauvages ou *clu*\_RNAi ont été transfectées avec PINK1 et Parkin fusionnées à deux étiquettes différentes. Dans le contexte sauvage, PINK1 n'interagit pas avec Parkin. Par contre, cette interaction est possible en absence de Clueless, même sans addition de CCCP. Ces résultats montrent la complexité des relations entre Clueless, PINK1 et Parkin.

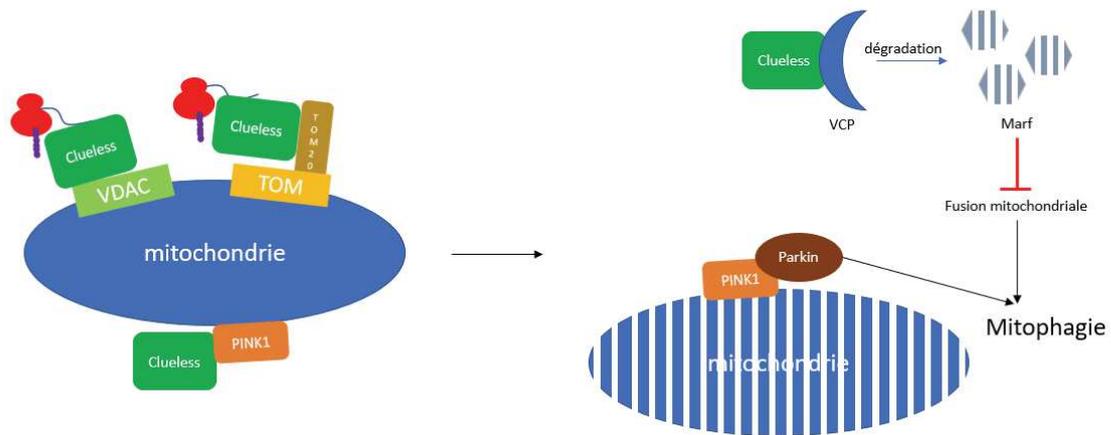
Wang *et al* (Wang et al., 2016) ont cherché à savoir si Parkin et Clueless étaient impliquées dans la même voie. Si les deux protéines sont dans la même voie de signalisation, le phénotype du double mutant *clu-park* devrait être similaire à ceux des mutants simples *clu* et *park*. Cela n'est pas le cas, le double mutant *clu-park* montre une réduction du contenu mitochondrial et une détérioration de la morphologie mitochondriale plus importante que pour les mutants simples *clu* et *park*. Ces résultats suggèrent que Clueless et Parkin fonctionnent dans des voies plus ou moins indépendantes dans la régulation de la morphologie mitochondriale.

Dans les muscles larvaires *clu*, le potentiel membranaire de la mitochondrie est réduit. Mais la surexpression de PINK1 ou de Parkin restaure ce potentiel membranaire. Parkin est une protéine cytosolique qui est recrutée à la surface mitochondriale suite à une variation du potentiel membranaire mitochondrial, signe d'une altération de la mitochondrie (cf ci-dessus). Wang *et al* (Wang et al., 2016) ont analysé la localisation de Parkin dans les muscles larvaires sauvages et *clu* par immunofluorescence. La protéine Parkin est majoritairement cytosolique avec seulement 10% des mitochondries entourées par Parkin dans les muscles sauvages. Dans le mutant *clu*, environ 55% des mitochondries sont entourées de la protéine Parkin. Ces résultats suggèrent que la mitophagie médiée par Parkin est induite dans le mutant *clu*. Wang *et al* ont analysé la mitophagie dans les cellules S2R+ *clu* et sauvages surexprimant la protéine Parkin. La surexpression de Parkin restaure partiellement le phénotype sauvage dans les mutants *clu*. Après 24h de traitement au CCCP, la plupart des cellules sauvages sont appauvries en mitochondries, signe d'une forte mitophagie, alors que 72% des cellules *clu* n'ont pas eu de mitophagie. Ces résultats montrent que la mitophagie est altérée en absence de Clueless malgré le recrutement de Parkin à la surface mitochondriale.



La protéine Atg8a est une protéine des autophagosomes. Dans les muscles larvaires *clu*, le taux de cette protéine augmente, de même que sa localisation mitochondriale. Néanmoins Atg8a ne semble pas entourer toute la mitochondrie. Ces résultats suggèrent que la mitophagie est induite dans le mutant *clu* mais qu'elle n'est pas complète. Cela suggère que Clueless est importante dans des stades tardifs de la mitophagie.

L'étude de Wang *et al* (Wang et al., 2016) a analysé la protéine Marf (Mitochondrial assembly regulatory factor, homologue des Mitofusines humaines), un facteur de la voie PINK1/Parkin impliqué dans la fusion mitochondriale. Dans des extraits protéiques de larves de drosophiles, le taux de la protéine Marf est augmentée en absence de Clueless, de Parkin ou de Clueless et Parkin. De plus, la surexpression de Clueless dans des larves de drosophiles sauvages aboutit à une réduction de la quantité de protéines Marf. Un traitement au CCCP, qui provoque un stress mitochondrial et induit la mitophagie, baisse le taux protéique de Marf dans des cellules S2R+ sauvages, alors qu'il est maintenu dans les cellules S2R+ *clu*\_RNAi. Ces résultats suggèrent que la protéine Clueless est importante pour la régulation de l'expression de la protéine Marf, donc pour la régulation de la fusion mitochondriale. Lors d'une recherche des partenaires de Clueless par co-IP, Wang *et al* ont identifié la protéine VCP. VCP est une protéine multifonctionnelle impliquée dans différents processus, et serait impliquée dans l'extraction des protéines Marf/Mitofusines ubiquitinylées hors de la membrane mitochondriale pour permettre leur dégradation, ce qui est important pour le contrôle qualité de la mitochondrie (MQC) (Tanaka et al., 2010). La surexpression de VCP dans des muscles *clu* aboutit à la suppression du gonflement des mitochondries observées dans les muscles *clu* alors que la surexpression de VCP dans des muscles sauvages n'a pas d'effet sur le phénotype mitochondrial. Un gonflement des mitochondries est également observé dans les muscles *vcp*, qui n'est que peu restauré par la surexpression de Clueless. Ces résultats suggèrent que Clueless agit avant VCP. Il y a donc une interaction biochimique et génétique entre Clueless et VCP. Nous avons vu précédemment que l'ajout de CCCP aboutit à une baisse du taux de de Marf dans des cellules sauvages, alors que le taux de Marf reste inchangé dans les cellules *clu*. La surexpression de VCP dans les cellules *clu* restaure la dégradation de Marf. Ces résultats suggèrent que Clueless participe à la dégradation de Marf médiée par VCP. Le modèle proposé par Wang *et al*. est le suivant: dans des cellules sauvages, en réponse à une dépolarisation de la membrane mitochondriale, PINK1 est stabilisée à la surface de la mitochondrie, recrute Parkin qui ubiquitine Marf. Clueless interagirait avec VCP pour extraire Marf des membranes



**Figure 21 : Clueless est impliqué dans la régulation de l'activité mitochondriale à travers son rôle dans la traduction à la surface mitochondriale et de régulation de la mitophagie médiée par PINK1-Parkin.**

Dans des conditions normales, la protéine Clueless est associée aux ribosomes en cours de traduction à la surface mitochondriale, et avec PINK1 bien que cette protéine soit majoritairement dégradée. Suite à un défaut mitochondrial non réparable, une mitochondrie défectueuse peut être dégradée par la voie de la mitophagie. Dans ce cas, la protéine Clueless serait associée à la protéine VCP pour induire la dégradation de la protéine Marf et ainsi inhiber la fusion mitochondriale. Le recrutement de Parkin et l'inhibition de la fusion mitochondriale permettent la mitophagie de la mitochondrie.

mitochondriales. Les mitochondries défectueuses ainsi privées de Marf ne pourraient plus fusionner avec des mitochondries fonctionnelles. Elles seraient au contraire dégradées. Clueless fonctionnerait donc de concert avec Parkin dans le MQC, en agissant sur la dégradation de Marf sur les mitochondries défectueuses (Wang et al., 2016).

#### **3.4.3.5. Conclusion sur Clueless.**

La protéine Clueless de 160kDa est une protéine importante pour la régulation de la fonction mitochondriale chez la drosophile (Cox and Spradling, 2009). A l'exception de son extrémité N terminale, toute la protéine est importante dans ce rôle de régulation de la fonction mitochondriale. L'un des domaines de Clueless, le domaine TPR, a priori impliqué dans des interactions protéine-protéine, serait aussi important pour la liaison de Clueless avec les ARNm (Sen and Cox, 2016) . Cette protéine est une protéine cytosolique qui forme des particules parfois associées à la mitochondrie (Cox and Spradling, 2009; Sen et al., 2013, 2015; Sheard et al., 2020).

Les études de Cox et Spradling (Cox and Spradling, 2009), Sen *et al* (Sen et al., 2015) et Wang *et al* (Wang et al., 2016) mettent en évidence le rôle de Clueless dans la mitophagie médiée par PINK1-Parkin. D'après les résultats de ces différentes études, Clueless interagirait avec PINK1 et Parkin quand elle est à la surface mitochondriale et agirait après PINK1 mais avant Parkin. De plus, Clueless et Parkin seraient dans deux voies différentes. D'un côté, Parkin induirait la mitophagie suite à son recrutement à la surface mitochondriale et de l'autre Clueless participerait à la dégradation de Marf et donc à l'inhibition de la fusion mitochondriale grâce à son interaction avec VCP. Ces deux étapes semblent importantes pour la mitophagie, puisque l'absence de Clueless ne permet pas la dégradation des mitochondries par mitophagie malgré l'initiation de ce processus en présence de Parkin. Enfin, d'après Sen et Cox (Sen and Cox, 2016) et Sen *et al* (Sen et al., 2015), Clueless serait impliquée dans la traduction à la surface mitochondriale et serait importante pour la régulation de l'association entre PINK1 et Parkin. Ces résultats laissent supposer que la protéine Clueless pourrait être importante pour la traduction à la surface mitochondriale et que, suite à un dommage mitochondrial, cette protéine serve de senseur pour la voie PINK1 / Parkin (figure 21).



### **3.4.4. La protéine Clu1p chez la levure.**

#### **3.4.4.1. La protéine Clu1p.**

L'étude de Sheard *et al* (Sheard et al., 2020) a analysé la localisation de Clu1p chez les levures. Pour cela, la séquence de la GFP a été intégrée dans la séquence endogène de CLU1 permettant la synthèse d'une protéine de fusion Clu1p-GFP. D'après les images de microscopie, Clu1p est une protéine cytosolique avec une localisation parfois ponctuelle.

#### **3.4.4.2. Rôle de Clu1p sur le réseau mitochondrial.**

L'étude de Fields *et al* (Fields et al., 1998) a analysé l'organisation du réseau mitochondrial dans des levures sauvages et *clu1* par immunofluorescence. Dans les levures sauvages, les mitochondries sont organisées en un réseau réticulé réparti dans tout le cytosol. En absence de Clu1p, les mitochondries sont regroupées d'un côté de la cellule. Le phénotype mitochondrial sauvage est restauré suite à la transformation des levures *clu1* avec une version sauvage de Clu1p. Dans ces levures, les mitochondries retrouvent leur organisation réticulée. L'étude de Fields *et al* a analysé la capacité de compensation de la protéine Clu1p sur les *Dictyostelium discoideum cluA* (absence d'expression de la protéine CluA). En absence de CluA, les cellules sont larges et multinucléées. De plus, leurs mitochondries sont elles aussi regroupées à une extrémité des cellules. La transformation des cellules *cluA* avec CLU1 montre des cellules plus petites et souvent mononucléées. Ces résultats suggèrent que Clu1p est capable de restaurer les défauts de cytokinèse observés en absence de CluA chez *Dictyostelium discoideum*. De plus, l'expression de Clu1p dans les cellules *cluA* aboutit à une restauration de la dispersion des mitochondries, bien qu'il reste quelques agrégats lâches dans le cytosol. Cette restauration partielle du phénotype mitochondrial de *cluA* par Clu1p suggère que ces deux protéines ont des fonctions similaires.

#### **3.4.4.3. Lien entre Clu1p et la traduction.**

Une étude de Vornlocher *et al* (Vornlocher et al., 1999) a analysé les partenaires protéiques de Clu1p (p135). Pour cela, une Co-IP contre la protéine p135 a été réalisée. Cette étude a mis en évidence l'association de p135 avec le complexe d'initiation de la traduction eIF3 impliqué dans l'association de l'ARNm lié à eIF4F avec la petite sous-unité du ribosome.



Ce résultat suggère que p135 est impliquée dans la traduction et plus particulièrement dans l'initiation de la traduction.

Une étude de Jao et Chen (Jao and Chen, 2006) a analysé les interactants du facteur d'initiation de la traduction eIF5A par une expérience de TAP-Tag dans des levures exprimant la protéine eIF5A fusionnée à l'étiquette TAP. Jao et Chen ont mis en évidence une interaction entre eIF5A et la protéine Clu1p ainsi que le ribosome. Ces résultats suggèrent aussi un lien entre Clu1p et la traduction notamment au niveau de l'initiation.

L'étude de Sheard *et al* (Sheard et al., 2020) a analysé les partenaires protéiques de Clu1p, par Co-IP sur des levures exprimant de manière endogène Clu1p-GFP. Cette expérience a mis en évidence l'interaction de Clu1p avec l'une des protéines de la grande sous-unité du ribosome : Rpl3. Sheard *et al* ont analysé la présence de Clu1p-GFP sur des extraits de levures soumis à un gradient de sucrose. Cette expérience a mis en évidence la sédimentation de Clu1p avec les fractions lourdes, correspondant aux fractions où sédimentent les ribosomes. Ces résultats mettent en évidence l'association entre Clu1p et le ribosome et donc un rôle potentiel de Clu1p dans la traduction ou sa régulation.

#### **3.4.4.4. Clu1p se lie aux ARNm.**

Une étude de Mitchell *et al* (Mitchell et al., 2013) a identifié les protéines associées aux ARNm chez la levure. Pour cela, les ARNm et les protéines sont liés de manière covalente grâce à un crosslink aux UVs. Ensuite les complexes ARN-protéines sont extraits, purifiés grâce à des billes Oligo-dT et les protéines sont analysées par spectrométrie de masse. Cette étude a mis en évidence 120 protéines capables de se lier aux ARNm, dont la protéine Clu1p codée par le gène TIF31. Une étude de Sen et Cox (Sen and Cox, 2016) a analysé la capacité de liaison aux ARNm de la protéine Clu1p. Un extrait de levures exprimant la protéine Clu1p fusionnée en C terminale avec la GFP a été exposé aux UVs, permettant ainsi la liaison covalente des ARNm et de leurs protéines associées. Les ARNm associées à leurs protéines ont ensuite été purifiés sur des billes oligo-dT avant d'analyser l'association de ces ARNm avec Clu1p-GFP par western blot. Ces expériences montrent également que Clu1p est capable de s'associer aux ARNm.



#### **3.4.4.5. Conclusion.**

Ces différentes études ont mis en évidence la localisation ponctuée de la protéine Clu1p dans le cytosol (Sheard et al., 2020). Clu1p influence la fonction mitochondriale notamment au niveau de l'organisation du réseau mitochondrial (Fields et al., 1998). Cette fonction mitochondriale pourrait être liée au rôle de Clu1p dans la traduction (Jao and Chen, 2006; Sheard et al., 2020; Vornlocher et al., 1999) et/ou sa capacité de liaison aux ARNm (Mitchell et al., 2013; Sen and Cox, 2016).

#### **3.4.5. La protéine CLUH chez les mammifères.**

##### **3.4.5.1. Localisation de CLUH.**

L'étude de Gao *et al* (Gao et al., 2014) a analysé la localisation de la protéine CLUH dans des cellules COS7 (lignée cellulaire obtenue à partir de fibroblastes de singe). CLUH est une protéine cytosolique présente sous forme granulaire. L'analyse de la colocalisation de CLUH avec les microtubules montre que CLUH est co-localisée avec les microtubules nouvellement formés et non avec les microtubules stables. Un traitement au nocodazole, un inhibiteur de la polymérisation des microtubules, n'a pas d'effet sur la colocalisation des microtubules et de CLUH. Ces résultats suggèrent que CLUH interagit principalement avec des hétérodimères de tubulines  $\alpha/\beta$  solubles. Après l'extraction des protéines solubles par des détergents, la localisation de CLUH change et semble montrer une localisation liée à des organites cellulaires (Gao et al., 2014). En effet, dans ces conditions, CLUH semble co-localiser avec les mitochondries. Gao *et al* ont aussi effectué un fractionnement subcellulaire à partir de cerveaux et de foies de souris. La protéine CLUH est retrouvée dans la fraction cytosolique ainsi que dans la fraction mitochondriale dans ces deux tissus. De plus, il semblerait que CLUH soit principalement enrichie dans la fraction membranaire. Ces résultats suggèrent que CLUH a une localisation cytosolique bien qu'une fraction de ces protéines soit à proximité des mitochondries.

La localisation cytosolique de CLUH a aussi été observée par Ando *et al* (Ando et al., 2016) dans des cellules HEK293. D'après cette étude, CLUH est répartie uniformément dans le cytoplasme et ne semble pas former de particules ni être associée à la mitochondrie. Ces résultats sont différents des observations de Gao *et al* (Gao et al., 2014) mais pas



nécessairement contradictoire. En effet, cette différence est peut-être liée aux tissus analysés (fibroblaste ou cellules de rein embryonnaire) ou au contexte de culture des cellules. Une étude de Pla-Martin *et al* a montré que la version souris de CLUH ou mCLUH (mouse CLUH) a une localisation cytosolique ponctuée dans des foies de souris et que les agrégats de mCLUH augmentaient dans des foies de souris soumis à un stress nutritif. Ce résultat suggère que la localisation de mCLUH est dynamique et dépendante des stress environnementaux (Pla-Martín et al., 2020).

Schatton *et al* (Schatton et al., 2017) ont analysé l'expression de la protéine mCLUH chez la souris. D'après cette étude, mCLUH est ubiquitaire et exprimée dans tous les tissus cellulaires, avec une plus forte expression dans les intestins, le foie, les reins et le cœur de la souris.

La localisation de CLUH a également été analysée dans des cellules HEK293T par Vardi-Oknin et Arava (Vardi-Oknin and Arava, 2019). Pour cela, un fractionnement subcellulaire sur les cellules HEK293T a mis en évidence la présence de deux populations de protéine CLUH : une population cytosolique et une population associée à la fraction mitochondriale, qui correspond à une faible fraction de la quantité totale de protéine CLUH.

### **3.4.5.2. Rôle de CLUH.**

#### **3.4.5.2.1. Sur le réseau mitochondrial.**

Gao *et al* (Gao et al., 2014) ont analysé le réseau mitochondrial dans des cellules COS7 sauvages et *cluh-KD* (Knock-Down, l'expression de *CLUH* est inhibée par RNAi). Le réseau mitochondrial est tubulaire dans les cellules sauvages, et les mitochondries sont regroupées autour du noyau dans les cellules *cluh-KD*. Schatton *et al* (Schatton et al., 2017) ont observé l'organisation du réseau mitochondrial dans des foies de souris sauvages et *cluh-KO* (Knock Out, inactivation de *Cluh* suite à la délétion de l'exon 10) au stade E18.5 (18.5 jours embryonnaire). En absence de mCLUH, les mitochondries sont regroupées dans le cytosol. De la même manière, l'étude de Wakim *et al* (Wakim et al., 2017) a analysé l'organisation du réseau mitochondrial dans des cellules HeLa sauvages et *cluh-inactivé* (inactivation de *CLUH* par le système CRISPR-Cas9). En absence de CLUH, les mitochondries sont aussi regroupées autour du noyau, avec 68% des mitochondries regroupées en absence de CLUH contre 28%



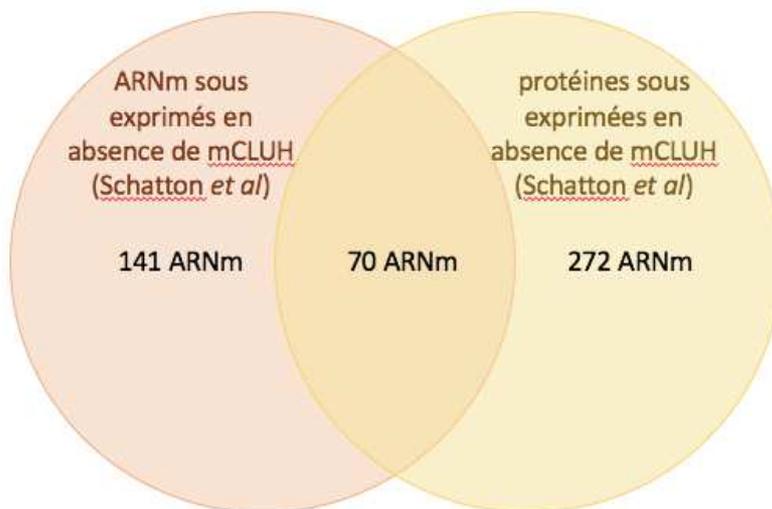
dans les cellules sauvages. L'ensemble de ces résultats met en évidence une fonction de la protéine cytosolique CLUH importante pour l'organisation du réseau mitochondrial.

Ravera *et al* (Ravera et al., 2018) ont étudié l'évolution du réseau mitochondrial au cours du développement chez l'Homme. Pour cela, l'organisation du réseau mitochondrial a été observé dans des cellules souches mésenchymateuses (MSCs) issus de cordons ombilicaux d'embryons et de nouveau-nés et dans des MSCs issus de la moelle osseuse. Des images de microscopie confocale ont mis en évidence l'organisation du réseau mitochondrial en réticulum dans les MSCs de nouveau-né et de moelle osseuse alors que les mitochondries sont éparpillées dans le cytosol des MSCs embryonnaires. De plus, les protéines OPA1 (impliquée dans la fusion mitochondriale) et DRP1 (impliquée dans la fission mitochondriale) semblent être exprimées dans les MSCs de nouveau-né et de moelle osseuse mais absentes des MSCs embryonnaires. Ces résultats suggèrent que la fusion et la fission mitochondriales sont impliquées dans l'évolution du réseau mitochondrial au cours du développement et participent à la formation du réticulum de mitochondries dans les cellules après la naissance. D'après l'étude de Ravera *et al*, ce changement d'organisation du réseau mitochondrial après la naissance s'accompagne d'un changement majeur dans la production d'énergie, avec une production d'ATP majoritairement issue de la glycolyse (anaérobie) avant la naissance et une production d'ATP issue de l'OXPPOS (aérobie) après la naissance (Ravera et al., 2018).

#### 3.4.5.2.2. Sur les mitochondries.

Gao *et al* (Gao et al., 2014) ont analysé plus précisément la structure des mitochondries dans des cellules COS7 sauvages et *cluh-KD*. L'absence de CLUH n'a pas d'effet sur la structure des mitochondries notamment au niveau de l'organisation des crêtes mitochondriales. De plus, il ne semble pas y avoir de connexion entre les mitochondries. Ces résultats sont similaires aux résultats de Schatton *et al* (Schatton et al., 2017) dans le foie et le cœur de souris sauvages et *cluh-KO*. Néanmoins, la densité de la matrice semble réduite en absence de mCLUH.

Schatton *et al* (Schatton et al., 2017) ont analysé l'expression des protéines (protéome) et des ARNm (transcriptome) de souris sauvages et *cluh-KO* au stade E18.5. L'analyse des protéomes de souris sauvages et *cluh-KO* permet de quantifier environ 3000 protéines, dont



**Figure 22 : les MITO ARNm et les protéines mitochondriales codées par ces MITO ARNm sont régulées par CLUH.**

Parmi les 211 ARNm sous-exprimés en absence de mCLUH, 70 codent pour des protéines elles aussi sous-exprimées en absence de mCLUH.

525 sont mitochondriales. Parmi ces 525 protéines mitochondriales, 40% ont une expression réduite en absence de mCLUH. De la même manière, l'analyse du transcriptome de souris sauvages et *cluh-KO* met en évidence une réduction de l'expression de 277 ARNm en absence de mCLUH, dont la majorité sont des MITO ARNm. Parmi ces protéines et ces ARNm sous-exprimées, 70 sont régulées par mCLUH au niveau ARN et protéique (figure 22). Ces MITO ARNm et ces protéines mitochondriales sont impliqués dans la dégradation des acides aminés, le cycle de Krebs, la dégradation des acides gras et l'OXPPOS. L'ensemble de ces résultats met en évidence le rôle de mCLUH dans la régulation des MITO ARNm impliqués dans les voies de conversion d'énergie de la mitochondrie, ce qui a un effet sur l'expression des protéines codées par ces MITO ARNm. L'analyse de ce transcriptome a aussi mis en évidence 183 ARNm surexprimés en absence de mCLUH. Néanmoins, il ne semble pas y avoir de de corrélation entre groupes fonctionnels des protéines codées par ces ARNm et les ARNm surexprimés en absence de mCLUH. Ces résultats pourraient suggérer que la surexpression de ces ARNm est liée à des phénomènes de compensation.

L'étude de Wakim *et al* (Wakim et al., 2017) a analysé la structure des mitochondries dans des cellules HeLa sauvages et *cluh-inactivé*. En absence de CLUH, il y a deux populations de mitochondries dans les cellules HeLa : une population représentant environ 40% des mitochondries qui ont peu de crêtes mitochondriales et une matrice peu dense aux électrons, et une population représentant environ 60% des mitochondries qui ont des crêtes mitochondriales organisées et une matrice dense aux électrons comme les mitochondries sauvages, bien qu'elles soient plus petites que les mitochondries sauvages. De plus, 2% des mitochondries montrent des connections entre elles, ce qui suggère des défauts de division et de fusion. Wakim *et al* (Wakim et al., 2017) ont ensuite étudié l'abondance des protéines de l'OXPPOS et l'activité des complexes de la chaîne mitochondriale dans les cellules HeLa sauvages et *cluh-inactivé*. En absence de CLUH, le taux de ATP5A (complexe V), UQCRC2 (complexe III), COX2 (complexe IV) et NDUFB8 (complexe I) est réduit dans les extraits totaux et mitochondriaux. Wakim *et al* ont ensuite analysé l'abondance des différents complexes de l'OXPPOS sur un gel bleu natif. De manière intéressante, le taux de protéines du complexe II (seul complexe composé uniquement de protéines mitochondriales d'origine nucléaire) n'est pas altéré en absence de CLUH alors que l'abondance des complexes I, III, IV et V est réduite de 50%, 80%, 40% et 20% respectivement. De plus, l'activité des complexes I, IV et V apparait

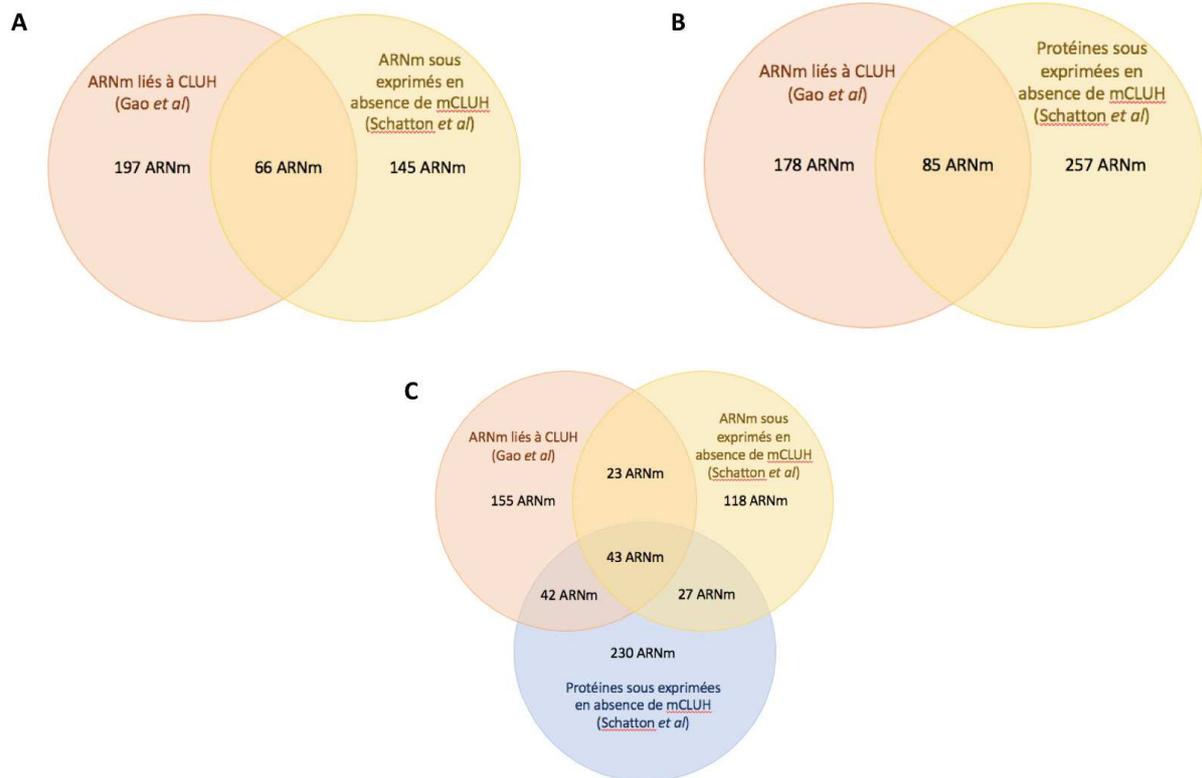


réduite de 40%, alors que celle du complexe II n'est pas altérée par l'absence de CLUH. Wakim *et al* n'ont pas observé de variation du taux d'ADN mitochondrial en absence de CLUH ni de délétion du génome mitochondrial. La baisse de l'abondance des complexes de l'OXPPOS n'est donc pas liée à une altération du génome mitochondrial. Wakim *et al* ont comparé le taux d'expression de l'ARNm *CLUH* et le taux d'expression d'autres ARNm. Cette analyse *in silico* a mis en évidence 258 ARNm coexprimés avec *CLUH* principalement impliqués dans les fonctions mitochondriales : métabolisme mitochondrial, respiration cellulaire, traduction mitochondriale. Les résultats sur l'activité des complexes de l'OXPPOS sont légèrement différents de ceux de Schatton *et al* (Schatton et al., 2017) dans des extraits de foies de souris sauvages et *cluh-KO*. En effet, l'activité des complexes I, III et IV, mais aussi II, est altérée en absence de mCLUH. Néanmoins, le complexe II est le moins altéré. La différence de matériel cellulaire analysé pourrait expliquer la différence entre les études de Schatton *et al* et Wakim *et al*.

En absence de CLUH, inhibée par RNAi dans les MSCs du cordon ombilical d'un nouveau-né (expériences sur des cellules ayant une production d'énergie aérobie), un changement de production d'énergie est observé. Il y a passage d'une production d'énergie aérobie à anaérobie, avec une baisse de l'efficacité de l'OXPPOS et une augmentation de la glycolyse. Ce résultat suggère que CLUH est important pour la production aérobie d'énergie. De plus, les mitochondries semblent moins organisées en absence de CLUH. Enfin, l'absence de CLUH aboutit à une baisse d'expression de OPA1. Ces résultats suggèrent que l'organisation du réseau mitochondrial en réticulum est nécessaire (ou une conséquence) à la production aérobie d'ATP, et que cette organisation est dépendante de CLUH peut-être grâce à son implication dans la régulation de OPA1 et plus généralement de la fusion mitochondriale (Ravera et al., 2018).

#### **3.4.5.3. CLUH lie les ARNm codant pour des protéines mitochondriales et influence leur stabilité.**

Une étude de Gao *et al* (Gao et al., 2014) a analysé la capacité de liaison aux ARNm de CLUH sur des cellules HeLa. Pour cela, une expérience de CLIP a été réalisée. La radiographie met en évidence l'association de CLUH avec des ARNm. Ces résultats montrent un rôle de liaison aux ARNm pour CLUH. Gao *et al* ont ensuite analysé les ARNm liés à CLUH par une



**Figure 23 : CLUH est importante pour la stabilité des ARNm auxquels elle est liée.**

- A) 259 ARNm sont liés à CLUH et parmi ces 259 ARNm, 66 ont une expression réduite en absence de CLUH.
- B) 85 codent pour des protéines sous exprimées en absence de CLUH.
- C) 43 sont impactées à la fois au niveau de l'ARNm et de la protéine en absence de CLUH.

expérience d'immunoprécipitation des ARN sur des cellules HeLa. Les ARNm associés à CLUH ont été identifiés par RNA-seq. Cette expérience met en évidence l'association de CLUH avec 259 ARNm dont 234 sont des MITO ARNm. Cette association a été confirmée pour les ARNm *ATP5A1*, *SPG7*, *OPA1*, *OGDH* et *GOT2* par RT-qPCR. Ces résultats suggèrent que CLUH lie préférentiellement des MITO ARNm.

L'étude de Schatton *et al* (Schatton et al., 2017) a mis en évidence 277 ARNm sous-exprimés en absence de mCLUH. Parmi ces 277 ARNm, 66 sont aussi liés à CLUH selon Gao *et al* (Gao et al., 2014) (figure 23A). De la même manière, 85 des protéines sous exprimées en absence de mCLUH sont codées par des ARNm liés à CLUH (figure 23B). La comparaison des ARNm et des protéines sous exprimés en absence de mCLUH met en évidence 43 ARNm et leur protéines associées qui sont sous exprimés en absence de mCLUH d'après Schatton *et al* et liés à CLUH d'après Gao *et al* (figure 23C). Ces résultats suggèrent que CLUH est impliquée dans la régulation au niveau ARNm et protéique des ARNm auxquels elle se lie. L'étude de Schatton *et al* a analysé la stabilité de ces ARNm dans des cellules MEFs (lignée cellulaire issue de fibroblastes embryonnaire de souris) sauvages et *cluh-KO*. En absence de mCLUH, la demi-vie de l'ensemble de ces ARNm est réduite. Ces résultats confirment le rôle de mCLUH dans la régulation de la stabilité d'un groupe de MITO ARNm.

Une étude de Cho *et al* (Cho et al., 2019) a analysé le rôle de CLUH dans l'adipogenèse. Pour cela, cette étude a analysé l'expression de mCLUH au cours de l'adipogenèse dans des cellules 3T3-L1 (pré-adipocytes de souris) et C3H10T1/2 (MSCs de la différenciation en adipocytes bruns) par qRT-PCR et par western blot. Suite à l'induction de l'adipogenèse, l'expression de l'ARNm et de la protéine mCLUH augmente (d'un facteur 7 pour l'ARNm *Cluh*) par rapport à des cellules non induites. Ces résultats ont aussi été observés suite à l'induction de l'adipogenèse dans les MSCs humains (hMSCs) avec une augmentation d'un facteur 11 de l'expression de l'ARNm *CLUH*. Ce résultat n'est pas un mécanisme général observé suite à la différenciation puisque la différenciation des hMSCs en ostéoplate n'induit pas d'expression de *CLUH*. Cette étude de Cho *et al* a mis en évidence le rôle de la signalisation AMPc (adénosine monophosphate cyclique) et du facteur de transcription CREB dans l'induction de l'expression de *Cluh* dans les cellules 3T3-L1 et C3H10T1/2. L'absence de *Cluh* par RNAi aboutit à une réduction de l'adipogenèse dans les cellules 3T3-L1 et C3H10T1/2 suite à l'induction de ce processus. Ces résultats suggèrent que l'induction de l'adipogenèse aboutit à une activation



de la signalisation AMPc qui active la transcription de *Cluh* grâce au facteur de transcription CREB. La transcription de *Cluh* serait donc nécessaire au fonctionnement des adipocytes. L'étude de Cho *et al* a montré une réduction de la respiration mitochondriale en absence de mCLUH, ce qui suggère que le rôle de mCLUH dans l'adipogenèse est lié à sa fonction mitochondriale. L'étude de Cho *et al* a observé une augmentation du taux des ARNm *Acat1*, *Atp5a1*, *Hadha*, *Pcca*, et *Pdha1* suite à l'induction de l'adipogenèse dans les cellules C3H10T1/2. Ces 5 ARNm sont des MITO ARNm liés à CLUH d'après gao *et al* (Gao et al., 2014). Cette augmentation du taux de ces 5 MITO ARNm est inhibée en absence de mCLUH dans les adipocytes issus de la différenciation des cellules C3H10T1/2. La stabilité des 5 MITO ARNm ciblées par mCLUH est réduite en absence de mCLUH. Ces résultats ont été obtenus suite à l'analyse du taux de chaque ARNm au cours du temps en présence ou non de mCLUH suite à un arrêt de la transcription. Ces résultats suggèrent que mCLUH est important pour la stabilité des MITO ARNm auxquelles elle se lie. Ce rôle de mCLUH dans la stabilité des MITO ARNm est nécessaire au fonctionnement correct des adipocytes et qui explique son induction lors de l'adipogenèse.

#### **3.4.5.4. Lien entre CLUH et la traduction.**

Une étude de Gao *et al* (Gao et al., 2014) a analysé le lien entre CLUH et les ribosomes dans les fractions membranaires de foies de souris. Pour cela, les ribosomes et les facteurs associés aux ribosomes sont isolés, et l'association de la protéine CLUH avec ces différents éléments a été analysée par western blot. CLUH est associée aux facteurs associés aux ribosomes mais pas aux ribosomes seuls. Ce résultat est aussi observé pour le facteur d'initiation de la traduction eIF3G. Gao *et al* ont aussi purifié les ribosomes sur gradient de sucrose et analysé l'association de CLUH avec les différentes fractions de ce gradient par western blot dans des cellules HeLa. CLUH est principalement trouvée dans les fractions légères contenant l'ARNm libre bien que du signal CLUH soit aussi retrouvé dans les fractions contenant la petite sous unité du ribosome (40S). Au contraire eIF3G est uniquement associé à la petite sous unité du ribosome (40S). Ces résultats suggèrent que CLUH est associée à la traduction, notamment à l'initiation de la traduction, bien que la plus grande partie des protéines CLUH soit libre dans le cytosol. Gao *et al* ont analysé l'effet de l'absence de CLUH sur la traduction globale dans les cellules MEFs. Le profil de sédimentation des ribosomes n'est



pas altéré en absence de mCLUH. Ce résultat a aussi été mis en évidence dans l'étude de Schatton *et al* (Schatton et al., 2017) sur les mêmes cellules. L'étude de Schatton *et al* a néanmoins montré une augmentation de l'absorbance de la fraction de monosomes (un seul ribosome associé à un ARNm). Cela suggère que mCLUH serait important pour la traduction des MITO ARNm. De plus, Gao *et al* ont analysé le taux de traduction cytosolique dans les cellules MEFs. Il ne semble pas y avoir de différence significative du taux de traduction en présence ou en absence de mCLUH. Ces résultats suggèrent que mCLUH n'a pas de rôle dans la régulation de la traduction globale. Néanmoins, l'analyse du taux des protéines mitochondriales mATP5A1, mOPA1, mGOT2, mSPG7, mPDHA et mSDHA, traduites à partir des MITO ARNm liés à CLUH, montre une baisse de l'expression de ces protéines. Cette baisse n'est liée qu'à une régulation traductionnelle puisque l'absence de mCLUH n'a pas d'effet sur le taux d'ARNm de chacun de ces MITO ARNm, sauf l'ARNm *Atp5a1*. Ces résultats suggèrent que mCLUH a un effet sur la régulation de la traduction des protéines mitochondriales dont elle lie les ARNm.

Une étude de Schatton *et al* (Schatton et al., 2017) a mis en évidence le rôle de mCLUH dans la stabilité des ARNm (voir paragraphe 3.2.5.3.). Cette augmentation de la dégradation des ARNm en l'absence de mCLUH pourrait être liée à une réduction de leur traduction. Pour confirmer cela, cette étude a analysé l'association des ARNm avec les ribosomes extraits sur gradient de sucrose à partir de cellules MEFs sauvages et *cluh-KO*. Schatton *et al* ont mis en évidence une réduction de l'association entre les ARNm *ATP5A1*, *HADHA* et *PCCA* et les ribosomes en absence de mCLUH. Ces résultats suggèrent que mCLUH promeut la traduction de certains MITO ARNm, ce qui les protège de la dégradation.

Pour vérifier le rôle de CLUH dans la traduction mitochondriale, Wakim *et al* (Wakim et al., 2017) ont inhibé la traduction cytosolique avec de l'emitine avant d'analyser l'effet de CLUH sur la traduction mitochondriale. En absence de CLUH dans les cellules HeLa, il y a une réduction de la traduction mitochondriale. Cela peut s'expliquer par la réduction de l'expression des protéines MRPS27, MRPS17, MRPL44, MRPL13, ERAL1, EFG1 et TUFM (des facteurs de la traduction mitochondriale) en absence de CLUH. Ces résultats suggèrent que CLUH est impliqué dans la régulation de l'expression des protéines impliquées dans la traduction mitochondriale. Cette régulation pourrait ainsi permettre la synchronisation de la traduction cytosolique et mitochondriale des protéines impliquées dans la mitochondrie.



Une étude de Vardi-Oknin et Arava (Vardi-Oknin and Arava, 2019) a analysé le rôle de CLUH dans la traduction cytosolique à la surface mitochondriale. Pour cela, Vardi-Oknin et Arava ont utilisé une technique de marquage de ribosome de proximité (ribosome-proximity labeling) dans des cellules HEK293T (voir paragraphe 2.2.1.1.). Suite à l'inhibition de CLUH par RNAi, cette expérience met en évidence une réduction de la quantité de ribosomes cytosoliques présents à la surface mitochondriale. Ces résultats suggèrent un rôle de CLUH dans la traduction cytosolique à la surface mitochondriale. Vardi-Oknin et Arava ont ensuite analysé les ARNm associées à ces ribosomes cytosoliques présents à la surface mitochondriale. Le taux des ARNm *ATP5A1*, *OPA1*, *OGDH* et *GOT2* (MITO ARNm liés à CLUH) n'est pas affecté par l'inhibition de CLUH dans les cellules HEK293T. En revanche, leur association avec les ribosomes cytosoliques présents à la surface mitochondriale est augmenté en absence de CLUH. Ces résultats suggèrent que CLUH a un rôle dans la régulation post transcriptionnelle de certains MITO ARNm. En effet, cette régulation n'est pas liée à la régulation de la stabilité de l'ARNm lui-même mais possiblement liée à une régulation de la traduction et de la localisation mitochondriale d'un groupe de MITO ARNm.

Cette étude de Vardi-Oknin et Arava met en évidence une augmentation de l'association des MITO ARNm avec les ribosomes cytosoliques présents à la surface mitochondriale en absence de CLUH, alors que l'étude de Schatton *et al* met en évidence une baisse de l'association de ces MITO ARNm avec les ribosomes cytosoliques en absence de CLUH. Ces résultats ne sont pas nécessairement contradictoires. L'hypothèse soulevée par l'ensemble de ces résultats suggère que la régulation traductionnelle par CLUH pourrait intervenir au niveau de la régulation entre traduction cytosolique et traduction à la surface mitochondriale.

#### **3.4.5.5. Rôle des granules de CLUH.**

Une étude de Pla-Martin *et al* (Pla-Martín et al., 2020) a analysé les granules de mCLUH dans des foies et des hépatocytes de souris. Dans des foies de souris, mCLUH forme des granules dans le cytosol qui sont plus gros suite à une privation de nourriture. Dans des hépatocytes cultivés dans un milieu de culture basal (riche en glucose), mCLUH forme essentiellement de petits agrégats. En cultivant des hépatocytes dans un milieu HBSS (milieu



faible en glucose, sans sérum ni acides aminés, provoquant des carences nutritives), mCLUH est regroupée dans des structures plus grandes souvent proches du noyau. Pour vérifier si les ARNm ciblés par mCLUH sont aussi présents dans ces granules, Pla-Martin *et al* ont marqué la protéine mCLUH par immunofluorescence et les ARNm *Pxc* et *Hadha* par hybridation *in situ*, dans des hépatocytes. Dans des conditions de culture basale, il y a peu de colocalisation entre mCLUH et les ARNm *Pxc* et *Hadha*, mais ce peu de colocalisation se fait au niveau des granules mCLUH. Après une privation de nourriture (milieu HBSS), les ARNm *Pxc* et *Hadha* forment plus d'agrégats et co-localisent avec les granules mCLUH de manière plus importante. Pour vérifier la nature de ces granules de mCLUH, l'étude de Pla-Martin *et al* (Pla-Martín et al., 2020) a analysé la colocalisation entre les marqueurs de SGs (les marqueurs sont TIA-1 et G3BP1) ou les marqueurs de P-Bodies (le marqueur est DCP1A) avec les granules mCLUH par immunofluorescence dans des hépatocytes cultivés en milieu HBSS. Les granules mCLUH ne co-localisent qu'avec TIA-1 et G3BP1. Ces résultats suggèrent que mCLUH est présente dans des SGs en cas de carence. Néanmoins, l'induction des SGs classiques par de l'arsenite ne met pas en évidence de colocalisation avec mCLUH. mCLUH forme donc des granules avec ses ARNm cibles, qui sont plus abondants suite à des carences. Ces granules correspondent à des SGs mais ne sont pas induits par la voie classique de stimulation des SGs.

Pla-Martin *et al* ont ensuite vérifié si les granules mCLUH maintenaient les ARNm dans un état non traduit. Pour cela, une expérience de ribopuromycylation a été réalisée sur des hépatocytes. Cette expérience révèle par microscopie la localisation de la traduction, en suivant par immunofluorescence l'incorporation de la puromycine dans les peptides en cours de traduction. Dans des conditions basales, il y a une traduction dans tout le cytosol. L'incubation des cellules dans un milieu HBSS montre un signal plus granulaire de la puromycine. De plus, ces granules de traduction semblent co-localiser avec les granules mCLUH de manière plus importante suite à des carences. L'ajout de HHT (inhibiteur de la traduction qui bloque les ribosomes au niveau des codons d'initiation) aux hépatocytes cultivés dans un milieu HBSS, aboutit à la délocalisation de seulement une partie des particules puromycine, qui ne co-localisent plus avec des particules mCLUH. Ces résultats suggèrent qu'il existe deux populations de granules mCLUH : une où la traduction est active et une où la traduction est bloquée. Pla-martin *et al* ont également analysé la traduction des ARNm *Hadha* et *Pcx* dans des hépatocytes. En condition basale, les granules mCLUH contenant les ARNm



*Hadha* et *Pcx* co-localisent avec la traduction. Cette colocalisation est réduite suite à la culture des cellules dans du HBSS. Ces résultats mettent en évidence la dynamique des granules mCLUH et suggèrent que les granules mCLUH permettent la régulation de la traduction des ARNm en fonction des demandes cellulaires.

L'effet de l'absence de mCLUH sur le transcriptome et le protéome d'hépatocytes sauvages et inactivé pour l'expression de *Cluh*, en conditions basale ou de carence, a également été analysé. Ces expériences mettent en évidence une réponse différente aux carences dans les cellules inactivées pour l'expression de *Cluh* par rapport aux cellules sauvages. En effet, l'expression des ARNm et des protéines impliqués dans la traduction et la respiration mitochondriales semble être augmentée en absence de mCLUH en cas de carence. Ces résultats suggèrent que mCLUH est impliquée dans la régulation de la stabilité des MITO ARNm et la traduction des protéines mitochondriales en réponse aux conditions environnementales.

De plus, mCLUH serait impliquée dans la régulation de mTORC1. mTORC1 protégerait la cellule de la mort cellulaire. Ces résultats ont été confirmés par l'inhibition de mTORC1 par la rapamycine qui protège les cellules inactivées pour le gène de *Cluh* de l'agrégation des mitochondries précédemment observées (Pla-Martín et al., 2020). De plus cette étude met en évidence une absence de mitophagie en absence de mCLUH. Cette absence de mitophagie aboutirait à la présence de plus de mitochondries défectueuses en absence de mCLUH qui serait responsable de l'agrégation des mitochondries. L'ensemble de ces résultats suggère que mCLUH serait impliquée dans la régulation de la voie de signalisation mTORC1. mCLUH serait donc impliqué dans la protection contre l'apoptose et permettrait la mitophagie des mitochondries défectueuses (Pla-Martín et al., 2020).

#### **3.4.5.6. Conclusion.**

D'après ces différentes études, CLUH est cytosolique et peut former des granules parfois associés à la mitochondrie (Gao et al., 2014; Pla-Martín et al., 2020; Schatton et al., 2017). CLUH est capable de s'associer avec un certain nombre de MITO ARNm dont elle régulerait la traduction, ce qui impacte leur stabilité (Gao et al., 2014; Schatton et al., 2017; Vardi-Oknin and Arava, 2019). Cette régulation semble être au niveau des granules. D'après

|  | Amibe ( <i>Dictyostelium discoideum</i> ) | Levures ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> )   | Insectes ( <i>Drosophila melanogaster</i> )  | Mammifères (homme, souris)  | Plantes ( <i>Arabidopsis thaliana</i> ) |
|--|---|---|--|---|---|
| Rôle de CLU dans structure de la mitochondrie            | Non                                       | Non renseigné   | En absence de CLU : Augmentation de la taille des mitochondries et réduction du nombre de crêtes mitochondriales.  | En absence de CLU : présence de deux populations de mitochondries : une population majoritaire normale et une population minoritaire avec peu de crêtes mitochondriales et une matrice peu dense aux électrons.   | Non                                     |
| Localisation cytosolique homogène de CLU                 | Non renseigné                             | Oui   | Oui  | Oui. Colocalisation avec les hétérodimères de tubulines solubles.   | Oui                                     |
| Localisation cytosolique sous forme de particules de CLU | Non renseigné                             | Occasionnelle   | Occasionnelle dont les mouvements sont dirigés par les microtubules. Ces particules sont dynamiques et se dissocient en cas de stress.   | Oui. Colocalisation avec les MITO ARNm auxquels elle se lie. Les granules sont plus abondantes en cas de carence. Les granules semblent importantes pour la régulation de la traduction des MITO ARNm.  | Occasionnelle                           |
| Proximité mitochondriale des particules de CLU           | Non renseigné                             | Non renseigné   | Oui  | Oui   | Oui                                     |
| Activité de liaison des ARNm de CLU                      | Non renseigné                             | Oui   | Oui au niveau du domaine TPR.  | Oui. CLU est majoritairement impliquée dans la liaison des MITO ARNm.   | Non renseigné                           |
| Activité de liaison aux ribosomes de CLU                 | Non renseigné                             | Association entre CLU et les facteurs d'initiation de la traduction eIF3 et eIF5A et avec le ribosome cytosolique notamment Rpl3. | Association entre CLU et certains facteurs de la traduction cytosolique et notamment le ribosome cytosolique entier possiblement en cours de traduction. Association au niveau de la surface mitochondriale. | CLU s'associe aux facteurs d'initiation de la traduction principalement (peu d'association avec le ribosome seul).  | Non renseigné                           |
| Rôle de CLU dans la traduction                           | Non renseigné                             | Au niveau de l'initiation de la traduction.   | Non renseigné  | Rôle dans les étapes initiales de la traduction cytosolique à la surface mitochondriale des MITO ARNm ce qui influence leur stabilité. Rôle dans la traduction mitochondriale probablement due à son action sur les protéines mitochondriales impliquées dans cette traduction. | Non renseigné                           |
| Partenaire protéique de CLU : le complexe TOM            | Non renseigné                             | Non renseigné   | Oui : TOM 20.  | Non renseigné   | Non renseigné                           |

l'ensemble de ces résultats, CLUH pourrait se lier à des MITO ARNm et former des granules dans lesquelles la traduction est régulée (Pla-Martín et al., 2020). L'absence de CLUH aboutirait à une augmentation de la traduction cytosolique à la surface mitochondriale de certains MITO ARNm, bien que le nombre de ribosomes présents à cette surface soit réduit. Cela suggère un rôle de CLUH dans la régulation de la traduction cytosolique à la surface mitochondriale (Vardi-Oknin and Arava, 2019). Parmi les complexes de l'OXPPOS, seul le complexe II, composé uniquement de protéines d'origine nucléaire n'est pas ou peu affecté par l'absence de CLUH. Cela, en plus de la régulation de la traduction mitochondriale par CLUH, laisse supposer que CLUH est importante pour la coordination entre les génomes nucléaire et mitochondrial nécessaire au bon fonctionnement des mitochondries.

### 3.5. Conclusion générale : les protéines de la famille CLU.

La famille des protéines CLU est caractérisée par deux éléments :

- Par la présence de deux domaines : un domaine Clu central et un domaine TPR (voir paragraphe 3.1.5.).
- Par la mise en évidence d'un phénotype similaire suite à leur inactivation (regroupement des mitochondries) et donc un rôle similaire dans l'organisation du réseau mitochondrial (table 1).

Les protéines CLU n'ont que peu d'effets sur la structure mitochondriale. En effet, celle-ci ne semble pas altérée chez les plantes et les amibes (Fields et al., 2002; Logan et al., 2003) alors que les crêtes mitochondriales et la matrice mitochondriale semblent être légèrement altérées chez les insectes et les mammifères (Cox and Spradling, 2009; Wakim et al., 2017; Wang et al., 2016) (table 1).

La localisation des protéines CLU est assez homogène. Les protéines CLU sont des protéines cytosoliques ayant un signal diffus, avec occasionnellement la mise en évidence de particules de CLU souvent colocalisées avec les mitochondries (Ando et al., 2016; Cox and Spradling, 2009; Gao et al., 2014; Sen et al., 2013; Sheard et al., 2020; Vardi-Oknin and Arava, 2019; El Zawily et al., 2014) (table 1).

|   | Amibe ( <i>Dictyostelium discoideum</i> )   | Levures ( <i>Saccharomyces cerevisiae</i> ) | Insectes ( <i>Drosophila melanogaster</i> )  | Mammifères (homme, souris)  | Plantes ( <i>Arabidopsis thaliana</i> )  |
|---|---|---|--|---|--|
| Partenaire protéique de CLU : autres protéines de l'OM        | Non renseigné   | Non renseigné                               | Oui : VDAC.  | Non renseigné   | Non renseigné  |
| Rôle de CLU dans la division mitochondriale                   | Oui. Dans la fusion et la fission mitochondriale.   | Non renseigné                               | Oui. Grâce à son implication dans la régulation du facteur de fusion mitochondriale : Marf médiée par VCP.   | Oui. Grâce à son implication dans la régulation du facteur de fusion mitochondriale : OPA1.   | Oui. Ce rôle de CLU influence le temps d'association des mitochondries entre elles.      |
| Rôle de CLU dans la cytokinèse                                | Oui   | Oui   | Non renseigné  | Non renseigné   | Non renseigné  |
| Rôle de CLU dans l'organisation du réseau mitochondrial       | Oui   | Oui   | Oui. Ce rôle de CLU influence la transmission des mitochondries lors de la division cellulaire. Néanmoins CLU n'est pas impliquée dans la régulation du nombre de mitochondries.           | Oui   | Oui  |
| Rôle de CLU sur le cytosquelette                              | CLU n'a pas de rôle dans l'organisation du cytosquelette. Néanmoins, le cytosquelette semble être important pour le maintien sous forme regroupée des mitochondries en absence de CluA. | Non renseigné                               | CLU n'a pas de rôle dans l'organisation du réseau de microtubules mais possiblement dans le déplacement des mitochondries le long des microtubules.  | Non renseigné   | Non renseigné  |
| Déplacement des mitochondries                                 | Par les microtubules.   | Non renseigné                               | Par les microtubules.  | Non renseigné   | Par les filaments d'actines.   |
| Régulation de CLU par des modifications post-traductionnelles | Non renseigné   | Non renseigné                               | Non renseigné  | Non renseigné   | Oui. L'acétylation au niveau des lysines 1022 et 1029. La forme active est non acétylée. |
| Rôle de CLU sur les MITO ARNm                                 | Non renseigné   | Non renseigné                               | Oui. Baisse de l'expression des MITO ARNm codants pour des protéines impliquées dans la protection contre les ROS, la réparation de l'ADN, l'apoptose et le métabolisme en absence de CLU. | Oui. CLU est impliquée dans la régulation de la stabilité des MITO ARNm et donc de l'expression des protéines correspondantes. CLU est impliquée dans la stabilité des MITO ARNm auxquelles elle se lie. Ces MITO ARNm régulés par CLU sont impliqués dans la dégradation des acides aminés et des acides gras, le cycle de Krebs, et l'OXPPOS (sauf le complexe II codé uniquement par le génome nucléaire). | Non renseigné  |
| Lien entre CLU et la mitophagie                               | Non renseigné   | Non renseigné                               | Oui, grâce à son interaction avec le complexe PINK1-Parkin et son rôle de régulation de la fusion mitochondriale.  | Oui, Grâce à son implication dans la régulation de la voie de signalisation mTORC1  | Oui, possiblement grâce à son association avec ATG8.                                     |

**Table 1 : Fonction des protéines de la famille CLU.**

Table récapitulative des informations concernant les fonctions de CLU chez l'amibe (*Dictyostelium discoideum*), la levure (*Saccharomyces cerevisiae*), l'insecte (*Drosophila melanogaster*), les mammifères (Homme et souris) et la plante (*Arabidopsis thaliana*).

D'après l'étude des protéines CLU chez les levures (*Saccharomyces cerevisiae*), les insectes (*Drosophila melanogaster*) et les mammifères (Homme et Souris), CLU serait impliquée dans la traduction des MITO ARNm à la surface mitochondriale. En effet, cette protéine lie les ARNm et principalement les MITO ARNm et serait impliquée dans la régulation de la traduction à la surface mitochondriale chez les levures, les insectes et les mammifères (Gao et al., 2014; Jao and Chen, 2006; Mitchell et al., 2013; Schatton et al., 2017; Sen and Cox, 2016; Sheard et al., 2020; Vardi-Oknin and Arava, 2019; Vornlocher et al., 1999) (table 1).



## MATERIELS ET METHODES



## 1. Matériels.

### 1.1. Cellules de mammifères.

**HCT116** : lignée cellulaire établie à partir d'un carcinome colorectal primaire d'un homme adulte. Mutation du codon 13 de RAS. Les cellules HCT116 sont cultivées dans un **milieu HCT** : DMEM (D6429, Sigma), 1 % de Pénicilline/streptavidine (Gibco), 10 % de sérum de veau foetal (Gibco).

**mES-E14** : cellules souches embryonnaires de souris. Les cellules mES-E14 sont cultivées dans un **milieu ES** : DMEM (D6429, Sigma), 15 % de sérum de veau foetal (Gibco), 1 % de Pénicilline/streptavidine (Gibco), 0,1 mM Betamercaptoéthanol et 100 Unités LIF (Leukemia inhibitory factor). Avant le dépôt des cellules mES-E14, les boîtes de cultures subissent un traitement avec 3% de gélatine. Le traitement à la gélatine permet l'adhérence des cellules mES-E14. Cela est permis par une incubation de 10 minutes des boîtes de culture avec 2 mL de gélatine 3% avant d'enlever l'excédent de gélatine et d'y déposer les cellules mES-E14.

**293T** : cellules humaines dérivées des cellules HEK293 qui expriment une version mutante de SV40 large T antigen. Ces cellules sont utilisées pour l'expression de protéines et la production de rétrovirus/lentivirus recombinant servant à la transduction stable des cellules HCT116 et mES-E14. Les cellules 293T sont cultivées dans du milieu HCT.

Toutes les lignées cellulaires sont cultivées dans un incubateur à 37°C, en atmosphère humidifiée avec 5% de CO<sub>2</sub>.

### 1.2. Matériel végétal.

***Nicotiana benthamiana*** : Les plantes de *N. benthamiana* sauvage sont utilisées pour toutes les expériences d'expression transitoire. Les plantes sont cultivées en condition 16h jour/8h nuit (Température 22°C/18°C).



***Arabidopsis thaliana*** : les plantes utilisées sont toutes issues de l'écotype Col0 : sauvage ou mutant friendly SALK\_056717 (*fmt*). Elles sont cultivées sur terre ou *in vitro*. Sur terre, les plantes sont cultivées en condition jour long (16h jour/ 8h nuit, températures 22°C/18°C). *In vitro*, les plantes sont cultivées sur boîte ou en liquide en condition 24h jour. Les conditions utilisées pour chaque expérience seront précisées tout le long du manuscrit.

### 1.3. Souches bactériennes.

***Escherichia coli* TOP10** : F- *mcrA*  $\Delta$ (*mrr-hsdRMS-mcrBC*)  $\Phi$ 80*lacZ* $\Delta$ M15  $\Delta$ *lacX74* *recA1* *araD139* $\Delta$ (*ara-leu*) 7697 *galU galK rpsL* (StrR) *endA1 nupG*.

***Agrobacterium tumefaciens* GV3101** : cette souche est résistante à la rifampicine et à la gentamicine. Elle possède le Ti plasmide désarmé pMP90 (résistant à la gentamicine) qui porte les gènes de virulences permettant l'intégration du T-DNA (ADN de transfert) dans le génome de plantes.

### 1.4. Vecteurs.

#### 1.4.1. Vecteurs pour la transfection de cellules humaines.

**pMSCVpuro** (Clontech) : ce vecteur est un vecteur rétroviral. Il permet l'expression de gènes d'intérêt en aval du promoteur phosphoglycerate kinase (PGK). Ce vecteur possède un gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection des bactéries et un gène de résistance à la puromycine pour la sélection des cellules de mammifère transformées.

**pLenti-EF1a (obtenu à partir du plasmide Addgene # 103862)** : vecteur lentiviral, permet l'expression de gène d'intérêt à partir du promoteur constitutif du gène EIF1a. Ce vecteur possède un gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection des bactéries. Le clonage dans le vecteur s'effectue au niveau des sites BsiWI et EcoRI. Le gène codant pour la résistance pour la sélection des cellules transduites est apportée lors du clonage en phase avec la protéine d'intérêt après un site de clivage P2A.



**pX459 (V2) (obtenu à partir du plasmide Addgene # 62988)** : ce vecteur permet l'expression du système CRISPR-Cas9 dans les cellules de mammifères. La nucléase Cas9 est sous le contrôle du promoteur cytomégalovirus (CMV) et l'ARNg est sous le contrôle d'un promoteur U6. Ce vecteur possède un gène de résistance à l'ampicilline pour la sélection des bactéries et un gène de résistance à la puromycine pour la sélection des cellules de mammifères.

**pUC19** : ce vecteur est un vecteur de clonage. Ce vecteur possède un gène de résistance à l'ampicilline ainsi que le fragment N-terminal de la  $\beta$ -galactosidase permettant la sélection blanc-bleu des bactéries transformées.

### **1.4.2. Vecteurs pour la transformation de plantes.**

#### **1.4.2.1. Vecteurs donneurs.**

Les vecteurs donneurs sont utilisés lors de clonage par la technologie de Gateway®. Ils possèdent les sites de recombinaisons attP1 et attP2 permettant le clonage des gènes d'intérêt par recombinaison. Le gène *ccdB*, codant un inhibiteur de gyrase, est présent entre les deux sites attP. L'expression de ce gène empêche la croissance des bactéries sensibles à ce gène (exemple des TOP10), ayant intégré le vecteur non recombiné.

Deux vecteurs donneurs ont été utilisés :

- **pDONR207** : Ce vecteur possède aussi un gène de résistance à la gentamycine pour la sélection des bactéries transformées.
- **pDONR207-zeo** : Ce vecteur possède aussi un gène de résistance à la zéocine pour la sélection des bactéries transformées.

#### **1.4.2.2. Vecteurs de destination.**

Ces vecteurs de destination sont utilisés lors de clonage par la technologie de Gateway®. Ils possèdent les sites de recombinaisons attR1 et attR2 permettant l'intégration des gènes d'intérêt par recombinaison à partir d'un vecteur donneur. Le gène *ccdB*, codant un inhibiteur de gyrase, est présent entre les deux sites attR.

Les différents vecteurs de destination sont :

Table 2 : Liste des anticorps utilisés lors de cette étude.

| anticorps         | type       | protéine cible                                    | taille de la protéine cible | hôte   | espèces réactives                              | Fournisseur   |
|-------------------|------------|---|-----------------------------|--------|--|---|
| anti-ATP5F1A      | polyclonal | ATP5A1  | 60kDa                       | Lapin  | Humain et souris                               | CusaBio Technology LLC  |
| anti-calregulin   | monoclonal | Calregulin (reticulum endoplasmique)              | 55kDa                       | Souris | Humain et souris                               | SantaCruz Biotechnology   |
| anti-catalase     | monoclonal | Catalase (peroxisome)                             | 64kDa                       | Souris | Humain et souris                               | SantaCruz Biotechnology   |
| anti-cox4         | monoclonal | Cox4 (mitochondria)                               | 18kDa                       | Souris | Humain et souris                               | Bio-Techne®   |
| anti-eIF3X        | polyclonal | Clustered mitochondria (CluH)                     | 155kDa                      | lapin  | Humain et souris                               | Bethyl Laboratories   |
| anti-enolase      | polyclonal | enolase (cytosol)                                 | 55kDa                       | Chèvre | Humain et souris                               | Dr. Nina ENTELIS (GMGM, Strasbourg)   |
| anti-GAPDH        | monoclonal | Glycéraldehyde-3-phosphate déshydrogénase (GAPDH) | 37kDa                       | Souris | Humain et souris                               | Elabscience®  |
| anti-GLS          | polyclonal | GLS   | 73kDa                       | Lapin  | Humain et souris                               | Elabscience®  |
| anti-HSP60        | polyclonal | HSPD1   | 68kDa                       | Lapin  | Humain et souris                               | Elabscience®  |
| anti-HSPA9        | polyclonal | HSPA9   | 74kDa                       | Lapin  | Humain et souris                               | Elabscience®  |
| anti-IARS2        | polyclonal | Isoleucine-tRNA ligase 2 (IARS1)                  | 113kDa                      | Lapin  | Humain et souris                               | CusaBio Technology LLC  |
| anti-IMMT         | polyclonal | Mitochondrial inner membrane protein (IMMT)       | 84kDa                       | Lapin  | Humain et souris                               | Elabscience®  |
| anti-LRP130       | polyclonal | LRPPRC  | 158kDa                      | Lapin  | Humain et souris                               | GeneTex   |
| anti-NDUFS1       | polyclonal | NDUFS1  | 79kDa                       | Lapin  | Humain et souris                               | Elabscience®  |
| anti-Paxilin      | polyclonal | paxiline (cytosquelette)                          | 68kDa                       | Lapin  | Humain et souris                               | SantaCruz Biotechnology   |
| anti-RPL7a        | polyclonal | RPL7a   | 35kDa                       | Lapin  | Humain et souris                               | Elabscience®  |
| anti-RPS21        | polyclonal | RPS21   | 14kDa                       | Chèvre | Humain et souris                               | Dr. Christine ALLEMAND-CURA (IBMC, Strasbourg)  |
| anti-tubuline     | monoclonal | γ-tubulin   | 48kDa                       | Souris | Humain et souris                               | Sigma-Aldrich®  |
| anti-eIF3X        | polyclonal | Clustered mitochondria (CluH)                     | 155kDa                      | lapin  | Humain   | NovusBio  |
| anti-MAVS         | monoclonal | Mitochondrial antiviral-signaling (MAVS)          | 57kDa                       | Souris | Humain   | SantaCruz Biotechnology   |
| anti-SPAG5        | polyclonal | Sperm-associated antigen 5 (SPAG5)                | 135 kDa                     | Lapin  | Humain   | CusaBio Technology LLC  |
| anti-FLAG         | polyclonal | étiquette FLAG                                    | 8 acides aminées            | Lapin  | <i>Arabidopsis thaliana</i> , humain et souris | Covalab   |
| anti-GFP          | polyclonal | Green Fluorescent Protein (GFP)                   | 25kDa                       | Lapin  | <i>Arabidopsis thaliana</i> , humain et souris | Pikaard C. lab - Indiana University   |
| anti-HA-HRP       | monoclonal | étiquette HA                                      | 9 acides aminées            |        | <i>Arabidopsis thaliana</i> , humain et souris | Sigma-Aldrich®  |
| Streptavidine-HRP |            | molécules de biotine                              |                             |        | <i>Arabidopsis thaliana</i> , humain et souris | cytiva  |
| anti-AOX          | polyclonal | AOX (mitochondrie)                                | 40kDa                       | Lapin  | <i>Arabidopsis thaliana</i>                    | T. Elthon (GT monoclonal antibodies, University of Nebraska, Lincoln, NE, USA)  |
| Anti-FMT          | polyclonal | Friendly mitochondria (FMT)                       | 155kDa                      | Lapin  | <i>Arabidopsis thaliana</i>                    | Covalab   |
| anti-NAD9         | polyclonal | NAD9 (mitochondrie)                               | 23kDa                       | Lapin  | <i>Arabidopsis thaliana</i>                    | J. M. Grienenberger (IBMP, Strasbourg)  |
| anti-UGPase       | polyclonal | UGPase (cytosole)                                 | 52kDa                       | Lapin  | <i>Arabidopsis thaliana</i>                    | Agrisera  |
| anti-VDAC         | polyclonal | VDAC1, VDAC2, VDAC3 et VDAC4 (mitochondrie)       | 29-30kDa                    | Lapin  | <i>Arabidopsis thaliana</i>                    | Anne COSSET (IBMP, Strasbourg)  |
| anti-VDAC2        | polyclonal | VDAC2 (mitochondrie)                              | 30kDa                       | Lapin  | <i>Arabidopsis thaliana</i>                    | Robert, N., d'Erfurth, I., Marmagne, A., Erhardt, M., Allot, M., Boivin, K., Gissot, L., Monachello, D., Michaud, M., Duchêne, A.M., et al. (2012). Voltage-dependent-anion-channels (VDACs) in Arabidopsis have a dual localization in the cell but show a distinct role in mitochondria. Plant Mol. Biol. |

- **pK7WGF2** : Ce vecteur possède des gènes de résistance à la spectinomycine pour la sélection des bactéries et à la kanamycine pour la sélection des plantes. Ce plasmide permet la fusion en N-terminal de la GFP avec la séquence d'intérêt sous contrôle d'un promoteur fort 2\*35S.
- **pB7WGF2** : Ce vecteur possède des gènes de résistance à la spectinomycine pour la sélection des bactéries et au Basta pour la sélection des plantes. Ce plasmide permet la fusion en C-terminal de la GFP avec la séquence sous contrôle du promoteur fort 2\*35S.
- **pGWB615** : Ce vecteur possède des gènes de résistance à la spectinomycine pour la sélection des bactéries et au Basta pour la sélection des plantes. Ce plasmide permet la fusion en N-terminal de l'étiquettes 3\*HA avec la séquence sous contrôle du promoteur fort 2\*35S.
- **pB2GW7** : Ce vecteur possède des gènes de résistance à la spectinomycine pour la sélection des bactéries et au Basta pour la sélection des plantes. Ce plasmide permet l'expression de la séquence d'intérêt d'intérêt sous contrôle du promoteur fort 2\*35S.
- **pMDC32** : ce vecteur possède des gènes de résistance à la kanamycine pour la sélection des bactéries et à l'hygromycine pour la sélection des plantes. Ce plasmide permet l'expression de la séquence d'intérêt sous contrôle du promoteur fort 2\*35S.

### 1.5. Anticorps.

L'ensemble des anticorps utilisés lors de cette études sont rassemblés dans la table 2.

### 1.6. Oligonucléotides.

Les oligonucléotides provenant de IDT ont été choisis en utilisant le logiciel Universal Probe Library (Roche) pour les amorces de qRT-PCR et selon le logiciel Primer-BLAST (NCBI) ou de manière manuelle pour les autres amorces (clonages, qPCR sur l'ADN, ...). Pour les qPCR, les amorces oligonucléotidiques permettent l'amplification de séquences de 60 à 110 nucléotides et leurs températures d'hybridations est aux alentours de 60°C. Pour les autres amorces nucléotidiques, les températures d'hybridations sont déterminées selon le logiciel Tm Calculator (ThermoFisher Scientific).



## 1.7. Outils informatiques.

**Alignement de séquence** : les alignements de séquences nucléotidiques ont été réalisés via le logiciel MacVector et toutes les manipulations de séquences ont été réalisées par le logiciel SerialCloner.

### Banque de Données utilisée :

TAIR : <https://www.arabidopsis.org/>

Uniprot : <https://www.uniprot.org/>

NCBI : <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/>

UCSC : <https://genome.ucsc.edu/cgi-bin/hgGateway>

STRING : <https://string-db.org/>

DAVID : <https://david.ncifcrf.gov/>

SUBA4 : <http://suba.live/>

## 1.8. Microscopie.

Les analyses de microscopie à fluorescence confocale ont été réalisées sur un microscope LSM 700 ou LSM 780 de ZEISS.

## 2. Méthodes.

### 2.1. Transformation des organismes.

#### 2.1.1. Transformation d'*Escherichie coli*.

Les bactéries thermo-compétentes TOP 10 sont obtenues selon le protocole standard décrit dans (Inoue et al., 1990).

100 ng de plasmide sont incubés 30 minutes sur glace en présence de bactéries compétentes TOP 10. Par la suite un choc thermique (40 secondes à 42°C puis 2 minutes dans la glace) permet l'incorporation des plasmides dans les bactéries. Ces bactéries sont ensuite



incubées 1h à 37°, ce qui permet l'expression du gène de résistance du plasmide incorporé, avant d'être étalées et incubées une nuit à 37°C. Le lendemain, les bactéries ayant poussé correspondent aux bactéries ayant intégré le plasmide d'intérêt et sont vérifiées par criblage sur colonie (paragraphe 2.3.5.) puis par séquençage sur plasmide (paragraphe 2.3.6. et 2.3.7.).

### **2.1.2. Transformation d'*Agrobacterium tumefaciens*.**

Les agro-bactéries thermo-compétentes GV3101 sont obtenues selon le protocole décrit dans (Wise et al., 2006).

800 ng de plasmide sont incubés en présence d'agro-bactéries compétente GV3101. Par la suite un choc thermique (5 minutes à 37°C puis 5 minutes dans la glace) permet l'incorporation des plasmides dans les bactéries. Ces bactéries sont ensuite incubées 2h à 28°C ce qui permet l'expression du gène de résistance porté par le plasmide plasmide, avant d'être étalées et incubées 2 jours à 28°C sur LB-agar + 50 µg/mL Rifampicine + 30 µg/mL Gentamycine + l'antibiotique correspondant au gène de résistance du plasmide intégré. Ces agro-bactéries peuvent ensuite être utilisées pour la transformation des plantes (paragraphe 2.1.3.).

### **2.1.3. Transformation des plantes.**

#### **2.1.3.1. Transformation transitoire.**

##### **2.1.3.1.1. *Nicotiana benthamiana*.**

Des agro-bactéries transformées avec le plasmide d'intérêt sont mises en culture une nuit à 28°C (5mL). Le lendemain, les cultures sont centrifugées à 4 000 rpm et à température ambiante pendant 15 minutes. Les agro-bactéries sont ensuite re-suspendues dans 5mL de **tampon d'infiltration *N.benthamiana***. Les agro-bactéries sont diluées à une Densité Optique (DO) finale de 1 Unité d'absorbance (UA)/mL. Les agro-bactéries sont ensuite incubées 1h à température ambiante avant d'être utilisées pour la transformation des feuilles de *N. benthamiana*. Une seringue est utilisée pour l'agro-infiltration des feuilles sur la partie inférieure de la feuille. Ces plantes sont ensuite incubées 2 à 4 jours en jour long (16h) à 23°C, 18°C la nuit. Les feuilles agro-infiltrées peuvent servir à des observations en microscopie confocale (paragraphe 1.8.) ou à des analyses par western blot (paragraphe 2.5.).



**Tampon d'infiltration *N.benthamiana*** : 1 mM MgCl<sub>2</sub> et 50 µM Acétosyringone.

#### 2.1.3.1.2. *Arabidopsis thaliana*.

Des agro-bactéries transformées avec le plasmide d'intérêt sont mises en culture une nuit à 28°C (5mL). Le lendemain, les cultures sont centrifugées à 4 000 rpm et à température ambiante pendant 15 minutes. Les agro-bactéries sont ensuite re-suspendues dans 5mL de **tampon d'induction *A.thaliana***. Après une incubation de 5 à 7h à température ambiante sous agitation, les agro-bactéries sont centrifugées à 4 000 rpm et à température ambiante pendant 15 minutes avant d'être reprises dans 5mL **tampon MES/MgCl<sub>2</sub>**. Les agro-bactéries sont diluées à une DO final de 0,1 UA/mL et sont utilisées pour la transformation des feuilles de *A. thaliana* de 4 semaines. Une seringue est utilisée pour l'agro-infiltration des feuilles sur la partie inférieure. Ces plantes sont ensuite incubées 4 à 7 jours en jour long (16h) à 23°C, 18 °C la nuit. Les feuilles agro-infiltrées peuvent servir à des observations en microscopie confocale (paragraphe 1.8.) ou à des analyses par western blot (paragraphe 2.5.).

**Tampon d'induction *A. thaliana*** : 10,5 g/L K<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 4,5 g/L KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 g/L Citrate de sodium, 0,1 g/L MgSO<sub>4</sub>, 0,4 % Glycérol, 0,1 g/L MES et 50 mg/L Acetosyringone.

**Tampon MES/MgCl<sub>2</sub>** : 10 mM acide 2-éthanosulfonique (MES) et 10 mM MgCl<sub>2</sub> à pH 5.86.

#### **2.1.3.2. Transformation stable : Floral Dip de *Arabidopsis thaliana***.

Des agro-bactéries transformées avec le plasmide d'intérêt sont mises en culture une nuit à 28°C puis 1 mL de cette pré culture est utilisée pour faire une culture de 200 mL d'agro-bactéries incubées toute une nuit à 28°C.

La culture d'agro-bactéries est ensuite utilisée pour la transformation stable des plantes *A. thaliana*. Les agro-bactéries sont centrifugées à 4 000 rpm et à température ambiante pendant 15 minutes puis reprise dans 50 mL de **tampon d'agro-infiltration floral**



**dip.** Les agro-bactéries sont ensuite diluées à une DO final de 0,5 UA/mL puis incubées 1h à température ambiante avant d'être utilisées pour la transformation des plantes. Les plantes sont incubées 1 minute dans ces agro-bactéries puis incubées 24h à l'obscurité et à 23°C et dans un environnement humide pour permettre l'entrée des agro-bactéries dans les plantes. Les plantes sont ensuite cultivées en jour long (16h) à 23°C et 18°C la nuit.

**Tampon d'agro-infiltration floral dip** : 50 % MS M0222, 5 % sucrose, 0,025 % Silwet L-77 et 200 µM Actetosyringone.

#### **2.1.4. Transfection/transduction des cellules de mammifères.**

##### **2.1.4.1. Transfection des cellules de mammifères par la méthode PEI.**

Des cellules HCT116, 293T ou mES-E14 à 70% de confluence sont utilisées pour la transfection. La transfection est réalisée dans des boîtes de 6 puits. 3 µg de plasmide sont mélangés à 100 µL de NaCl 150 mM avant d'être mélangés à un tube contenant 6 µL de PEI (polyéthylèneimine 40000 MAX à 2mg/mL) dans 100 µL de NaCl 150 mM. Le mélange est incubé 30 minutes à température ambiante puis ajouté goutte par goutte aux cellules. Après 6 heures d'incubation à 37°C et 5% de CO<sub>2</sub>, le milieu des cellules est changé pour un milieu frais sans antibiotiques. Les cellules peuvent être collectées après 48-72h. Si besoin, 24 heures après transfection, le milieu peut être échangé contre du milieu de culture contenant un antibiotique correspondant à la résistance portée par le plasmide pour la sélection de lignée stable. Ces cellules peuvent servir à des observations en microscopie confocale (paragraphe 1.8.) ou à des analyses par western blot (paragraphe 2.5.).

La transfection des cellules de mammifères a été utilisée pour la délétion de *CLUH* par CRISPR-Cas9. Suite à la transfection, les cellules ont été déposées à une concentration de 1 cellule par puits dans une plaque 96 puits en présence de 200µL de milieu de culture. Après l'accroissement des différentes populations monoclonales des cellules inactivées pour le gène de *CLUH*, un génotypage par PCR est réalisé suite à l'extraction de l'ADN génomique sur plaque 96 puits (paragraphe 2.3.1.2. et 2.3.2.).



#### **2.1.4.2. Transduction des cellules de mammifères.**

Les lignées stables ont été générées à partir des cellules HCT116 ou mES-E14 à l'aide de lentivirus ou de rétrovirus. Les particules virales sont produites dans des cellules 293T transfectées transitoirement avec le vecteur lentiviral/rétroviral ainsi qu'avec les plasmides codants pour les protéines d'empaquetage du virus. La production de particules virales s'effectue en plaque de 6 puits avec les quantités de plasmides suivants : Pour les rétrovirus : 0,25 µg pAdantage, 0,875 µg pGAG-POL, 0,5 µg pVSV-G et 1,4 µg du plasmide rétroviral d'intérêt. Pour les lentivirus : 0,3µg pVSV, 1,2µg psPAX2 et 1,5 µg du plasmide lentiviral d'intérêt. Pour cela, les cellules 293T sont utilisées à 70 % de confluence. Le Protocole de transfection est décrit dans le paragraphe 2.1.4.1, sans sélection. 48 heures après la transfection, le milieu de ces cellules 293T contenant les particules virales est récupéré et filtré sur filtre 0,45 µm (PES).

Les cellules HCT116 ou mES-E14 peuvent ensuite être transduites. Celles-ci sont mises à une confluence de 70 % puis les virus précédemment récoltés (1mL) sont ajoutés aux cellules. Les cellules sont ensuite incubées au moins 24h. Après l'incubation avec les virus, le milieu de culture contenant les virus est changé pour un milieu + antibiotique correspondant au plasmide inséré.

## **2.2. Culture des eucaryotes.**

### **2.2.1. Plantes.**

#### **2.2.1.1. Culture liquide.**

Avant la mise en culture liquide dans 80 mL de **milieu de culture liquide *in vitro* ARA**, une quantité correspondant à un volume de 50 µL de graines doit être stérilisée. Ces graines sont lavées avec 1,5mL l'éthanol 70 % pendant 2 minutes sous agitation avant d'être stérilisées via l'incubation de 15 minutes sous agitation dans 1,5mL de **Javel-Tween**. Par la suite, les graines sont lavées à l'eau 4 fois (1,5mL). Une fois les graines stérilisées, celle-ci sont reprises dans 1 mL d'eau et mises en culture liquide. Les conditions de cultures liquides sont de la lumière continue à 23°C.



**Javel-Tween** : 2 % Javel et 4 % Tween 20.

**Milieu de culture liquide in vitro ARA** : 2,21 g/L MS231, 2,34 mM MES et 2,5% sucrose et pH5.8

#### **2.2.1.2. Culture solide.**

Avant la mise en culture sur boîte de 20 cm de milieu de culture solide, une quantité correspondant à un volume de 50 µL de graines doit être stérilisée. Ces graines sont lavées avec 1,5mL d'**Ethanol-Tween** pendant 2 minutes sous agitation avant d'être stérilisées via l'incubation de 15 minutes sous agitation dans 1,5 mL de Javel 2 %. Par la suite, les graines sont lavées avec 1,5mL d'éthanol 100 % 4 fois avant d'être séchées 2h et déposées sur boîte de culture sur **milieu de culture solide in vitro ARA**. Les conditions de cultures sont en lumière continue à 23°C.

**Ethanol-Tween** : 70 % Ethanol et 4 % Tween 20.

**Milieu de culture solide in vitro ARA** : 4,91 g/L MS255, 1% sucrose et 8,6 g/L agar.

#### **2.2.2. Cellules de mammifères.**

##### **2.2.2.1. Décongélation.**

Les cellules congelées sont placées dans le l'azote pour une conservation long durée. Les cellules sont décongelées rapidement et re-suspendues dans du **milieu HCT ou ES**. Une centrifugation à 500 g et à température ambiante pendant 5 minutes permet l'élimination du glycérol présent dans le surnageant. Le culot cellulaire est repris dans 10 mL de **milieu HCT ou ES** puis déposé dans une Boite B10 avant d'être mis en culture à 37°C et 5 % de CO<sub>2</sub>.

**Milieu HCT** : DMEM D6429, 1 % Pénicilline/Streptavidine (Gibco), 10 % SVF (Gibco).

**Milieu ES** : DMEM D6429 (sigma), 15 % SVF (Gibco), 1 % Pénicilline/streptavidine (Gibco), 0,1 mM BetaMercaptoéthanol et 100 Unités Leukemia inhibitory factor (LIF).



#### **2.2.2.2. Passage.**

Une boîte B10 (boîte de culture de 10 cm de diamètre soit 55 cm<sup>2</sup> de surface) contenant des cellules confluentes nécessite d'être passée. Après un lavage des cellules avec du PBS 1X (sigma), celles-ci sont détachées grâce à un traitement avec de la trypsine (1 mL de trypsine pendant 10 minutes à 37°C). Suite à cette incubation, du **milieu HCT ou ES** est ajouté aux cellules en suspension. Une centrifugation à 500 g et à température ambiante pendant 5 minutes permet l'élimination du surnageant contenant de la trypsine et 1/10<sup>ème</sup> des cellules contenues dans le culot peuvent être déposées dans une nouvelle boîte B10 contenant 10 mL de **milieu HCT ou ES**. Le reste du culot peut être lavé au PBS 1X et servir pour des extractions d'ADN (paragraphe 2.3.1.2.), d'ARN (paragraphe 2.4.1.) ou de protéines (paragraphe 2.5.1.2.).

#### **2.2.2.3. Congélation.**

Après leur passage, il est possible de congeler des cellules. Pour cela, les cellules issues d'un passage sont reprises dans du **milieu HCT ou ES + 10 % DMSO** et déposées dans des tubes de congélation par fraction de 1,5 mL. La congélation doit être douce ce qui implique l'utilisation d'une boîte de congélation qui abaisse la température de 1°C toutes les minutes. Les cellules sont maintenues à -80°C le temps de la congélation avant d'être stockées dans de l'azote liquide à long terme.

### **2.3. Techniques relatives aux ADN.**

#### **2.3.1. Extraction d'ADN génomique.**

##### **2.3.1.1. Plantes.**

Un petit morceau de feuille est placé dans un tube contenant 400 µL de **tampon d'extraction ADN génomique plantes** ainsi que des billes de 1 mm de diamètre. L'échantillon est broyé par deux agitations successives de 30 secondes à 5 500 rpm dans un PreCellys® (Ozyme) coupé d'une pause de 5 secondes. L'échantillon est ensuite centrifugé à 16 000 g, 5 minutes. 0.75 volume d'isopropanol est ajouté au surnageant obtenu. Suite à une incubation de 5 minutes à température ambiante, l'échantillon est centrifugé à 16 000 g, 5 minutes. Le culot d'ADN génomique est lavé avec de l'éthanol 70 % (v/v) puis repris dans de l'eau. Un traitement RNase est ensuite réalisé pendant 1h à température ambiante en présence de 40



µg/mL de RNase A et 100 U/mL de RNase T1 (Mix RNase A/T1, thermoscientific). Après précipitation à l'éthanol en présence de 0,04 volume de NaCl 5 M et de 2,5 volumes d'éthanol 100% lors d'une incubation d'au moins 30 minutes à -20°C, l'échantillon est centrifugé à 16 000 g, 30 minutes à 4°C puis l'ADN est repris dans de l'eau avant d'être dosé au Nanodrop.

**Tampon d'extraction ADN génomique plantes** : 200 mM tris HCl pH7.5, 250 mM NaCl, 25 mM EDTA.

### **2.3.1.2. Cellules de mammifères.**

Un culot cellulaire est re-suspendu dans 300µL de **tampon d'extraction ADN génomique mammifère** puis incubé toute la nuit à 55°C sous agitation. Le lendemain, 1 volume de Roti® Phenol/Chloroform/isoamyl alcohol (ROTH) est ajouté à l'échantillon puis un vortex et une centrifugation à 16 000 g, 15 minutes à 4°C permettent la récupération de la phase aqueuse supérieure contenant l'ADN génomique. L'ADN contenu dans cette phase aqueuse est précipité suite à une incubation de 15 minutes à -80°C dans 1 mL d'éthanol 100 % suivi d'une centrifugation à 16 000 g, 10 minutes à 4°C. L'ADN est ensuite lavé avec 1 mL d'éthanol 70 % puis centrifugé à 16 000 g, 5 minutes à 4°C. Enfin, l'ADN est repris dans de l'eau et dosé au Nanodrop. L'ADN ainsi extrait pourra être utilisé pour des analyses PCR (paragraphe 2.3.2.).

Pour l'extraction de l'ADN génomique sur plaque de 96 puits, le milieu est enlevé de chaque puits puis ceux-ci sont lavés au PBS 1X. Par la suite, l'ADN est extrait suite à l'ajout de 50 µL de **tampon de lyse Bradley** et à l'incubation des plaques en chambre humide toute la nuit à 60°C. Après le retour des plaques à température ambiante, 100 µL de **mix Ethanol/NaCl** sont ajoutés dans chaque puits pour précipiter les ADN. Les plaques sont incubées 30 minutes à température ambiante puis celles-ci sont centrifugées à 1 800 g pendant 20 minutes. L'ADN est ensuite lavé deux fois avec 150 µL d'éthanol 70 % froid puis centrifugé à 1 800 g pendant 10 minutes. Une fois le culot à sec, ajouter 30 µL d'eau dans chaque puits et les plaques sont incubées à 56°C pendant 10 minutes pour dissoudre d'ADN génomique.



**Tampon d'extraction ADN génomique mammifère** : 50 mM Tris-HCl pH 8, 100 mM EDTA pH 8, 100 mM NaCl, 1 % SDS et 0.1 mg/mL protéinase K.

**Tampon de lyse Bradley** : 10 mM Tris-HCl pH 7.5, 10 mM EDTA pH 8, 0,5 % SDS, 10mM NaCl et 1 µg/mL protéinase K.

**Mix Ethanol/NaCl** : 98,5 % Ehanol et 75mM NaCl.

### **2.3.2. PCR.**

Les PCR de génotypage sont réalisées avec une ADN polymérase recombinante de type Taq purifiée à partir de bactéries par la plateforme de production de protéines de l'institut (Nicolas Baumberger, P3P-IBMP). Les réactions sont réalisées dans un volume final de 15 µL en présence de 1 X Green GoTaq® Flexi Buffer (Promega), 0,2 mM de chacune des 4 dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), 1 µM de chacune des amorces, 2,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 50 ng d'ADNg et 0,5 U d'ADN polymerase. Les PCR sont composées d'une étape de dénaturation de 5 min à 95°C suivies de 35 cycles d'amplification (30 sec à 95°C, 30 sec à la température d'hybridation-3°C (en fonction du couple d'amorce) et 1 min/kb à 72°C). Pour finir, une étape finale d'élongation de 5 minutes à 72°C est réalisée. Après PCR, 10 µL de produit sont déposés sur gel d'agarose 1 % (p/v).

### **2.3.3. Clonage par la technologie Gateway®.**

Le clonage par la technologie Gateway® est basé sur le système de recombinaison du phage lambda. Il permet de cloner rapidement un gène d'intérêt, présent dans un vecteur donneur, dans différents vecteurs de destinations ayant diverses applications (fusion de protéines à différents tags, surexpression de protéines...)(Katzen, 2007).



### **2.3.3.1. Réaction BP.**

La première étape consiste à amplifier le gène d'intérêt par PCR en ajoutant les sites de recombinaison attB1 et attB2 aux extrémités. Pour cela, des amorces nucléotidiques composées d'environ 20 nucléotides (nt) s'hybridant spécifiquement au gène d'intérêt suivis de la séquence att à ajouter sont utilisées. La PCR est réalisée dans un volume final de 50 µL en présence de 1 X Phusion® HF Buffer, 0,2 µM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), 0,5 µM de chaque amorce nucléotidique, de 50 ng d'ADN génomique (paragraphe 2.3.1.) ou complémentaire (paragraphe 2.4.3.) et la polymérase utilisée est la Phusion® (Thermo scientific) à une concentration de 1 U/ 50 µL. Après une dénaturation initiale de 30 secondes à 98°C, 35 cycles d'amplifications sont réalisés (dénaturation de 15 secondes à 98°C, hybridation de 15 secondes à la température de fusion (Tm) +3°C de l'amorce ayant le plus petit Tm et élongation de 15 secondes/kb à 72°C) avant de terminer par une étape d'élongation finale de 10 minutes à 72°C. Le produit PCR est ensuite purifié sur gel d'agarose via l'utilisation du kit Nucleospin® Gel and PCR Clean-up (MACHEREY-NAGEL) selon les instructions du fournisseur.

Une première réaction de recombinaison, appelée réaction « BP », est ensuite réalisée entre les sites attB1 et attB2 du produit PCR et les sites attP1 et attP2 présents sur le vecteur donneur (pDONOR207, paragraphe 1.4.2.1) afin de générer un clone d'entrée. Après recombinaison, les sites attL1 et attL2 sont obtenus. La réaction BP est réalisée dans un volume final de 5 µL et renferme 100 ng de vecteur, 150 ng de produit PCR et 1 µL Gateway® BP Clonase® II Enzyme mix (Invitrogen). Après une incubation de 1h à température ambiante, 2 ng de protéinase K (ThermoFisher) sont ajoutés et le mix est incubé 10 minutes à 37°C. Ce mix est ensuite utilisé pour la transformation de bactéries TOP10 (paragraphe 2.1.1.).

### **2.3.3.2. Réaction LR.**

La deuxième étape des clonages par la technologie Gateway® consiste en une réaction de recombinaison, appelée réaction LR, entre les sites attL1 et attL2 du clone d'entrée (paragraphe 2.3.3.1.) et les sites attR1 et attR2 du vecteur de destination (paragraphe 1.4.2.2.). Après recombinaison, les sites attB1 et attB2 sont de nouveau obtenus. La réaction LR est réalisée dans un volume final de 5 µL et renferme 150 ng du vecteur de destination, 300

| Nom                    | Description   | Vecteur     |
|------------------------|---|-------------|
| Plante                 |   |             |
| pSU9-RFP               | MTS de la sous unité 9 du complexe IV de l'ATP synthase fusionnée à la RFP  | pH7RGW2     |
| pNP4                   | Protéine Cox4 du complexe IV de la chaîne respiratoire  |             |
| pAM544                 | La protéine Friendly (fourni par D. Logan, Angers)  | pDONORz     |
| pAM549                 | La GFP est fusionnée en N-terminale de Friendly   | pK7WGF2     |
| pAM557                 | La GFP est fusionnée en C-terminale de Friendly   | pB7FWG2     |
| pAM566                 | La BirA* est fusionnée en C-terminale de Friendly   | pB7WGF2     |
| pAM581                 | La BirA* est fusionnée en C-terminale de la GFP   | pB2GW7      |
| pAM573                 | La Split GFP partie $\beta$ 1-10 est fusionnée et N-terminale à la Tom5 de levure   | pMDC32      |
| pAM574                 | La Split GFP partie $\beta$ 11 est fusionnée en N-Terminale à Friendly  | pMDC32      |
| pAM576                 | La Split GFP partie $\beta$ 11 est fusionnée en N-Terminale à Tom20   | pMDC32      |
| pAM588                 | La Split GFP partie $\beta$ 11 est fusionnée en N-Terminale à la GAPDH  | pMDC32      |
| pAM602                 | La Split GFP partie $\beta$ 1-10 est fusionnée en N-Terminale à la RPL18  | pMDC32      |
| pAM495                 | MS2 protein in fusion with GFP  | pB7FWG2     |
| pFLAG-RPL18            | FLAG-RPL18  |             |
| Cellules de mammifères |   |             |
| pNG07                  | La BirA* est fusionnée en C-terminale de la GFP   | pMSCV_puro  |
| pNG09                  | La BirA* est fusionnée en N-terminale de mCLUH (souris)   | pMSCV_puro  |
| pNG10                  | Le Tag 3*HA est fusionné en N-terminale de mCLUH (souris)   | pMSCV_puro  |
| pNG12                  | plasmide pour le Tag endogène de mCLUH avec la BirA* en N-Terminale chez les cellules de souris   | pUC19       |
| pNG13                  | plasmide pour le Tag endogène de mCLUH avec le tag 3*HA en N-Terminale chez les cellules de souris  | pUC19       |
| ARNg3                  | Plasmide contenant la protéine Cas9 et un ARNg ciblant l'exon 3 de CLUH chez l'Homme (induction d'un KO avec ARNg4)                                   | pX459 (V2)  |
| ARNg4                  | Plasmide contenant la protéine Cas9 et un ARNg ciblant l'intron 3 de CLUH chez l'Homme (induction d'un KO avec ARNg3)                                 | pX459 (V2)  |
| ARNg5                  | Plasmide contenant la protéine Cas9 et un ARNg ciblant l'exon 3 de mCLUH chez la souris (induction d'un KO avec ARNg6)                                | pX459 (V2)  |
| ARNg6                  | Plasmide contenant la protéine Cas9 et un ARNg ciblant l'intron 3 de mCLUH chez la souris (induction d'un KO avec ARNg5)                              | pX459 (V2)  |
| ARNg7                  | Plasmide contenant la protéine Cas9 et un ARNg ciblant l'exon 4 de mCLUH chez la souris (induction d'un KO avec ARNg8)                                | pX459 (V2)  |
| ARNg8                  | Plasmide contenant la protéine Cas9 et un ARNg ciblant l'intron 6 de mCLUH chez la souris (induction d'un KO avec ARNg7)                              | pX459 (V2)  |
| sgRNA1                 | Plasmide contenant la protéine Cas9 et un ARNg ciblant l'ATG de mCLUH chez la souris pour les tag endogènes de CluH avec 3*HA ou BirA* en N-terminale | pX459 (V2)  |
| sgRNA2                 | Plasmide contenant la protéine Cas9 et un ARNg ciblant l'ATG de mCLUH chez la souris pour les tag endogènes de CluH avec 3*HA ou BirA* en N-terminale | pX459 (V2)  |
| pNG81                  | Le Tag 3*HA est fusionné en N-terminale de CLUH (humaine)   | pLenti-EF1a |
| pNG83                  | La GFP est fusionnée en N-terminale de KNSTRN (humaine)   | pLenti-EF1a |
| pNG84                  | La GFP est fusionnée en N-terminale de SPAG5 (humaine)  | pLenti-EF1a |
| pNG85                  | La GFP est fusionnée en N-terminale de CLUH (humaine)   | pLenti-EF1a |

**Table 3 : Liste des plasmides utilisés pour la transformation des plantes et des cellules de mammifères.**

ng du clone d'entrée et 1  $\mu\text{L}$  de Gateway<sup>®</sup> LR Clonase<sup>®</sup> II Enzyme mix (Invitrogen). Après une incubation d'une heure à température ambiante, 2 ng de protéinase K (ThermoFisher) sont ajoutés et le mix est incubé 10 minutes à 37°C. Ce mix est ensuite utilisé pour la transformation de bactéries TOP10 (paragraphe 2.1.1.). Les différents plasmides obtenus par clonage utilisés par la suite sont présentés dans la table 3.

#### **2.3.4. Clonage par la technologie Gibson.**

Le clonage Gibson est basé sur l'assemblage de différents fragments d'ADN qui ont la particularité de posséder des extrémités d'homologie avec les autres fragments auxquelles ils vont s'assembler (Gibson et al., 2009).

La première étape consiste à amplifier les fragments d'intérêt par PCR en ajoutant des extrémités d'homologies de la même manière que dans le paragraphe 2.3.3.1. Les différents fragments d'ADN sont rassemblés à quantité équimolaire (les quantités sont déterminées à partir de 150 ng du plasmide) dans un volume de 5  $\mu\text{L}$  puis incubés 1h à 50°C en présence de 15  $\mu\text{L}$  de **mix Gibson**. Le produit de cet assemblage Gibson peut directement être utilisé pour la transformation de bactéries (paragraphe 2.1.1.). Les différents plasmides obtenus par clonage et utilisés par la suite sont présentés dans la table 3.

**Mix Gibson** : 0,5625 U T5 Exonucléase (NEB), 300 U Taq Ligase (NEB), 1,875 U Phusion polymérase (Thermoscientific), 0,5 M Tris-HCl pH 7.5, 50 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM dNTP, 50 mM DTT, 250 g/L PEG-8000 Ultrapure et 3,3 g/L NAD.

#### **2.3.5. Criblage de colonies par PCR.**

Le criblage consiste à vérifier la présence du fragment d'ADN d'intérêt dans un vecteur par réaction de PCR directement à partir de colonies bactériennes. Les conditions de PCR utilisées sont celles décrites dans le paragraphe 2.3.2. Les bactéries provenant d'une colonie sont transférées directement dans ce milieu PCR à l'aide d'un cure-dent. La première étape de dénaturation de 5 minutes à 95°C suffit à lyser les bactéries et à libérer l'ADN.



### **2.3.6. Préparation de l'ADN plasmidique.**

L'ADN plasmidique est extrait et purifié à l'aide des kits de minipréparation Nucleospin® Plasmid easypure (Macherey-Nagel) et de midipréparation NucleoSnap® plasmid midi (Macherey-Nagel) selon les instructions du fournisseur. Ils utilisent le principe de lyse alcaline (Birnboim and Doly, 1979) suivi d'une purification sur colonne. Les termes mini et midi désignent le volume de départ de la culture: 50 mL pour une midipréparation, contre 4 mL pour une minipréparation.

### **2.3.7. Séquençage de l'ADN.**

Le séquençage de l'ADN a été réalisé à la plateforme de séquençage de l'institut (M. Alioua-service de séquençage de l'IBMP) avec l'appareil « applied Biosystems 373 DNA sequencer » (Perkin Elmer). La méthode utilisée est basée sur la technique de Sanger (Sanger et al., 1977). Pour cela, 25 à 50 ng de produit PCR ou 500 à 600 ng de plasmides sont envoyés au service de séquençage en présence de 5 pmole d'amorce oligonucléotidique.

## **2.4. Techniques relatives à l'ARN.**

### **2.4.1. Extraction des ARN.**

Les extractions d'ARN sont réalisées à partir de 100 mg de poudre de plantules obtenue par broyage dans de l'azote liquide, à partir de culot mitochondriaux (paragraphe 2.6.) ou à partir d'un culot cellulaire de 2-10 millions de cellules. L'extraction des ARN utilise le Tri Reagent® (MRC) selon le protocole du fournisseur. La concentration d'ARN est ensuite quantifiée par Nanodrop. Les ARN sont ensuite analysés sur gel d'agarose 1,5 % pour vérifier la qualité de l'échantillon.



### **2.4.2. Traitement DNase.**

Pour purifier l'échantillon d'ARN de ses contaminants ADN, la digestion de ces derniers est réalisée dans un volume final de 200 µL en présence de 8 unités de DNase RQ1 (Promega), d'un dixième du volume de tampon DNase RQ1 10 X (Promega) et de 10 U de RNase Out (Invitrogen). Suite à une incubation de 30 minutes à 37°C, 20 µL de **solution STOP** sont ajoutés à l'extrait et le tube est incubé 10 minutes à 65°C pour arrêter la digestion. Une précipitation éthanolique en présence de 0,1 volume d'acétate de sodium 3 M et 2,5 V d'éthanol 100 % pendant au moins 30 minutes à -20°C puis une centrifugation à 16 000 g pendant 30 minutes à 4°C permet la concentration des ARN purifiés dans un culot qui est ensuite re-suspendu dans de l'eau et dosé au Nanodrop.

**Solution STOP** : 20 mM EGTA pH8.

### **2.4.3. Rétrotranscription des ARN.**

Le milieu de rétro-transcription renferme 65 ng d'ARN/µL, 2,5 mM d'oligoDT, 5 ng/µL d'hexamère aléatoire (Fermentas), 0,5 mM de chaque dNTP (dATP, dCTP, dGTP et dTTP), 5 mM de DTT (Invitrogen), 1 X de tampon First-Strand (250 mM Tris-HCl pH8,3, 375 mM KCl, 15 mM MgCl<sub>2</sub>, Invitrogen), 0.4 U/µL de RNase Out (Invitrogen) et 10 U/µL de reverse transcriptase Superscript IV (Invitrogen). Dans un premier temps, l'ARN, les dNTP, l'oligoDT et les hexamères aléatoires sont mélangés et incubés 5 minutes à 65°C puis 5 minutes à 4°C. Le tampon First-Strand, le DTT et la RNase Out sont ensuite ajoutés à l'échantillon avant d'ajouter la SuperScript IV au 19/20<sup>ème</sup> de l'échantillon (échantillon RT+) et que de l'eau soit ajoutée au 1/20<sup>ème</sup> restant (échantillon RT-) qui servira de contrôle négatif. Tous les tubes (RT+ et RT-) sont ensuite placés dans un thermocycleur (Biometra® T3000) et soumis à un cycle de 10 minutes à 25°C, 10 minutes à 50°C puis 10 minutes à 80°C.

| Nom   | Amorce oligonucléotidique pour les qPCR |                             |
|---|---|-----------------------------|
| <i>Amorce pour les RT-qPCR sur Arabidopsis thaliana</i> |   |                             |
| Cox 1   | Amorce sens                             | GTAGCTGCGGTGAAGTAGGC        |
|   | Amorce antisens                         | CTGCGTGGATTCCGGTATCAT       |
| VDAC3 long  | Amorce sens                             | TCCATATCTTTTACTTGGTTCTCTCTT |
|   | Amorce antisens                         | GGGAACTCCAAATGGAACAA        |
| GAPDH   | Amorce sens                             | AGGCTGCTGCTCACTTGAA         |
|   | Amorce antisens                         | AACATGGGCGCATCTTTG          |
| RPL2  | Amorce sens                             | CCGAAGACGGATCAAGGTAA        |
|   | Amorce antisens                         | CGCAATTCATCACCATTITG        |
| VDAC3 CDS debut   | Amorce sens                             | CACTGAAATCGGCAAAAAGG        |
|   | Amorce antisens                         | TGTTCCCGTTGTAGTGATCG        |
| RPL12 cyto  | Amorce sens                             | GACGTGTACGTCGGAGTAACC       |
|   | Amorce antisens                         | GACCGATTTTGGGAGCTAGA        |
| RPS3  | Amorce sens                             | CCGATTCGGTAAGACTTGG         |
|   | Amorce antisens                         | AGCCGAAGGTGAGTCTCGTA        |
| COB   | Amorce sens                             | TGCCGGAATGGTATTTCTTA        |
|   | Amorce antisens                         | GCCAAAAGCAACCAAAACAT        |
| NAD4  | Amorce sens                             | AATACCCATGTTCCCGAAG         |
|   | Amorce antisens                         | TGCTACCTCCAATTCCCTGT        |
| COX2  | Amorce sens                             | TCCGATGAGCAGTCACTCAC        |
|   | Amorce antisens                         | AATAAACGTGATTGACCCAATTCT    |
| 18S MT  | Amorce sens                             | CATGCAAGTCGAACGTTGTT        |
|   | Amorce antisens                         | CCTTGAGCTAGGAGCCTCTTT       |
| <i>Amorce pour les qPCR sur Arabidopsis thaliana</i>    |   |                             |
| ARNr 18S (mito)   | Amorce sens                             | CCTTGAGCTAGGAGCCTCTTT       |
|   | Amorce antisens                         | CATGCAAGTCGAACGTTGTT        |
| cox2 (mito)   | Amorce sens                             | AATAAACGTGATTGACCCAATTCT    |
|   | Amorce antisens                         | TCCGATGAGCAGTCACTCAC        |
| Actin (nucléair)  | Amorce sens                             | CATCTTGGCCTCCCTCAGTA        |
|   | Amorce antisens                         | GAGTAAACAAGTGATGGGACTGTG    |
| ndhH (chloro)   | Amorce sens                             | TCCGGATAAACCCCAATTTA        |
|   | Amorce antisens                         | AGAACGGGTTGAAGGAGTTG        |
| ARNr 16S (chloro)                                       | Amorce sens                             | GATCGGAAAGAACCAACCG         |
|   | Amorce antisens                         | CCCCTAGCTTTCGTCTCTCA        |
| ARNr 18S (nucléair)                                     | Amorce sens                             | AAACGGCTACCACATCCAAG        |
|   | Amorce antisens                         | ACTCGAAAGAGCCCGGTATT        |
| <i>Amorce pour les RT-qPCR sur Homo sapiens</i>         |   |                             |
| eIF5a   | Amorce sens                             | AGATCGTCGAGATGTCTACTTCG     |
|   | Amorce antisens                         | TTGACGGGCAGATATCTTCATA      |
| IMMT  | Amorce sens                             | AACAGCCTGCCTCACAACCTC       |
|   | Amorce antisens                         | TGAGCCGCTTCTGTAGGTG         |
| HSPA9   | Amorce sens                             | AAGAAGACCGGCGAAAGAA         |
|   | Amorce antisens                         | TCAGCAGGTAATTGGTCCTTG       |
| HSPD1 (2 pics)  | Amorce sens                             | AATGAACGGCTTGCAAACT         |
|   | Amorce antisens                         | TCACTTGCCACCAACCTT          |
| GAPDH   | Amorce sens                             | AGCCACATCGCTCAGACAC         |
|   | Amorce antisens                         | GCCCAATACGACCAATCC          |
| ATP5A1  | Amorce sens                             | TGCTATTGGTCAAAGAGATCCA      |
|   | Amorce antisens                         | GTAGCCGACACCACAATGG         |
| ALDH18A1  | Amorce sens                             | AGAAATGGCGCGATCTGGAGGA      |
|   | Amorce antisens                         | TCTCATCACGCTGGTCCGTCAA      |
| VWA8  | Amorce sens                             | AGCTTGTGGCTGCCTTTGGAGA      |
|   | Amorce antisens                         | CGAACTACACTGGAGAGACCTTC     |
| IARS2   | Amorce sens                             | ACTAGTGAACAACACGGCA         |
|   | Amorce antisens                         | GGCCACCAACCTCAGATAAGA       |
| MTCO2   | Amorce sens                             | AACCAAACCACTTTCACCGC        |
|   | Amorce antisens                         | CGATGGGCATGAACTGTGG         |
| SUB1  | Amorce sens                             | CGTCACTCCGGTTCTCTGT         |
|   | Amorce antisens                         | TGATTTAGGCATCGCTTCGC        |
| HSPD1 new   | Amorce sens                             | ACTCGGAGCGGGAAGAAA          |
|   | Amorce antisens                         | GGTAACCGAAGCATTCTCG         |
| LRPPRC  | Amorce sens                             | ATCCGACATGGTTACTGGTGGC      |
|   | Amorce antisens                         | GTGTCAAGGACAGCAGATGAATC     |
| GLS   | Amorce sens                             | CAGAAGGCACAGACATGGTTGG      |
|   | Amorce antisens                         | GGCAGAAACCACCATTAGCCAG      |
| NDUFS1  | Amorce sens                             | GAGTGGACTCTGACACCTTATGC     |
|   | Amorce antisens                         | ACAACATCTGCCTCTCCACACC      |

**Table 4 : Liste des amorces oligonucléotidique utilisées en qPCR.**

#### **2.4.4. qPCR.**

Les réactions de qPCR sont réalisées à partir de trois répliques biologiques pour chaque condition d'extraction d'ARN. Les ADN complémentaires (ADNc) servant de matrice ont été réalisés selon le protocole décrit dans le paragraphe 2.4.3., et la réaction de qPCR a été effectuée au moins trois fois par matrice (répliques techniques). Chaque mélange de qPCR est réalisé dans un volume final de 10 µL et déposée dans un puit d'une plaque 384 puits. Le milieu réactionnel contient 1 µL de matrice, 0,5 µM de chacune des deux amorces (sens et antisens), 1 X du mélange LightCycler480® SYBR Green I Master (Roche) renfermant le tampon, les dNTPs et la FastStart Taq DNA polymérase. La réaction de PCR ainsi que le suivi de la fluorescence à 530 nm au cours des cycles d'amplification sont réalisés dans le LightCycler480® (Roche). Après la dénaturation de 7 minutes à 95°C, les échantillons sont soumis à 45 cycles d'amplification de 15 secondes à 95°C, 15 secondes à 60°C et 15 secondes à 72°C. A la fin de l'amplification, une courbe de dénaturation des produits est réalisée. Le logiciel LightCycler480® Software version 1.5 (Roche) permet ensuite, à partir des courbes d'amplification, de déterminer les cycles seuil (Ct) pour chaque échantillon par la méthode du maximum des dérivées secondes. Les courbes de dénaturation permettent de mettre en évidence la présence d'un ou de plusieurs produits d'amplification. Les couples d'oligonucléotides utilisés pour les différentes qPCR sont présentés dans la table 4. Pour chaque couple de qPCR, les efficacités d'amplification ont été déterminées selon la méthode des dilutions en série.

### **2.5. Techniques relatives aux protéines.**

#### **2.5.1. Extraction des protéines.**

##### **2.5.1.1. Plantes.**

Environ 100 mg de poudre de plantes (plantules, feuilles, ...) ou un culot d'au moins 50 µg de mitochondries sont utilisés pour réaliser l'extraction. Les poudres de plantes sont réalisées avec du matériel congelé dans de l'azote liquide, que ce soit par broyage dans un mortier, ou via l'utilisation du silamate qui broie le matériel végétal grâce à l'agitation pendant 8 secondes d'un tube contenant 100 µL de billes de 2 mm de diamètre et le matériel végétal à broyer. 100µL de **tampon d'extraction protéique ARA** est ajouté aux échantillons avant de leur faire subir deux cycles de vortex 10 secondes et chauffage 10 minutes à 65°C. Par la suite,



une centrifugation à 10 000 g, 10 minutes à 4°C est réalisée et le surnageant est transféré dans un nouveau tube. La concentration en protéines est ensuite déterminée par la méthode de Bradford.

Cette méthode est basée sur la modification de la longueur d'onde d'absorption du bleu de Coomassie G-250 en milieu acide après sa fixation sur les acides aminés (595 nm) (Bradford, 1976). 1 mL de réactif de Bradford 1 X et 1 à 10 µL d'extrait protéique à quantifier sont mélangés, et l'absorbance à 595 nm est mesurée après 5 minutes d'incubation à température ambiante. Cette mesure de DO permet de déterminer la quantité de protéines présentes en se référant à une gamme étalon de BSA établie avec des quantités connues. Il est à noter que les échantillons contenant des détergents tels que le SDS ou le Triton X-100 ne peuvent pas être quantifiés par cette méthode car ces derniers interfèrent avec le réactif de Bradford. Dans ce cas, un dosage BCA est réalisé (paragraphe 2.5.1.2.).

**Tampon d'extraction protéique ARA** : 50 mM Tris-HCl pH6,8, 8 M Urée, 1 mM EDTA et 5 % β-Mercaptoéthanol(v/v).

#### **2.5.1.2. Cellules de mammifères.**

Le culot cellulaire issu d'une boîte B10 lavé au PBS est utilisé pour réaliser l'extraction (paragraphe 2.2.2.2.). 100µL de **tampon RIPA** est ajouté aux échantillons avant de les incuber 15 minutes dans la glace. Deux cycles de sonications de 10 secondes à 10 % sont réalisés pour extraire les protéines et fragmenter l'ADN. Une centrifugation à 11 000 g pendant 10 minutes à 4°C est réalisée pour éliminer les débris cellulaires. Ce surnageant protéique est ensuite transféré dans un nouveau tube avant d'être dosé par la méthode BCA.

Cette méthode est basée sur la réduction des ions Cu<sup>2+</sup> et Cu<sup>+</sup> en milieu alcalin. L'acide biconchoninique est un réactif chromogène hautement spécifique pour le Cu<sup>+</sup> ce qui forme un complexe pourpre ayant une absorption maximale à la longueur d'onde de 562 nm (Smith et al., 1985). Le dosage BCA est réalisé à partir du kit Pierce TM BCA Protein Assay® (Thermo Scientific) et selon les instructions du fournisseur. Cette mesure de DO permet de déterminer



la quantité de protéines présentes dans l'échantillon, en se référant à une gamme étalon de BSA établit avec des quantités connues selon les instructions du fournisseur.

**Tampon RIPA** : 50 mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl, 1 % NP40 (v/v), 0,5 % Sodium déoxycholate (p/v), 0,1 % SDS (v/v) et protease inhibitor cocktail EDTA free (Roche).

### **2.5.2. Electrophorèse en conditions dénaturantes (SDS-PAGE).**

La séparation des protéines est réalisée par migration électrophorétique en gel de polyacrylamide en conditions dénaturantes. Les mailles de la matrice sont définies par le rapport polyacrylamide/N,N' méthylène bisacrylamide (37,5/1). Le gel (8cm x 12cm x 0,1cm) comporte 2 parties : un **gel de séparation** et un **gel de concentration** de 1,5 cm de hauteur au-dessus. Les protéines, additionnées de **tampon de charge 1 X**, sont chargées sur le gel. La migration s'effectue dans du **tampon de migration** sous ampérage constant de 35 mA pendant le temps nécessaire pour que le front de migration bleu sorte du gel.

**Gel de séparation** : 10 à 15 % Acrylamide/bisacrylamide selon la taille des protéines à séparer, 100 mM Tris-HCl pH8.8, 0,1 % SDS (v/v), APS 0,1 % (p/v) et TEMED 0,05 % (v/v).

**Gel de concentration** : 5 % Acrylamide/Bisacrylamide, 100 mM Tris-HCl pH6.8, 0,1 % SDS (v/v), APS 0,1 % (p/v) et TEMED 0,05 % (v/v).

**Tampon de charge 1 X** : 20 mM tris-HCl pH6.8, 2 % Glycérol (v/v), 0,4 % SDS (v/v), 0,05 % Bleu de Bromophénol (p/v) et 0,6 %  $\beta$ -Mercaptoéthanol (v/v).

**Tampon de migration** : 25 mM Tris-HCl pH8.3, 250 mM Glycine et 0,1 % SDS(v/v).



### **2.5.3. Immunoblot de type Westernblot.**

Cette technique consiste à révéler une protéine particulière à l'aide d'anticorps spécifiquement dirigés contre cette protéine.

#### **2.5.3.1. Transfert des protéines sur membrane.**

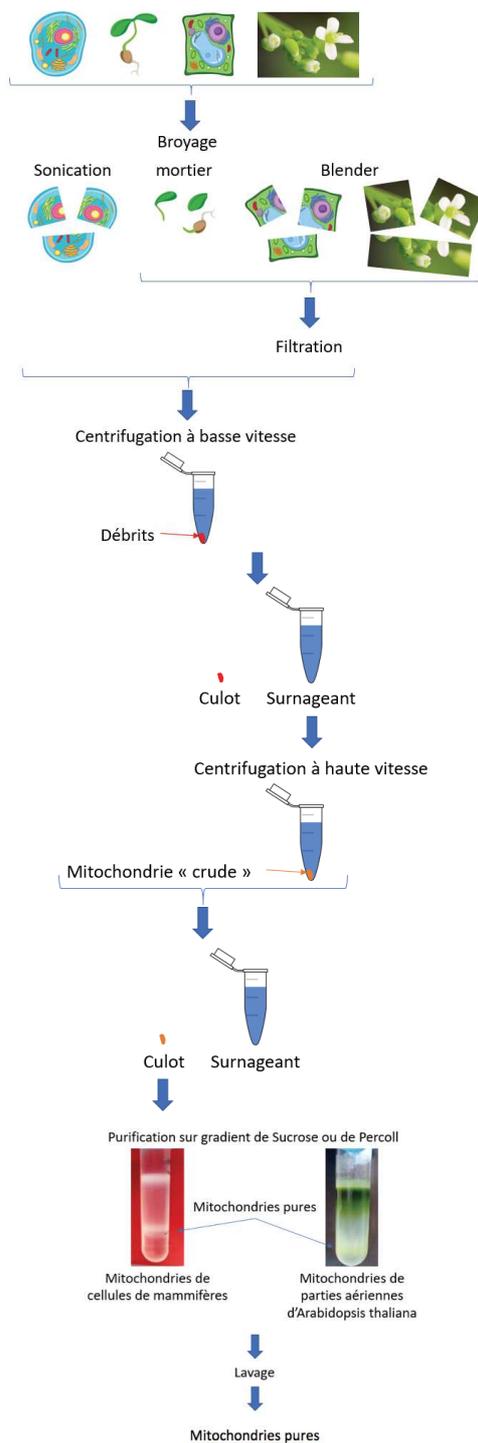
Après séparation sur un gel de polyacrylamide, les protéines sont transférées sur une membrane de PVDF Immobilon-P 0,45 µm (Millipore) que l'on active par de l'éthanol 100 %. L'ensemble est disposé en « sandwich » entre 4 feuilles de papier Whatman imbibées avec du **tampon de transfert** et placé dans une cuve à électrotransfert liquide (BioRad). Gel et membrane sont placés de sorte que les protéines se fixent sur la membrane en migrant de la cathode à l'anode. Ce transfert est effectué en voltage constant à 100V pendant 1 heure.

**Tampon de transfert** : 25 mM Tris-HCl pH8,3, 250 mM Glycine, 0,1 % SDS(v/v) et 20 % Ethanol.

#### **2.5.3.2. Fixation des anticorps.**

La membrane est équilibrée dans du **TBS-Tween-lait** 5 % (p/v) pour saturer les sites aspécifiques de fixation par une incubation de 1 heure sous agitation. L'anticorps primaire spécifique est ajouté dans du **TBS-Tween-Lait** 5 % et incubé 1h à température ambiante ou toute la nuit à 4°C sous agitation en présence de la membrane. La membrane est ensuite lavée 3 fois 10 minutes à température ambiante et sous agitation avec du **TBS-Tween**. Par la suite, les anticorps secondaires (anticorps de chèvres dirigés contre les immunoglobulines de lapins ou de souris (GAR ou GAM) ou des anticorps d'âne dirigés contre des immunoglobuline de chèvres (DAG)) sont ajoutés à du **TBS-Tween-Lait** 5 % à la dilution 1/10 000 et incubé 1h à température ambiante sous agitation. Enfin la membrane est lavée 3 fois pendant 10 minutes sous agitation à température ambiante dans du **TBS-Tween**.

**TBS-Tween** : 20 mM Tris-HCl pH 7,4, 150 mM NaCl et 0,1 % Tween 20(v/v).



**Figure 24 : Isolement de mitochondries.**

Le matériel est broyé avant d'éliminer les débris par une centrifugation à basse vitesse. Une centrifugation à haute vitesse permet d'obtenir une fraction enrichie en mitochondries. Ces mitochondries sont ensuite purifiées sur gradient puis lavées.

### **2.5.3.3. Révélation de la fixation des anticorps.**

Les anticorps secondaires sont couplés à la peroxydase. La révélation s'effectue avec un kit ECLLumi Light<sup>plus</sup> (Roche) ou un kit ECL Western blotting Analysis system (Amersham) qui consiste en une réaction de chimioluminescence catalysées par la peroxydase et produisant l'émission de photons au lieu de la fixation des anticorps secondaires. Dans la pratique, les conditions préconisées par le fournisseur sont suivies et l'émission chimioluminescente est révélée par autoradiographie ou par chimioluminescence sur le Fusion®.

### **2.5.3.4. Coloration des protéines et séchage des membranes.**

Les protéines transférées sont visualisées par coloration avec une **solution de coloration** puis décolorées au **tampon de décoloration** avant de prendre une photo au scanner. Le colorant est totalement éliminé par lavage prolongé au méthanol 100 %.

**Solution de coloration** : 0,25 % Bleu de Coomassie (p/v), 50 % Méthanol (v/v) et 7 % Acide Acétique (v/v).

**Tampon de décoloration** : 50 % Méthanol (v/v) et 7 % Acide Acétique (v/v).

## **2.6. Isolement de mitochondries.**

L'isolement des mitochondries permet d'enrichir et de purifier les mitochondries à partir de cellules ou de tissus végétaux. En fonction du matériel, le protocole diffère tout en restant similaire dans les différentes étapes de purification (voir figure 24).



### **2.6.1. A partir de plantules d'*Arabidopsis thaliana*.**

En chambre froide, des plantules de 8 jours provenant de 6 erlens (6X80 mL de culture) sont broyées dans du **tampon de broyage plantules** (150mL pour 30 g de plantules) puis filtrées sur Miracloth. Par la suite, le filtrat ainsi obtenu est centrifugé à trois reprises (les deux premières fois 5 minutes, 4°C à 1 600 g puis à 2000 g et la troisième fois à 17 200 g, 20 minutes à 4°C). Le culot de mitochondrie est repris dans 1 mL de **tampon de lavage 1 X plantules + BSA** 2 g/L avec un pinceau avant de répartir l'échantillon sur deux gradients de Percoll continu. Ces gradients ont été obtenus en mélangeant deux solutions de gradient: une **solution de gradient lourde plantule** et une **solution de gradient légère plantule**. Les gradients chargés sont centrifugés à 40 000 g, 40 minutes à 4°C ce qui permet la séparation des mitochondries et des chloroplastes contaminants. Les mitochondries (jaunâtre) présentes au fond du gradient sont distribuées en fraction de 500 µL et lavées avec 1,5mL de **tampon de lavage 1 X plantules + 2 g/L BSA** puis centrifugées à 12 000 rpm, 10minutes à 4°C. Les culots sont ensuite rassemblés dans différentes fractions de 500 µL qui sont lavés une nouvelle fois avec 1,5mL de **tampon de lavage 1 X plantules** puis centrifugées. Ce lavage est répété jusqu'à regroupement de toutes les mitochondries dans un seul tube. Un dosage Bradford est ensuite réalisé (paragraphe 2.5.1.1.) et les mitochondries sont aliquotées en tubes de 1 mg de protéines mitochondriales. Une dernière centrifugation à 11 000 rpm, 8 minutes à 4°C est ensuite réalisée afin de stocker les mitochondries sous forme de culot à -80°C.

**Tampon de broyage plantules** : 300 mM sucrose, 25 mM tétrasodium pyrophosphate, 2 mM EDTA, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 % (w/v) PVP-40, 3,5 g/L ascorbate de sodium et 2,5 g/L Cystéine à pH 7,5.

**Tampon de lavage 1 X plantules** : 300 mM Sucrose et 10 mM MOPS à pH 7,5.

**Solution de gradient lourde plantule** : 28 % Percoll, 4,4 % PVP-40, 600 mM Sucrose, 20 mM MOPS à pH 7.5 et 2 g/L BSA.

**Solution de gradient légère plantule** : 28 % Percoll, 600 mM Sucrose, 20 mM MOPS à pH 7.5 et 2 g/L BSA.



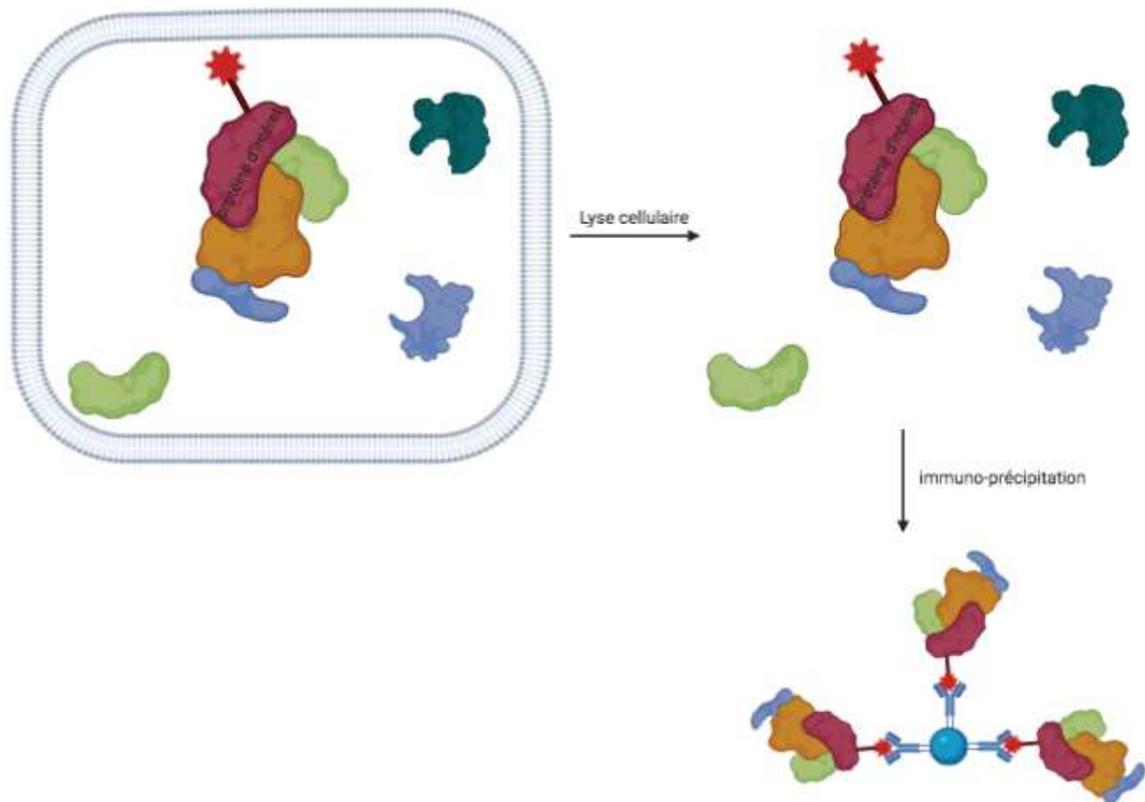
### **2.6.2. A partir des inflorescences de plantes *Arabidopsis thaliana*.**

Après la récolte, des inflorescences de 6 plateaux de 60 plantes d'*Arabidopsis thaliana* sont broyées dans du **tampon de d'extraction fleurs ARA** (150mL pour 30g de matériel végétal). Le broyage utilise un blender et passe par 2 cycles de broyage de 1 fois 5 secondes à haute vitesse et 2 fois 5 secondes à basse vitesse avec des pauses de 30 secondes. L'échantillon est ensuite filtré sur 2 couches de Miracloth, puis centrifugé à 2 reprises (une fois à 1 500 g, 5 minutes à 4°C et une fois à 17 700 g, 10 minutes à 4°C). Ce culot est ensuite repris dans 5 mL de **tampon de lavage fleurs ARA** puis passé au Potter A 15 mL pour dissocier les agrégats avant d'être transféré dans un nouveau tube. L'échantillon est ensuite centrifugé de nouveau deux fois (2 000 g, 5 minutes à 4°C puis 20 000 g, 10 minutes à 4°C). Ce culot est repris dans 500 µL de **tampon de lavage fleurs ARA** et passé au Potter A 2 mL pour dissocier les agrégats. L'échantillon peut ensuite être déposé sur le gradient discontinu 50% (5 mL) /25% (25 mL) /18% (5 mL). Ce gradient a été réalisé à partir de solution 50 %, 25 % et 18 % de Percoll dans du **tampon de gradient fleurs ARA 1 X**. Les gradients sont centrifugés à 40 000 g, 45 minutes à 4°C. Les mitochondries (jaunâtre) présentes au fond du gradient sont distribuées en fraction de 500 µL et lavées avec 1,5 mL de **tampon de lavage fleurs ARA** puis centrifugées à 12 000 rpm, 10 minutes à 4°C. Les culots sont ensuite rassemblés dans différentes fractions de 500 µL qui sont lavées une nouvelle fois avec 1,5 mL de **tampon de lavage fleurs ARA** puis centrifugées. Ce lavage est répété jusqu'à regroupement de toutes mitochondries dans un seul tube. Un dosage Bradford est ensuite réalisé (paragraphe 2.5.1.1.) et les mitochondries sont aliquotées en tubes de 1 mg de protéines mitochondriales. Une dernière centrifugation à 11 000 rpm, 8 minutes à 4°C est ensuite réalisée afin de stocker les mitochondries sous forme de culot à -80°C.

**Tampon de d'extraction fleurs ARA** : 0,3 M Sucrose, 15 mM Tetrasodium pyrophosphate, 2 mM EDTA, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1 % PVP-40, 10 g/L BSA, 4 g/L Acide Ascorbique et 0,9 g/L Cystéine à pH7,5.

**Tampon de lavage fleurs ARA** : 0,3 M Sucrose, 10 mM MOPS et 1 mM EGTA à pH7,2.

**Tampon de gradient fleurs ARA 1 X** : 0,3 M Sucrose et 10 mM MOPS à pH7,2.



**Figure 25 : Principe de la Co-IP.**

La protéine d'intérêt fusionnée à une étiquette forme, *in vivo*, des complexes protéiques. Lors de la Co-IP, les cellules sont lysées de manière à maintenir les complexes protéiques associés. Par la suite, une immuno-précipitation spécifique de l'étiquette utilisée permet la purification des complexes comprenant la protéine d'intérêt.

### **2.6.3. Cellules de mammifères.**

Les mitochondries de mammifères sont obtenues suivant le protocole de Williamson et al. (Williamson et al., 2015). Les mitochondries « pures » ou « crudes » (avant gradient) sont conservées à -80°C sous forme de culot.

### **2.7. Isolement de polysomes sur cellules de mammifères.**

Un culot cellulaire (obtenu à partir d'une boîte B10 lavé au PBS, voir paragraphe 2.2.2.2.) ou un culot de mitochondries « crudes » (obtenu suivant le paragraphe 2.6.3.) sont utilisés pour extraire les polysomes. Les culots cellulaires sont obtenus avec du cycloheximide (CHX) à 100 µg/mL (dans le PBS). Le CHX est maintenu dans chacun des tampons utilisés. Le protocole utilisé est issu de Pringle et al. (Pringle et al., 2019) Le gradient de polysome est analysé et divisé en 24 fractions grâce à un fractionneur BioComp selon les instructions du fournisseur.

Les différentes fractions obtenues sont dissoutes dans 500 µL de TRI Reagent® (MRC) et l'extraction d'ARN est réalisée selon le paragraphe 2.4.1. La phase organique est ensuite utilisée pour extraire les protéines selon le protocole du fournisseur.

Les échantillons ainsi obtenus sont utilisés pour des analyse par RT-qPCR (fraction ARN, voir paragraphe 2.4.3. et 2.4.4.) et par western blot (fractions protéiques, voir paragraphe 2.5.2. et 2.5.3.).

### **2.8. Recherche de partenaires protéiques.**

#### **2.8.1. Co-Immuno-précipitation.**

La Co-Immuno-précipitation (ou Co-IP) permet la purification d'une protéine d'intérêt et des protéines en complexe avec cette dernière, grâce à la reconnaissance spécifique d'une étiquette fusionnée à la protéine d'intérêt (voir figure 25). Cette technique permet de mettre en évidence les partenaires protéiques associés à la protéine d'intérêt ce qui permet la caractérisation des complexes protéiques comprenant la protéine intérêt.



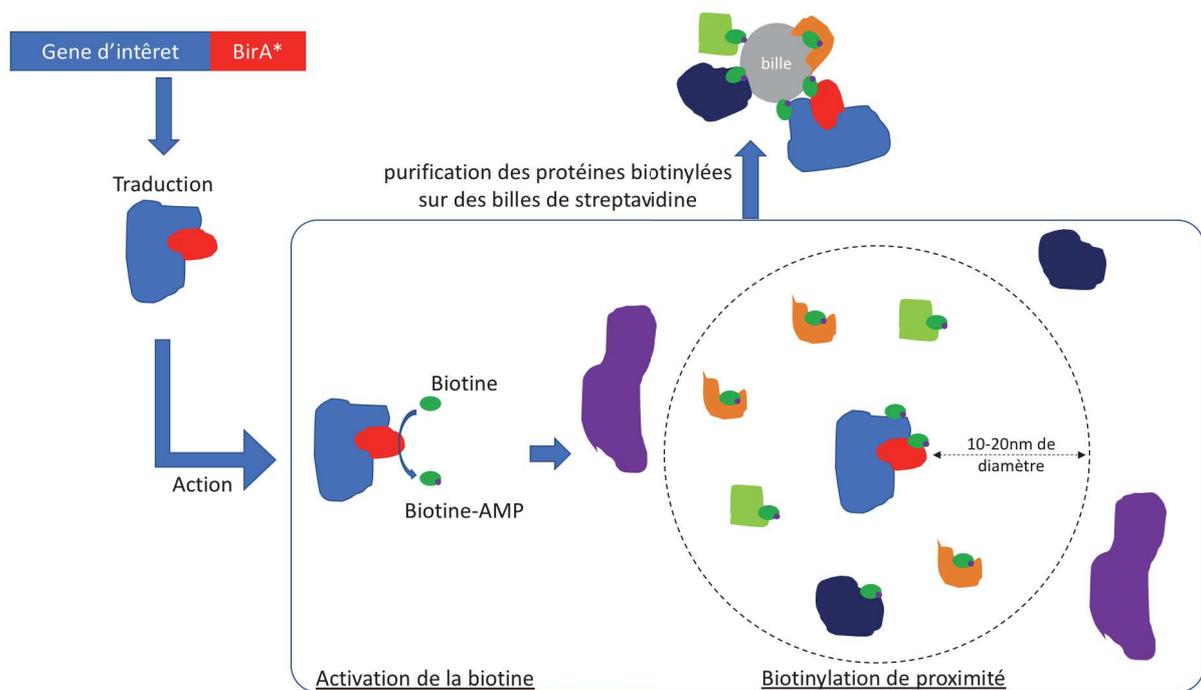
### 2.8.1.1. Plantes.

Des plantes friendly-GFP, GFP-friendly ou RPL18-FLAG sont comparées à des plantes wt (inflorescence) ou MS2-GFP (plantules) dans des fonds Col0. Les échantillons sont repris dans 1 mL de **tampon de lyse IP**. 30 minutes d'incubation à 4°C sous 5 rpm d'agitation permettent d'extraire les protéines. Une centrifugation à 16 000 g, 10 minutes à 4°C permet de récupérer le surnageant contenant les protéines. Les protéines sont dosées et les échantillons sont dilués à une concentration finale de 1 mg/mL de protéines dans du **tampon de Lyse IP**. 50 µL de billes magnétiques anti-GFP ou anti-FLAG (MILTENYI Biotec) sont ensuite ajoutées à 1 mg de protéines et incubées 30 minutes à 4°C et sous 5 rpm d'agitation afin de fixer sur les billes les complexes protéiques associés à notre protéine d'intérêt fusionné à un Tag (GFP pour friendly et FLAG pour RPL18) avant de passer par fraction de 200 µL sur des colonnes M MACS fixées sur des rack magnétiques MACS (MILTENYI Biotec) préalablement équilibrées avec 200 µL de **tampon de lyse IP**. Les colonnes sont ensuite lavées 4 fois avec 200 µL de **tampon de lavage IP** et 1 fois avec 200 µL de Tris-HCl pH7.2 50 mM. Pour finir, les protéines fixées à notre protéine de fusion d'intérêt lié à la GFP ou à l'étiquette FLAG sont récupérées via l'ajout de 3 fois 35 µL de **tampon d'élution** chauffé à 95°C. Pour limiter les pertes de protéines, les billes sont récupérées suite à la sortie des colonnes du rack magnétique et l'aspiration des dernier µL de tampon d'élution. Les éluions peuvent ensuite être analysées par westernblot (paragraphe 2.5.2. et 2.5.3.) ou par spectrométrie de masse via l'envoi des échantillons sur la plateforme protéomique de l'IBMC.

**Tampon de lyse IP** : 1 % Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH8, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µg/mL CHX, protease inhibitor cocktail EDTA free (Roche).

**Tampon de lavage IP** : 0,1 % Triton X-100, 50 mM Tris-HCl pH8, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 200 µg/mL CHX, protease inhibitor cocktail EDTA free (Roche).

**Tampon d'élution** : Kit MILTENYI Biotec.



**Figure 26 : Principe du BioID.**

Suite à l'expression de la protéine d'intérêt en fusion avec la biotine ligase muté BirA\*, celle-ci est capable de biotinyler, *in vivo*, toutes les protéines proches de la protéine d'intérêt dans un rayon de 10 à 20 nm. Ces protéines biotinylées peuvent ensuite être purifiées sur des billes de streptavidine ce qui permet de mettre en évidence toutes les interactions stables et transitoires de la protéine d'intérêt.

### **2.8.1.2. Cellules de mammifères.**

Environ 10 millions de cellules sont utilisées par condition. 1 mL de **tampon de lyse** (kit MILTENYI) est ajouté aux cellules avant que celles-ci ne soient récupérées à l'aide d'un « grattoir ». Les échantillons sont incubés 30 minutes à 4°C avec des agitations par inversion de manière occasionnelle avant d'être centrifugés à 10 000 g, 10 minutes à 4°C. 50 µL de billes anti-HA ou anti-GFP (MILTENYI Biotec) sont ensuite ajoutées au surnageant obtenu et incubées 30 minutes à 4°C sous 5 rpm d'agitation pour la fixation des complexes protéiques associés à 3HA-CLUH sur les billes. L'échantillon est ensuite passé par fraction de 200 µL sur des colonnes µMACS (MILTENYI Biotec) préalablement équilibrées avec 200 µL de **tampon de lyse**. Les colonnes sont ensuite lavées 4 fois avec 200 µL de **tampon de lyse** et 1 fois avec **Tris-HCl pH7.2 50mM** (kit MILTENYI). Pour finir, les protéines fixées à notre protéine d'intérêt sont récupérées via l'ajout de 2 fois 35 µL de **tampon d'élution** (kit MILTENYI) chauffé à 95°C. Pour limiter les pertes de protéines, les billes sont aussi récupérées suite à la sortie des colonnes du rack magnétique et l'aspiration des dernier µL de tampon d'élution. Les éluions peuvent ensuite être analysées par westernblot (paragraphe 2.5.2. et 2.5.3.) ou par spectrométrie de masse. L'analyse par spectrométrie de masse est effectuée à la plateforme de Protéomique de l'IBMC à Strasbourg.

### **2.8.2. BioID.**

Le BioID ou Biotin dependant Identification assay se base sur la purification de protéines biotinylées sur bille de streptavidine suite à leur proximité avec la protéine d'intérêt fusionnée à une biotin ligase mutée au niveau de l'arginine 40 qui est remplacé par de l'aspartate (BirA\*). La protéine BirA\* catalyse l'activation de la Biotine en présence d'ATP. Cette biotine activée est ensuite libérée dans l'environnement immédiat de la protéine fusionnée à la BirA\* ce qui permet la biotinylation des résidus Lysines des protéines présentes dans un rayon d'environ 20 nm. (Figure 26) (Kim et al., 2016).



### 2.8.2.1. Plantes.

Des plantules de 8 jours (mise en culture des plantules dans le paragraphe 2.2.1.1.) transformées avec friendly fusionnée en C-terminal avec la Biotine Ligase muté BirA\* sont comparées aux plantules de 8 jours transformées avec la protéine de fusion GFP-BirA\* (contrôle). Au moins 26 heures avant l'expérience, 50  $\mu$ M de Biotine sont ajoutées à l'échantillon. Les plantules sont récupérées puis broyées dans de l'azote liquide avant d'y ajouter du **RIPA** (1 mL pour 250mg de poudre) et d'extraire les protéines par la sonication (2 x 10 secondes à 10%). L'échantillon est ensuite clarifié grâce à une centrifugation à 16 000g pendant 10 minutes à 4°C.

La présence de biotine naturellement produite par la plante ou ajoutée au milieu aboutit à un excès de ce composé incompatible avec l'extraction des protéines biotinyllées (la biotine libre est en compétition avec la biotine liée aux protéines recherchées). Pour éliminer cette biotine excédentaire, la gel filtration est utilisée. L'échantillon (500  $\mu$ L) est déposé sur colonnes G25 nous permettant de récupérer les protéines supérieures à 5 kDa et donc d'exclure la biotine. 100  $\mu$ L de billes magnétiques de streptavidine (Streptavidin Mag Sepharose™, GE Healthcare) sont ajoutées à 1mg de protéines. Ces billes sont préalablement lavées deux fois pendant 5 minutes avec 1,5mL de **RIPA** sous agitation de 15 rpm. Le changement des solutions de lavage se fait via un rack magnétique. Les échantillons sont ensuite incubés toute une nuit à 4°C sous 15 rpm d'agitation. Le lendemain, les billes sont lavées 2 fois 5 minutes sous 15 rpm d'agitation dans 1,5mL de **RIPA**. Il y a ensuite 1 lavage avec 1,5 mL KCl 1M, 1 lavage avec 1,5 mL de Na<sub>2</sub>CO<sub>3</sub> 0,1M, 1 lavage avec 1,5 mL de Urée 2M, Tris-HCl pH8 10mM, 2 lavages avec 1,5 mL de **RIPA** et 2 lavages avec 1,5 mL de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50mM. 10 % de ces échantillons sont utilisés pour des analyse par western blot (paragraphe 2.5.2. et 2.5.3.) et les 90 % restant sont repris dans 100  $\mu$ L de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM pour une analyse par spectrométrie de masse.

Toutes les solutions sont complétées avec du protease inhibitor cocktail EDTA free (Roche).

**Tampon RIPA** : 50 mM Tris-HCl pH8, 150 mM NaCl, 1 % NP40 (v/v), 0,5 % Sodium déoxycholate (p/v), 0,1 % SDS (v/v).



### **2.8.2.2. Cellules de mammifères.**

Des cellules transformées avec CLUH fusionné en N-terminal avec la Biotine Ligase muté BirA\* sont comparées à des cellules transformées avec la protéine de fusion GFP-BirA\* (contrôle). Au moins 16 heures avant l'expérience, 50  $\mu$ M de Biotine sont ajoutés à 4 boîtes B10 par échantillon. Les cellules sont récupérées puis lavées au PBS 1 X avant que 1 mL de **tampon de lyse BioID** soit ajouté aux cellules. Une fois les cellules reprises dans le tampon de lyse, 2 % de triton X-100 y sont ajoutés avant de soniquer les cellules 3 fois 20 secondes à 20 % avec des pauses de 1 minute. Après la sonication, le tampon de lyse est dilué de moitié via l'ajout du Tris-HCl pH7.5 50 mM, et l'échantillon est distribué dans des tubes 2 mL. Une centrifugation à 16 500 g, 10 minutes à 4°C servira à éliminer les débris cellulaires. 200  $\mu$ L de billes magnétiques de streptavidine (Streptavidin Mag Sepharose™, GE Healthcare) sont ajoutées à l'échantillon. Ces billes sont préalablement lavées deux fois pendant 2 minutes avec 1,5 mL de **tampon de lyse BioID** dilué de moitié avec du Tris-HCl pH7.5 50 mM sous agitation de 12 rpm. Le changement des solutions de lavage se fait via un rack magnétique. Les échantillons sont ensuite incubés toute une nuit à 4°C sous 12 rpm d'agitation. Le lendemain, les billes sont lavées 2 fois 8 minutes sous 12 rpm d'agitation dans du SDS 2 % et protease inhibitor cocktail EDTA free (Roche). Il y a ensuite 1 lavage avec 1,5 mL de **tampon de lavage 1 BioID** et 1 lavage avec 1,5 mL de **tampon de lavage BioID 2**. Les billes sont enfin reprises dans du Tris-HCl pH7.5 50 mM. 10 % de ces échantillons sont utilisés pour des analyses par westernblot (paragraphe 2.5.2. et 2.5.3.) et les 90 % restant sont lavés 4 fois avec 50 mM NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> et repris dans 50  $\mu$ L de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM pour une analyse par spectrométrie de masse.

Toutes les solutions sont complétées avec du protease inhibitor cocktail EDTA free (Roche).

**Tampon de lyse BioID** : 50 mM Tris-HCl pH7.5, 500 mM NaCl, 0,4 % SDS et 1 mM DTT.

**Tampon de lavage 1 BioID** : 0.1 % Sodium deoxycholate, 1 % Triton X-100, 500 mM NaCl, 1 mM EDTA et 50 mM HEPES pH7.5.

**Tampon de lavage BioID 2** : 250 mM LiCl, 0.5 % Sodium deoxycholate, 1 mM EDTA et 10 mM Tris-HCl pH8.



## 2.9. Immunofluorescence (IF) des cellules de mammifères.

Des cellules de mammifères sont mises en culture avec 200 µL de milieu de culture sur des chambres de cultures 8 puits (Falcon 8-well Culture Slide). Pour l'expérience d'IF, le milieu est enlevé puis les cellules sont incubées 1 heure à 37°C dans 200 µL de milieu de culture complétement avec 200 nM de MitoTracker™ Red CMXRos (ThermoFisher) pour marquer les mitochondries. Après deux lavages de 5 minutes à 37°C avec 200µL de milieu de culture, les cellules sont incubées 15 minutes à température ambiante avec 200µL de paraformaldéhyde 4% pour fixer les cellules. Par la suite, les cellules sont lavées 3 fois avec 200µL de PBS 1X pendant 5 minutes à température ambiante. Pour marquer les différentes protéines par immunofluorescence, les cellules sont incubées 1 heure à température ambiante avec 50 µL de **tampon de blocage IF** complétement avec l'anticorps primaire à une concentration 1/250<sup>ème</sup>. Ensuite, elles sont lavées à 3 reprises dans 200µL de PBS 1 X pendant 5 minutes puis incubées 1 heure à température ambiante avec 50 µL de **tampon de blocage IF** complétement avec l'anticorps secondaire correspondant couplé à l'Alexa fluor 488 (Life Technology) à une concentration 1/1000<sup>ème</sup>. Pour finir, les cellules sont lavées 3 fois dans du PBS 1X pendant 5 minutes (ajout de 1 µg/mL de Hoechst 33342 (ThermoFisher) lors du dernier lavage pour marquer les noyaux) puis celles-ci sont montées entre lame et lamelle et observées par microscopie confocale (paragraphe 1.8.).

**Tampon de blocage IF** : 1 % BSA, 5 % Sérum, 0,25 % Triton X-100 et PBS 1X.

## 2.10. Immuno-précipitation des ARN (RIP) à partir de cellules de mammifères.

Des cellules HCT 116 sauvages (WT) et inactivées pour le gène de *CLUH* grâce au système CRISPR-Cas9 (*CLUH*-KO) sont utilisées pour cette expérience de (RIP). Les cellules *CLUH*-KO servent de témoin.

Pour commencer, les billes Protein A (Dynabeads) (25 µL par condition) sont préparées. Pour cela, les billes sont lavées deux fois avec 150 µL de **tampon de lyse RIP**. Par la suite, du BSA acétylé (150 µg/mL) et des tRNA totaux de levures (150 µg/mL) sont ajoutés



pour saturer les billes et ainsi éviter la fixation aspécifique des ARNm. Les billes sont ensuite incubées 1 heure sur roue à 15 rpm.

Pour réaliser le RIP, les cellules en culture dans une boîte B10 (55 cm<sup>2</sup>) à 80-90% de confluence sont utilisées. Dans un premier temps, un crosslink aux ultraviolets est réalisé (400mJ/cm<sup>2</sup>) directement sur les cellules en culture. Ensuite, les cellules sont récoltées (voir paragraphe 2.2.2.2.) et 1 mL de **tampon de lyse RIP** froid y est ajouté. Les échantillons sont ensuite incubés 15 minutes dans la glace et centrifugés à 11 000g pendant 10 minutes à 4°C. 1% de ces échantillons sont mis de côté et complétés avec 140 µL de **tampon d'élution RIP**, cela correspond à l'Input. Les 990 µL restants sont incubés avec 0,6 µg d'anticorps anti-CLUH (Novusbio, voir paragraphe 1.5.) 2 heures à 4°C sur roue (15 rpm). Les complexes ARN associés à CLUH sont ensuite immuno-précipités grâce à l'ajout des protéines A précédemment préparées (25µL par condition) et à une incubation de 2 heures supplémentaires sur roue (15 rpm). Les billes sont ensuite lavées avec 1 mL de **tampon de lyse RIP** puis avec 1 mL de **tampon High-Salt RIP** pendant 5 minutes sur roue (15 rpm). Les billes sont ensuite re-suspendues dans 75 µL de **tampon d'élution RIP** et incubées à 1200 rpm pendant 10 minutes à 37°C deux fois, cela correspond aux éluions. Pour finir, les Input et les éluions sont complétés avec 6 µL de NaCl 5M et 20 µg de protéinase K et incubés 1 heure à 50 °C. Les ARN sont ensuite extraits (voir paragraphe 2.4.1) et analysés par qRT-PCR (voir paragraphe 2.4.3. et 2.4.4.).

**Tampon de lyse RIP** : 50 mM Tris-HCl pH7.4, 100 mM MgCl<sub>2</sub>, 0,1 mM CaCl<sub>2</sub>, 1 % IGEPAL CA-630, 0,1 % SDS, 0,5 % sodium dodecyl sulfate deoxycholate, protease inhibitor cocktail EDTA free 1X et 40 U de RNAsin (Promega).

**Tampon Hight-Salt RIP** : 50 mM Tris-HCl pH7.4, 1 M NaCl, 1 % IGEPAL CA-630, 0,1 % SDS, 1 % sodium dodecyl sulfate deoxycholate, 1 mM EDTA pH8, protease inhibitor cocktail EDTA free 1X et 40 U/µL de RNAsin (Promega).

**Tampon d'élution RIP** : 10 mM EDTA pH8, 100 mM Tris-HCl pH8, 1% sodium dodecyl sulfate deoxycholate, protease inhibitor cocktail EDTA free 1X et 40 U/µL de RNAsin (Promega).



## 2.11. Étude de l'activité mitochondriale.

### 2.11.1. Respiration chez les plantes.

La respiration cellulaire est mesurée via l'utilisation d'un oxygraphe (Hansatech) et de son logiciel correspondant (Oxygraphe plus V1.01). Une électrode placée dans une chambre de respiration va permettre de mesurer en temps réel la quantité d'oxygène présent dans cette chambre et ainsi de mesurer la consommation d'oxygène de nos différents échantillons. La calibration utilisée sera une calibration en phase liquide selon les instructions du logiciel avec l'ajout de KCl 50 % de saturation pour faire le zéro en oxygène. A la fin de l'expérience, le lavage de la chambre de respiration se fait avec plusieurs passages d'eau dans la chambre avant de passer à l'analyse de l'échantillon suivant.

Les plantules (environ 100 mg) issues d'une culture liquide (paragraphe 2.2.1.1.) sont placées dans 2 mL de milieu de **culture liquide *in vitro* ARA**. Ces plantules sont préalablement placées à l'obscurité pour éviter la production d'oxygène par les chloroplastes et le resteront tout le long de l'expérience. Suite au démarrage du logiciel puis à l'ajout des plantules, les mesures de respiration basale durent 6 minutes (le temps de la stabilisation du taux de consommation en oxygène des plantules). Pour mesurer l'activité de la chaîne respiratoire, 2,5 mM de Cyanure (KCN) sont ajoutés à l'échantillon via l'utilisation d'une seringue et le passage par l'ouverture du bouchon. Ce composé permet l'inhibition du complexe IV de la chaîne respiratoire. Une mesure de 8 minutes permettra la stabilisation de signal. Enfin, pour mesurer l'activité de l'AOX, 2,5 mM de Propyl-gallate sont ajoutés à l'échantillon et une mesure de 8 minutes est effectuée. Le Propyl-gallate inhibe l'AOX.

**Culture liquide *in vitro* ARA** : 2,21 g/L MS231, 2,34 mM MES et 2,5% sucrose.

### 2.11.2. Production d'ATP chez les mammifères.

La mesure de production d'ATP est réalisée via l'utilisation du kit CellTiter-Glo® 2.0 Assay (Promega) selon les instructions du fournisseur. 10 000 cellules HCT116 sont mises en culture dans du **milieu HCT ou galactose** (IX-a.ii.) et l'analyse de la production d'ATP est effectuée 48h plus tard. La normalisation par rapport au nombre de cellules est effectuée via



l'utilisation du kit CellTiter-Fluor™ Cell Viability Assay (Promega) selon les instructions du fournisseur.



## OBJECTIF DE LA THESE

Durant ma thèse, j'ai étudié la famille des protéines CLU. Pour cela, j'ai travaillé sur deux modèles : un modèle mammifère et un modèle plante. Chez les mammifères j'ai étudié CLUH en utilisant une lignée cellulaire : les cellules humaines HCT116 dérivées de cellules cancéreuses du colon et des cellules souches embryonnaires de souris : les cellules mES-E14. Chez les plantes j'ai étudié Friendly (FMT) grâce à l'utilisation de l'organisme modèle *Arabidopsis thaliana*.

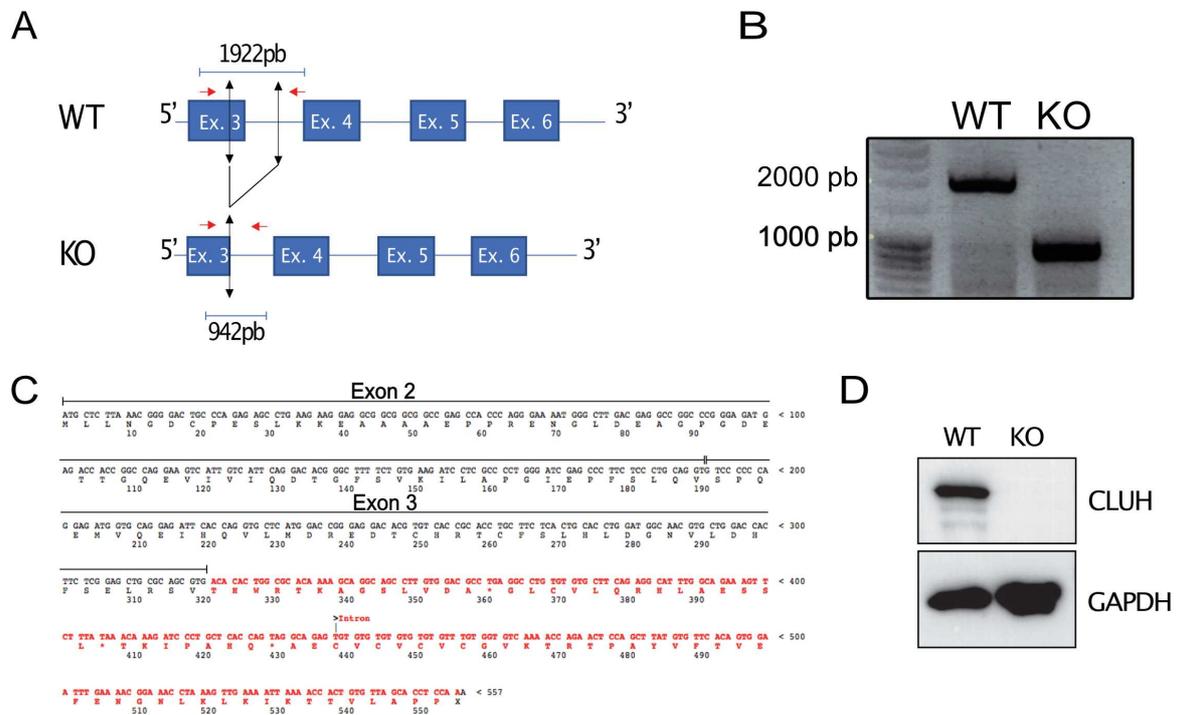
D'après la bibliographie, les protéines de la famille CLU sont importantes pour la biogenèse mitochondriale (Gao et al., 2014; El Zawily et al., 2014) néanmoins leur fonction n'est pas complètement élucidée. Durant ma thèse, j'ai voulu apporter ma contribution à la compréhension des fonctions moléculaires des protéines de la famille CLU.

Chez les mammifères, j'ai initié mon étude par l'identification des interactants protéiques de CLUH en utilisant deux approches complémentaires, à savoir la co-immunoprécipitation et le BioID. Pour comprendre l'implication de CLUH dans la biogenèse mitochondriale, j'ai exploré l'importance de CLUH pour la localisation et la traduction des MITO ARNm, en utilisant des cellules mutantes dépourvues de CLUH.

Chez les plantes, j'ai analysé l'impact de FMT sur les fonctions mitochondriales avant d'étudier le rôle de cette protéine grâce à l'étude des interactants de FMT. Pour finir, j'ai étudié le rôle de FMT dans l'adressage mitochondrial des MITO ARNm.



# RESULTATS



**Figure 27 : Délétion du gène *CLUH* dans des cellules humaines HCT116 par le système CRISPR/Cas9.**

- Représentation schématique de la stratégie d'édition du génome. Les doubles flèches noires représentent les sites de coupure par la Cas9 dans la lignée sauvage (WT) et la zone de fusion après la coupure pour le mutant (KO). Les flèches rouges représentent la position des amorces utilisées en génotypage et la longueur théorique des fragments obtenus est indiquée pour le WT et le KO. Les différents exons sont représentés par des carrés bleus et les introns sont représentés par des traits bleus.
- PCR de génotypage de la délétion de *CLUH* dans le mutant (KO). L'amplification dans le WT sert de témoin sans délétion.
- Pour confirmer la délétion de *CLUH*, la région éditée a été séquencée. En rouge est représentée la séquence qui correspond à la séquence nucléotidique et protéique obtenue après la coupure permettant l'apparition d'un codon STOP prématuré et l'inactivation de *CLUH*.
- Vérification de l'expression de *CLUH* par westernblot. *CLUH* est détecté par un anticorps spécifique et la protéine GAPDH sert de témoin de charge.

## 1. Étude du rôle de CLUH chez les mammifères.

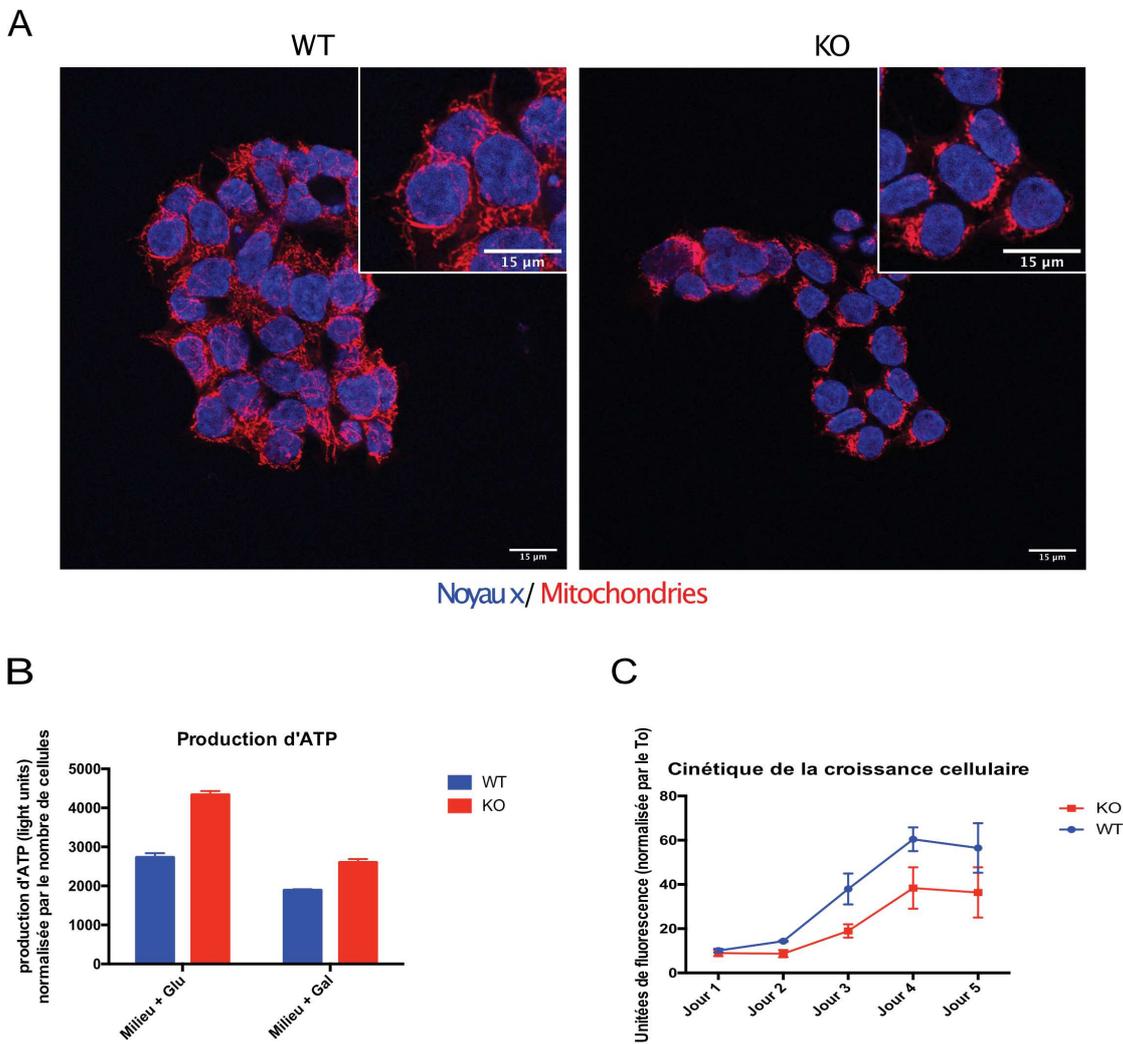
### 1.1. Inactivation de CLUH dans les cellules de mammifères.

Chez les mammifères, la protéine de la famille CLU est appelée CLUH. Les protéines de la famille CLU ayant des fonctions liées à la biogenèse mitochondriale nous avons analysé le rôle de CLUH chez les mammifères. Une approche génétique a été utilisée pour étudier la fonction de CLUH dans des cellules humaines HCT 116 et dans les cellules souches de souris mES E14.

#### 1.1.1. Dans les cellules HCT 116 (Humain).

Lors de notre étude, nous avons utilisé le système CRISPR-Cas9 pour inactiver le gène de *CLUH* dans des cellules HCT 116. Le système CRISPR-Cas9 utilise la nucléase Cas9 pour induire une cassure double brin de l'ADN. Pour cibler de manière spécifique un gène, un ARNg contenant une séquence de 20 nucléotides complémentaire du gène cible est utilisé associé à la nucléase Cas9 (Doudna and Charpentier, 2014). Dans le cas du gène *CLUH*, deux ARNg ont été utilisés pour cibler l'exon 3 et l'intron suivant l'exon 3. Ces deux ARNg induisent deux coupures doubles brins permettant la délétion d'un fragment de 980 nucléotides et l'inactivation de *CLUH* dans la lignée KO (figure 27A). L'utilisation d'amorces nucléotidiques autour de la zone ciblée dans le gène *CLUH* (en rouge dans la figure 27A) permet de vérifier l'inactivation de CLUH par génotypage. En effet, dans la lignée KO, nous observons un fragment d'environ 1000pb correspondant à une délétion de 980 nucléotides par rapport au fragment du gène *CLUH* dans les cellules sauvages (WT) (Figure 27B). Ce fragment a ensuite été séquencé pour déterminer de manière précise l'inactivation de *CLUH* (figure 27C). Nous observons donc la fusion entre l'exon 3 et la fin de l'intron suivant l'exon 3 (figure 27C en rouge) permettant l'apparition d'un codon STOP prématuré au niveau du 360<sup>ème</sup> acide aminée et l'inactivation de *CLUH* (la protéine CLUH étant de 1 309 acides aminées). Pour confirmer l'inactivation de CLUH, un westernblot contre cette protéine a été réalisé dans des extraits totaux de cellules HCT 116 sauvages (WT) et inactivées pour *CLUH* (KO). La protéine CLUH est bien absente dans la lignée HCT 116 KO ce qui confirme l'inactivation de CLUH dans cette lignée.

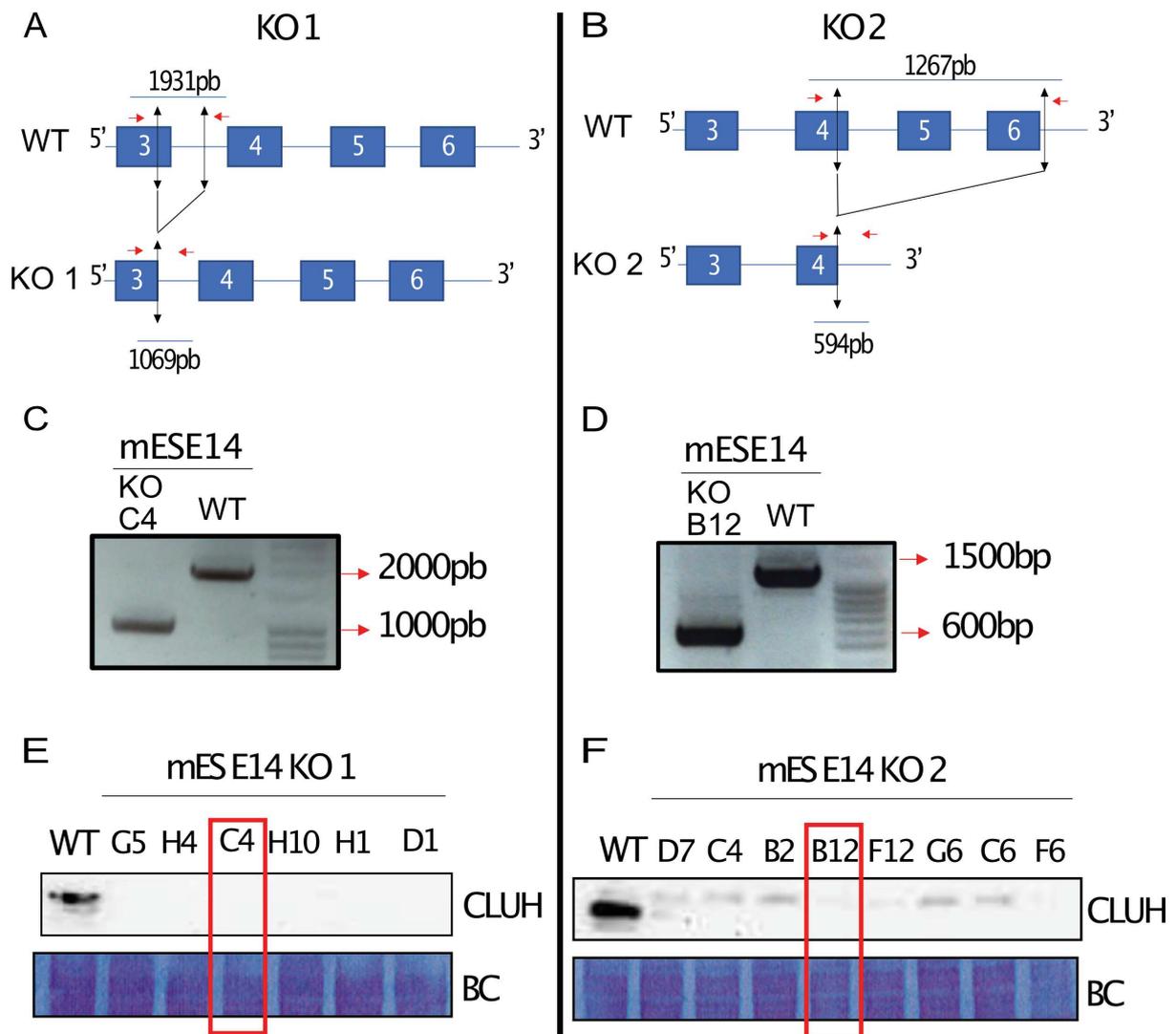
Suite à l'inactivation de *CLUH* dans les cellules HCT 116, nous avons étudié les caractéristiques phénotypiques liées à l'absence de CLUH. Dans un premier temps, des images de microscopies confocales montrent une modification de l'organisation du réseau



**Figure 28 : Caractérisation du phénotype lié à la délétion de *CLUH* dans les cellules humaines HCT 116.**

- A) Microscopie confocale montrant l'organisation du réseau mitochondrial dans les cellules HCT 116 sauvages (WT) et mutant (KO). Les noyaux sont marqués en bleu avec du Hoescht 33342 et les mitochondries sont marquées en rouge grâce au MitoTracker™ Red CMXRos. L'échelle est indiquée au bas de chaque image.
- B) Analyse de la production d'ATP dans les cellules KO (en rouge) et dans les cellules WT (en bleu) sur milieu riche en glucose (Milieu + Glu) ou sur milieu pauvre en glucose (Milieu + Gal). La production d'ATP est normalisée par rapport au nombre de cellules et est représentée sous la forme d'unité de photons (light units). Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type entre les trois réplicats biologiques.
- C) Cinétique de la croissance cellulaire dans les cellules WT (en bleu) ou KO (en rouge). Le nombre de cellules représenté grâce à des unités de fluorescences est observé au cours du temps grâce à une normalisation par rapport au jour 0 (T0). Les barres d'erreurs correspondent à l'écart-type entre les trois réplicats biologiques.

mitochondrial en absence de CLUH (Figure 28 A). En effet, les mitochondries sont organisées en réseau étendu dans tout le cytoplasme dans les cellules sauvages (WT). En absence de CLUH (KO), les mitochondries semblent être rassemblées autour du noyau. Cette modification du réseau mitochondrial pourrait avoir un impact sur le fonctionnement de ces cellules. Pour le vérifier, nous avons étudié la production d'ATP dans des cellules HCT 116 sauvages (WT) et inactivées pour *CLUH* (KO) grâce à la mesure de l'ATP produite par les cellules à l'aide d'un réactif spécifique sensible au taux d'ATP (kit CellTiter-GLO<sup>®</sup> 2.0) (figure 28B). En effet, grâce à l'ajout de luciférine et de luciférase, ce kit permet de suivre la production d'ATP car la luciférine est transformée en un composé bioluminescent et présence d'ATP par la luciférase (Crouch et al., 1993). Le signal bioluminescent est normalisé par rapport au nombre de cellules (grâce au kit CellTiter-Fluor<sup>™</sup> Cell viability assay qui quantifie le nombre de cellules d'une manière indépendante du métabolisme énergétique cellulaire (voir plus loin)). L'utilisation de ces deux kits nous permet de comparer la production d'ATP entre les cellules HCT 116 WT et KO dans différentes conditions de métabolisme énergétique (milieu riche en glucose (milieu+Glu) favorisant la glycolyse ou milieu pauvre en glucose (milieu+Gal) favorisant la respiration mitochondriale) pendant 24 heures (figure 28B). Dans les deux conditions testées (avec ou sans glucose), l'absence de CLUH influence la production d'ATP avec une augmentation de celle-ci. Ces résultats suggèrent que CLUH est important pour la formation du réseau mitochondrial et pour la régulation de la production d'ATP. Dans des conditions de cultures normales (milieu + Glu), la production d'ATP est permise par la glycolyse et par l'OXPPOS. En cas de défaut mitochondrial, il est observé un changement important de la production d'ATP qui devient majoritairement lié à la glycolyse ce qui rend difficile l'observation du phénotype mitochondrial. Cet effet est appelé « l'effet Crabtree » (Kamalian et al., 2019). De plus, les cellules HCT 116 sont issues d'une lignée de cellules cancéreuses. Les cellules cancéreuses ont la particularité de faire de la glycolyse même en condition aérobie, cela est appelé « l'effet Warburg » (Diaz-Ruiz et al., 2011). Pour éviter ces biais, la culture des cellules en présence d'une source de carbone alternative comme le galactose permet d'inhiber la production d'ATP par la glycolyse et ainsi l'observation de la production d'ATP mitochondriale grâce à l'OSPHOS (voir l'introduction 2.1.1.2.1.) (Kamalian et al., 2019). En milieu pauvre en glucose (milieu + Gal), il y a une production moins importante de l'ATP dans les cellules WT par rapport à une culture des cellules dans du milieu riche en glucose (figure 28B). Cela est logique car l'absence de glucose inhibe la production d'ATP par la glycolyse.



**Figure 29 : Délétion du gène *Cluh* dans des cellules souches de souris mES E14 par le système CRISPR/Cas9.**

A et B)

Représentation schématique de la stratégie d'édition du génome pour les deux inactivations de *Cluh*. Les doubles flèches noires représentent les sites de coupure par la Cas9 dans la lignée sauvage (WT) et la zone de fusion après la coupure pour les mutants (KO). Les flèches rouges représentent la position des amorces utilisées en génotypage et la longueur théorique des fragments obtenus est indiquée pour le WT et le KO. Les différents exons sont représentés par des carrés bleus et les introns sont représentés par des traits bleus.

C et D)

PCR de génotypage de la délétion de *Cluh* dans les mutants (KO1 (C) et le KO2 (D)). L'amplification dans le WT sert de témoin sans délétion.

E et F)

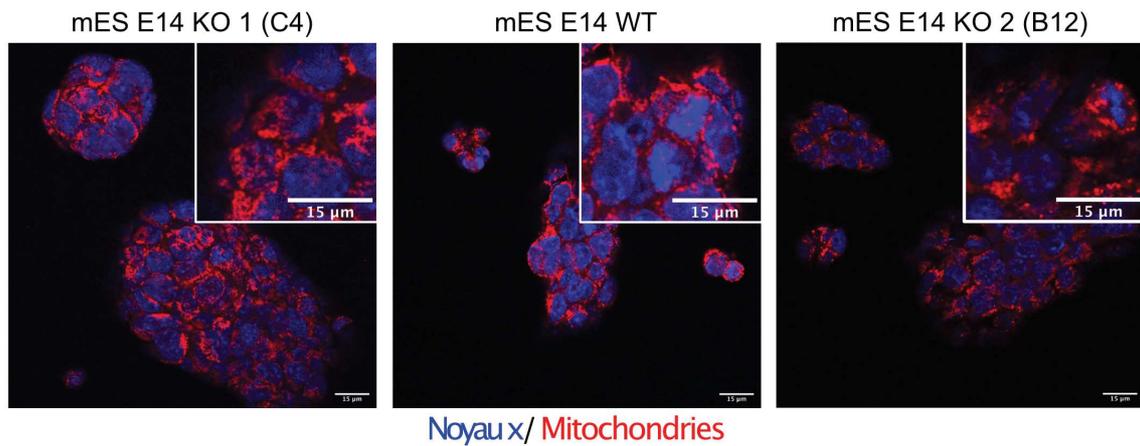
Vérification de l'expression de CLUH par westernblot. CLUH est détecté par un anticorps spécifique et la charge des protéines visible en bleu de coomassie (BC) sert de témoin de charge.

Néanmoins, comme dans le milieu riche en glucose, dans le milieu pauvre en glucose, il y a aussi une augmentation de la production d'ATP en absence de CLUH (KO). Ces résultats confirment que CLUH est impliqué dans la régulation des fonctions mitochondriales et notamment la production d'ATP grâce à l'OXPPOS dans l'IM. On s'est ensuite intéressé à la croissance de ces cellules et au rôle de CLUH dans cette croissance (figure 28C). Le kit CellTiter-Fluor™ Cell viability assay utilise un agent non-lytique (marquage des cellules vivantes) pour marquer les cellules (marquage indépendant du métabolisme cellulaire donc indépendant des fonctions mitochondriales). Ce composé est le Gly-Phe-AFCoumarin. Il est capable d'entrer dans les cellules et plus particulièrement dans les noyaux où il peut être clivé ce qui crée un composé fluorescent (AFC) par les protéases cellulaires qui ne fonctionnent que dans les cellules vivantes (Niles et al., 2007). Lors de cette expérience, une quantité équivalente de cellules ont été mises en culture à T = 0 jour. Le nombre de cellules (visualisé par des unités de fluorescence) a été normalisé par rapport à ce T = 0 jour dans les cellules HCT 116 sauvages (WT) et inactivées pour *CLUH* (KO) (figure 28 C). D'après ces résultats, la croissance cellulaire est impactée par l'absence de CLUH. Cette baisse de la croissance cellulaire peut être liée à une augmentation de la mortalité cellulaire des cellules HCT 116 KO ou à une augmentation de la durée du cycle de division de la cellule en absence de CLUH.

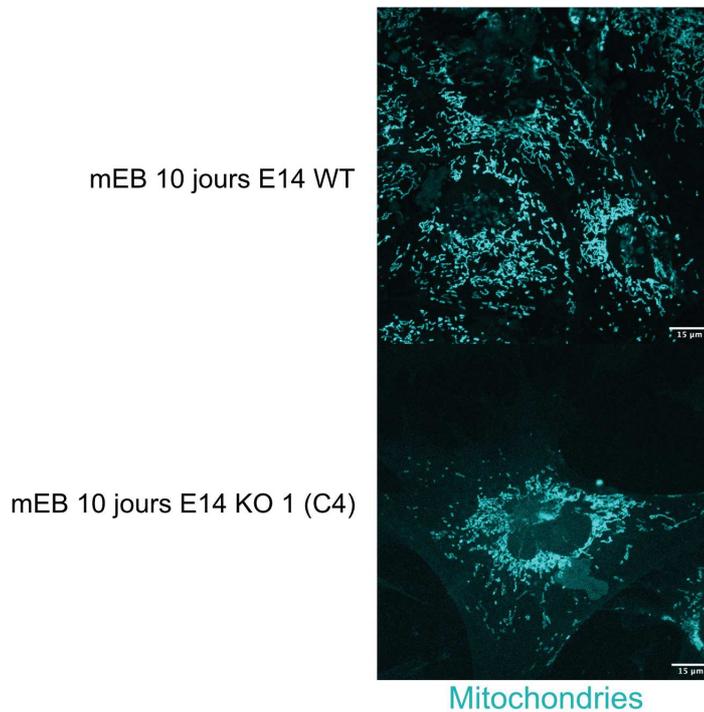
### **1.1.2. Dans les cellules souches mES E14 (souris).**

Grâce au système CRISPR-Cas9, nous avons également inactivé *Cluh* dans des cellules souches de souris mES E14. Dans ces cellules, deux inactivations différentes de *Cluh* ont été réalisées (figure 29A et B) : KO1 et KO2. Comme pour les cellules HCT 116, 2 ARNg ont été utilisés pour induire une large délétion dans les cellules mES E14. Une délétion de 862 nucléotides au niveau de l'exon 3 et de l'intron suivant l'exon 3 pour le KO1 et une délétion de 673 nucléotides entre l'exon 4 et l'intron suivant l'exon 6 pour le KO2. Ces délétions ont été confirmées pour le clone C4 pour le KO1 (figure 29C) et pour le clone B12 pour le KO2 (figure 29D). Par la suite, un westernblot contre la protéine CLUH a été réalisé pour confirmer l'inactivation de *Cluh* dans le KO1 (figure 29E) et dans le KO2 (figure 29F). Dans le cas du KO1 (figure 29E), 6 clones ayant une délétion dans *Cluh* ont été testés et se sont révélés être tous inactivés. Nous avons gardé l'un d'entre eux, le clone C4. Dans le cas du KO2 (figure 29F), 8

A



B

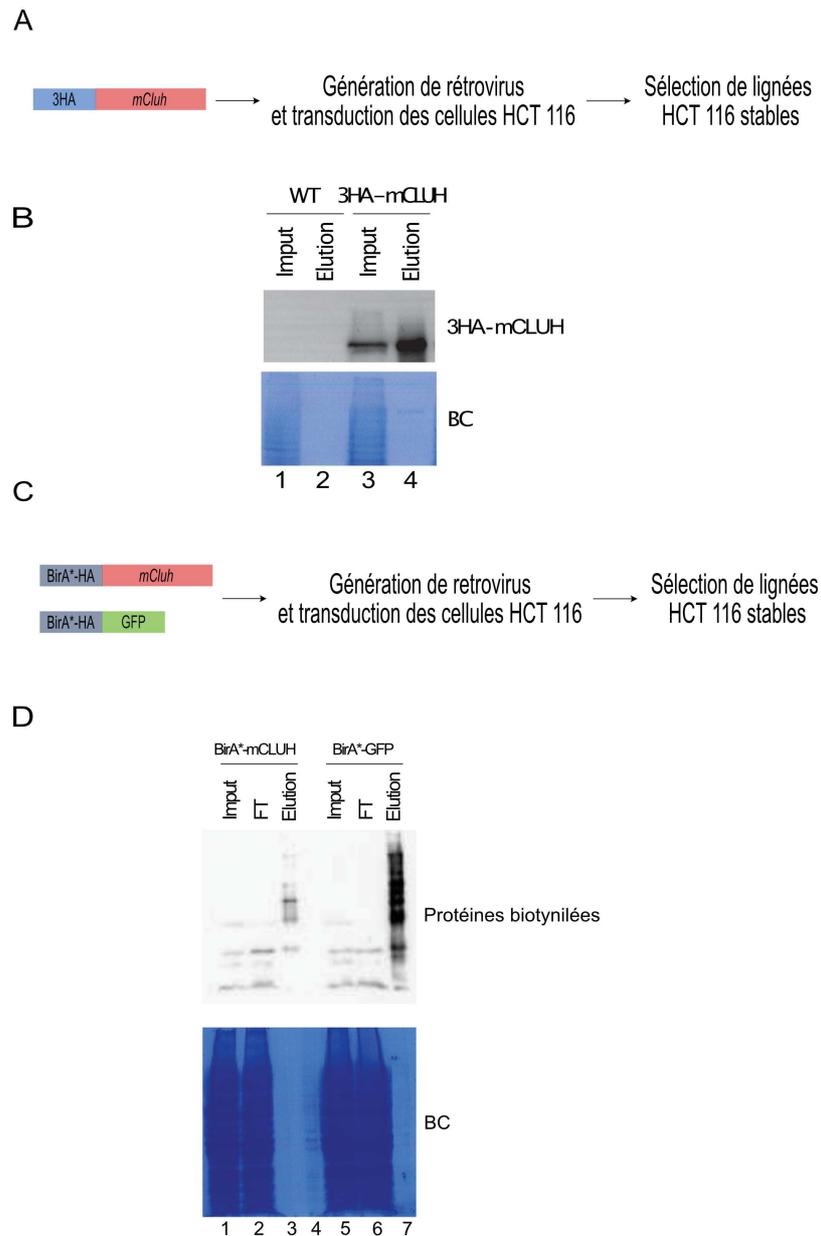


**Figure 30 : Observation en microscopie confocale du réseau mitochondrial dans les cellules souches de souris mES E14.**

- A) Cellules mES E14 sauvages (WT) et deux mutants indépendants (KO1 C4 et KO2 B12). Les noyaux sont marqués en bleu avec du Hoescht 33342 et les mitochondries sont marquées en rouge grâce au MitoTracker™ Red CMXRos.
- B) Cellules mES E14 sauvages (WT) et mutantes (KO1 C4) après 10 jours de différenciation spontanée en corps embryonnaire (mEB 10 jours E14). Les mitochondries sont marquées en bleu clair grâce à l'expression stable d'une BFP (Blue Fluorescent Protein) mitochondriale. L'échelle est indiquée au bas de chaque image.

clones ayant la délétion ont été testés et seuls les clones B12 et F6 ne semblent pas exprimer de *Cluh* et donc sont inactivés pour ce gène. Nous avons gardé le clone B12 pour la suite.

Dans les cellules HCT 116, l'absence de CLUH aboutit à un regroupement des mitochondries autour du noyau (figure 28A). Nous avons donc voulu confirmer ce phénotype mitochondrial dans une autre lignée de mammifère, les cellules de souris mES E14 (figure 30A). Dans ces cellules, les mitochondries semblent être regroupées autour du noyau dans les lignées sauvages (WT) ce qui ne permet pas d'observer des différences avec les lignées KO 1 (C4) et KO2 (B12) où les mitochondries sont, elles aussi, regroupées autour du noyau. Ce regroupement des mitochondries autour du noyau est connu dans les cellules souches où il correspondrait à un état immature des mitochondries lié à un besoin énergétique moindre des cellules souches. Ce n'est qu'après différenciation que le réseau mitochondrial s'étend dans tout le cytoplasme (Facucho-Oliveira et al., 2007; Seo et al., 2018). Pour analyser le réseau mitochondrial des cellules mES E14, nous les avons différenciées en corps embryoïde selon un protocole déjà établi (Ngondo et al., 2018). Pour cela, les cellules mES-E14 sont cultivées en suspension pendant 6 jours en condition de différenciation (un milieu de culture sans LIF), jusqu'à l'obtention d'agrégats appelés corps embryoïdes. Puis ces corps embryoïdes sont remis en culture sur un support permettant leur adhésion pendant 4 jours supplémentaires (mEB 10 jours E14). Cela permet la différenciation spontanée des cellules mES-E14 en différents types cellulaires issus des trois feuillets germinaux : le mésoderme (précurseurs du système musculaire), l'endoderme (précurseurs des tissus épithéliaux) et l'ectoderme (précurseurs du système nerveux) (Ngondo et al., 2018). Suite à leur différenciation, les cellules mEB 10 jours E14 sauvages (WT) ont une extension de leur réseau mitochondrial dans tout le cytoplasme (Figure 30B). Cette extension du réseau mitochondrial n'est pas observée en absence de mCLUH dans le KO1 (C4) après différenciation. Ce résultat confirme le rôle de mCLUH dans la biogenèse mitochondriale et notamment dans l'organisation du réseau mitochondrial chez les souris. Ce résultat associé à ce qui a été observé dans les cellules Humaines (figure 28A) implique une conservation du rôle de CLUH chez les mammifères (Hommes et souris).



**Figure 31 : Génération de lignées HCT 116 stables utilisées en Co-IP et en BioID.**

- A) Représentation schématique de l'obtention des lignées HCT 116 stables utilisées lors de la co-IP contre 3HA-CLUH. L'ORF de *Cluh* version souris (*mCluh*) est représentée en rouge et l'étiquette 3HA (3 fois l'étiquette hemagglutinine) est représentée en bleu.
- B) Westernblot de la co-IP contre 3HA-mCLUH. L'utilisation d'un anticorps spécifique de l'étiquette HA dans les échantillons totaux (Input, 1 et 3) et les éluions (Elution, 2 et 4) de la co-IP. La coloration des protéines au bleu de coomassie (BC) sert de témoin de charge. Westernblot réalisé en triplicat.
- C) Schéma représentatif de l'obtention des lignées HCT 116 stables utilisées lors du BioID. L'étiquette BirA\*-HA (la biotine ligase mutée BirA\* fusionnée à l'étiquette HA) est représentée en gris et l'ORF de la GFP est représentée en vert.
- D) Westernblot de vérification des lignées BirA\* utilisées lors du BioID. L'utilisation de la streptavidine permet la reconnaissance spécifique des protéines biotinyllées dans les échantillons totaux (Input, 1 et 5), les éffluents (FT, 2 et 6) et les éluions (Elution, 3 et 7) du BioID. La coloration des protéines au bleu de coomassie (BC) sert de témoin de charge. Le puit 4 est vide. Westernblot réalisé en triplicat.

## 1.2. Les interactants de CLUH.

### 1.2.1. Génération des lignées utilisées pour la recherche des interactants de CLUH.

Pour comprendre le rôle de CLUH dans les cellules de mammifères, nous avons réalisé des expériences de Co-IP et de BioID. Dans un premier temps, il a fallu produire des lignées de cellules humaines (HCT 116) ou souches de souris (mES E14) avec la protéine CLUH fusionnée à des étiquettes 3HA (pour la co-IP) et BirA\* (pour le BioID) (figure 31 et 32).

#### 1.2.1.1. Dans les cellules HCT 116 (Humain).

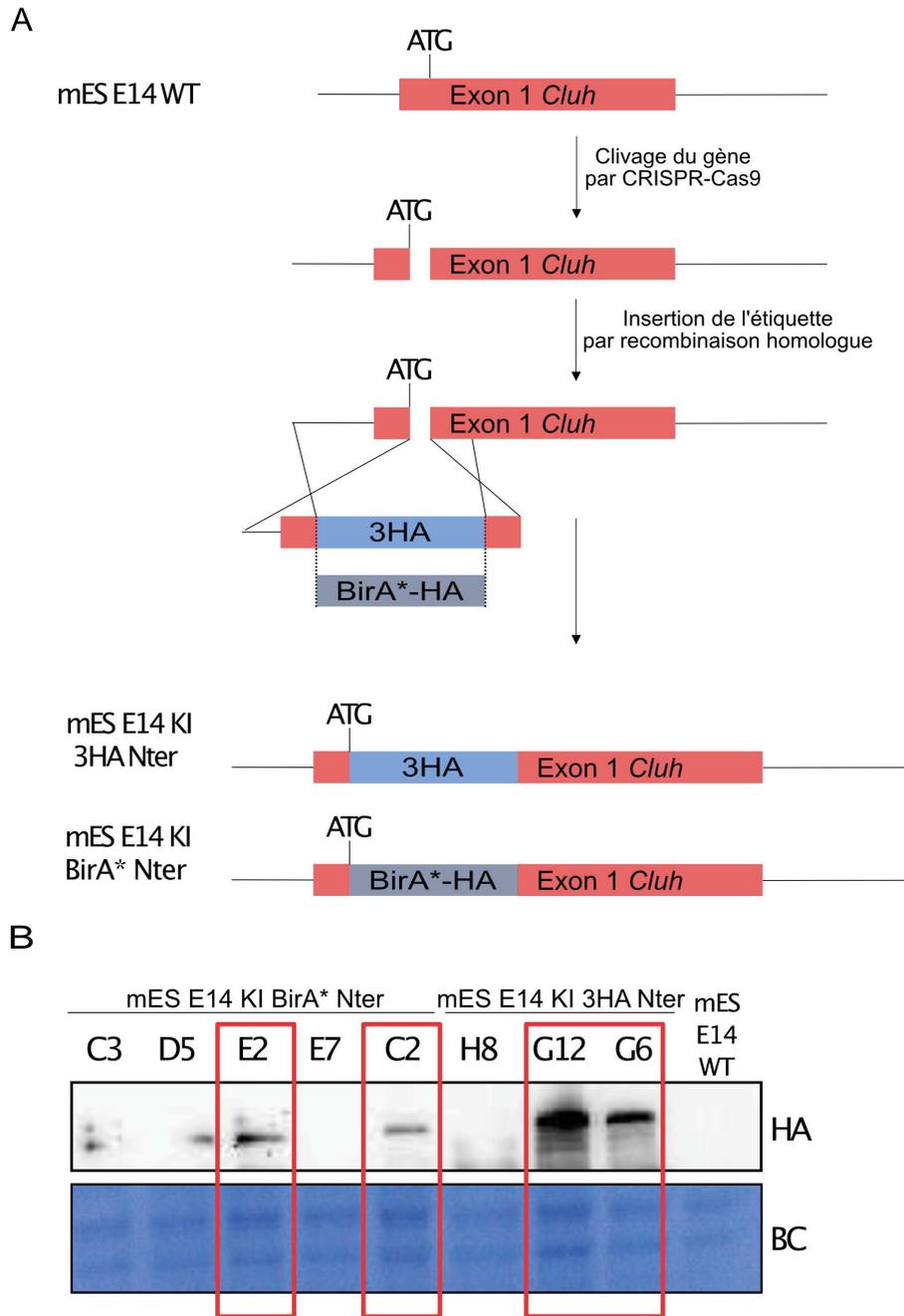
Dans les cellules HCT 116, une transduction lentivirale a été utilisée pour produire une lignée stable exprimant la protéine mCLUH de souris (mCLUH) fusionnée à l'étiquette 3HA (3 fois l'étiquette hémagglutinine) en N terminale (3HA-mCLUH) (figure 31A). L'utilisation des lentivirus permet l'intégration efficace dans le génome d'une séquence d'intérêt (ici 3HA-mCLUH) grâce à la présence de séquences LTR (Long Terminal Repeat sequence). L'expression de la protéine a été confirmée par westernblot (Figure 31B) grâce à l'utilisation d'un anticorps contre l'étiquette HA dans l'échantillon Input (puits 3). Cette lignée HCT 116 3HA-mCLUH a par la suite été utilisée pour déterminer les interactants stables de CLUH par co-IP. L'immunoprécipitation de 3HA-mCLUH avec des anticorps spécifiques contre l'étiquette HA permet d'obtenir un enrichissement de la protéine mCLUH (figure 31B, puits 4). Pour identifier les protéines co-immunoprécipitées avec mCLUH, les échantillons ont été analysés par spectrométrie de masse. Tous les interactants stables de CLUH vont pouvoir être déterminés par spectrométrie de masse (voir 1.2.2.).

Lors de la co-IP, les complexes sont extraits des cellules et doivent se maintenir tout le long de l'expérience pour être analysés par spectrométrie de masse. Cette technique permet de mettre en lumière les protéines ayant une interaction forte avec CLUH (les interactants stables). Néanmoins, cette technique a quelques limites puisque, par exemple, l'immunoprécipitation de complexes associés aux membranes se révèle très compliquée. Cela est dû à la faible stringence des tampons de lyse utilisés qui sont nécessaires au maintien des complexes protéiques. De plus, malgré les conditions propices au maintien des complexes protéiques certains interactants de CLUH, ceux qui ne s'associent que faiblement avec CLUH ou de manière brève, ne peuvent pas être mis en évidence. Pour déterminer ces interactants



(appelés interagants transitoires), une technique de biotinylation de proximité (BioID) a été utilisée (Sears et al., 2019). Lors du BioID, la biotine ligase mutée BirA\* active la biotine qui peut biotinyler les protéines à proximité de la BirA\*. En fusionnant la BirA\* avec CLUH, cette technique permet de marquer *in vivo* par biotinylation toutes les protéines à proximité de CLUH ce qui permet par la suite de les isoler et ainsi de mettre en évidence les interagants faibles et transitoires de CLUH (figure 26). Après lyse des cellules humaines HCT116 et des cellules souches de souris (mES E14), les protéines biotinylées sont précipitées et analysées par spectrométrie de masse (figure 35 et 36).

Pour réaliser un BioID contre CLUH, la biotine ligase mutée BirA\* doit s'exprimer en fusion avec CLUH (figure 26). Pour exprimer de manière stable cette protéine de fusion, des lentivirus ont été utilisés pour transduire des cellules HCT 116 sauvages avec la version souris de CLUH (mCLUH) fusionnée en N terminale avec BirA\* (BirA\*-mCLUH) (figure 31C). Pour différencier les protéines spécifiquement biotinylées par CLUH du bruit de fond, cette expérience nécessite un contrôle négatif. Le témoin négatif de notre BioID utilise une protéine quelconque fusionnée à BirA\*. La protéine choisie est la GFP (Green Fluorescent Protein). Elle a été fusionnée avec la BirA\* en N terminale avant d'être intégrée dans le génome de cellules HCT 116 sauvages de manière stable grâce à des lentivirus (Figure 31C). L'expression des protéines étiquetées ont été vérifiées par westernBlot avec des anticorps spécifiques contre l'étiquette HA et leur capacité à biotinyler les protéines ont été évaluées par westernBlot en utilisant de la streptavidine couplée à une peroxydase (figure 31D). La biotinylation des protéines a été vérifiée pour la lignée HCT 116 BirA\*-mCLUH (puits 1 à 3) et pour la lignée HCT 116 BirA\*-GFP (puits 5 à 7) (Figure 31D). Ce westernblot montre le résultat d'une expérience de BioID avec les protéines présentes dans l'échantillon total (Input, puits 1 et 5), dans les lavages des extraits (effluent (FT) (où sont éluées les protéines non biotinylées), puits 2 et 6) et dans les extraits récupérés sur billes après précipitation des protéines biotinylées (Elution, puits 3 et 7). On observe bien un ensemble de signaux dans les éluations des lignées BirA\*-mCLUH et BirA\*-GFP signe que l'expression est effective dans les lignées éponymes. De plus, ce résultat de BioID montre que les protéines biotinylées sont bien précipitées sur les billes (échantillons Éluion, puits 3 et 7). Elles vont ensuite être analysées par spectrométrie de masse (figure 34) (voir paragraphe 1.2.3.).



**Figure 32 : Edition du génome par CRISPR-Cas9 pour étiqueter la protéine endogène CLUH dans des cellules mES E14.**

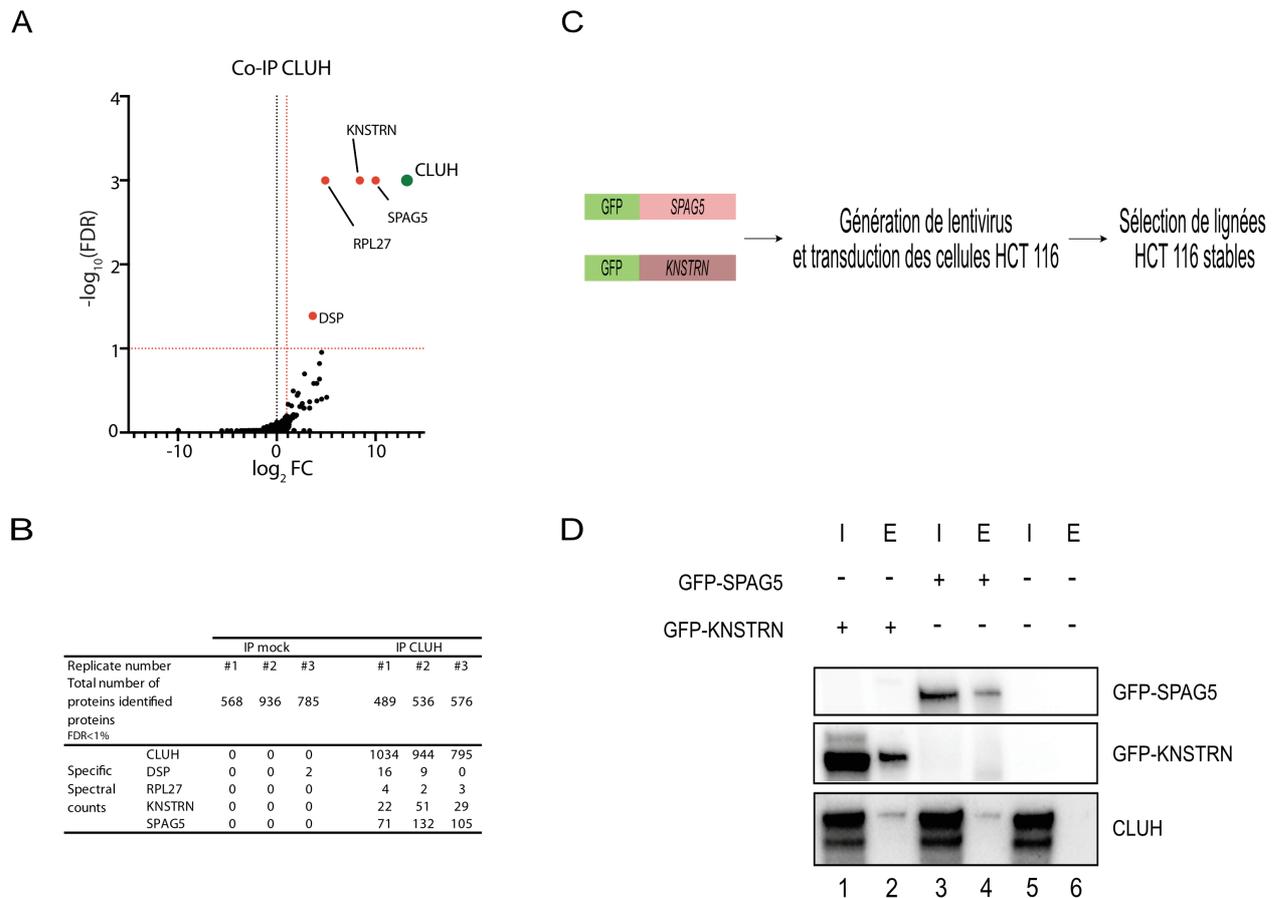
- A) Représentation schématique de la stratégie d'édition du génome dans les cellules mES E14 sauvages (WT). Seul le premier exon de *mCluh* est représenté en rouge et ATG représente le site d'initiation de la traduction. L'étiquette 3HA (3 fois l'étiquette hemagglutinine) est représentée en bleu et l'étiquette BirA\*-HA (la biotine ligase mutée BirA\* fusionnée à l'étiquette HA) est représentée en gris.
- B) Vérification de l'étiquetage de la protéine endogène CLUH par westernblot. L'anticorps utilisé est spécifique de l'étiquette HA et la coloration des protéines au bleu de coomassie (BC) sert de témoin de charge. C3, D5, E2, E7 et C2 représentent 5 populations monoclonales de l'insertion de l'étiquette 3HA en N terminale de *Cluh* endogène. H8, G12 et G6 représentent 3 populations monoclonales de l'insertion de l'étiquette BirA\*-HA en N terminale de *Cluh* endogène. L'extrait sauvage (mES E14 WT) sert de témoin de CLUH non édité.

### **1.2.1.2. Dans les cellules mES E14 (Souris).**

Dans les cellules souches de souris (mES E14), le système CRISPR-Cas9 a été utilisé pour introduire l'étiquette 3HA ou la protéine BirA\* en amont du gène *Cluh* endogène (figure 32A). Ces constructions permettent l'expression de la protéine endogène mCLUH en fusion N terminale avec 3HA ou BirA\*. L'utilisation d'un ARNg spécifique de la région autour du site d'initiation de la traduction (ATG) permet la formation d'une cassure double brin par le système CRISPR-Cas9. Pour la réparation de cette coupure, la cellule peut utiliser deux modes de réparation : une réparation par jonction d'extrémités non homologues (NHEJ, Non-Homologous End-Joining) ou la recombinaison homologue. La recombinaison homologue utilise une matrice homologue pour réparer la cassure double brin sans introduire d'erreur. Pour introduire notre ADN exogène en amont de *Cluh*, nous utilisons cette recombinaison homologue grâce à l'introduction d'une séquence d'ADN exogène contenant des régions d'homologie avec *Cluh* entourant la séquence de 3HA ou de BirA\*-HA (figure 32A). Différentes populations monoclonales de cellules mES E14 ayant intégré l'étiquette 3HA (mES E14 KI 3HA Nter) ou la séquence BirA\*-HA (mES E14 KI BirA\* Nter) en amont de *Cluh* ont été testées par westernblot (figure 32B). Parmi les 5 populations monoclonales mES E14 KI BirA\* Nter, seules les lignées E2 et C2 semblent exprimer l'étiquette 3HA en fusion avec mCLUH. De la même manière, parmi les 3 lignées mES E14 KI 3HA Nter, seules les lignées G12 et G6 expriment la protéine de fusion BirA\*-HA-mCLUH (figure 32B). Ces lignées sont utilisées pour déterminer les interactants stables de mCLUH (la lignée mES E14 KI 3HA Nter G12 pour faire une co-IP) et les interactants transitoires de mCLUH (la lignée mES E14 KI BirA\* E2 pour faire un BioID) (voir 1.2.2. et 1.2.3.). Pour le BioID dans les cellules ES, comme pour les cellules HCT 116, une lignée mES E14 BirA\*-HA-GFP a été produite. Sa réalisation est identique au processus des cellules humaines HCT 116 (figure 31C) sauf qu'une population monoclonale de cellules mES E14 BirA\*-HA-GFP a été isolée.

### **1.2.2. Les interactants stables de CLUH.**

Pour la détermination des interactants stables de CLUH, des Co-IP contre cette protéine ont été réalisées dans des cellules humaines HCT 116 et des cellules souches de souris (mES E14). Lors de la co-IP, on utilise une protéine d'intérêt (ici mCLUH) fusionnée à une étiquette (ici 3HA). L'immunoprécipitation de cette protéine de fusion ainsi que des protéines



**Figure 33 : Identification des protéines interagissant avec CLUH dans les cellules HCT116.**

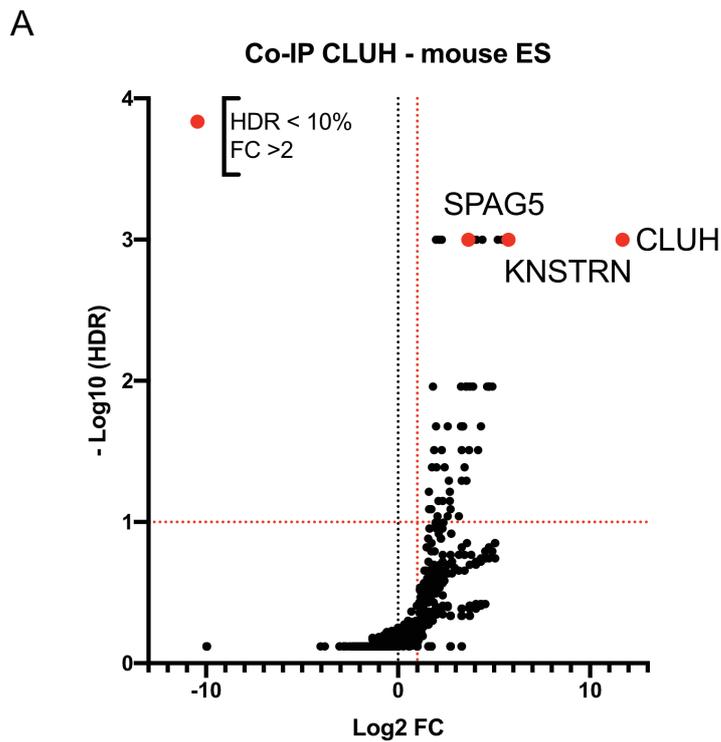
- A) Volcanoplot représentant les résultats de spectrométrie de masse de la co-IP contre l'étiquette 3HA fusionnée à la version souris de CLUH (mCLUH) qui a été réalisée sur des cellules HCT 116. Le  $-\log_{10}$  (FDR) (False discovery rate) est représenté sur l'axe y et le  $\log_2$  (FC) (Fold Change) est représenté sur l'axe x. Des cellules HCT 116 sauvages (WT) ont servi de contrôle négatif pour la détermination de l'enrichissement. La significativité statistique de l'enrichissement (FDR) a été déterminée avec le logiciel SAINT EXPRESS (Choi et al., 2011). Un seuil de FC > 2 et FDR > 10% a été appliqué pour la sélection des candidats. L'expérience a été réalisée en triplicat.
- B) Tableau représentant les résultats significatifs de la Co-IP contre 3HA-mCLUH obtenue par spectrométrie de masse. Ce tableau montre le nombre de spectres correspondant aux différentes protéines dans chaque réplicat.
- C) Schéma représentatif de l'obtention des lignées HCT 116 stables utilisées lors des co-IP contre SPAG5 et KNSTRN. L'ORF de la GFP (en vert) est fusionné en N terminale de l'ORF de SPAG5 (en rose) ou de l'ORF de KNSTRN (en marron).
- D) Validation de l'interaction de SPAG5 et KNSTRN avec CLUH par des Co-IP réverses. Westernblot représentatif d'une expérience réalisée en duplicat avec les échantillons totaux avant la Co-IP (I, puits 1, 3 et 5) et les éluions (E, puits 2, 4 et 6) de la Co-IP contre KNSTRN (puits 1 et 2), contre SPAG5 (puits 3 et 4) et contre les HCT 116 sauvages (WT, puits 5 et 6). La protéine CLUH endogène est révélée avec des anticorps spécifiques et les protéines de fusion (GFP-KNSTRN et GFP-SPAG5) avec un anticorps dirigé contre la GFP.

associées avec celle-ci se fait grâce à l'utilisation de billes magnétiques recouvertes d'anticorps spécifiques de l'étiquette utilisée. Ces interactants sont analysés par spectrométrie de masse ce qui permet leurs déterminations (figure 25). Une co-IP contre des cellules HCT116 sauvages (WT) sert de témoin négatif.

Dans les cellules HCT 116 humaines, la co-IP contre 3HA-mCLUH permet de mettre en évidence 4 protéines interagissant de manière stable avec mCLUH : SPAG5, KNSTRN, RPL7A et DSP (figure 33A et 33B). SPAG5 (Sperm-associated antigen 5) est une protéine associée à KNSTRN (Small kinetochore-associated protein) (Kern et al., 2017). Ensemble, ces protéines ont été décrites comme étant liées au fuseau mitotique ou elles participent à la séparation des chromatides sœurs (Thein et al., 2007). Elles ont aussi été décrites dans la formation de granules de stress dans le cytoplasme en réponse à des stress cellulaires (Thedieck et al., 2013). RPL7A est une protéine de la grande sous unité du ribosome cytosolique. Enfin, DSP (Desmoplakin) est une protéine du desmosome (zone d'adhésion entre cellules). Parmi ces 4 protéines, 2 semblent être les interactants principaux de CLUH, il s'agit de SPAG5 et KNSTRN. Pour ces protéines, il y a entre 70 et 130 spectres qui ont été trouvés pour l'une (SPAG5) et entre 30 et 50 spectres qui ont été trouvés pour l'autre (KNSTRN) (figure 33B).

Pour confirmer l'interaction de CLUH avec SPAG5 et KNSTRN, des co-IP réverses sont réalisées. Pour cela, des cellules HCT 116 humaines sauvages ont été transformées avec des protéines de fusion GFP-SPAG5 ou GFP-KNSTRN. La GFP est en N terminale des protéines SPAG5 et KNSTRN humaines (figure 33C). Les résultats de ces co-IP reverse ont été mis en évidence par westernblot (figure 33D). En réalisant des co-IP contre l'étiquette GFP, nous pouvons isoler les protéines associées à GFP-SPAG5 (puits 2) et à GFP-KNSTRN (puits 4). L'utilisation d'un anticorps spécifique de CLUH endogène met en évidence l'interaction de ces deux protéines avec CLUH (Figure 33D). Ces résultats montrent l'interaction de CLUH avec 4 protéines dont deux (SPAG5 et KNSTRN) ont été confirmées par des co-IP réverses.

Dans les cellules souches de souris (mES E14), la co-IP contre 3HA-mCLUH endogène permet de mettre en évidence plusieurs protéines interagissant de manière stable avec mCLUH dont SPAG5, KNSTRN, LARP1 (La-related protein 1, une protéine de liaison aux ARN (RBP)), PQBP1 (Polyglutamine-binding protein 1, une protéine impliquée dans la régulation de la transcription) et EIF4B (Eukaryotic translation initiation factor 4B, un facteur impliqué dans la liaison entre l'ARNm et le ribosome). Comme dans les cellules humaines, SPAG5 et KNSTRN



**B**

| Co-IP mouse ES                      |        | IP mock |     |     | IP CLUH |     |      |
|-------------------------------------|--------|---------|-----|-----|---------|-----|------|
|                                     |        | #1      | #2  | #3  | #1      | #2  | #3   |
| Replicate number                    |        |         |     |     |         |     |      |
| Total number of proteins identified |        | 782     | 895 | 911 | 1092    | 800 | 1054 |
| FDR<1%                              |        |         |     |     |         |     |      |
| Specific                            | CLUH   | 0       | 0   | 0   | 322     | 199 | 477  |
| Spectral counts                     | KNSTRN | 0       | 1   | 1   | 37      | 33  | 38   |
|                                     | LARP1  | 0       | 0   | 1   | 4       | 26  | 15   |
|                                     | PQBP1  | 0       | 0   | 0   | 4       | 4   | 5    |
|                                     | EIF4B  | 0       | 0   | 0   | 4       | 3   | 4    |
|                                     | ...    |         |     |     |         |     |      |

**Figure 34 : Identification des protéines interagissant avec CLUH dans les cellules souches mES-E14.**

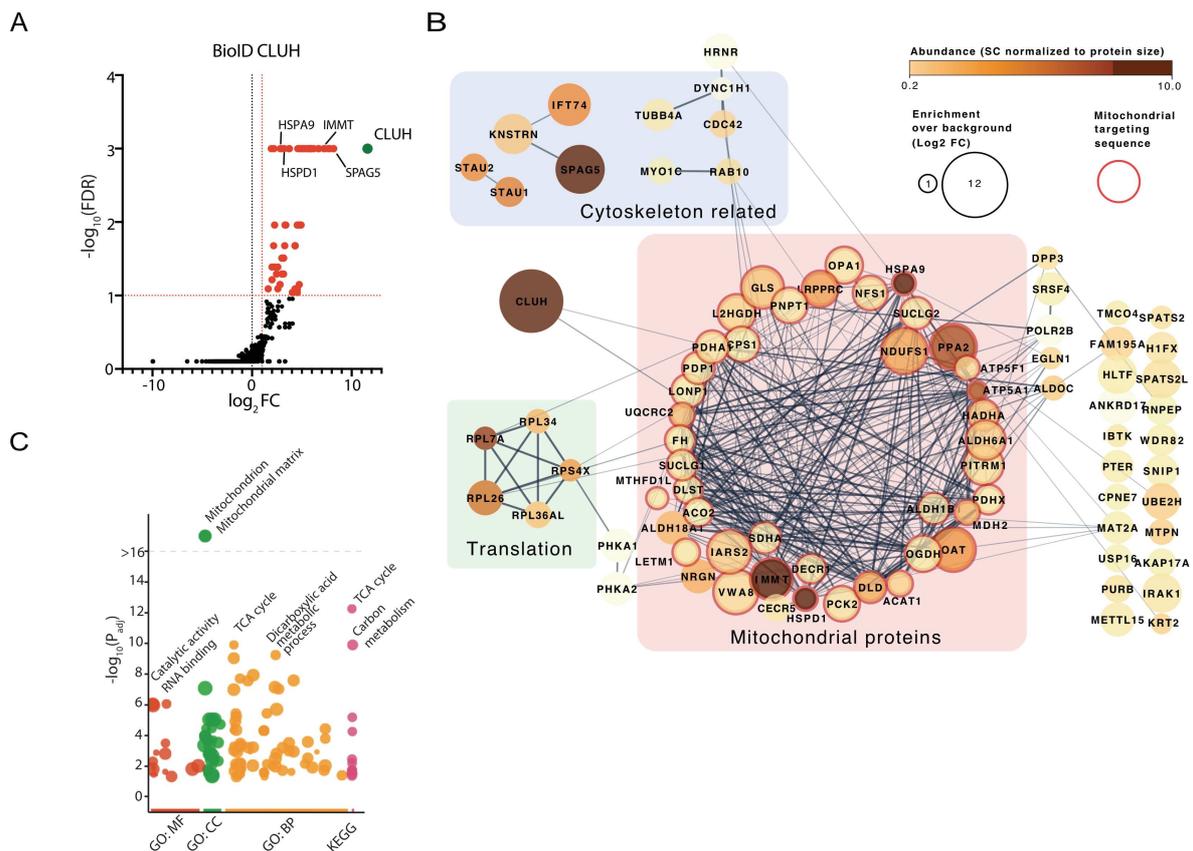
- A) Volcanoplots représentant les résultats de spectrométrie de masse de la co-IP contre l'étiquette 3HA fusionnée à mCLUH qui a été réalisée sur des cellules souches mES-E14. Le  $-\log_{10}$  (FDR) (False discovery rate) est représenté sur l'axe y et le  $\log_2$  (FC) (Fold Change) est représenté sur l'axe x. Des cellules mES-E14 sauvages (WT) ont servi de contrôle négatif pour la détermination de l'enrichissement. La significativité statistique de l'enrichissement (FDR) a été déterminée avec le logiciel SAINT EXPRESS (Choi et al., 2011). Un seuil de  $FC > 2$  et  $FDR > 10\%$  a été appliqué pour la sélection des candidats. L'expérience a été réalisée en triplicat.
- B) Tableau représentant certains des résultats significatifs de la Co-IP contre 3HA-mCLUH obtenus par spectrométrie de masse. Ce tableau montre le nombre de spectres correspondant aux différentes protéines dans chaque réplicat.

sont, là aussi les interactants principaux trouvés associés à mCLUH dans les cellules souches de souris (figure 34).

L'ensemble de ces résultats suggère une association entre CLUH et le complexe SPAG5-KNSTRN (figure 33 et 34). Cette association est conservée chez les mammifères.

### **1.2.3. Les interactants transitoires de CLUH.**

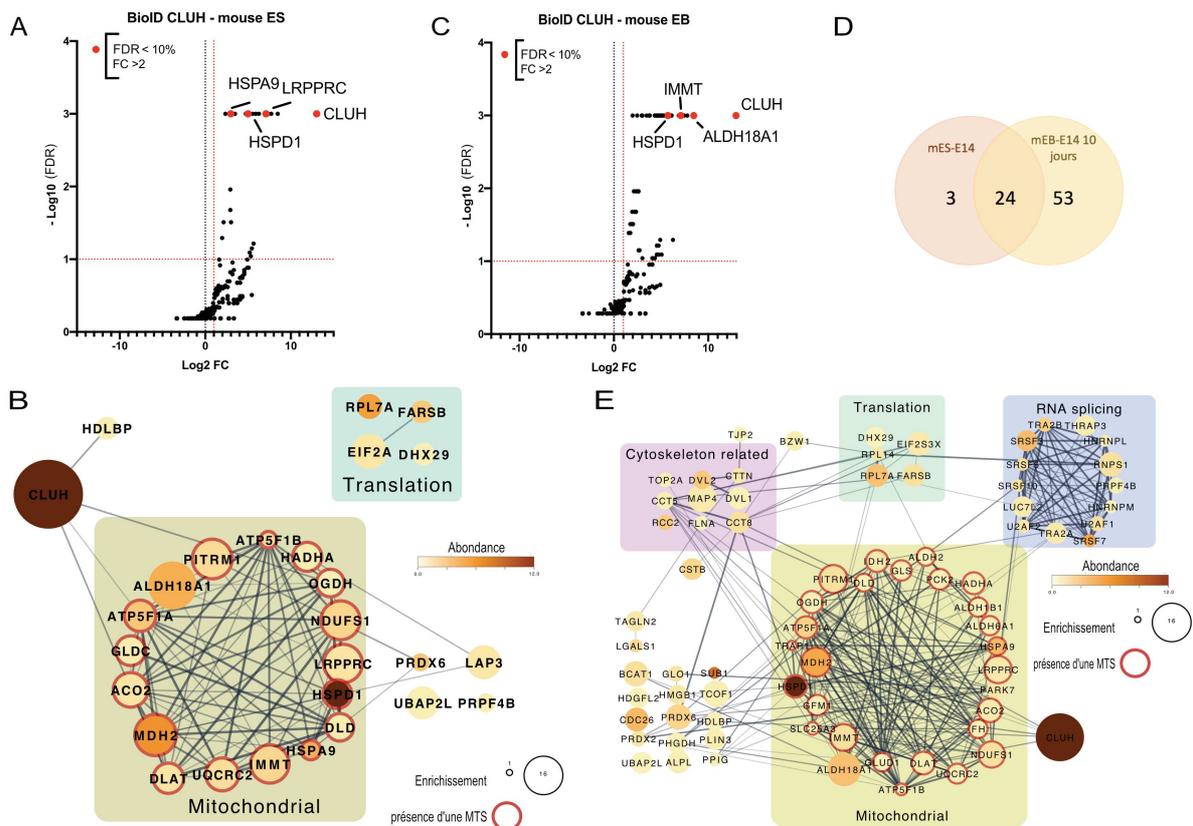
Dans les cellules HCT 116, le BioID contre BirA\*-HA-mCLUH permet l'identification de 88 protéines (Figure 35A). Parmi ces protéines, on retrouve 3 des 4 interactants de CLUH identifiés par Co-IP : SPAG5, KNSTRN et RPL7A (figure 35B). Ces résultats, obtenus par une deuxième méthode, confirment l'interaction de CLUH avec SPAG5, KNSTRN et RPL7A. Toutes les protéines identifiées en BioID ont été regroupées en fonction de leurs fonctions et montrent un grand nombre de protéines mitochondriales (figure 35B). Cet enrichissement des protéines mitochondriales est confirmé par l'analyse des GO term des protéines identifiées en BioID (Figure 35C). En analysant les GO term liés aux fonctions moléculaires, aux composants cellulaires, au processus biologique et aux voies métaboliques, nous retrouvons des processus et fonctions liés à la mitochondrie. Ces résultats semblent indiquer que CLUH interagit de manière faible et/ou transitoire avec des protéines mitochondriales. Parmi les protéines mitochondriales les plus significatives, on retrouve, IMMT, HSPD1, HSPA9, LRPPRC, GLS, ATP5A, VWA8, ALDH18A1, NDUF51 et IARS2. Nous allons nous concentrer plus particulièrement sur ces protéines pour la suite de cette étude. IMMT est une protéine du complexe MICOS présente dans l'IM et impliquée dans la formation des cristae junctions. HSPD1 et HSPA9 sont des protéines chaperonnes impliquées dans l'import des protéines mitochondriales et l'assemblage des complexes mitochondriaux. LRPPRC est une protéine impliquée dans la traduction et la stabilisation de certains ARNm mitochondriaux. GLS est une protéine impliquée dans le maintien de l'homostasie acide-base. ATP5A est une protéine du complexe V de l'OXPPOS (l'ATP synthase). VWA8 est une protéine qui possède une activité ATPase. La protéine ALDH18A1 est impliquée dans la biosynthèse des acides aminés proline, ornithine et arginine. NDUF51 est l'une des protéines du complexe I de l'OXPPOS. Enfin, IARS2 est une protéine impliquée dans la production de l'ARNt isoleucine chargé avec son acide aminé.



**Figure 35 : Identification des interactants transitoires de CLUH par BioID.**

- A) Volcanoplot représentant les résultats de spectrométrie de masse du BioID montrant les protéines biotinylées la protéine de fusion BirA\*-HA-mCLUH (Biotine ligase mutée BirA\* fusionnée à l'étiquette hemagglutinine (HA) et à la version souris de CLUH) dans des cellules HCT 116 sauvages. La significativité statistique ( $-\log_{10}(\text{FDR})$ ) est représentée en ordonnée et l'enrichissement en abscisse ( $\log_2(\text{FC})$ ). Des cellules HCT 116 sauvages transformées avec la protéine GFP fusionnée à BirA\*-HA ont servi de témoins négatifs pour la détermination du FC et de la FDR de chaque interactant transitoire de CLUH par SAINT EXPRESS avec l'utilisation d'un seuil  $\text{FC} > 2$  et un  $\text{FDR} > 10\%$ . Expérience réalisée en triplicat.
- B) Représentation graphique du résultat du BioID réalisée avec le logiciel Cytoscape. Les protéines biotinylées par BirA\*-CLUH sont regroupées selon leur fonction. Chaque cercle représente une protéine enrichie à la proximité de CLUH (l'abondance de la protéine est représentée par la couleur du cercle et son enrichissement est représenté par la taille du cercle). Les protéines possédant un peptide signal d'adressage mitochondrial sont marquées d'un cercle rouge.
- C) Manhattan plot représentant l'enrichissement des GO term de chaque interactant transitoire de CLUH à partir de différentes bases de données en fonction des fonctions moléculaires (GO-MF, orange), des composants cellulaires (GO-CC, vert), des processus biologiques (GO-BP, jaune) ainsi que des voies métaboliques impliquant ces protéines (KEGG, rose). La significativité statistique ( $p$ -value) est indiquée en ordonnée.

Dans les cellules souches de souris (mES E14), une expérience de biotinylation a aussi été réalisée sur les cellules souches (mES E14, figure 36A et B) ainsi que sur les cellules différenciées en corps embryoides (mEB E14, figure 36C et E) selon le même protocole que dans le paragraphe 1.1.2. Dans les cellules mES E14, 26 protéines sont identifiées à proximité de BirA\*-HA-mCLUH contre 76 dans les mEB E14 (figure 36B et E). L'analyse des GO term associés aux composants cellulaires enrichis dans les protéines à proximité de CLUH montre un enrichissement des protéines mitochondriales que ce soit dans les cellules souches (figure 36B) ou dans les cellules différenciées (figure 36E). Ces résultats similaires aux résultats du BioID réalisé dans les cellules humaines HCT 116, mettent en évidence une interaction faible et/ou transitoire de CLUH avec les protéines mitochondriales chez les mammifères. L'analyse des protéines trouvées à proximité de mCLUH dans les cellules différenciées (mEB E14 10 jours) par rapport aux cellules souches (mES E14) (figure 36D) montre seulement 24 protéines trouvées à proximité de mCLUH dans les cellules souches et les cellules différenciées de souris qui correspondent à la quasi-totalité des protéines présentes à proximité des cellules souches de souris. Dans les cellules souches de souris différenciées en corps embryoides, il y a 53 protéines trouvées à proximité de mCLUH alors que ce n'était pas le cas dans les cellules souches. Cela suggère qu'il y a une différence dans les interactants de mCLUH entre les cellules mES-E14 et mEB-E14 10 jours. Néanmoins, malgré la différence du nombre de protéines présentes à proximité de mCLUH entre ces deux lignées de souris, l'enrichissement des protéines mitochondriales reste similaire entre les deux lignées (figure 36B et 36E). Cela suggère que malgré des différences, sa fonction reste similaire dans les cellules souches et dans les cellules différenciées chez la souris. Enfin, il est intéressant de montrer que les 5 interactants stables de mCUH mis en évidence par co-IP contre 3HA-mCLUH ne semblent pas être enrichis à proximité de mCLUH dans ces expériences de BioID que ce soit dans les cellules mES E14 ou dans les cellules mEB E14 10 jours (figure 34 et 36A). Cette différence est surprenante mais pourrait s'expliquer par le rayon d'action de la biotinylation qui semble indiquer que dans ces cellules, contrairement aux cellules HCT116, CLUH serait plus éloignée de SPAG5 et KNSTN.



**Figure 36 : Identification des interactants transitoires de CLUH par BioID.**

A et C)

Volcanoplot représentant les résultats de spectrométrie de masse du BioID montrant les protéines biotinylées la protéine de fusion BirA\*-HA-mCLUH dans des cellules souches de souris mES-E14 sauvages (A) et dans les cellules souches de souris différenciées en corps embryoides mEB-E14 sauvages (C). La significativité statistique ( $-\log_{10}(\text{FDR})$ ) est représentée en ordonnée et l'enrichissement en abscisse ( $\text{Log}_2(\text{FC})$ ). Des cellules mES-E14 sauvages transformées avec la protéine GFP fusionnée à BirA\*-HA ont servi de témoins négatifs pour la détermination du FC et de la FDR de chaque interactant transitoire de CLUH par SAINT EXPRESS avec l'utilisation d'un seuil  $\text{FC} > 2$  et un  $\text{FDR} > 10\%$ . Expérience réalisée en triplicat.

B et E)

Représentation graphique du résultat du BioID sur cellules mES-E14 (B) ou mEB-E14 (E) réalisée avec le logiciel Cytoscape. Les protéines biotinylées par BirA\*-mCLUH sont regroupées selon leur fonction. Chaque cercle représente une protéine enrichie à la proximité de CLUH (l'abondance de la protéine est représentée par la couleur du cercle et son enrichissement est représenté par la taille du cercle). Les protéines possédant un peptide signal d'adressage mitochondrial sont marquées d'un cercle rouge.

D)

Diagramme de venn représentant protéines significativement associées à mCLUH (l'utilisation d'un seuil  $\text{FC} > 2$  et un  $\text{FDR} > 10\%$ ) dans les cellules souches de souris (mES-E14 en bleu) et dans les cellules souches de souris différenciées en corps embryoides (mEB-E14 10 jours en jaune).

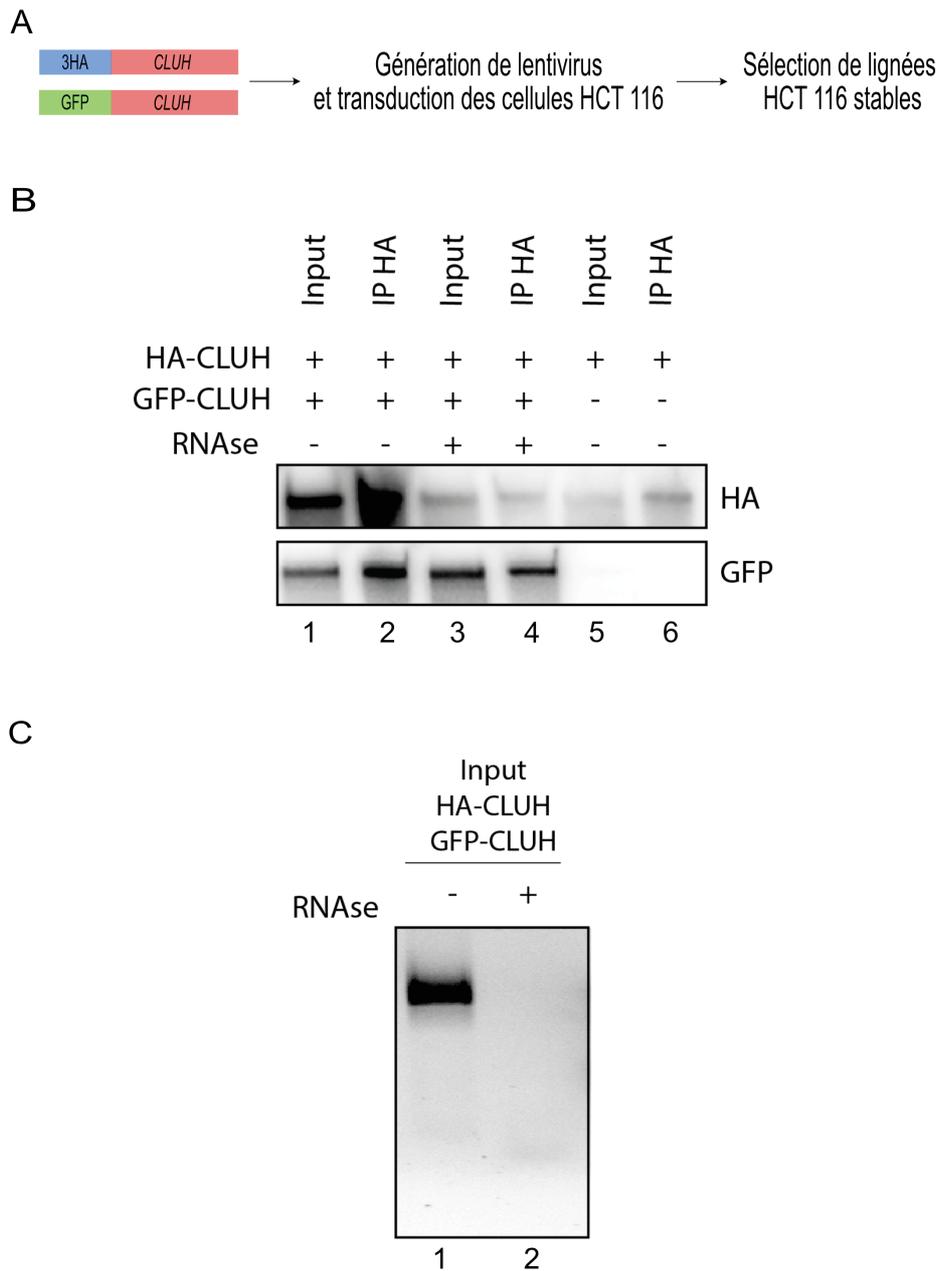
#### **1.2.4. CLUH s'associe avec lui-même indépendamment de la présence d'ARN.**

Chez la drosophile, la protéine de la famille CLU est appelée Clueless et semblerait pouvoir s'associer à elle-même (Sen and Cox, 2016). Nous avons voulu vérifier si cette capacité d'association avec elle-même est conservée chez les mammifères.

Pour déterminer l'association de CLUH avec lui-même, nous avons réalisé une co-IP contre 3HA-CLUH dans des cellules HCT 116. Pour cela, nous avons produit des protéines de fusion de la protéine CLUH humaine fusionnée en N terminale avec l'étiquette 3HA (3 fois l'étiquette hémagglutinine) ou avec la GFP (figure 37A). Ces protéines sont exprimées de manière stable dans les cellules HCT 116 3HA-CLUH seul (Input puits 5, figure 37B) ou 3HA-CLUH et GFP-CLUH ensemble (Input puits 1 et 3, figure 37B). La co-IP contre 3HA-CLUH dans les cellules HCT 116 3HA-CLUH et GFP-CLUH ensemble met en évidence l'immunoprécipitation de GFP-CLUH ce qui suggère l'association de CLUH avec lui-même dans les cellules humaines HCT 116. Cette co-IP a été réalisée en présence de RNase (figure 37B, puits 4). En présence de RNase, tous les ARN semblent être dégradés (figure 37C). De plus, dans ces conditions, l'association entre 3HA-CLUH et GFP-CLUH est maintenue (figure 37B). Ce résultat suggère que cette association est indépendante des ARN. Ces résultats montrent que CLUH s'associe avec lui-même. Cette formation de multimère n'est pas liée à l'association de plusieurs CLUH aux mêmes ARNm car cette association est indépendante de la présence d'ARN.

#### **1.3. CLUH est une protéine cytosolique.**

Pour comprendre l'interaction transitoire de mCLUH avec les protéines mitochondriales identifiées avec l'expérience de BioID (figure 35), nous avons analysé la localisation de la protéine CLUH. Dans un premier temps, nous avons purifié des mitochondries à partir de cellules HCT 116 sauvages (WT). Pour cela, des centrifugations différentielles permettent d'enrichir l'échantillon en mitochondries avant de les purifier grâce à un gradient de sucrose (figure 38A). Par la suite, l'extraction des protéines à partir d'extraits totaux et de mitochondries pures permet d'analyser la présence de CLUH endogène dans ces différentes fractions. On observe un signal plus important des protéines mitochondriales (LRPPRC, GLS et IMMT) ainsi qu'une baisse du signal de la protéine cytosolique GAPDH dans

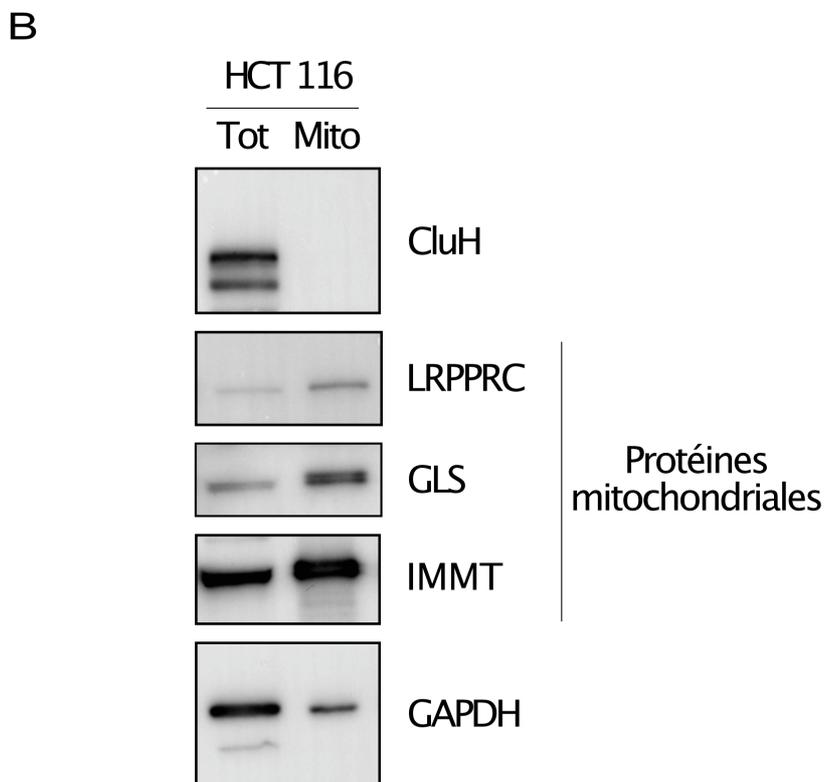
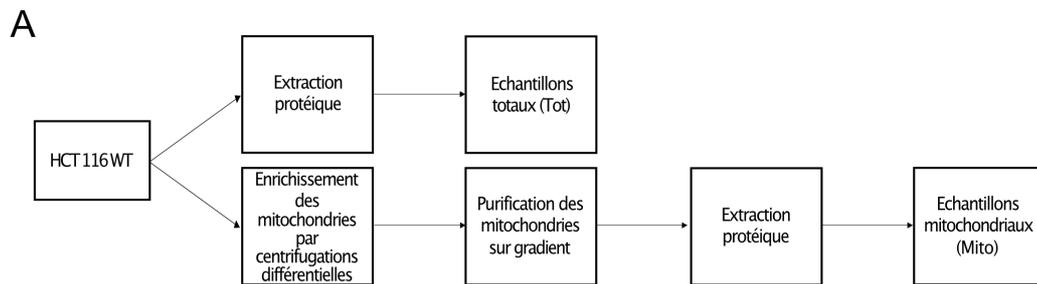


**Figure 37 : CLUH forme des multimères indépendamment de la présence d'ARN.**

- A) Schéma représentatif de l'obtention des lignées HCT 116 stables utilisées lors de la co-IP contre 3HA-CLUH. L'ORF de la version humaine de CLUH est représentée en rouge et est fusionnée à l'étiquette 3HA (3 fois l'étiquette hemagglutinine) ou à l'ORF de la GFP.
- B) Co-IP contre 3HA-CLUH dans des cellules HCT 116 transformées avec la protéine CLUH humaine fusionnée avec l'étiquette 3HA (puits 5 et 6)) ou co-transformées avec CLUH humaine fusionnée à l'étiquette 3HA et CLUH humaine fusionnée avec la GFP (puits 1 à 4). Westernblot représentatif d'une expérience réalisée en duplicat avec les extraits totaux avant la co-IP (Input, puits 1, 3 et 5) et les éluions de la Co-IP (IP-HA, puits 2, 4 et 6). Les protéines CLUH étiquetées sont révélées avec des anticorps dirigés contre l'étiquette HA ou GFP. La co-IP a été réalisée en présence de RNAses T1/A (puits 3 et 4).
- C) Migration des extraits protéiques totaux (Input) utilisés pour la Co-IP, sur gel d'agarose en présence (puits 2) ou non (puits 1) d'un traitement RNAse. La présence d'ARN est révélée au bromure d'éthidium.

l'extrait de mitochondries pures (figure 38B, Mito). Ces signaux servent de témoin de la purification des mitochondries. La protéine CLUH endogène est présente dans les cellules HCT 116 WT (figure 38B, Tot). Néanmoins, CLUH est absent de la fraction de mitochondries pures (figure 38B, Mito).

Nous avons également utilisé une deuxième méthode pour analyser la localisation de CLUH endogène dans les cellules HCT 116 sauvages (WT). Il s'agit d'analyse d'immunofluorescence (IF) par microscopie confocale (figure 39). Pour chaque analyse de microscopie (chaque ligne), nous avons regardé la localisation de la protéine d'intérêt en utilisant un anticorps spécifique de la protéine visualisée révélée par un anticorps secondaire couplé à l'Alexa Fluo 488 (première image). Nous avons aussi marqué les noyaux en bleu grâce au Hoescht (deuxième image) et les mitochondries en rouge grâce au MitoTracker (troisième image). Enfin, une image composite regroupant les trois signaux précédents est montrée (quatrième image). Dans un premier temps, nous avons confirmé la localisation de trois protéines mitochondriales (figure 39A). Pour chaque protéine mitochondriale observée par IF une condition témoin sans anticorps contre la protéine mitochondriale a été réalisée (Témoin, au-dessus de chaque protéine mitochondriale). Ces images d'IF mettent en évidence la localisation mitochondriale des protéines HSPA9, LRPPRC et IMMT avec le signal de la protéine mitochondriale (Alexo Fluo 488) qui co-localise avec le signal mitochondrial (MitoTracker) (figure 39A). Pour analyser la localisation de CLUH endogène, nous avons aussi utilisé l'IF mais le témoin négatif du signal Alexa Fluo 488 correspond à l'IF de CLUH endogène dans une lignée de cellules inactivées pour ce gène (KO, paragraphe 1.1.1.). En absence de CLUH, l'anticorps spécifique de cette protéine ne semble pas donner un signal important (figure 39B, KO). Le peu de signal mis en évidence correspond donc au bruit aspécifique de l'anticorps primaire CLUH. Dans les cellules HCT 116 sauvages (WT), CLUH semble avoir une localisation cytosolique (figure 39B, Alexa Fluo 488). De plus, ce signal ne co-localise pas avec le signal mitochondrial (figure 39B, MitoTracker et Merge). L'ensemble de ces résultats suggère que la localisation de CLUH est cytosolique et différente de la localisation mitochondriale des interactants transitoires de CLUH observée en BioID. Cela met en évidence une question importante liée au rôle de CLUH, à savoir comment, malgré des localisations différentes, une interaction transitoire entre CLUH et les protéines mitochondriales est possible.



**Figure 38 : CLUH n'est pas localisé dans la mitochondrie.**

- A) Représentation schématique de la procédure expérimentale utilisée pour l'obtention d'une fraction protéique totale et d'une fraction protéique de mitochondries pures à partir de cellules HCT 116 sauvages.
- B) Westernblot réalisé avec des extraits protéiques totaux (Tot) et des mitochondries pures (Mito) obtenus à partir de cellules HCT 116 sauvage. Westernblot représentatif d'une expérience réalisée en duplicat. La protéine CLUH est révélée avec des anticorps spécifiques. Les protéines mitochondriales (LRPPRC, GLS, IMMT) et une protéine cytosolique (GAPDH) sont révélées à l'aide d'anticorps spécifiques et servent de témoin de la purification des mitochondries.

#### 1.4. CLUH est lié aux MITO ARNm.

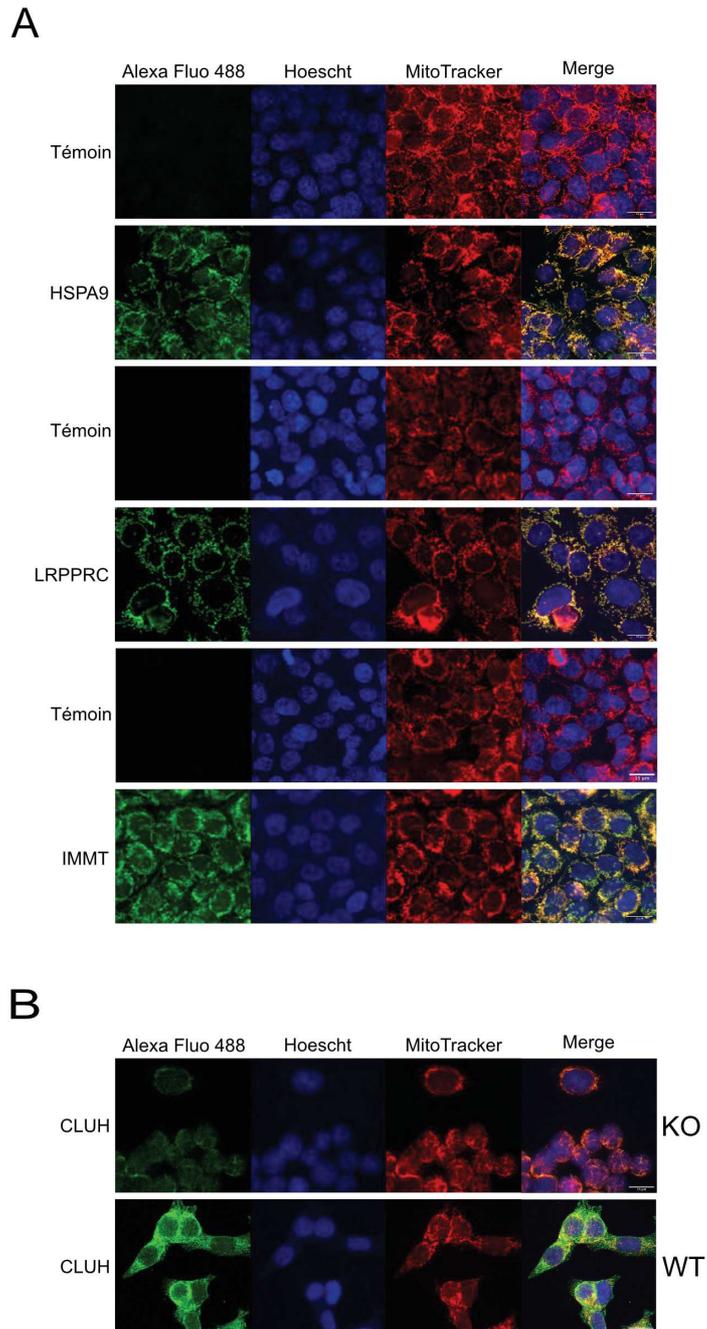
L'association entre la protéine cytosolique CLUH et les protéines mitochondriales interroge. L'une des hypothèses pouvant expliquer ce lien pourrait être les MITO ARNm.

##### 1.4.1. CLUH affecte l'expression de certains MITO ARNm.

Dans un premier temps, nous cherchons à savoir si la protéine CLUH influence l'expression des ARNm. Pour cela, des ARNm ont été extraits à partir d'extraits totaux de cellules HCT 116 sauvages (WT) et inactivés pour le gène de *CLUH* (KO). Après leurs rétrotranscriptions, le taux de différents MITO ARNm a été analysé dans les WT et KO par qRT-PCR (figure 40). Nous avons analysé l'expression de deux ARNm cytosoliques (*SUB1* et *GAPDH*) et d'un ARNm mitochondrial (*MTCO2*) en absence de CLUH. Ces trois ARNm ne semblent pas être affectés par l'absence de CLUH (figure 40). D'autres ARNm ont aussi été testés, les MITO ARNm *ALDH18A1*, *IARS2*, *NDUFS1*, *VWA8*, *GLS*, *IMMT*, *HSPA9*, *ATP5A*, *HSPD1* et *LRPPRC*. Parmi ces différents MITO ARNm, 4 ne semblent pas être affectés par l'absence de CLUH : les ARNm *IARS2*, *NDUFS1*, *VWA8* et *GLS*. En effet, leur expression est similaire en absence (KO) ou en présence (WT) de CLUH (figure 40). L'un des MITO ARNm : *ALDH18A1* semble augmenter en absence de CLUH. L'autre moitié des MITO ARNm : *IMMT*, *HSPA9*, *ATP5A*, *HSPD1* et *LRPPRC* sont aussi affectés par l'absence de CLUH (KO). Leur expression est diminuée dans le KO. Ce résultat suggère que seuls les MITO ARNm sont affectés par l'inactivation de CLUH. Parmi ces MITO ARNm certains d'entre eux seulement semblent avoir une expression dépendante de CLUH : les ARNm *ALDH18A1*, *IMMT*, *HSPA9*, *ATP5A*, *HSPD1* et *LRPPRC*. L'absence de CLUH semble aboutir principalement à une baisse d'expression de ces MITO ARNm (sauf *ALDH18A1* dont l'expression est augmentée). Ces résultats suggèrent que CLUH est impliqué dans la régulation de l'expression de certains MITO ARNm.

##### 1.4.2. CLUH se lie aux MITO ARNm.

Certaines études ont été réalisées sur les protéines de la famille CLU et ont montré que ces protéines lient les ARNm et plus particulièrement les MITO ARNm chez la drosophile (paragraphe INTRODUCTION 3.4.3.1.2.) et chez l'Homme (paragraphe INTRODUCTION 3.4.5.3.). Nous avons effectué un RIP associés à CLUH pour mettre en évidence cette



**Figure 39 : CLUH est localisé dans le cytosol contrairement aux protéines mitochondriales HSPA9, IMMT et LRPPRC identifiées en BioID.**

A) Immunofluorescence sur des cellules HCT 116 sauvages observées par microscopie confocale. Des anticorps primaires contre HSPA9, LRPPRC ou IMMT sont utilisés pour localiser les protéines. Le témoin correspond à une condition sans marquage avec un anticorps primaire.

B) Immunofluorescence de CLUH sur des cellules HCT 116 sauvages (WT) et mutantes (KO) observée par microscopie confocale. Un anticorps primaire contre CLUH est utilisé pour localiser les protéines. Le témoin correspond aux cellules KO dépourvues de protéines CLUH.

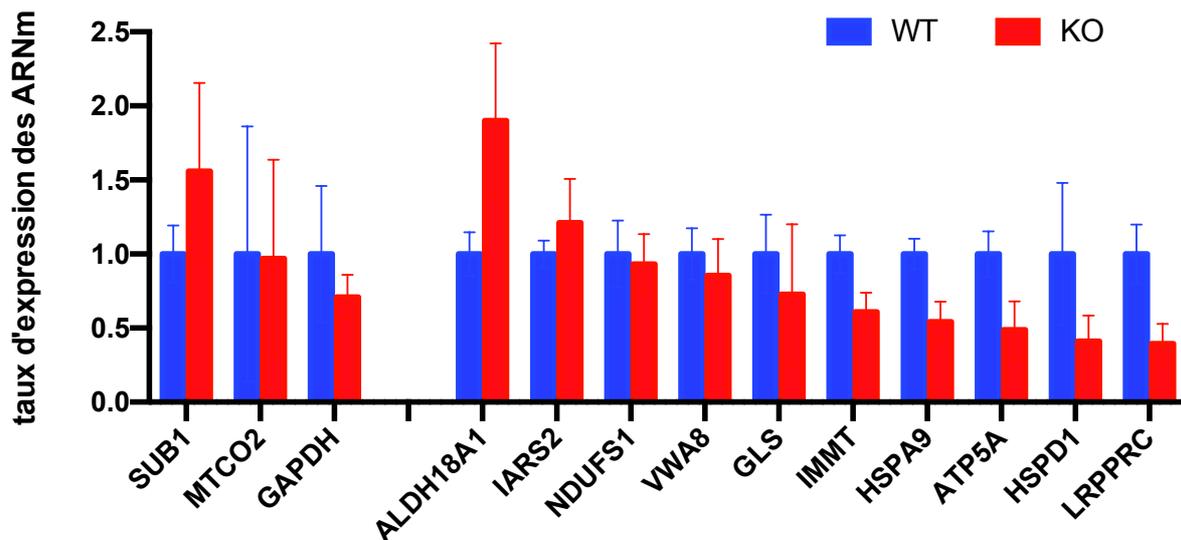
La visualisation du signal se fait grâce à un anticorps secondaire couplé au fluorophore Alexa fluo 488. Les noyaux sont marqués en bleu avec du Hoescht 33342 et les mitochondries sont marquées en rouge grâce au MitoTracker™ Red CMXRos. L'échelle est indiquée au bas de chaque image « merge ».

interaction pour les MITO ARNm codants pour certaines des protéines mitochondriales identifiées en BioID (paragraphe 1.2.3.). Dans les cellules HCT 116, l'expérience de RIP a été réalisée grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifique de CLUH endogène et les ARNm associés à CLUH ont été analysés par qRT-PCR. Lors du RIP, les ARNm sont fixés aux protéines grâce à un pontage ARN-protéines aux UVs avant de précipiter la protéine CLUH et ses ARNm associés. Dans cette expérience, l'utilisation de la lignée HCT 116 inactivé pour le gène *CLUH* (KO) sert de témoin négatif de l'immuno-précipitation. En effet, les ARNm trouvés associés à CLUH dans le KO ne peuvent correspondre qu'à du signal aspécifique et non à une interaction entre CLUH et un ARNm. En plus de 7 MITO ARNm (*ATP5A*, *HSPA9*, *HSPD1*, *ALDH18A1*, *IARS2*, *IMMT* et *VWA8*), deux ARNm cytosoliques ont été testés (*GAPDH* et *SUB1*). Ces deux ARNm cytosoliques ne devraient pas être associés à CLUH d'après l'étude de Gao *et al* (Gao et al., 2014). Ces ARNm servent donc de témoin du RIP. S'ils ne sont pas enrichis dans le RIP contre CLUH dans les cellules HCT 116 sauvages (WT) par rapport au signal aspécifique c'est que le RIP dans le WT a marché puisque des ARNm non associés à CLUH ne sont pas enrichis dans cette expérience. L'enrichissement des 7 MITO ARNm testés semble être plus important dans les cellules WT par rapport aux cellules KO. Cet enrichissement est représentatif de l'association de ces MITO ARNm avec CLUH. Ce résultat confirme donc la liaison de CLUH avec les MITO ARNm *ATP5A*, *HSPA9*, *HSPD1*, *ALDH18A1*, *IARS2*, *IMMT* et *VWA8* (figure 41).

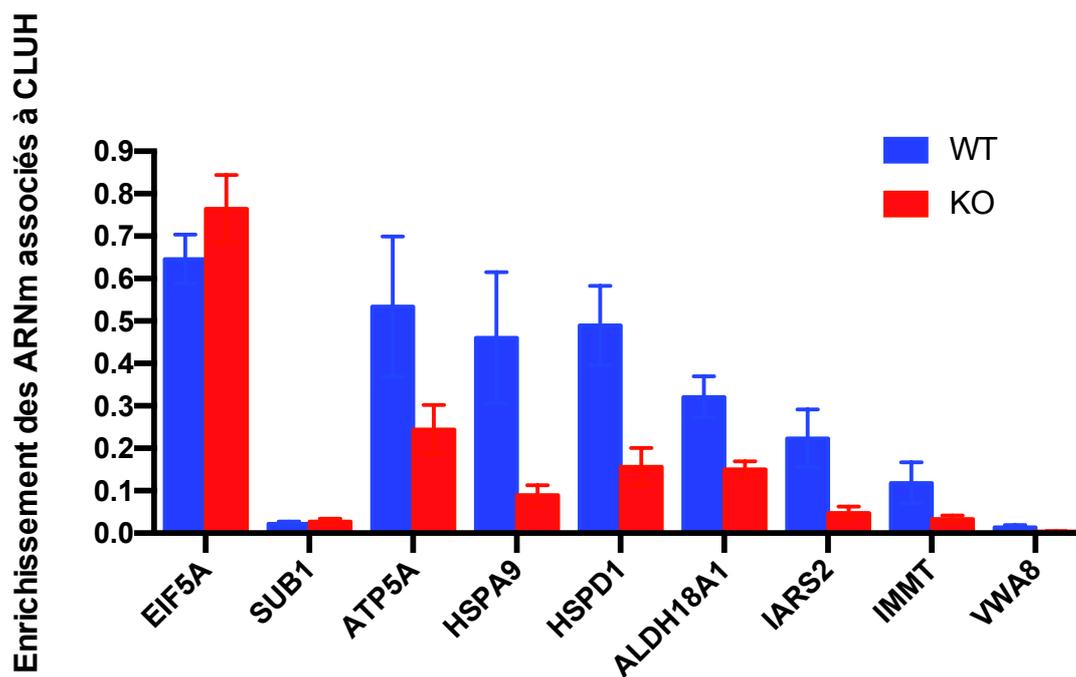
#### **1.4.3. L'absence de CLUH n'a pas d'effet sur la stabilité des MITO ARNm.**

D'après les résultats précédents, l'absence de CLUH aboutit à la baisse de l'expression de certains MITO ARNm (paragraphe 1.4.1.). L'une des possibilités pouvant expliquer cette baisse de l'expression d'un ARNm est un rôle de la protéine d'intérêt dans la stabilité de celui-ci.

Pour tester cette hypothèse, nous avons comparé la stabilité de différents MITO ARNm en absence de CLUH (KO) avec leur stabilité dans des cellules HCT 116 sauvages (WT) (figure 42). Pour ce test, les cellules ont été incubées avec de l'actinomycine D (ActD). L'ActD est un antibiotique provenant de *Streptomyces parvullus* qui cible l'ADN et s'y insère au niveau des paires Guanine-Cytosine. A cause de cette insertion, la transcription de l'ADN en ARN est inhibée (Lai et al., 2019). Les ARNm ne pouvant plus être formés grâce à la transcription, en analysant le taux de ces ARNm au cours du temps, nous observons la cinétique de dégradation



**Figure 40 : La délétion de *CLUH* affecte le taux de certains MITO ARNm dans les cellules HCT116.** RT-qPCR représentant l'expression relative des ARNm dans des extraits totaux de cellules HCT 116 mutantes (*CLUH* KO, rouge) par rapport aux extraits de cellules sauvages (WT, en bleu). Le taux d'expression de chaque ARNm a été normalisé par rapport à *EIF5A*. Expérience réalisée en triplicat. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type entre trois réplicats.



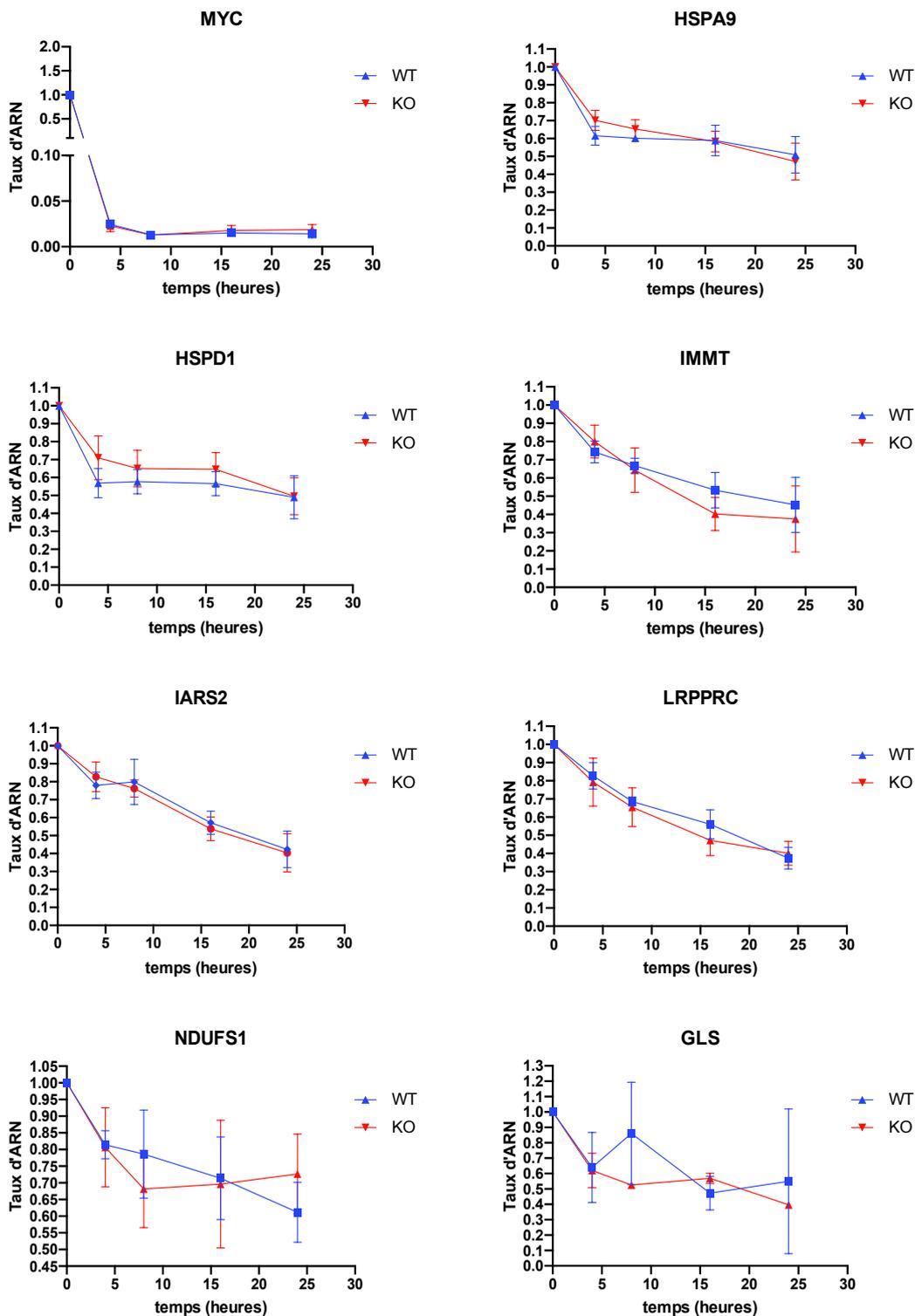
**Figure 41 : *CLUH* est associé à certains MITO ARNm.** RT-qPCR représentant les résultats d'une immunoprécipitation des ARNm après pontage UV (RIP) associés à *CLUH* dans les cellules HCT 116 sauvages (WT, en bleu). L'immunoprécipitation est réalisée avec des anticorps dirigés contre la protéine *CLUH* endogène. Le taux des ARNm est normalisé par rapport au taux d'ARNm GAPDH. L'enrichissement du RIP est calculé par rapport au taux dans l'extrait total (Input). Un RIP réalisé avec des cellules HCT116 dépourvues de *CLUH* (KO, rouge) correspond à un témoin de spécificité d'enrichissement. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type de trois réplicats biologiques.

de ces ARNm et donc leur stabilité. Plus le temps pour dégrader la moitié des ARNm ( $t_{1/2}$ ) est long, plus l'ARNm est stable. En analysant la cinétique de dégradation des ARNm dans les cellules sauvages (WT) et inactivées pour *CLUH* (KO), nous pouvons donc voir l'effet de *CLUH* dans la stabilité de ces ARNm. Pour contrôler cette expérience de stabilité des ARNm, un ARNm indépendant de *CLUH*, est utilisé. L'ARNm utilisé ici est *MYC*. Cet ARNm est pratiquement entièrement dégradé au bout de 4 heures et la vitesse de dégradation des ARNm *MYC* est similaire entre les deux lignées (figure 42). Cette absence de différence entre WT et KO pour l'ARNm *MYC* indique que l'expérience de stabilité des ARNm a marché dans les deux lignées. Le rôle de *CLUH* dans la stabilité des MITO ARNm *HSPA9*, *HSPD1*, *IMMT*, *IARS2*, *LRPPRC*, *NDUFS1* et *GLS* a ensuite été analysé. Ces 6 MITO ARNm sont très stables puisqu'il faut au moins 20 heures pour dégrader la moitié de ces MITO ARNm. De plus, nous n'observons pas de différence dans la vitesse de dégradation de ces 6 MITO ARNm dans les deux lignées WT et KO (figure 42). Ces résultats mettent en évidence la grande stabilité des MITO ARNm. De la même manière, l'absence de différence dans la vitesse de dégradation des MITO ARNm entre WT et KO met en évidence que l'absence de *CLUH* n'a pas d'effet sur leur stabilité. Cela suggère que *CLUH* n'affecte pas la stabilité des MITO ARNm testés.

### 1.5. Rôle de *CLUH* dans la traduction.

D'après les résultats précédents, nous avons mis en évidence une association transitoire entre *CLUH* et les protéines mitochondriales par BioID (paragraphe 1.2.3.). Nous avons aussi confirmé que *CLUH* lie les MITO ARNm codant pour ces protéines mitochondriales précédemment mises en évidence (paragraphe 1.4.2.). De plus, l'expression de certains de ces MITO ARNm semble être altérée par l'absence de *CLUH* (paragraphe 1.4.1.) bien que leur stabilité ne soit pas modifiée (paragraphe 1.4.3.).

L'une des hypothèses qui pourrait expliquer le lien entre *CLUH*, les MITO ARNm et les protéines codées par ces MITO ARNm serait liée à la traduction. En effet, le rôle de *CLUH* au niveau de la régulation de la traduction des MITO ARNm pourrait expliquer la proximité de *CLUH* avec les protéines mitochondriales.



**Figure 42 : La stabilité des MITO ARNm n'est pas affectée par la délétion de CLUH.**

Cinétique de stabilité de différents ARNm après un traitement à l'actinomycine D dans des cellules HCT 116 sauvages (WT, bleu) et mutantes (KO, rouge). Le taux des ARNm au cours du temps est représenté en fonction du taux au temps t<sub>0</sub>, correspondant à l'initiation du traitement à l'actinomycine D. Le taux de chaque ARNm a été normalisé par rapport au taux de *GAPDH*. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type de trois réplicats biologiques.

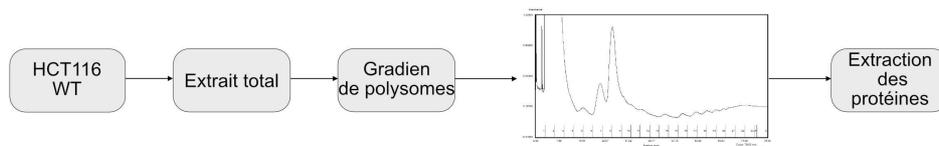
### **1.5.1. CLUH est associé à la traduction cytosolique.**

Pour savoir si CLUH est associé à la traduction, nous avons analysé la présence de la protéine endogène CLUH dans les fractions issues d'un fractionnement des polysomes de cellules HCT 116 sauvages (WT) (figure 43). Pour cela, un extrait total de cellules HCT 116 WT est soumis à un gradient de sucrose permettant de séparer les différentes sous-unités des ribosomes des monosomes (un ribosome seul) et des différents polysomes (2 ou plus ribosomes associés au même ARNm). Les protéines de chaque fraction de ce gradient de polysomes ont ensuite été extraites (figure 43A).

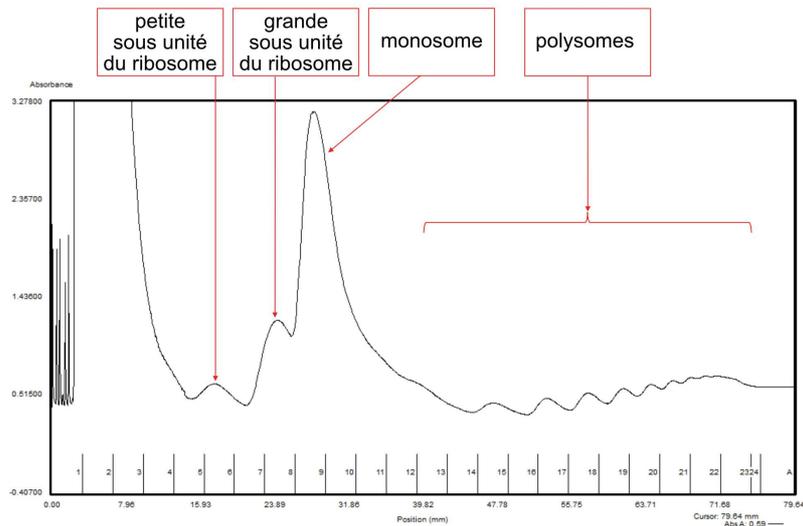
Lors du fractionnement du gradient de polysome, nous avons observé l'évolution de la DO à 260 nm en fonction des fractions (figure 43B). La DO à 260nm est représentative des ARN présents dans les différentes fractions. Dans le cas du gradient de polysome, il s'agit des ARN ribosomiques 18S (pour la petite sous-unité du ribosome) et 28S, 5,8S et 5S (pour la grande sous-unité du ribosome). Le suivi de la DO à 260 nm met donc en évidence la bonne séparation des différents éléments du gradient (différentes sous-unités, monosomes et polysomes). Les petites sous-unités du ribosome sont présentes dans les fractions 5 et 6, les grandes sous-unités sont présentes dans les fractions 7 et 8, les monosomes sont présents dans les fractions 9 à 11 et les polysomes sont présents dans les fractions 12 à 23 (figure 43B).

Suite à l'extraction des protéines à partir des fractions du gradient de polysome, la présence de CLUH dans chaque fraction a été analysée par westernblot (figure 43C). Pour chaque fraction, la totalité de protéines extraites a été déposée dans ce westernblot. Le bleu de coomassie permet de voir l'ensemble des protéines présentes dans chaque fraction. Cette coloration montre que la quantité de protéines est très inégale en fonction des fractions du gradient de polysome avec un grand nombre de protéines présentes dans les fractions 2 à 5 et beaucoup moins de protéines présentes dans les fractions polysomes (12 à 23). Ces résultats sont cohérents avec la réalisation du gradient de polysome. En effet, lors du gradient de polysome, les complexes protéiques sont séparés avec les complexes les plus grands (les polysomes) qui sédimentent plus loin que les protéines isolées. Les protéines isolées sont donc présentes dans les premières fractions et les complexes protéiques dans les dernières fractions. Le taux de protéines au bleu de coomassie est donc cohérent avec la réalisation du gradient. De la même manière, l'analyse de la présence de la protéine de la grande sous-unité du ribosome RPL7A dans les différentes fractions du gradient de polysome permet de

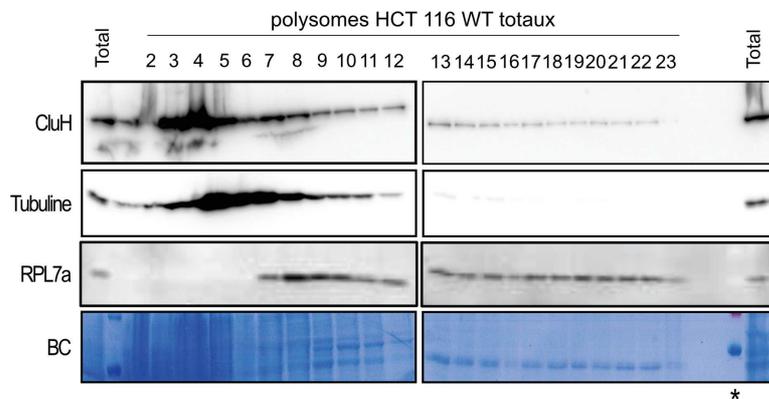
A



B



C



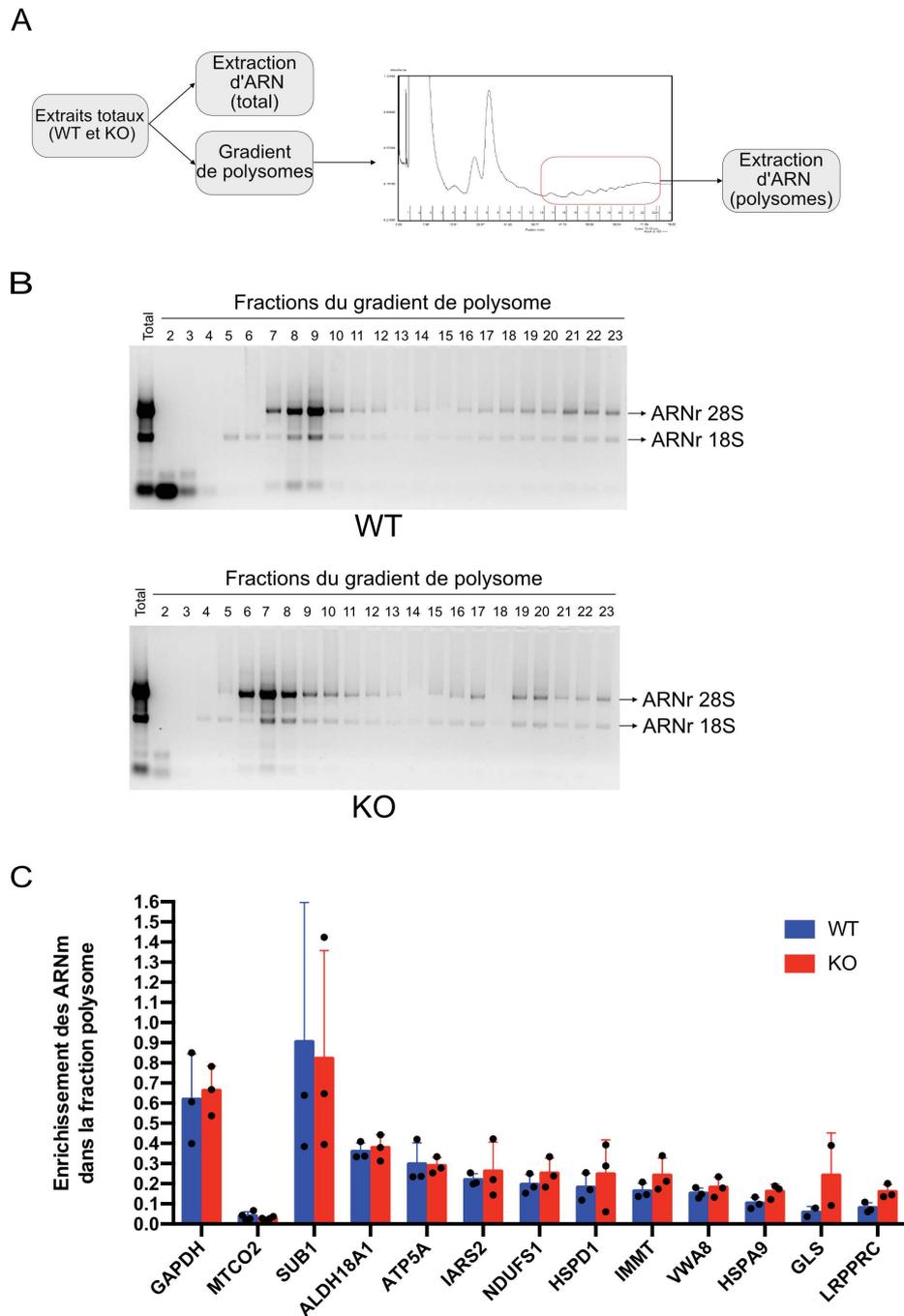
**Figure 43 : Une fraction de CLUH est associée aux polysomes totaux.**

- A) Schéma représentatif de l'analyse des protéines associées à la traduction.
- B) Vérification du gradient de polysome par le suivi de la variation de l'absorbance à 280 nm des différentes fractions du gradient de polysome HCT 116 sauvage (WT). Les différents éléments présents dans ce gradient de polysome sont montrés avec des flèches rouges.
- C) Après extraction des protéines de chaque fraction du gradient de polysome total de cellules HCT 116 WT, ceux-ci ont été observés par westernblot. Utilisation d'anticorps spécifique de CLUH, de la tubuline ainsi que d'une protéine de la grande sous-unité du ribosome RPL7a, qui permet de contrôler la présence de ribosomes. La coloration des protéines au bleu de coomassie (BC) sert de témoin de charge. Les fractions sont numérotées de 1 à 23 avec les fractions 8 à 10 qui correspondent au monosome et les fractions 12 à 23 qui correspondent aux polysomes. Le puits (\*) correspond au marqueur de poids moléculaire avec la marque 55 kDa visible en bleu.

confirmer la présence des différents éléments des polysomes dans ces fractions. On observe la présence de la protéine RPL7A à partir de la fraction 7. De plus, le signal le plus important est au niveau des fractions 8 à 10 (figure 43C). Ces résultats sont cohérents avec les résultats de DO à 260 nm où la grande sous-unité apparaît à partir de la fraction 7 et où le signal le plus important correspond aux fractions 8 à 11. Les fractions 8 à 11 correspondant à la grande sous-unité du ribosome et aux monosomes (figure 43B).

L'analyse de la présence de CLUH dans les différentes fractions du gradient de polysome met en évidence la présence d'une grande quantité de CLUH dans les premières fractions de ce gradient (fractions 2 à 5). Ce résultat suggère qu'une grande partie des protéines CLUH n'est pas associée aux ribosomes. Néanmoins, du signal CLUH apparaît aussi dans les fractions 6 à 22 correspondantes aux différents éléments des ribosomes. Ce signal ne correspond qu'à une portion de la protéine CLUH. De plus, le fait que la tubuline (une protéine cytosolique) n'est que faiblement présente dans la fraction polysomale implique que les protéines CLUH présentes dans les fractions polysomales est spécifique. Ce résultat suggère que CLUH est présent dans les fractions ribosomales et notamment polysomales. Cela pourrait indiquer une association entre CLUH et les ribosomes cytosoliques et donc la traduction cytosolique (figure 43C). Néanmoins, cette association ne correspondrait qu'à une petite fraction des protéines CLUH puisque la plupart semblent être libres (dans les premières fractions).

Il est à noter que ce n'est pas la première fois que la traduction cytosolique apparaît dans nos résultats. En effet, lors de la co-IP contre 3HA-mCLUH dans les cellules HCT116, la protéine de la grande sous unité du ribosome RPL7A a été mise en évidence comme l'un des 4 interagants stables de CLUH (figure 33A et 33B). D'après la co-IP, 4, 2 et 3 spectres ont été mis en évidence pour cette protéine dans les trois réplicats biologiques de la lignée 3HA-mCLUH contre 0 dans les réplicats de la lignée sauvage (WT) (figure 33B). Lors de l'expérience de BioID, des protéines du ribosome ont aussi été mises en évidence à proximité de BirA\*-HA-mCLUH dans les cellules HCT 116. En effet, elles sont moins nombreuses que les protéines mitochondriales mais il y en a 5 mises en évidence lors de cette expérience (figure 35B). Dans la lignée BirA\*-HA-mCLUH, les protéines de la grande sous unité du ribosome RPL7A, RPL34, RPL28 et RPL36AL ainsi que la protéine RPS4X de la petite sous unité du ribosome semblent être retrouvées à proximité de CLUH (figure 35B).



**Figure 44 : L'absence de CLUH n'affecte pas l'efficacité de traduction des MITO ARNm.**

- A) Schéma représentatif de l'analyse des ARNm associés à la traduction.
- B) Analyse sur gel d'agarose des ARN présents dans chacune des fractions du gradient de polysome dans les cellules HCT 116 sauvages (WT) et mutantes pour CLUH (KO).
- C) Analyse par RT-qPCR de l'enrichissement des ARNm présents dans les polysomes totaux (fractions 11 à 23) issus de cellules mutantes (KO, rouge) et sauvages (WT, bleu). Le taux d'ARN est normalisé par rapport au taux de l'ARNm *EIF5A* et l'enrichissement de chaque ARNm dans la fraction polysomale est calculé par rapport au taux du messager dans la fraction totale correspondante. Expérience réalisée en triplicat. La barre d'erreur correspond à l'écart-type de trois réplicats biologiques. Les carrés noirs correspondent aux différents réplicats biologiques.

L'ensemble de ces résultats suggère que CLUH pourrait être associé à traduction cytosolique.

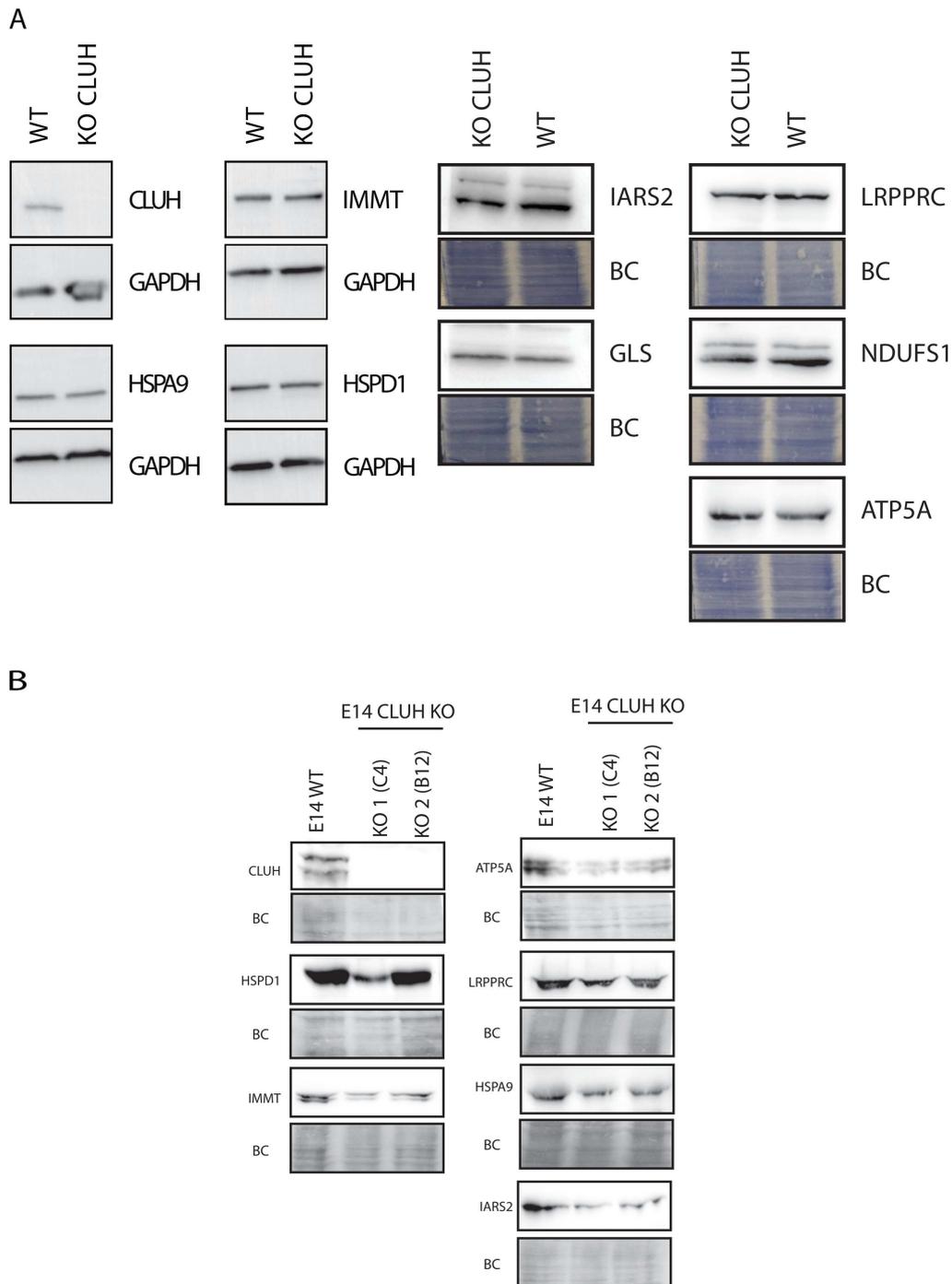
### **1.5.2. CLUH n'est pas impliqué dans l'association des MITO ARNm avec les polysomes dans le cytosol.**

Si CLUH est associé à la traduction cytosolique, nous voulons savoir si CLUH est important pour la traduction des ARNm et notamment ceux avec les MITO ARNm auxquels il est associé (figure 41). Nous allons rester focalisés sur les MITO ARNm qui codent pour des protéines mitochondriales retrouvées à proximité de CLUH lors de l'expérience de BioID (figure 35). Il s'agit des MITO ARNm *ALDH18A1*, *ATP5A*, *IARS2*, *NDUFS1*, *HSPD1*, *IMMT*, *VWA8*, *HSPA9*, *GLS* et *LRPPRC*.

Pour cela, nous allons analyser l'association de ces MITO ARNm avec les polysomes par qRT-PCR. Des extraits de cellules HCT 116 sauvages (WT) et inactivées pour le gène *CLUH* (KO) ont été soumis à un gradient de polysome avant que les ARNm des fractions 11 à 23 (fraction des polysomes) soit extraits et analysés par qRT-PCR. Pour la normalisation du taux de chaque ARNm par rapport à son niveau d'expression dans les cellules concernées, un extrait total de cellules WT et KO a été utilisé. Celui-ci est obtenu suite à l'extraction des ARNm des extraits totaux WT et KO (figure 44A). Les gradients de polysome WT et KO ont été vérifiés sur gel d'agarose pour observer les ARN. Les ARNm de chaque fraction des gradients de polysome ont été extraits et déposés sur gel d'agarose. Dans chaque puits de ce gel,  $\frac{1}{4}$  des ARN de chaque fraction a été déposé (figure 44B). Dans un extrait total (figure 44B, Total), la migration des ARN sur gel d'agarose met en évidence trois signaux qui correspondent aux ARN ribosomiques (ARNr) 28S (pour la grande sous-unité du ribosome), 18S (pour la petite sous-unité du ribosome) et les ARNt puisque ces trois populations correspondent aux ARN les plus représentés dans un extrait d'ARNm. Les signaux correspondant aux ARNr 28S et 18S sont inscrits et le signal correspondant aux ARNt est le premier signal trouvé en bas du gel d'agarose (figure 44B). Pour le gradient de polysome WT, il y a les petites sous-unités du ribosome dans les fractions 5 et 6 (ARNr 18S seul), les grandes sous-unités dans la fraction 7 (ARNr 28S seul), les monosomes dans les fractions 8 à 10 (ARNr 18S et 28S ensembles) et les polysomes dans les fractions 11 à 23 (ARNr 18S et 28S ensembles). Ce résultat met en évidence la bonne séparation des différents éléments des ribosomes dans les cellules HCT 116 WT. L'un



des signaux les plus importants lors d'un gradient de polysome correspond aux monosomes (il y a plus de monosomes que de sous-unités du ribosome séparées ou que des différentes populations de polysomes (2 ribosomes, 3 ribosomes, ...). Cela est confirmé par ce gel d'agarose car le signal le plus important correspond aux fractions 8 et 9 dans lesquelles se trouvent les monosomes (figure 44B). De manière similaire, l'analyse des ARN présents dans les différentes fractions du gradient de polysome issu des cellules HCT 116 KO met aussi en évidence la bonne réalisation de ce gradient avec les petites sous-unités du ribosome présent dans les fractions 4 et 5 (ARNr 18S seul), les grandes sous-unités du ribosome dans la fraction 6 (ARNr 28S seul), les monosomes dans les fractions 7 à 10 (ARNr 28S et 18S ensembles) et les polysomes dans les fractions 11 à 23 (ARNr 28S et 18S ensembles). Avec les fractions « monosomes » qui ont le signal le plus important (fractions 7 et 8) (figure 44B). Les ARN des fractions 11 à 23 ont ensuite été rassemblés puis rétrotranscrits avant d'analyser leur taux d'association avec la fraction polysomale par qPCR dans les cellules WT (en bleu) et KO (en rouge) (figure 44C). Les ARNm cytosoliques *GAPDH* et *SUB1* ainsi que l'ARNm mitochondrial *MTCO2* ont été utilisés pour contrôler l'association des ARNm avec les polysomes dans le WT et le KO. En effet, ces ARNm ne devant pas être impactés par l'absence de CLUH dans le KO, leur taux d'association avec les polysomes doit être égal entre le WT et le KO pour que l'expérience soit validée. Dans cette expérience, il y a bien une absence de différence de l'association des ARNm *GAPDH*, *SUB1* et *MTCO2* entre le WT et le KO ce qui est représentatif d'une absence de modification du taux de traduction de ces ARNm en absence de CLUH (figure 44C). Pour ce qui concerne les 10 MITO ARNm analysés dans cette étude, leur association avec la fraction polysomale ne semble pas être altérée en absence de CLUH (KO, en rouge) pour aucun d'entre eux. En effet, l'enrichissement de chaque MITO ARNm est le même dans le WT (en bleu) et dans le KO (en rouge). Ce résultat suggère que CLUH n'affecte pas l'association de ces MITO ARNm avec les ribosomes et donc leur traduction.



**Figure 45 : Le taux des protéines codées par les MITO ARNm associés à CLUH n'est pas affecté par la délétion de CLUH.**

- A) Westernblot contre des extraits protéiques totaux de cellules HCT116 sauvages (WT) et inactivé pour le gene de *CLUH* (KO *CLUH*).
- B) Westernblot contre des extraits protéiques totaux de cellules souches de souris (mES E14) sauvages (E14 WT) et inactivé pour le gène de *Cluh* (E14 *CLUH* KO). Les deux lignées mES E14 inactivées pour le gène de *Cluh* (KO 1 (C4) et KO 2 (B12)) ont été analysées.

Les protéines mitochondriales (IMMT, HSPA9, HSPD1, IARS2, GLS, LRPPRC, NDUFS1 et ATP5A) sont révélées par l'utilisation d'anticorps spécifiques. La présence de CLUH dans les extraits est révélée avec des anticorps dirigés contre la protéine endogène. La GAPDH ou le bleu de coomassie (BC) servent de témoin de charge.

### **1.5.3. Le taux des protéines mitochondriales n'est pas affecté par l'absence de CLUH chez les mammifères.**

D'après nos résultats précédents, l'expression de certains MITO ARNm était altérée en absence de CLUH. On observait notamment une baisse de l'expression des MITO ARNm *IMMT*, *HSPA9*, *ATP5A*, *HSPD1* et *LRPPRC* en absence de CLUH (figure 40 et paragraphe 1.4.1.). Nous avons également vu que ce n'était pas leur stabilité qui a été affectée par l'absence de CLUH (figure 42 et paragraphe 1.4.3.). L'expression des MITO ARNm étant altérée sans lien avec une diminution de leur stabilité en absence de CLUH et sachant que le taux de traduction de ces ARNm n'est pas non plus affecté par l'absence de CLUH. Nous avons voulu savoir si CLUH affecte l'expression des protéines mitochondriales codées par ces MITO ARNm. En effet, s'il y a moins d'ARNm mais une même fraction de ce total d'ARNm en cours de traduction, il pourrait y avoir un effet au niveau de l'expression des protéines mitochondriales correspondantes. Pour voir cela, nous avons analysé l'expression de 8 protéines mitochondriales (*HSPA9*, *HSPD1*, *IMMT*, *IARS2*, *GLS*, *LRPPRC*, *NDUFS1* et *ATP5A*) dans les cellules sauvages (WT) ou inactivées pour le gène de *CLUH* (KO *CLUH*) (figure 45A). Pour contrôler la quantité de protéines entre les cellules WT et KO *CLUH*, l'anticorps spécifique de la *GAPDH* a été utilisé pour les expériences sur *CLUH*, *HSPA9*, *IMMT* et *HSPD1* et la coloration des protéines au bleu de coomassie (BC) a été utilisée pour les expériences sur *IARS2*, *GLS*, *LRPPRC*, *NDUFS1* et *ATP5A*. Dans chaque expérience la quantité de protéines est similaire entre WT et KO *CLUH*. Cela va permettre de confirmer que les différences ou les similarités dans l'expression des différentes protéines testées sont bien dues à l'absence de *CLUH*. Dans la lignée HCT 116 KO *CLUH*, nous avons confirmé l'absence de l'expression de la protéine *CLUH* grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifique de cette protéine (figure 45A). L'observation du signal pour les différentes protéines testées ne montre pas de différence entre le WT et le KO *CLUH*. L'absence de *CLUH* ne semble pas affecter le taux de ces protéines mitochondriales même pour les protéines *IMMT*, *HSPA9*, *HSPD1*, *ATP5A* et *LRPPRC* qui ont une expression du MITO ARNm correspondant affecté par l'absence de *CLUH*.

L'analyse du taux d'expression des protéines mitochondriales a aussi été réalisée dans les cellules souches de souris (mES E14) sauvées (E14 WT) et inactivées pour le gène de *Cluh* (E14 *CLUH* KO). Dans le cas des cellules E14 *CLUH* KO, deux lignées inactivées pour le gène *Cluh* ont été testées : les lignées mES E14 KO1 C4 (KO 1 (C4)) et mES E14 KO2 B12 (KO 2 (B12)) (figure 45B). Ces deux lignées ont été obtenues grâce à l'utilisation du système CRISPR-Cas9

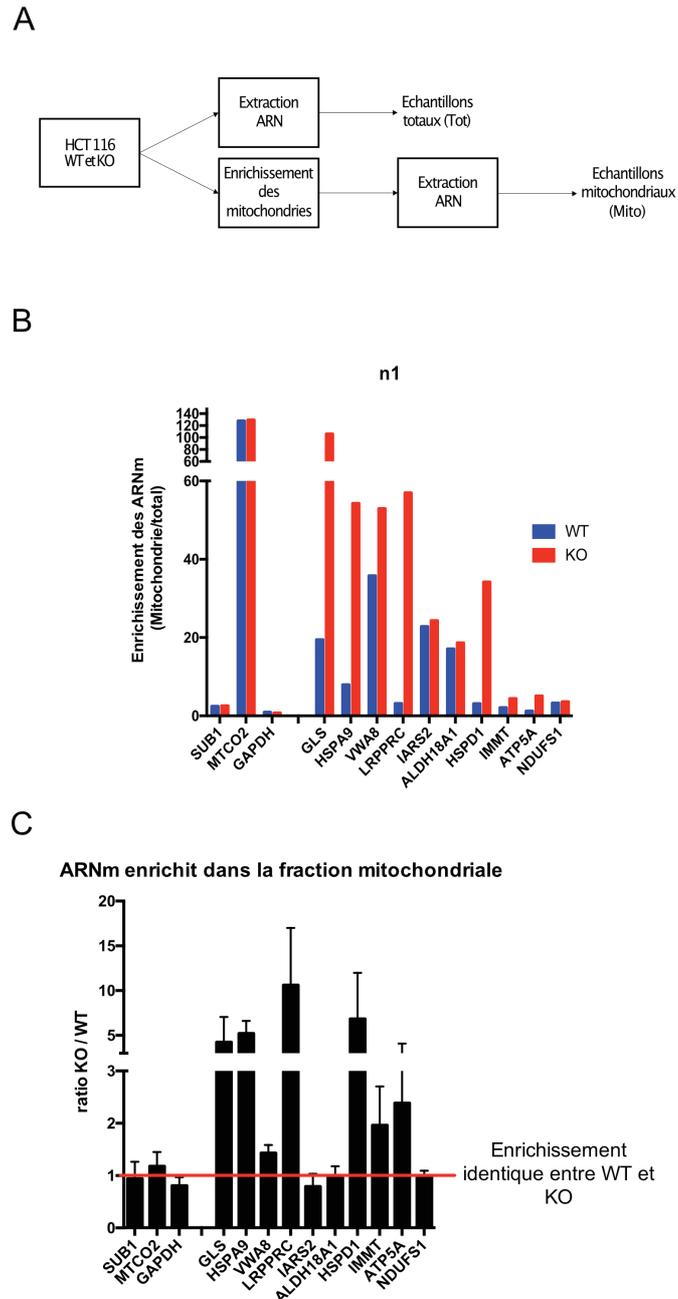


(figure 29, paragraphe 1.1.2.). Comme dans les cellules HCT 116, l'utilisation de la coloration des protéines au BC sert de témoin de charge des protéines ce qui permet d'interpréter la différence ou non de signal entre les trois lignées comme étant dépendante de l'absence de CLUH (figure 45B). Grâce à l'utilisation d'un anticorps spécifique de la protéine CLUH endogène, nous observons l'absence de celle-ci dans les deux lignées E14 CLUH KO. Pour la protéine HSPD1, seule la lignée KO 1 (C4) montre une diminution de l'expression de cette protéine. L'absence de CLUH étant effective dans les deux lignées E14 CLUH KO, cette différence ne doit pas être liée à CLUH (figure 45B). De la même manière, les protéines LRPPRC, et HSPA9 ne semblent pas avoir un taux d'expression altéré par l'inactivation de *Cluh* dans les cellules souches de souris. Pour les protéines IMMT, ATP5A, HSPA9 et IARS2, il semble y avoir moins de protéines en absence de CLUH dans les deux lignées E14 CLUH KO néanmoins, d'après la coloration au BC, cette différence ne semble être liée qu'à une différence de chargement en protéines de ces lignées mutantes. L'ensemble de ces résultats ne montre pas de différence dans le taux des protéines mitochondriales testées entre les cellules ES E14 WT et ES E14 CLUH KO.

Ces résultats, similaires aux résultats observés dans les cellules humaines HCT 116, suggèrent que CLUH n'affecte pas l'expression des protéines mitochondriales que nous avons identifiées par BiID chez les mammifères. De plus, nous n'avons qu'une seule lignée inactivée pour le gène *CLUH* dans les cellules humaines HCT 116. Les observations similaires dans deux lignées de cellules souches de souris inactivées pour le gène de *Cluh* nous permettent de valider les résultats en cellules humaines puisque trois inactivations différentes donnent les mêmes résultats.

#### 1.6. Rôle de CLUH dans la localisation mitochondriale des MITO ARNm et de leur traduction.

D'après la bibliographie, plusieurs études menées chez l'Homme et la drosophile suggèrent que les protéines de la famille CLU sont liées aux MITO ARNm dans la fraction mitochondriale et notamment à leur traduction à la surface mitochondriale (Sen and Cox, 2016; Vardi-Oknin and Arava, 2019).



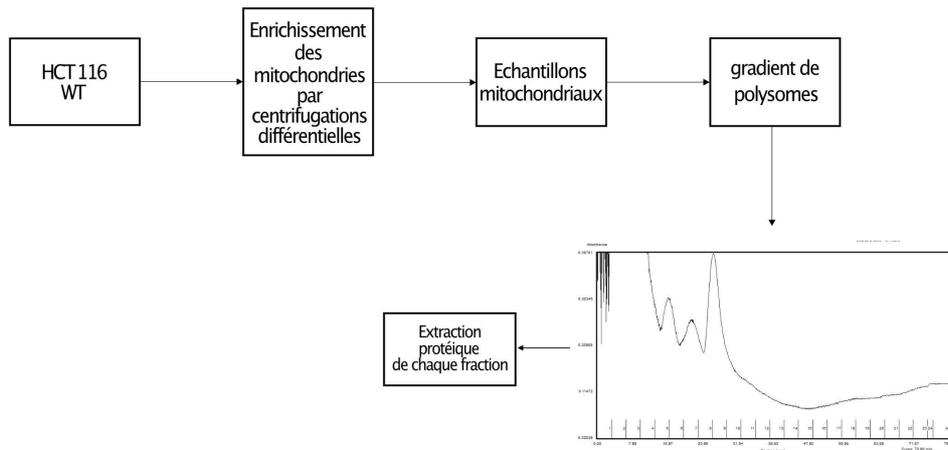
**Figure 46 : L'association des MITO ARNm à la fraction mitochondriale est augmentée en absence de CLUH.**

- A) Schéma représentatif de la procédure d'obtention des ARN à partir d'extraits protéiques totaux et à partir d'une fraction enrichie en mitochondries. L'enrichissement en mitochondries est réalisé grâce à des centrifugations différentielles. Les ARN ont été isolés à partir de cellules HCT 116 sauvages (WT) et dépourvues de CLUH (KO).
- B) RT-qPCR représentant l'enrichissement de chaque ARNm dans la fraction mitochondriale. Le taux d'ARNm a été normalisé par rapport au taux de l'ARNm *EIF5A*. Expérience réalisée en triplicat. Représentation du réplicat 1 (n1).
- C) RT-qPCR représentant l'enrichissement de chaque ARNm dans la fraction mitochondriale. Le taux d'ARNm a été normalisé par rapport au taux de l'ARNm *EIF5A*. L'enrichissement de chaque ARNm est représenté en fonction du ratio d'enrichissement dans le KO sur l'enrichissement dans le WT. Expérience réalisée en triplicat. Le trait rouge représente les valeurs d'enrichissements pour lesquelles il n'y a pas de différence entre WT et KO.

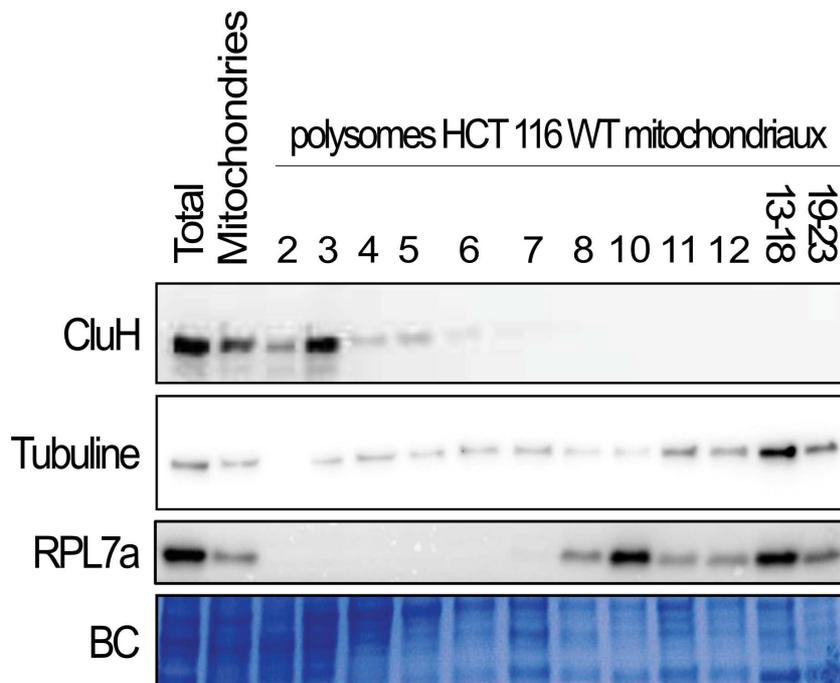
### **1.6.1. Les MITO ARNm semblent être localisés dans la fraction mitochondriale de manière plus importante en absence de CLUH.**

Nous avons d'abord analysé l'association des MITO ARNm avec la fraction mitochondriale et le rôle de CLUH dans cette association dans les cellules HCT 116 (figure 46). Des extraits d'ARN totaux et mitochondriaux ont été obtenus à partir de cellules HCT 116 sauvages (WT) ou inactivées pour le gène de *CLUH* (KO). Pour les extraits mitochondriaux, un enrichissement des mitochondries a été réalisé grâce à des centrifugations différentielles (figure 46A). L'analyse de l'enrichissement des ARNm dans la fraction mitochondriale est déterminée grâce au ratio de la fraction d'ARNm présent dans la fraction mitochondriale sur le taux d'expression de celui-ci dans la fraction totale. Le réplicat 1 (n1) a été montré séparément et est représentatif pour l'analyse de l'enrichissement des MITO ARNm dans la fraction mitochondriale (figure 46B). La représentation de l'enrichissement des MITO ARNm dans la fraction mitochondriale sous la forme d'un ratio KO sur WT met en évidence l'augmentation de l'enrichissement de certains MITO ARNm en absence de CLUH (figure 46B et C). Une fois encore, les ARNm cytosoliques *SUB1*, *GAPDH* et l'ARNm mitochondrial *MTCO2* servent à contrôler l'expérience. Pour ces trois ARNm qui ne sont pas impactés par l'absence de CLUH dans le KO, il ne doit pas y avoir de différence d'association avec la fraction mitochondriale avec (WT) ou sans (KO) CLUH. L'ensemble de ces trois gènes ne montre pas de différence d'association avec la fraction mitochondriale (figure 46B et 46C). Ces résultats mettent en évidence la bonne réalisation de cette expérience. Lors de cette expérience, on détermine l'enrichissement des ARNm dans la fraction mitochondriale par rapport à leur expression dans la fraction totale. Cela implique que les ARNm cytosoliques ne sont pas enrichis dans la fraction mitochondriale contrairement aux ARNm mitochondriaux. Cette logique est respectée dans cette expérience car l'ARNm mitochondrial *MTCO2* est fortement enrichi dans la fraction mitochondriale alors que les ARNm cytosoliques *GAPDH* et *SUB1* sont très peu enrichis (figure 46B). Cela met en évidence un bon enrichissement en mitochondrie de cette fraction mitochondriale. Les MITO ARNm *IARS2*, *ALDH18A1* et *NDUFS1* ne semblent pas être affectés par l'absence de CLUH. En effet, l'association de ces ARNm avec la fraction mitochondriale est identique entre WT et KO (figure 46C). Inversement les ARNm *GLS*, *HSPA9*, *VWA8*, *LRPPRC*, *HSPD1*, *IMMT* et *ATP5A* ont un enrichissement dans la fraction mitochondriale fortement augmentée en absence de CLUH (figure 46C). L'ensemble de ces résultats suggère que, à l'exception des MITO ARNm *IARS2*, *ALDH18A1* et *NDUFS1*, il y aurait un enrichissement

A



B



**Figure 47 : CLUH est absent des polysomes associés à la fraction mitochondriale.**

- A) Schéma représentatif de l'analyse des protéines associées à la traduction dans la fraction mitochondriale.
- B) Après extraction des protéines de chaque fraction du gradient de polysomes associés à la fraction mitochondriale de cellules HCT 116 sauvages (WT), ceux-ci ont été observés par western blot. Utilisation d'anticorps spécifique de CLUH, de la tubuline ainsi que d'une protéine de la grande sous-unité du ribosome RPL7a, qui permet de contrôler la présence de ribosomes. La coloration des protéines au bleu de coomassie (BC) sert de témoin de charge. Les fractions sont numérotées de 1 à 23 avec la fraction 10 qui correspond aux monosomes et les fractions 12 à 23 qui correspondent aux polysomes. Les fractions 13 à 18 ainsi que 19 à 23 ont été rassemblées (deux derniers puits).

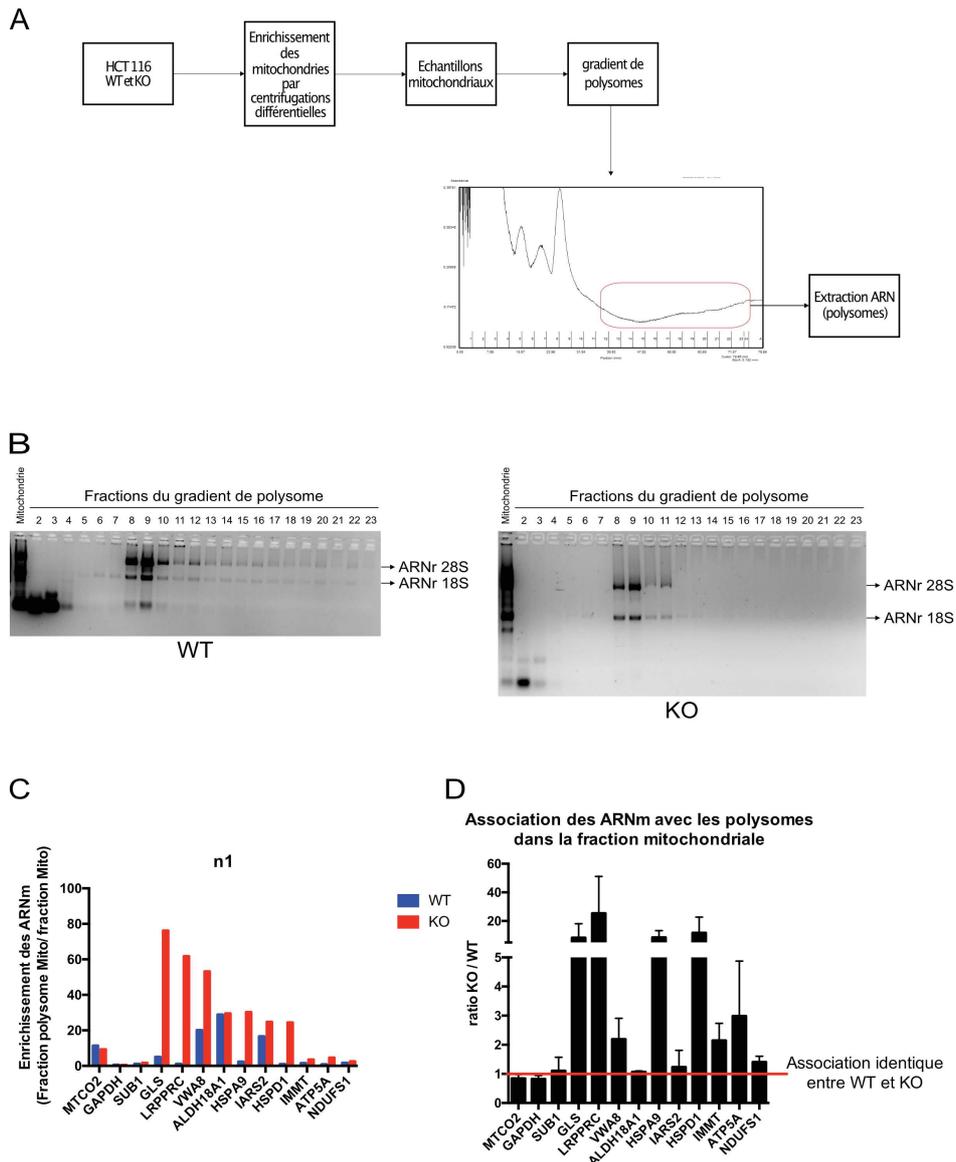
des ARNm à la surface mitochondriale en absence de CLUH (figure 46B). Cela pourrait s'expliquer par un rôle de CLUH non dans la stabilité ou la traduction des MITO ARNm mais dans la régulation de leur localisation.

### **1.6.2. CLUH pourrait être impliqué dans la régulation de la traduction localisée à la surface mitochondriale.**

La protéine CLUH est retrouvée associée aux ribosomes dans la fraction totale bien qu'elle ne semble pas impacter la traduction des MITO ARNm (paragraphe 1.5.). Nous voulons savoir si la fonction de CLUH pouvait être limitée à une fraction plus réduite de cette traduction : la traduction localisée à la surface mitochondriale qui ne se verrait pas nécessairement dans un extrait total.

#### **1.6.2.1. CLUH n'est pas présent dans les polysomes de la fraction mitochondriale.**

Dans un premier temps, nous avons analysé l'association de CLUH avec les différentes fractions d'un gradient de polysome à partir de mitochondries de cellules HCT 116 sauvages (WT) (figure 47). Pour cela nous avons enrichi un extrait en mitochondries à partir de cellules HCT 116 WT grâce à des centrifugations différentielles avant de soumettre ces mitochondries à un gradient de polysome (figure 47A). Les protéines des différentes fractions de ce gradient sont ensuite extraites et analysées par westernblot (figure 47B). Ces fractions ont été rassemblées pour les fractions polysomes en trois puits : un puits avec la fraction 12, un puits avec les fractions 13 à 18 et un puits avec les fractions 19 à 23. Ce rassemblement a été réalisé à cause de la faible quantité de polysomes trouvés dans la fraction mitochondriale. Les extraits totaux et mitochondriaux (tot et Mito) montrent que la protéine CLUH comme la protéine RPL7A sont présentes dans ces extraits (tot) mais aussi présentes dans la fraction mitochondriale (Mito). Pour la présence de CLUH dans la fraction mitochondriale, ce résultat est différent de la figure 38B (paragraphe 1.3.). Néanmoins, la différence est due au fait qu'il s'agissait de mitochondries pures dans la figure 38B (purification sur gradient de sucrose) alors qu'ici la fraction mitochondriale est une fraction enrichie en mitochondries (mitochondries « crudes »). Pour la protéine RPL7A, ce résultat montre la présence de la grande sous-unité ribosomale et donc du ribosome dans la fraction mitochondriale (figure 47B). Les différentes



**Figure 48 : L'efficacité de traduction des MITO ARNm est augmentée dans la fraction mitochondriale en absence de CLUH.**

- A) Schéma représentatif de l'analyse des ARNm associés à la traduction dans la fraction mitochondriale.
- B) Analyse sur gel d'agarose des ARN présents dans chacune des fractions du gradient de polysome.
- C) Analyse par RT-qPCR de l'enrichissement des ARNm présents dans les polysomes de la fraction mitochondriale (fractions 11 à 23) issus de cellules mutantes (KO, rouge) et sauvages (WT, bleu). Le taux d'ARN est normalisé par rapport au taux de l'ARNm *EIF5A* et l'enrichissement de chaque ARNm dans la fraction polysomale est calculé par rapport au taux du messageur dans la fraction totale correspondante. Expérience réalisée en triplicat. Représentation du réplicat 1 (n1).
- D) RT-qPCR représentant l'association de chaque ARNm avec les polysomes dans la fraction mitochondriale. Le taux d'ARNm a été normalisé par rapport au taux de l'ARNm *EIF5A*. L'association de chaque ARNm est représentée en fonction du ratio d'association avec les polysomes dans la fraction mitochondriale dans le KO sur l'association aux polysomes dans la fraction mitochondriale dans le WT. Expérience réalisée en triplicat. Le trait rouge représente les valeurs d'association pour lesquelles il n'y a pas de différence entre WT et KO.

fractions (fractions 2 à 23) issues du gradient de polysome de la fraction mitochondriale montrent la présence de la protéine RPL7A à partir de la fraction 8. Il y a aussi la présence de la tubuline dans toutes les fractions de ce gradient de polysome. Pour la protéine CLUH, on observe la présence de cette protéine dans les fractions 2 à 7 seulement ce qui est en opposition avec les résultats observés dans les extraits de cellules HCT 116 sauvages (figure 43C, paragraphe 1.5.1.). Cela suggère que contrairement aux échantillons totaux, CLUH n'est pas associé aux ribosomes dans la fraction mitochondriale (figure 47B).

#### **1.6.2.2. La traduction des MITO ARNm à la surface mitochondriale semble être plus importante en absence de CLUH.**

Suite à l'observation de la protéine CLUH qui affecte l'association des MITO ARNm avec la fraction mitochondriale dans les cellules humaines HCT 116, nous avons cherché à savoir si cette protéine affectait aussi leur traduction dans la fraction mitochondriale (figure 48). Pour cela, comme précédemment (figure 47, paragraphe 1.6.2.1.) nous avons extrait les polysomes à partir d'une fraction de mitochondries enrichies. Les cellules HCT 116 sauvages (WT) ou inactivées pour le gène de *CLUH* (KO) ont subi des centrifugations différentielles afin d'enrichir les échantillons en mitochondries. Un gradient de polysome est ensuite réalisé avant l'extraction des ARN de chaque fraction. Pour analyser le rôle de CLUH dans la traduction des MITO ARNm, nous avons analysé leur association avec la fraction polysomale (fractions 11 à 23) par qRT-PCR (figure 48A).

Lors d'un gradient de polysome sur une fraction mitochondriale, la fraction polysomale n'apparaît pas dentelée synonyme des différents polysomes mais lisse avec une augmentation du signal de DO progressive comme on le voit sur le graphe de gradient de polysome mitochondriaux (figure 48A comparée à la figure 43B). Cela ne signifie pas qu'il n'y a pas de polysomes mais que ceux-ci sont moins présents dans la fraction mitochondriale. En effet, la migration des ARN sur gel d'agarose montre la présence des ARNr 18S et 28S dans les fractions polysomales (fractions 11 à 23) même si le signal est très faible (figure 48B). Cette migration des ARN sur gel d'agarose dans les cellules WT et KO montre la bonne réalisation du gradient de polysome avec la séparation des différents éléments de celui-ci entre les fractions 5 à 23.



L'association des différents ARNm avec la fraction polysomale a été mise en évidence grâce à l'observation de l'enrichissement de chaque ARNm dans la fraction polysomale par rapport à leur taux dans la fraction mitochondriale (figure 48C qui représente le réplikat 1). Nous avons ensuite représenté l'association des MITO ARNm avec les polysomes dans la fraction mitochondriale sous la forme d'un ratio de l'association des ARNm avec les polysomes à la fraction mitochondriale dans le KO sur cette association dans le WT (figure 48D). Cette représentation permet de mettre en évidence l'augmentation de l'association de ces ARNm avec les polysomes dans la fraction mitochondriale dans le KO si le ratio est supérieur à 1 (figure 48D). Dans le cas des deux ARNm cytosoliques (GAPDH et SUB1) et de l'ARNm MTCO2, il ne semble pas y avoir de différence d'association avec la fraction mitochondriale de ces ARNm dans les cellules WT et KO. Ces ARNm, non impactés par CLUH, servent de témoin de l'expérience. Pour les différents MITO ARNm testés on observe une augmentation de l'association de ces ARNm avec la fraction polysomale en absence de CLUH sauf pour les MITO ARNm *ALDH18A1* et *IARS2*. Ce résultat montre une augmentation de l'association des MITO ARNm *GLS*, *LRPPRC*, *VWA8*, *HSPA9*, *HSPD1*, *IMMT*, *ATP5A* et *NDUFS1* en absence de CLUH. Cela suggère une augmentation de la traduction à la surface mitochondriale pour ces 9 MITO ARNm en absence de CLUH.

## 1.7. Conclusion / discussion sur CLUH.

Lors de ma thèse, j'ai analysé la fonction de la protéine CLUH dans deux lignées cellulaires de mammifères : des cellules HCT116 humaines et des cellules souches de souris (mES-E14).

### 1.7.1. L'inactivation de CLUH impacte les fonctions mitochondriales.

Pour analyser le rôle de CLUH dans les cellules de mammifères, nous avons utilisé le système CRISPR-Cas9 pour inactiver le gène *CLUH* dans des lignées cellulaires humaines (HCT 116) et de souris (mES-E14). Le phénotype causé par l'absence de CLUH a été confirmé suite à l'analyse du réseau mitochondrial qui montre un regroupement des mitochondries. Ce regroupement des mitochondries est un phénotype commun à l'absence des protéines de la famille CLU dans les organismes correspondants (Cox and Spradling, 2009; Fields et al., 1998; Gao et al., 2014; Logan et al., 2003; Zhu et al., 1997). L'absence de CLUH a aussi un effet sur la



production d'ATP et sur la croissance cellulaire dans les cellules HCT 116. En effet, on observe une augmentation de la production d'ATP en absence de CLUH. CLUH ayant un impact sur l'organisation du réseau mitochondrial, on pourrait supposer que l'altération de la production d'ATP serait dépendante des fonctions mitochondriales. Ces points ont déjà été abordés dans de précédentes études. Par exemple, il y aurait une baisse de l'activité de tous les complexes de la chaîne respiratoire et surtout une baisse de l'activité du complexe I de l'OXPPOS dans des foies de souris en absence de mCLUH ainsi que dans des cellules Hela en absence de CLUH (Schatton et al., 2017; Wakim et al., 2017). Une altération de l'OXPPOS a aussi été observée que les cellules de foies qui atteignent leur capacité respiratoire maximale en absence de mCLUH (Schatton et al., 2017). Néanmoins, contrairement aux études précédentes, nous n'observons pas une baisse des complexes de l'OXPPOS mais plutôt une augmentation de la production d'ATP. Cette différence pourrait être liée à la différence de type cellulaire utilisé. Cela pourrait aussi être expliqué par l'effet WARBURG qui est caractéristique des cellules cancéreuses. Celles-ci font principalement de la glycolyse même en milieu aérobie (Diaz-Ruiz et al., 2011). L'ensemble de ces résultats suggère que CLUH est important pour les fonctions mitochondriales dont le fonctionnement de l'OXPPOS mais aussi pour les autres fonctions mitochondriales comme par exemple le cycle de KREBS et la bêta-oxydation comme cela a été mis en évidence dans les cellules Hela (Wakim et al., 2017). L'absence de CLUH implique aussi une réduction de la cinétique de croissance des cellules HCT 116. En absence de CLUH, une baisse de la cinétique de croissance cellulaire a déjà été mise en évidence sur des cellules MEFs et sur des cellules Hela (Schatton et al., 2017; Wakim et al., 2017). Cette protéine ayant une fonction liée à la mitochondrie dont le fonctionnement est altéré en absence de CLUH, on pourrait supposer que ces deux évènements sont liés. L'altération des fonctions mitochondriales pourrait expliquer la baisse de la croissance des cellules en absence de CLUH.

### **1.7.2. CLUH interagit avec le complexe SPAG5-KNSTRN.**

L'analyse des interactants de CLUH met en évidence l'interaction de cette protéine avec le complexe SPAG5-KNSTRN. Cette interaction n'a jamais été mise en évidence pour les protéines de la famille CLU. Le complexe SPAG5-KNSTRN est impliqué dans la formation des granules de stress en réponse à des stress cellulaires et serait lié à la voie de régulation de



survie cellulaire mTORC1 (Thedieck et al., 2013). De plus, CLUH serait lui aussi impliqué dans la régulation de la voie mTORC1 où elle serait impliquée dans la régulation de la mitophagie (Pla-Martín et al., 2020). Ces résultats suggèrent une association entre CLUH et le complexe SPAG5-KNSTRN qui seraient liés à la formation des granules de stress et à la régulation de la mitophagie en lien avec la voie mTORC1. Le lien entre CLUH et la mitophagie n'est pas encore élucidé bien que ce lien soit conservé dans différents organismes comme chez la drosophile (Wang et al., 2016) ou chez les plantes (Ma et al., 2020).

### **1.7.3. Localisation dynamique de CLUH.**

CLUH est une protéine cytosolique. CLUH n'est pas associé à la fraction mitochondriale pure dans les cellules HCT 116. Néanmoins, CLUH est retrouvé dans les fractions mitochondriales pures dans les cerveau et les foies de souris (Gao et al., 2014). Ces résultats suggèrent que la localisation mitochondriale de CLUH est dynamique. Le dynamisme de CLUH a déjà été mis en évidence dans des foies de souris où il a été montré que CLUH formait plus de particules en cas de stress environnementaux et notamment nutritif (Pla-Martín et al., 2020).

### **1.7.4. CLUH est associé à la traduction.**

Nous avons observé la présence d'une fraction des protéines CLUH associée aux polysomes dans les cellules HCT116. De plus l'analyse des interactants faibles et/ou transitoires de CLUH par BioID met en évidence la proximité de CLUH avec de nombreuses protéines mitochondriales bien que cette protéine ait une localisation cytosolique. La différence de localisation entre CLUH et ses interactants faibles/transitoires suggère un rôle de CLUH au niveau des MITO ARNm codant pour ces protéines mitochondriales possiblement lors de la traduction. Le lien avec la traduction est aussi suggéré par la présence de certains facteurs liés à la traduction dans les interactants stables et transitoires de CLUH (co-IP et BioID). L'ensemble de ces résultats suggère que CLUH serait associé à la traduction et plus particulièrement la traduction des MITO ARNm.

Nous avons choisi des MITO ARNm dont les protéines sont retrouvées à proximité de CLUH (BioID). L'analyse des MITO ARNm associés à la fraction polysomale (2 ou plus ribosomes



associés au mêmes ARNm) ne montre pas de différence en présence ou non de CLUH dans des fractions totales. Ces résultats suggèrent que CLUH n'est pas impliqué dans la traduction globale des MITO ARNm. Dans cette étude, nous avons rassemblé la fraction polysomale et nous n'observons pas de différence d'association des MITO ARNm avec les ribosomes. Cela ne permet pas de conclure à une absence de différence de traduction des MITO ARNm en absence de CLUH. On pourrait tester l'association de ces différents MITO ARNm avec les différentes fractions polysomales pour voir si un nombre égal ou différent de polysomes s'associe à chaque MITO ARNm testé en absence ou en présence de CLUH. Cette hypothèse permettrait d'expliquer le fait que malgré une baisse de l'expression de certains MITO ARNm, le taux des protéines correspondantes n'est pas diminué en absence de CLUH.

Il a été observé chez la souris, une baisse de l'association avec les polysomes pour les ARNm *Atp5a1*, *Hadha* et *Pcca* en absence de mCLUH (Schatton et al., 2017). Néanmoins, nous sommes avec des gènes différents (sauf pour le gène *ATP5A* chez l'Homme et *Atp5a1* chez la souris) et dans des organismes différents. L'altération de la traduction chez les souris suggère qu'on ne peut pas exclure un rôle de CLUH sur la traduction d'autres ARNm non testés lors de nos expériences. Une analyse globale des polysomes, par RNA-seq (Ribosome profiling) permettrait d'avoir une vision plus globale de l'effet de CLUH sur la traduction.

Néanmoins, pour les MITO ARNm que nous avons testés correspondant aux protéines trouvées à proximité de CLUH, il ne semble pas y avoir d'effet de CLUH sur leur association avec les polysomes dans la fraction totale.

#### **1.7.5. CLUH n'affecte pas la stabilité des MITO ARNm testés lors de notre étude.**

La stabilité d'autres ARNm a été testée dans des études précédentes. mCLUH semble impacter la stabilité des MITO ARNm *Pcca*, *Bdh1*, *Atp5a1*, *Mccc1*, *Acat1* et *Pdha1* dans des MEFs de souris (Schatton et al., 2017). Ces différents MITO ARNm sont aussi retrouvés associés à CLUH chez l'Homme (Gao et al., 2014).

L'analyse des MITO ARNm dont les protéines sont retrouvées à proximité de CLUH dans les cellules HCT116 montre que l'expression de certains d'entre eux est affectée par l'absence de CLUH. C'est le cas des MITO ARNm *IMMT*, *HSPA9*, *ATP5A*, *HSPD1* et *LRPPRC*. Nous avons aussi testé l'association entre CLUH et ces MITO ARNm (codant pour des protéines



mitochondriales présentes à proximité de CLUH) mis en évidence comme associés à CLUH (Gao et al., 2014). Nous avons confirmé la liaison de certains de ces MITO ARNm (*IMMT*, *HSPA9*, *ATP5A*, *HSPD1*, *ALDH18A1*, *IARS2* et *VWA8*) avec CLUH.

Nous avons ensuite testé la stabilité de ces MITO ARNm en présence ou non de CLUH et ne mettons pas en évidence d'une altération de leur stabilité en absence de CLUH dans les cellules HCT116. Cette absence d'effet sur la stabilité dans les cellules HCT116 sont différents des études précédentes. Néanmoins, il s'agit de deux modèles différents dans deux organismes différents. De plus, les ARNm testés ne sont pas les mêmes (sauf l'ARNm *ATP5A* chez l'Homme et *Atp5a1* chez la souris). L'ensemble de ces résultats suggère que CLUH a un effet variable en fonction des MITO ARNm auxquels ils s'associent. Il est possible qu'en fonction des tissus et des besoins de la cellule, CLUH influence la stabilité de certains ARNm et pas des autres.

Pour les MITO ARNm testés durant ma thèse et correspondant aux protéines identifiées en BioID, nous avons donc observé une baisse du taux de leur expression en absence de CLUH. CLUH est capable de lier ces MITO ARNm et malgré cela, il n'affecte pas leur stabilité. Ni la stabilité ni la traduction globale des MITO ARNm testés ne semble être altérée par l'absence de CLUH. D'après ces résultats, il est possible que la baisse d'expression de ces MITO ARNm soit le résultat d'un rôle de CLUH au niveau transcriptionnel.

#### **1.7.6. CLUH serait impliqué dans la régulation de la traduction localisée des MITO ARNm.**

Bien que le taux d'association globale des MITO ARNm avec les polysomes ne semble pas être influencé par l'absence de CLUH, nous avons observé une altération de l'association de certains MITO ARNm avec la fraction mitochondriale qui semble être augmentée en absence de CLUH. Cela concerne principalement les MITO ARNm *GLS*, *HSPD1*, *IMMT*, *ATP5A*, *HSPA9*, *VWA8* et *LRPPRC*. De plus, pour ces mêmes MITO ARNm, on observe également une augmentation de leur association avec la fraction polysomale dans la fraction mitochondriale. Cela suggère que CLUH pourrait être impliqué dans un mécanisme de régulation de la localisation et de la traduction des MITO ARNm à la surface mitochondriale. L'augmentation de l'association des MITO ARNm avec les ribosomes à la surface mitochondriale a déjà été mis



en évidence sur des cellules HEK293T1 pour les MITO ARNm ATP5A1, OGDH, OPA1 et GOT2 (Vardi-Oknin and Arava, 2019). Cette hypothèse est d'autant plus plausible que la protéine CLUH ne se retrouve pas associée à la fraction polysomale dans des extraits mitochondriaux. Il est aussi possible que l'augmentation de la localisation et de la traduction localisée à la surface mitochondriale des MITO ARNm ne sont que des phénomènes de compensation des cellules à l'absence de CLUH. En effet, les MITO ARNm dont l'expression baisse en absence de CLUH semblent avoir une association et une traduction dans la fraction mitochondriale augmentée. Cela pourrait expliquer l'absence de variation de l'expression des protéines mitochondriales en absence de CLUH.

### **1.7.7. Conclusion.**

Chez les mammifères, CLUH serait associé à des MITO ARNm dans des granules de stress non classiques où il participerait à la régulation de la traduction. De plus, cette protéine serait aussi impliquée dans la régulation de la mitophagie (Pla-Martín et al., 2020). D'après nos résultats, CLUH impacte l'association des MITO ARNm avec la fraction mitochondriale et avec les polysomes dans la fraction mitochondriale. Ces résultats ont aussi été mis en évidence sur des cellules HEK-293T1 (Vardi-Oknin and Arava, 2019). Il est possible que si CLUH régule la traduction des MITO ARNm dans des sortes de granules de stress (ayant une induction différente des granules de stress classiques) et puisse également réguler leur association avec la fraction mitochondriale. Cela expliquerait l'augmentation de leur association avec la mitochondrie et de leur traduction localisée en absence de CLUH. Ces différents résultats suggèrent que CLUH pourrait être impliqué dans la séquestration des ARNm dans des granules dans le cytoplasme.

CLUH semble impliqué dans la régulation de la traduction et plus particulièrement dans la traduction à la surface mitochondriale. De plus, comme Clueless chez la drosophile (Zhang et al., 2016, 2019), Friendly chez les plantes (Ma et al., 2020) et CLUH chez les mammifères (Pla-Martín et al., 2020), les protéines de la famille CLU semblent être impliquées dans la mitophagie. On peut faire l'hypothèse que CLUH serait impliqué dans la mitophagie grâce à son rôle de régulation de la traduction des MITO ARNm. Dans cette hypothèse, CLUH pourrait être impliqué dans la régulation de la traduction et servir de senseur a une dysfonction mitochondriale. Grace à ce rôle de senseur, CLUH initierait la mitophagie dans le cas d'un



dérèglement de la traduction des MITO ARNm suite à un stress qui pourrait aboutir à des dysfonctions mitochondriales. Pour vérifier cette hypothèse, il serait intéressant de voir l'effet des stress sur l'association des MITO ARNm avec les polysomes et l'impact de CLUH sur cette association.

## **2. Rôle de Friendly (FMT) chez *Arabidopsis thaliana*.**

### **2.1. Article 2.**

#### **The dual localization of FMT in the cell suggests different functions**

Mickaele Hemono, Thalia Salinas-Giegé, Patryk Ngondo, Anne-Marie Duchêne

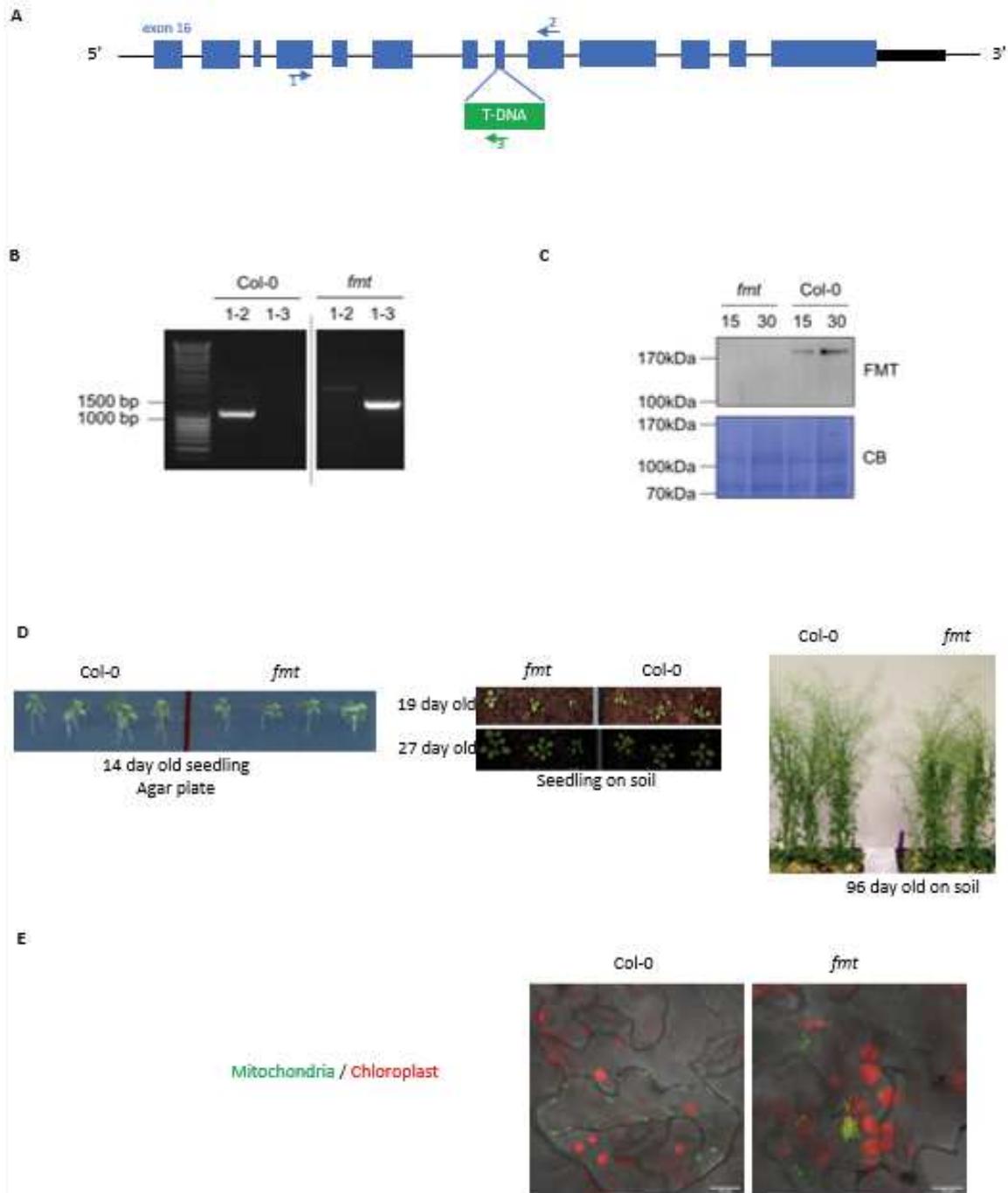
Institut de biologie moléculaire des plantes, UPR 2357 du CNRS, Université de Strasbourg,

12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg cedex, France.

### **INTRODUCTION**

Mitochondria are vital organelles for the eukaryotic cell, through their role in ATP synthesis, but also in many other metabolic pathways. Their biogenesis is based on the expression of the mitochondrial genome, but also relies on a massive import of nuclear-encoded proteins. It has been recently shown that protein import into mitochondria can occur post-translationally, but also co-translationally. In accordance, numerous cytosolic mRNAs and ribosomes were found associated with the mitochondrial surface (Fazal et al., 2019; Saint-Georges et al., 2008; Vincent et al., 2017).

The intracellular distribution of organelles is an essential process for cellular activity. The plant cell chondriome is made up of hundreds of isolated, extremely dynamic mitochondria (Logan, 2010), which are maintained through frequent fusion and fission events. The fusion / fission balance is found to be affected under particular conditions or organs (Arimura, 2018). Few of the proteins involved in the fusion / fission dynamics have so far been identified in *Arabidopsis thaliana*. A microscopy-based screen allowed the identification of mutants with disrupted chondriome structure (Logan et al., 2003). In one of these mutants, mitochondria appeared



**Fig. 1: Characterization of *fmt* KO line SALK\_056717**

- A) **Schematic representation of T-DNA insertion** in 3' end of At3g52140 locus. Blue boxes, exons; black box, 3' untranslated region; arrows, primers used for PCR genotyping.
- B) **PCR genotyping.** Expected size of PCR products: 1060 bp in Col0 with primers 1-2, and 1300 bp in *fmt* with primers 1-3.
- C) **FMT protein level** in total extracts from Col0 and *fmt* leaves. Western blot with anti-FMT antibody (FMT); CB Coomassie Blue staining of the membrane.
- D) **Plant phenotype.** *A. thaliana* roots of 14-day-old seedling on agar plate (right), 19 and 27-day-old seedling on soil (middle) and 96-day-old plant on soil (left).
- E) **Mitochondria phenotype.** *A. thaliana* leaves transiently expressing COX IV-GFP (mitochondrial protein, in green) were examined by confocal microscopy. red : chloroplast autofluorescence.

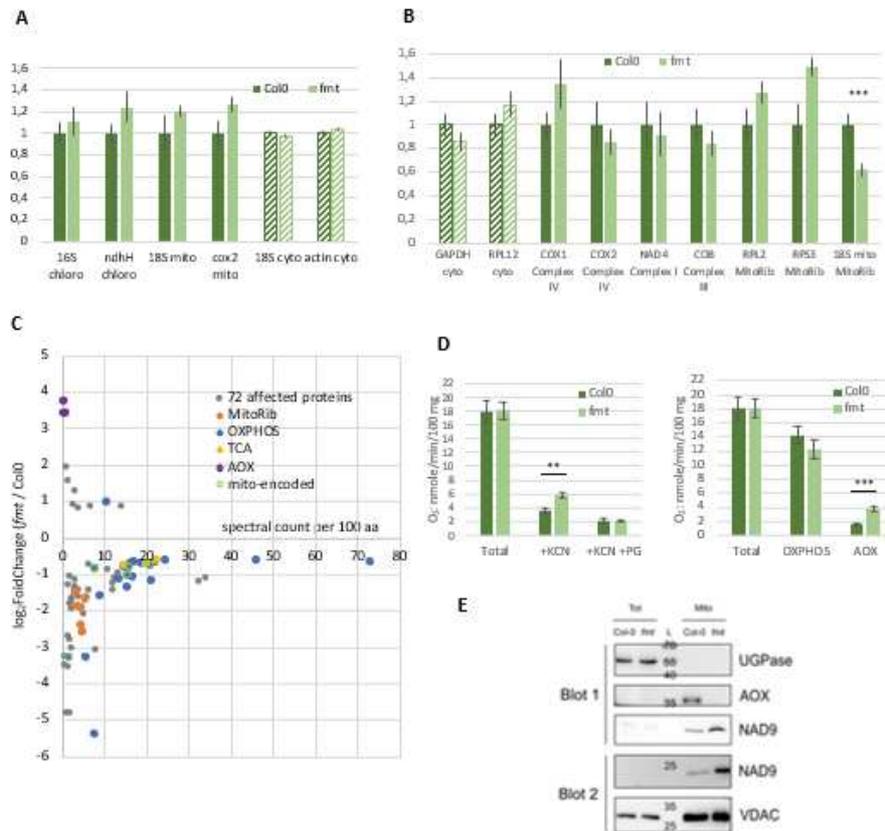
either isolated or in large clusters of about 10 organelles. The involved mutation was localized in At3g52140 gene, and the encoded protein, called FRIENDLY or FMT, is a member of CLU family (CLU for clustered mitochondria) (El Zawily et al., 2014). Knock-down of CLU proteins induces a clustering of mitochondria in all studied organisms. The proteins of CLU family are therefore required for a correct distribution of mitochondria in the cell. Moreover, human CLUH was shown to interact with some mRNAs coding for mitochondrial proteins (Gao et al., 2014), and drosophila CLUELESS was able to bind ribosomal components at the surface of mitochondria (Sen and Cox, 2016).

In this paper, we have shown that FMT intracellular localization and function depended on *A. thaliana* tissues. Moreover, FMT was able to interact with cytosolic ribosomes, and its mutation affects mRNA association with the mitochondrial surface.

## RESULTS

### **FMT mutation is associated with a reduced growth of seedlings.**

Different *fmt* mutants exist, corresponding to ethyl methane sulphonate (EMS) or T-DNA insertion lines. Here, we have analyzed the T-DNA insertion line SALK\_056717. The T-DNA insertion in FMT locus (At3g52140) was checked (Fig. 1 A-B). Moreover, FMT protein was not detected in this line (Fig. 1C). Phenotype of *fmt* plant appears similar to what has been already described for 2 other *fmt* mutants, an ethyl methane sulphonate (EMS) line and a T-DNA insertion one (SALK\_046271) (El Zawily et al., 2014), with shorter primary roots in seedlings. But the delayed phenotype is no longer observed in older and flowering plants (Fig. 1D). The clustering of mitochondria was observed in SALK\_056717 line (Fig. 1E), as it has been previously observed in EMS, SALK\_046271 and SAIL\_284\_D06 *fmt* lines (Ayabe et al., 2021; Logan et al., 2003; El Zawily et al., 2014).



**Fig. 2: Analysis of mitochondria from *fmt* seedlings**

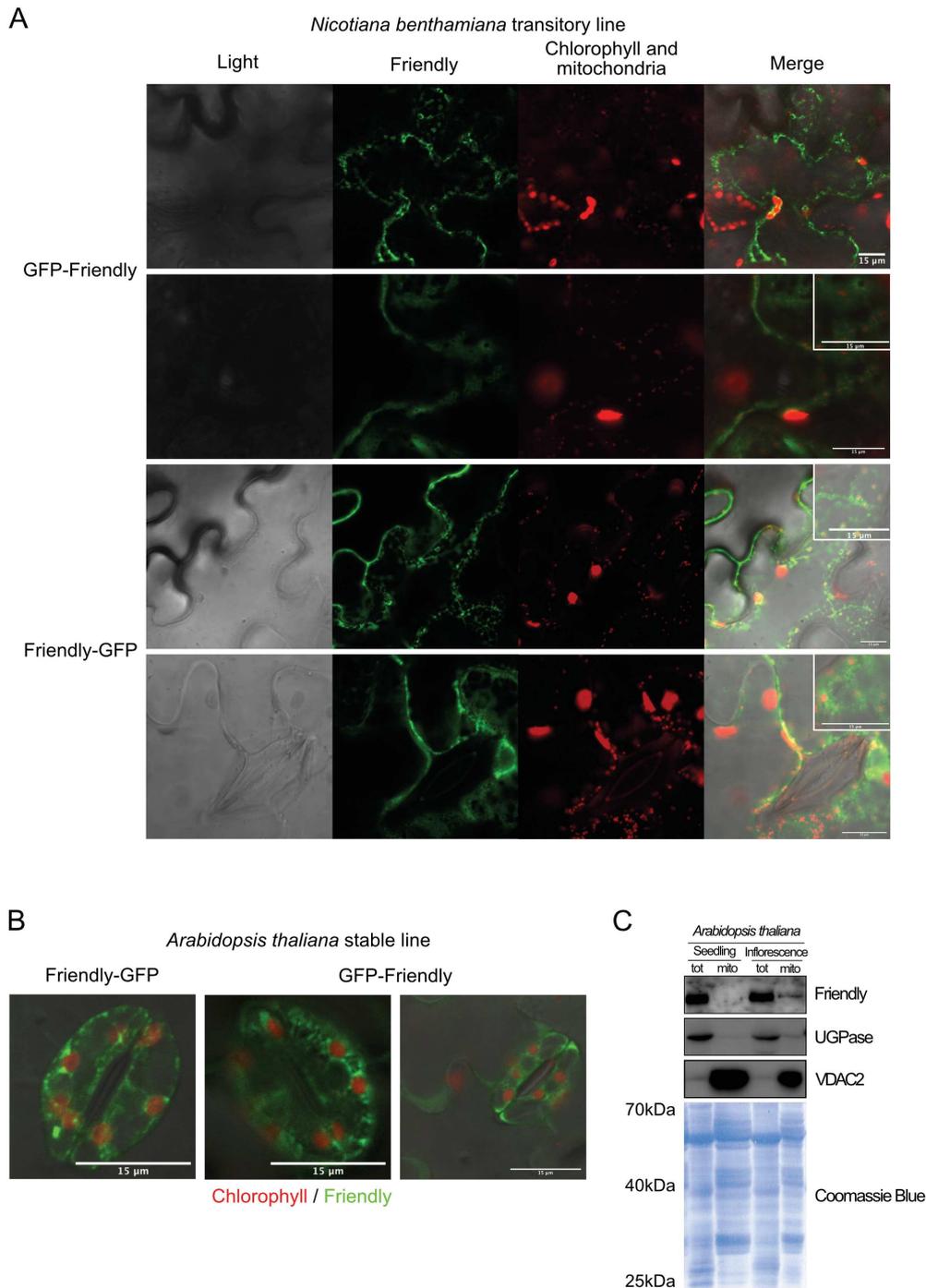
- A) **Mitochondrial DNA content in total extracts.** The level of organellar DNA was evaluated in total extracts of Col0 or *fmt* seedlings by qPCR. Normalisation was done with 2 nuclear genes coding for cytosolic 18S and actin, and results are expressed relatively to Col0. The error bars correspond to SEM (biological repeats n=3).
- B) **Mitochondrial mRNA level in total extract.** The level of mitochondrial encoded RNAs was evaluated in total extracts of Col0 or *fmt* seedlings by RT-qPCR. Tree to six biological repeats were performed. Normalisation was done with 2 cytosolic transcripts (GAPDH and RPL12), and results are expressed relatively to Col0. (\*\*\*) t.test p-value <0.1%). The error bars correspond to SEM (biological repeats n=6, except for RPS3 (n=3)).
- C) **Mitochondrial proteome.** Proteins from purified mitochondria were analysed by MS/MS, and spectral count label-free quantifications were performed (*fmt* line compared to Col0). With criteria [adjusted p-value < 0.1; spectral count > 3; Fold Change > 1.5], 72 were found differently expressed in *fmt* mitochondria compared to Col0. The expression level in Col0 is presented in the x-axis (spectral count normalized per 100 amino acids). The fold change is shown in y-axis ( $\log_2$ FoldChange (*fmt*/Col0)).
- D) **O<sub>2</sub> uptake (nmole/min/100 mg fresh seedlings): OXPHOS and AOX activities.** Oxygen consumption was measured with an oxygraph. After a few minutes, cyanide (KCN), which blocks oxidative phosphorylation (OXPHOS pathway), was added. Then, a few minutes later, propylgallate (PG), which blocks alternative oxidase (AOX), was also added. The difference between total rate and residual rate in presence of KCN corresponded to OXPHOS respiration. The difference between rates in presence of KCN and in presence of both KCN and PG corresponded to AOX activity. t.test \*\* pvalue < 1% ; \*\*\* pvalue < 0.1% ; n=10.
- E) **E- Western blots of total and mitochondrial extracts** from 8-day-old *fmt* and Col0 seedling. The same samples were loaded in gel 1 (blot 1: 3  $\mu$ g of proteins) and gel 2 (blot 2: 8  $\mu$ g). Immunodetections were performed with antibodies directed against the mitochondrial AOX, NAD9 and VDAC proteins and the cytosolic UGPase. L, ladder.

### **FMT mutation weakly affects mitochondrial proteome.**

According to plant phenotype in SALK\_056717 line (called *fmt* line below), seedlings mitochondria were deeper analyzed. The DNA contents, RNA and proteins levels were analyzed. The quantity of mitochondrial DNA in a total DNA extract appeared similar in Col0 and *fmt* (Fig. 2A). Moreover, mitochondrial-encoded mRNAs did not seem affected by *fmt* mutation. Only the mitochondrial 18S rRNA was found reduced in the *fmt* line (Fig. 2B).

We then compared mitochondrial proteomes in seedlings of *fmt* and Col0 lines. Mitochondrial extracts were analyzed by mass spectrometry, and about 720 mitochondrial proteins were identified in each extract. The total number of MS/MS fragmentation spectra was then used for label-free quantification, comparing *fmt* to Col0. For each protein, a protein fold-change (FC) and an adjusted p-value (adj-p) were calculated. Taking criteria of a fold-change above 1.5 and an adjusted p-value below 0.1, 72 were found enriched or depleted in *fmt* mitochondria compared to Col0 (Fig. 2C; Table S1; Fig. S1A). Eleven were over-expressed among which the 3 alternatives oxidases, which is in accordance with O<sub>2</sub> uptake experiments and AOX Western blots (see below, Fig. 2D-E). Among the 61 down-regulated proteins, 3 were TCA enzymes, 6 were component of the mitochondrial ribosome (Waltz et al., 2019) and 22 from OXPHOS complexes, mostly from complex I (15 out of the 22) (Senkler et al., 2017). The lower level of some mito-ribosomal proteins is in accordance with the lower level of the mitochondrial 18S rRNA (Fig. 2B). The induction of AOX and depletion of NAD9 (OXPHOS complex I) in *fmt* mitochondria were verified by western blot (Fig. 2E).

A similar approach was performed with mitochondria from *fmt* and Col0 inflorescences. Indeed, the inflorescences are mitochondria-enriched tissues (Warmke and Lee, 1978), and some mitochondrial defects affect these tissues while that the rest of the plant seems normal (such as cytosolic male sterility or CMS) (Chase). With the same criteria as for seedlings, only 4 proteins were found affected in *fmt* compared to Col0 mitochondria (Fig. S1B). All 4 were also affected in seedlings mitochondria: 2 were down-expressed (both from mito ribosome) and 2 were overexpressed (one OXPHOS). Such a result is in accordance with the absence phenotype in flowering plants, but also suggests that the few differences observed in proteomes from seedlings mitochondria may have a meaning.



**Fig. 3: FMT localization in plant cells.**

- A) **FMT localization in *N. benthamiana*.** *N. benthamiana* 6-week-old leaves transiently expressing FMT-GFP (top) or GFP-FMT (bottom) were examined by confocal microscopy. White: Bright light; Green: GFP fluorescence; Red: chloroplast autofluorescence and mitochondrial pSU9-RFP fluorescence.
- B) **FMT localization in *A. thaliana*.** *A. thaliana* 18-day-old seedling stably expressing FMT-GFP (first image) or GFP-FMT (two last images) were examined by confocal microscopy. Green: GFP fluorescence; Red: chloroplast autofluorescence.
- C) **Western blots of total (tot) and mitochondrial (mito) extracts from *fmt* and Col-0 seedlings or inflorescence** Antibodies were against FMT, UGPase (cytosolic) and VDAC2 (mitochondrial).

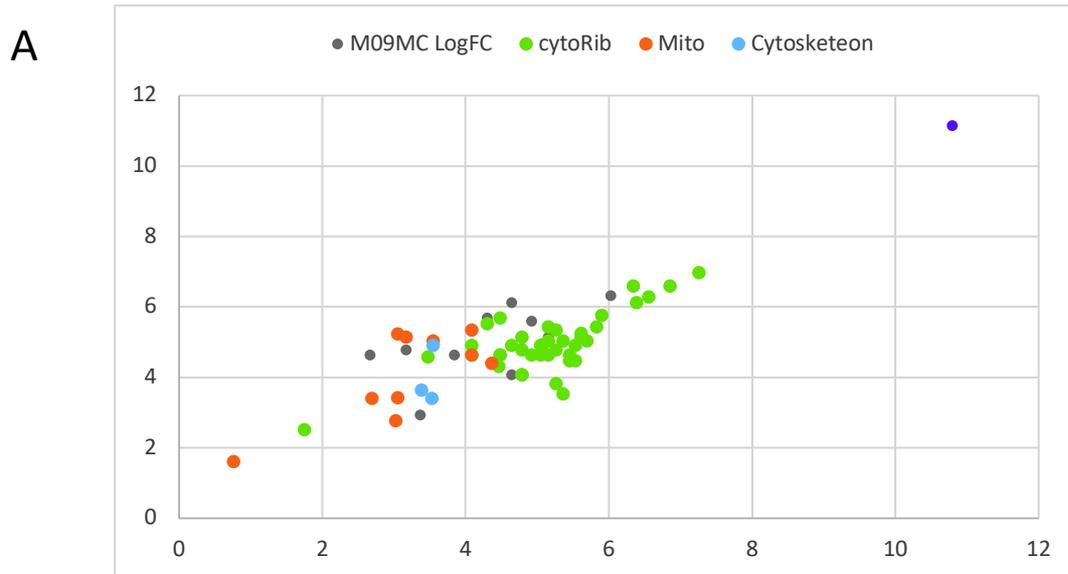
Oxygen uptake was also measured in Col0 and *fmt* seedlings (Fig. 2D), but no difference was observed between the 2 lines. The addition of cyanide (KCN), which blocks oxidative phosphorylation (OXPHOS pathway), and propylgallate (PG), which blocks alternative oxidase (AOX) shows an increase of AOX pathway but no clear change in OXPHOS pathway, in *fmt* compared to Col0. The activity of AOX pathway was also found increased in EMS-*fmt* seedlings (El Zawily et al., 2014). However, we could not observe a strong decrease of OXPHOS activity in *fmt* mutant, by contrast to what has been found in EMS-*fmt* line (El Zawily et al., 2014).

In summary, the reduced levels of some OXPHOS proteins were observed in seedling mitochondria, but they did not seem to greatly affect OXPHOS activity (Fig. 2E). For mitochondrial translation, some mito-ribosomal proteins were also found down-expressed in *fmt*. The analysis of the proteome showed that most of the 16 identified mitochondrial-encoded proteins seemed weakly depleted in *fmt* (Fig. S1C), suggesting that the mitochondrial translation could be weakly affected in this mutant. Last, increased levels of AOX proteins and AOX activity were observed in *fmt*, and AOX have been usually considered as indicators of stress and mitochondrial dysfunctions (Robert et al., 2012).

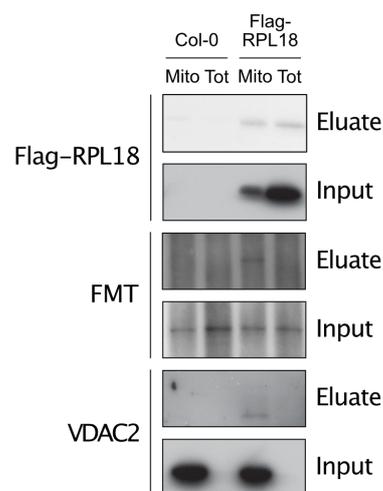
#### **FMT is mainly cytosolic, with a diffuse localization or in puncta.**

Two translational fusions of FMT with GFP were constructed, one with GFP in N-terminal (GFP-FMT), the other with GFP in C-terminal (FMT-GFP). When transiently expressed in *Nicotiana benthamiana*, both gave a similar cytosolic localization, with a diffuse or punctate pattern (Fig. 3A). FMT was occasionally found in the vicinity of mitochondria (Fig. 3A). Similar diffuse and punctuated patterns were also observed in leaves of stable *Arabidopsis* transformants (Fig. 3B). Such patterns have been previously observed by (El Zawily et al., 2014).

Mitochondria were also prepared from seedlings and inflorescences of wild type *Arabidopsis*. Although FMT level was similar in all total extracts (Fig. S2), FMT was detected in the inflorescence mitochondrial extract but not in the seedling one (Fig. 3C), suggesting that FMT association with mitochondria could change depending of tissues.



**B**



**Fig. 4: Characterization of FMT partners in inflorescence mitochondrial extracts.**

- A) Enriched proteins in FMT coIP:** In addition to FMT, 63 proteins were found enriched in GFP-FMT or FMT-GFP coIP compared to Col0. x- and y-axes correspond respectively to logFC in FMT-GFP and in GFP-FMT coIP. Proteins involved in translation are in green, mitochondrial ones in orange, and components of the cytoskeleton in blue.
- B) Reverse Co-IP with Flag-RPL18.** Co-IP were performed with mitochondrial (Mito) and total (Tot) extracts from Col0 or Flag-RPL18 line. Western blots with input and eluate samples were performed with antibodies against Flag, FMT and VDAC2.

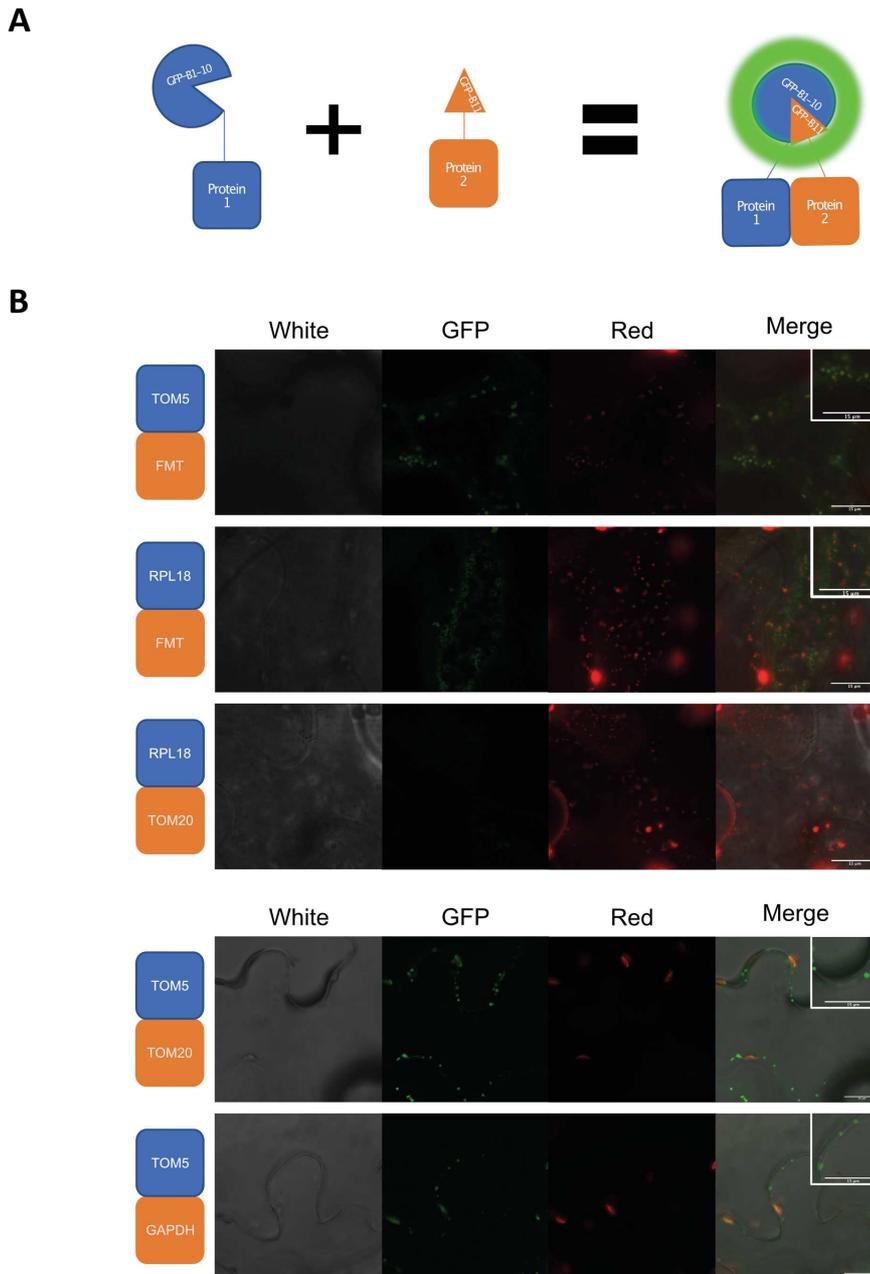
### **FMT strongly interacts with the ribosome at the surface of mitochondria.**

To determine FMT interactants, total extracts were first prepared from Arabidopsis MS2-GFP, GFP-FMT or FMT-GFP seedlings. Proteins from each extract were immunoprecipitated with anti-GFP beads, and identified by mass spectrometry. Specific spectral count label-free quantifications were then performed. With a cut-off of FC above 2, and in addition to FMT, 25 proteins were found enriched in GFP-FMT (17 proteins) or FMT-GFP (14 proteins) eluates compared to GFP control (Table S2). However, none except one (AT3G13930 in GFP-FMT) had an adj-pvalue below 0.1. Eighteen out of the 25 were components of the cytosolic ribosome (Salih et al., 2020)(Salih et al., 2019). Considering all ribosomal proteins, 34 were identified in these seedlings coIP, among them 30 seems more or less enriched (that is with a positive LogFC) in both coIP (Table S3, Fig. S3)

A similar result was obtained with inflorescences total extracts, prepared from Col0, GFP-FMT or FMT-GFP lines. With a cut-off of FC above 2 and in addition to FMT, 96 proteins were found enriched in FMT-GFP eluate compared to Col0, with 1/6th also enriched GFP-FMT coIP (Table S2). However, once again, none except one (AT3G13930) had an adj-pvalue below 0.1. Considering all ribosomal proteins, 16 were identified in these inflorescences coIP, and 15 out of them were found enriched in FMT-GFP coIP with a FC above 2 (Table S3).

So, FMT did not seem to strongly interact with any protein in a total extract. Cytosolic ribosomal proteins were however identified in FMT coIP, suggesting either that the interaction between FMT and ribosomes is weak, or that only part of FMT interacts (strongly?) with the ribosomes.

Last, mitochondrial extracts were prepared from Col0, GFP-FMT or FMT-GFP inflorescences, because FMT was found associated with inflorescences mitochondria (Fig. 3C). The quality of mitochondrial extract was checked by western blot (Fig. S4). Mitochondrial extracts were then immunoprecipitated with anti-GFP beads, and identified by mass spectrometry. With the cut-off of FC above 2 and adjp below 0.1, and in addition to FMT, respectively 60 and 24 proteins were found enriched in GFP-FMT and FMT-GFP coIP compared to Col0 (Fig. S5). 21 out of the 24 proteins enriched in FMT-GFP are shared with GFP-FMT. So, in total, 63 proteins were found enriched in FMT coIP from mitochondrial extract of At (Table S4). Thirty-eight of the 63 were cytoRib proteins, and 2 others were translation factors, clearly showing the interaction



**Fig. 5: Split-GFP experiments.**

- A) **Schematic representation of Split-GFP experiment.** The proteins of interest were respectively fused with GFP  $\beta$ 1-10 strands (Protein 1) or with GFP b11 strand (Protein 2). The colocalisation of the two proteins allowed the reconstitution of GFP and a fluorescence signal.
- B) **Confocal imaging.** *N. benthamiana* leaves were co-transformed with constructs encoding  $\beta$ 1-10 and b11 fusions. Confocal microscopy was performed 2 days after agroinfiltration. Three pairs of constructs were tested, FMT and TOM5, FMT and RPL18, and RPL18 and TOM20. TOM5 and TOM20 are 2 component of TOM complex that is localized at the outer membrane of mitochondria. So, the TOM5-TOM20 pair served as a positive control. Moreover, the cytosolic GAPDH enzyme has been already detected at the surface of mitochondria (2ref), so the GAPDH-TOM5 pair was also a positive control for the interaction of a cytosolic protein with the outer membrane of mitochondria. Alone, none of these constructs gave fluorescence (see Fig. S6). White: Bright light; Green: GFP fluorescence; Red: chloroplast autofluorescence and mitochondrial pSU9-RFP fluorescence (3 first line) and chloroplast autofluorescence alone (other lines).

of FMT with cytosolic ribosomes, at least at the surface of mitochondria in inflorescences. Ten other proteins were mitochondrial (one from OMM and 5 IMM), and 3 were tubulin or actin subunits (Fig 4A, Table S4).

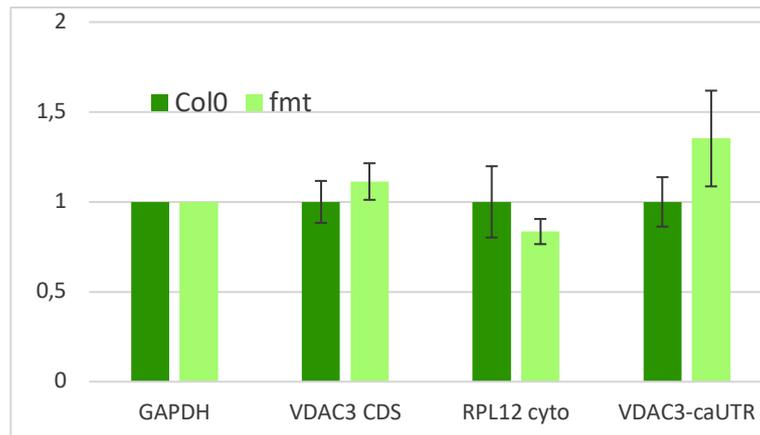
We have previously shown that FMT was mainly cytosolic but was also detected in an inflorescences mitochondrial extract. In the cytosol of both seedlings and inflorescences, FMT did not seem to strongly interact with any proteins but could weakly interact with the cytosolic ribosome. By contrast, FMT was found to strongly interact with the cytosolic ribosome at the surface of inflorescences mitochondria.

To confirm the interaction of FMT with the ribosomes at the mitochondrial surface, reverse colP were performed with an At line expressing an epitope-tagged ribosomal protein, Flag-RPL18 (AT3G05590) (Zanetti et al., 2005). Total and mitochondrial proteins extracts were prepared from Col0 and Flag-RPL18 inflorescences. Proteins were then immunoprecipitated with anti-FLAG beads, and western blots were performed. FMT was detected in input sample of all extracts, but only in eluate from the mitochondrial extract of Flag-RPL18 line (Fig. 4B).

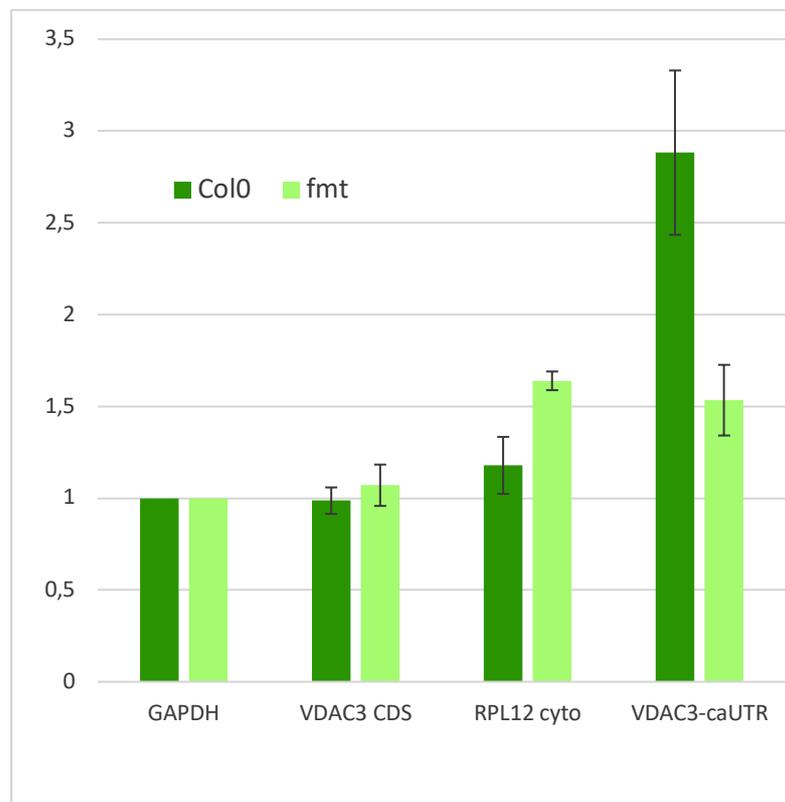
Moreover, the split-GFP approach was used to confirm the interactions of FMT with the ribosome and with the mitochondrial membrane. Translational fusions with either GFP Beta 11 strand (S11) or GFP Beta 1\_10 strands (GFP1–10) were transitory co-expressed in *N. benthamiana* (Fig. 5). The co-expression of GFP1–10-Tom5 and S11-FMT resulted in fluorescence, as well as the co-expression of GFP1–10-RPL18 and S11-FMT, showing that interactions between FMT and the ribosomal protein RPL18 or the outer membrane protein Tom20 could be obtained in *N. benthamiana*. Surprisingly, no fluorescence was observed with GFP1–10-RPL18 and S11-Tom20. It is possible that the orientation of the ribosome at the mitochondrial surface prevents interactions between RPL18 and Tom20.

So, in conclusion, the interaction of FMT with ribosomes seemed weak/partial in a total extract, but strong in an inflorescences mitochondrial extract.

### A- Total extracts



### B- Mito/Tot ratios



**Fig. 6 : *fmt* mutation disturbed mRNA targeting to the mitochondrial surface**

mRNAs were quantified by RT-qPCR in mitochondrial (Mito) and total (Tot) extracts from seedlings.

- The quantity of each mRNAs in total extracts was expressed relatively to GAPDH, and was similar in wild-type Col0 and *fmt* line.
- The quantity of each mRNA in the mitochondrial fraction (Mito) was normalized by its quantity in the total fraction (Tot) to take into account the expression level of the gene. Mito/Tot ratios were expressed relatively to GAPDH ratio. Error bars represent SEM (n = 3). GAPDH, glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (At3g04120); RPL12cyto, cytosolic ribosomal protein L12A (At2g37190); VDAC3, mitochondrial voltage-dependent anion channel 3 (At5g15090). VDAC3-CDS corresponds to both VDAC3 mRNAs isoforms; VDAC3-caUTR corresponds to the isoform with the long 3'UTR, which is targeted to the mitochondrial surface (Michaud et al., 2014)

### **The targeting of cytosolic mRNAs to the mitochondrial surface is disrupted in *fmt* line.**

It has been shown in numerous organisms that some cytosolic ribosomes and mRNAs, in particular mRNAs coding for mitochondrial proteins, are associated with the mitochondrial surface (Fazal et al., 2019; Saint-Georges et al., 2008; Vincent et al., 2017). Moreover, FMT orthologues in drosophila (Clueless; (Sen and Cox, 2016)) and mammals (CluH; (Gao et al., 2014)) have been described as RNA binding proteins that recognize mRNAs coding for mitochondrial proteins. In Arabidopsis, a well-studied targeted mRNA is that of VDAC3. VDAC3 gene has been previously shown to be transcribed into 2 isoforms that differ by the length of their 3'UTR. The long isoform was found at the surface of mitochondria, but not the short one (Michaud et al., 2014a). To test the impact of FMT mutation on VDAC3 mRNAs, total and mitochondrial RNAs were extracted from Col0 and *fmt* seedlings, and RT-qPCR were performed. The expression of VDAC3 isoforms appeared similar in Col0 and *fmt* (Fig. 6A). However, mitochondrial targeting of the long VDAC3 isoform was found reduced in *fmt* line (Fig. 6B), suggesting a role of FMT in mRNA targeting to the mitochondrial surface.

## **DISCUSSION**

FMT and its orthologues in drosophila and mammals have been identified because their mutation induced a similar response, which is a clustering of mitochondria. All proteins of CLU family have been described as mainly cytosolic, either with a diffuse pattern or in puncta, and eventually interacting with mitochondria. All these aspects were confirmed in the present study. In addition, we have shown that FMT localizations and functions depend on plant tissues.

If seedling root growth was reduced in *fmt* line, older plants seemed normal (Fig. 1). Moreover, the mitochondrial proteome was found weakly affected in *fmt* seedlings, in particular for OXPHOS and ribosomal proteins, but appeared normal in *fmt* inflorescences (Fig. 2). In seedlings, mitochondrial-encoded mRNAs did not seem affected, but mitochondrial translation could be weakly reduced (Fig. 2). These observations suggested that FMT was important in seedlings but seemed dispensable in inflorescences. Concerning FMT localization, FMT was detected by western blot in mitochondrial fractions from inflorescences, but not from seedlings (Fig. 3).



FMT partners were searched by coIP in total extracts from both seedlings and inflorescences. Similar results were obtained: no strong interactants were detected, but a weak interaction with cytosolic ribosomes was probable (Tables S2, S3, Fig. S3). An interaction with translation-related proteins was also proposed by Ayabe et al (Ayabe et al., 2021). Split GFP experiments confirmed these results: when transiently overexpressed in *N. benthamiana* leaves, FMT and RPL18 were shown to interact, giving a grainy fluorescent signal in the cytosol (Fig. 5).

FMT was also detected in a mitochondrial extract from inflorescences. Split GFP experiments in *N. benthamiana* confirmed that FMT and TOM5 were indeed able to interact at the surface of *N. benthamiana* mitochondria (Fig. 5). Moreover, both coIP and reverse coIP showed that FMT and ribosomes strongly interacted at the surface of inflorescences mitochondria (Fig. 4).

Last, we have shown that VDAC3 mRNA association with mitochondria was reduced in *fmt* seedlings (Fig. 6). Messenger association with mitochondria implies mRNA trafficking to mitochondria, and mRNA docking to the mitochondrial surface. Because FMT was not found at the mitochondrial surface in seedlings, it is probably not involved in the anchoring of mRNA at the surface of mitochondria and would thus be involved in mRNA trafficking. FMT could be a component of a ribonucleoprotein complex involved or controlling mRNA trafficking and translation. If, in some conditions, this complex is found stabilized at the mitochondrial surface, FMT would no longer be necessary. Such an interpretation could explain the observations that FMT was found associated with ribosomes at the surface of inflorescence mitochondria, and these mitochondria were not affected by FMT mutation (Fig. 2 and 4). Alternatively, FMT association with mitochondria could be a way to limit its diffusion and function in the cytosol.

Two recent studies address the relations between FMT and mitophagy in *Arabidopsis thaliana* (Ma et al., 2020; Nakamura et al., 2020), but the direct implication of FMT in mitophagy is subject to debate. FMT therefore could be involved in different processes, and further studies would be necessary to establish its exact functions.



## MATERIAL AND METHODS

### Plant material and growth conditions.

*Arabidopsis thaliana* plants were grown in long-day conditions (16 h-day-at 21°C / 8 h night at 18°C cycles, LED tubes Philips 1500 mm SO 20W 840 T8, photon flux density of 120  $\mu\text{mol/s/m}^2$  at the plant level).

Seedlings were grown at 23°C with constant light in Murashige and Skoog MS231medium (Duchefa) (8 days in hydroponic cultures).

The insertion mutant SALK\_056717 was from Columbia ecotype.

The line expressing the epitope-tagged ribosomal protein, Flag-RPL18 (AT3G05590), was from (Zanetti et al., 2005). FMT-GFP, GFP-FMT and MS2-GFP lines were obtained by floral dip with pAM557, pAM549 and pAM495 plasmid respectively (see below) (Clough and Bent, 1998). For GFP-FMT line, seeds were selected on Murashige and Skoog agar plates containing 50  $\mu\text{g mL}^{-1}$  of kanamycin for 14 d. Kanamycin-resistant seedlings were transferred to soil for propagation. For the two other line, the selection was done on soil with a spray of BASTA at the dilution 1/500.

Transient transformation of 6-week-old *N. benthamiana* was performed by infiltration of leaves with a suspension of *Agrobacterium tumefaciens* harboring different constructs. The constructs allowed the expression of different split-GFP constructs, a mitochondrial marker (pSu9-RFP, (Michaud et al., 2014a)), and the silencing suppressor P19 protein (to limit silencing of constructs, (Michaud et al., 2014a)).

### Genotyping.

Genomic DNA was extracted from rosette leaves of 4-week-old *Arabidopsis thaliana* plants as described previously (Edwards et al., 1991) and subjected to a PCR-based screening using primer pairs 1-2 and 1-3 (1 : CAACCCATCACCAAGAAGGGTC ; 2 : CATGGTACAAAACCATAGCCAGG ; 3 : TGGTTCACGTAGTGGGCCATCG). Go-Taq DNA polymerase (Promega) was used at 0.375 units per 5  $\mu\text{L}$  assay. Amplification was carried out in the presence of deoxyribonucleotide triphosphates (0.2 mM), and specific primers (1 $\mu\text{M}$ ) in the



buffer provided by the supplier. Conditions for amplification were as follows: 94°C for 3 min; 30 cycles of amplification at 94°C for 30 s, 50°C for 30 s, and 72°C for 90 s; and a final extension of 72°C for 3 min. PCR products were separated by agarose gel electrophoresis and visualized by ethidium bromide staining.

### **Genomic DNA (gDNA) extraction and qPCR.**

gDNA for qPCR experiment was extracted from 8 days old seedling using the NucleoSpin® plant L kit according to the manufacturer's instructions. For qPCR, the gDNA was used directly at the concentration of 3 ng/μL and 10 times diluted, and 3 technical replicates were performed for each dilution. At least 3 biological replicates were prepared. The qPCR efficiency for each primers couple was determined by serial dilutions of gDNA. The qPCR results were normalized with the nucleus gene of actin (Actin cyto) and the nucleus gene of 18S ribosomal RNA (18S cyto) (table 1).

### **RNA extraction, reverse transcription and RT-qPCR.**

RNA was extracted from mitochondria and whole cells using Tri Reagent® (Molecular Research Center) according to the manufacturer's instructions, then treated with RNase free-DNase RQ1 (Promega) and quantified with nanodrop. Their quality was checked by electrophoresis in MOPS buffer/formaldehyde/agarose gel. Reverse transcription was performed with Reverse Transcription SuperScript™ IV (Invitrogen) in presence of hexamers and oligo dT primer (Michaud et al., 2010). For qPCR, the RT was used directly and 10 times diluted, and 2 to 3 technical replicates were performed for each dilution. At least 3 biological replicates, corresponding to mitochondrial and total RNA extracted from the same plant material, were prepared. The qPCR efficiency for each primers couple (table1) was determined by serial dilutions of cDNA. The qPCR results were normalized with the cytosolic ribosomal protein L12 (RPL12) or Glyceraldehyde-3-P-dehydrogenase (GAPDH) mRNAs.



| Name                 | Sequence                  |
|----------------------|---------------------------|
| related to figure 2A |                           |
| 18S mito             | CCTTGAGCTAGGAGCCTCTTT     |
|                      | CATGCAAGTCGAACGTTGTT      |
| cox2 mito            | AATAAACGTGATTGACCCAATTCT  |
|                      | TCCGATGAGCAGTCACTCAC      |
| Actin cyto           | CATCTTGGCCTCCCTCAGTA      |
|                      | GAGTAAACAAGTGATGGGACTGTG  |
| ndhH chloro          | TCCGGATAAACCCCAATTTA      |
|                      | AGAACGGGTTGAAGGAGTTG      |
| 16S chloro           | GATCGGAAAGAACACCAACG      |
|                      | CCCCTAGCTTTCGTCTCTCA      |
| 18S cyto             | AAACGGCTACCACATCCAAG      |
|                      | ACTCGAAAGAGCCCGGTATT      |
| related to figure 2B |                           |
| 18S mito MitoRib     | CATGCAAGTCGAACGTTGTT      |
|                      | CCTTGAGCTAGGAGCCTCTTT     |
| GAPDH cyto           | AGGCTGCTGCTCACTTGA        |
|                      | AACATGGGCGCATCTTTG        |
| COX1 complex IV      | GTAGCTGCGGTGAAGTAGGC      |
|                      | CTGCCTGGATTCCGTATCAT      |
| COX2 complex IV      | TCCGATGAGCAGTCACTCAC      |
|                      | AATAAACGTGATTGACCCAATTCT  |
| NAD4 complex I       | AATACCCATGTTTCCGAAG       |
|                      | TGCTACCTCCAATTCCTGT       |
| COB complex III      | TGCCGGAATGGTATTTCTA       |
|                      | GCCAAAAGCAACCAAACAT       |
| RPL2 MitoRib         | CGAAGACGGATCAAGGTAA       |
|                      | CGCAATTCATCACCATTTTG      |
| RPS3 MitoRib         | CCGATTCGGTAAGACTTGG       |
|                      | AGCCGAAGGTGAGTCTCGTA      |
| related to figure 6  |                           |
| RPL12 cyto           | GACGTGTACGTCCGAGTAACC     |
|                      | GACCGATTTTGGGAGCTAGA      |
| VDAC3 CDS            | CACTGAAATCGGCAAAAAGG      |
|                      | TGTTCCCGTTGTAGTGATCG      |
| VDAC3-caUTR          | TCCATATCTTTACTTGGTTCTCTCT |
|                      | GGGAACCTCAAATGGAACAA      |

**Table 1: sequence of oligonucleotides**



### **Mitochondria preparation.**

Mitochondria were extracted from 8-day-old water-cultured seedling according to (Hemono et al., 2020), or from inflorescence of 6/8-week-old *Arabidopsis thaliana* (Waltz et al., 2019).

### **Immunoprecipitation.**

Proteins were extracted from grounded seedlings or inflorescences, or from mitochondria according to (Waltz et al., 2019) (inflorescence mitochondria) or (Hemono et al., 2020) (seedling mitochondria).  $\mu$ MACS™ GFP or  $\mu$ MACS™ DYKDDDDK (FLAG-tagged) Protein Isolation Kit (Miltenyi Biotec) were used. For seedling material, the lysis buffer (50 mM Tris-HCl pH8, 50 mM NaCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 200 $\mu$ g/mL cycloheximide, protease inhibitors (cOmplete™, EDTA-free protease inhibitor cocktail, Roche, 1 tablet for 50mL) and wash buffer (as lysis buffer but with 0,1% Triton X-100) were used. For inflorescence material, the lysis buffer (1 mM DTT, 20 mM HEPES-KOH pH7.6, 100 mM KCl, 20 mM MgCl<sub>2</sub>, 1% Triton X-100, 20 $\mu$ g/mL cycloheximide, protease inhibitors (cOmplete™, EDTA-free protease inhibitor cocktail, Roche, 1 tablet for 50mL) and wash buffer (as lysis buffer but with 0,1% Triton X-100) were used. Experiment were done with 3 biological repeats.

### **Proteomic analyses.**

Proteins (1 mg) from each sample were trypsin digested, then analyzed by nanoLCMS/MS. Data were searched against the TAIR *A. thaliana* database. All steps were performed at the "Plateforme Protéomique Strasbourg-Esplanade" (<http://www-ibmc.u-strasbg.fr/proteo/Web/accueil.htm>).

To identify significantly affected proteins, a statistical analysis based on spectral counts was performed using a homemade R package (<https://github.com/hzuber67/IPinquiry4>) as described in (Chicois et al., 2018), except that the size factors used to scale samples were calculated according to DESeq2 normalization method (i.e., median of ratios method, (Love et al., 2014)). The R-package performs a negative-binomial test using an edgeR based GLM regression (Robinson et al., 2010) and calculates the fold change and an adjusted p-value corrected by Benjamini-Hochberg for each identified protein. To avoid too much bias, only



proteins with a mean of at least 3 spectra in the most expressed condition were further considered.

Mitochondrial localization was determined according to SUBA4 (<http://suba.live/>). For functional annotations

### **Western blot and antibodies.**

Western blot analysis was conducted according to standard. Antibodies against AOX (from T. Elthon (GT monoclonal antibodies, University of Nebraska, Lincoln, USA) (Elthon et al., 1989)), UGPase (from Agrisera), NAD9 (from J. M. grienenberger, IBMP, Strasbourg), FLAG (from covalab), VDAC2 (Robert et al., 2012) and VDAC (from A. Dietrich, IBMP, Strasbourg), were used. For FMT antibody, the peptide corresponding to the C-terminal part of FMT (373 amino acids) was purified from SDS-polyacrylamide gel and injected into rabbits (Covalab antibody production)

### **Plasmid construction.**

For the generation of stable FMT-GFP, GFP-FMT and MS2-GFP line, plasmid were cloned by gateway. For pAM549 and pAM557 FMT sequence was amplified from Col0 cDNA with the AT3G52140.1 gene (obtained from (El Zawily et al., 2014) for pAM549). Each FMT cDNA were cloned in pK7WGF2 (Karimi et al., 2002) for pAM495 and in pB7FWG2 (Karimi et al., 2002) for pAM557. MS2 gene was cloned in pH7RGW2 (Karimi et al., 2002) by gateway using MS2 from (Michaud et al., 2014a).

For the mitochondrial phenotype observation, the pNP4 plasmid from (Peeters et al., 2000) was used.

For the split GFP experiment, S11-GFP sequence was amplified from pCAMBIA1380-pUBI-MTS-mCherry-sfGFP  $\beta$ 11 (Addgene #97398) (Park et al., 2017) and cloned into Ascl site of pMDC32 (Curtis and Grossniklaus, 2003). cDNA corresponding to *A. thaliana* FMT (AT3G52140.1), *A. thaliana* TOM20 (AT3G27080) and *S. tuberosum* GAPDH (TC147420) (Michaud et al., 2010) were subsequently cloned by gateway into this vector. Beta



1-10 sequence was amplified from pCAMBIA1380-pUBI-MTS-sfGFP $\beta$ 1-10<sup>OPT</sup> (Addgene #97390) (Park et al., 2017). Yeast TOM5 (YPR133W-A) sequence was obtained by RT-PCR with *S. cerevisiae* RNA and *A. thaliana* RPL18 (AT3G05590) sequence was amplified from Col0 cDNA. Both were subsequently cloned by gateway into this vector.

### **Confocal microscopy.**

*N. benthamiana* or *A. thaliana* leaves were directly observed 2–5 d after agroinfiltration by using a LSM700 confocal microscope (Zeiss). GFP and RFP fluorophores were excited at 488 and 555 nm, respectively, and emission signals were simultaneously collected at 488–560 nm for GFP and at long-pass 560 nm for RFP.

### **O<sub>2</sub> consumption.**

Oxygen consumption of seedlings was measured in 2 mL of culture medium with a liquid-phase Oxytherm oxygen electrode system (Hansatech Instruments, Pentney, UK). Five-day-old seedlings grown in liquid phase (30–40 mg) were directly imbibed in the electrode chamber and rates of oxygen consumption were measured. After 6 min, KCN was added (final concentration: 2.5 mM) and oxygen consumption was re-measured. Differences between these two rates corresponded to cyanide-sensitive oxygen uptake (OXPHOS O<sub>2</sub> uptake) (N = 3). Then, after 8 min, propylgalate (PG) was added (final concentration: 2.5 mM) and oxygen consumption was re-measured. Differences between the KCN rate and the PG rate corresponded to AOX oxygen uptake.

### **BIBLIOGRAPHY**

Arimura, S.-I. (2018). Fission and Fusion of Plant Mitochondria, and Genome Maintenance. *Plant Physiol.* *176*, 152–161.

Ayabe, H., Kawai, N., Shibamura, M., Fukao, Y., Fujimoto, M., Tsutsumi, N., and Arimura, S. (2021). FMT, a protein that affects mitochondrial distribution, interacts with translation-related proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* *40*, 327–337.



Chicois, C., Scheer, H., Garcia, S., Zuber, H., Mutterer, J., Chicher, J., Hammann, P., Gagliardi, D., and Garcia, D. (2018). The UPF1 interactome reveals interaction networks between RNA degradation and translation repression factors in Arabidopsis. *Plant J.* *96*, 119–132.

Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* *16*, 735–743.

Curtis, M.D., and Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* *133*, 462–469.

Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* *19*, 1349.

Elthon, T.E., Nickels, R.L., and McIntosh, L. (1989). Monoclonal Antibodies to the Alternative Oxidase of Higher Plant Mitochondria. *Plant Physiol.* *89*, 1311–1317.

Fazal, F.M., Han, S., Parker, K.R., Kaewsapsak, P., Xu, J., Boettiger, A.N., Chang, H.Y., and Ting, A.Y. (2019). Atlas of Subcellular RNA Localization Revealed by APEX-Seq. *Cell* *178*, 473–490.e26.

Gao, J., Schatton, D., Martinelli, P., Hansen, H., Pla-Martin, D., Barth, E., Becker, C., Altmueller, J., Frommolt, P., Sardiello, M., et al. (2014). CLUH regulates mitochondrial biogenesis by binding mRNAs of nuclear-encoded mitochondrial proteins. *J. Cell Biol.* *207*, 213–223.

Hemond, M., Ubrig, É., Azeredo, K., Salinas-Giegé, T., Drouard, L., and Duchêne, A.-M. (2020). Arabidopsis Voltage-Dependent Anion Channels (VDACs): Overlapping and Specific Functions in Mitochondria. *Cells* *9*, 1023.

Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for *Agrobacterium*-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* *7*, 193–195.

Logan, D.C. (2010). Mitochondrial fusion, division and positioning in plants. *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 789–795.

Logan, D.C., Scott, I., and Tobin, A.K. (2003). The genetic control of plant mitochondrial morphology and dynamics. *Plant J.* *36*, 500–509.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* *15*, 550.



Ma, J., Liang, Z., Zhao, J., Wang, P., Ma, W., Fernandez Andrade, J., Zeng, Y., Grujic, N., Jiang, L., Dagdas, Y., et al. (2020). Friendly regulates membrane depolarization induced mitophagy in Arabidopsis. *BioRxiv*.

Michaud, M., Maréchal-Drouard, L., and Duchêne, A.M. (2010). RNA trafficking in plant cells: Targeting of cytosolic mRNAs to the mitochondrial surface. *Plant Mol. Biol.* *73*, 697–704.

Michaud, M., Ubrig, E., Filleur, S., Erhardt, M., Ephritikhine, G., Marechal-Drouard, L., and Duchene, A.-M. (2014). Differential targeting of VDAC3 mRNA isoforms influences mitochondria morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 8991–8996.

Nakamura, S., Hagihara, S., Otomo, K., Ishida, H., Hidema, J., Nemoto, T., and Izumi, M. (2020). Autophagy contributes to quality control of leaf mitochondria. *Plant Cell Physiol.*

Park, E., Lee, H.-Y., Woo, J., Choi, D., and Dinesh-Kumar, S.P. (2017). Spatiotemporal Monitoring of *Pseudomonas syringae* Effectors via Type III Secretion Using Split Fluorescent Protein Fragments. *Plant Cell* *29*, 1571–1584.

Peeters, N.M., Chapron, A., Giritch, A., Grandjean, O., Lancelin, D., Lhomme, T., Vivrel, A., and Small, I. (2000). Duplication and quadruplication of *Arabidopsis thaliana* cysteinyl- and asparaginyl-tRNA synthetase genes of organellar origin. *J. Mol. Evol.* *50*, 413–423.

Robert, N., D’Erfurth, I., Marmagne, A., Erhardt, M., Allot, M., Boivin, K., Gissot, L., Monachello, D., Michaud, M., Duchêne, A.-M., et al. (2012). Voltage-dependent-anion-channels (VDACs) in *Arabidopsis* have a dual localization in the cell but show a distinct role in mitochondria. *Plant Mol. Biol.* *78*, 431–446.

Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* *26*, 139–140.

Saint-Georges, Y., Garcia, M., Delaveau, T., Jourden, L., Le Crom, S., Lemoine, S., Tanty, V., Devaux, F., and Jacq, C. (2008). Yeast mitochondrial biogenesis: a role for the PUF RNA-binding protein Puf3p in mRNA localization. *PLoS One* *3*, e2293.

Salih, K.J., Duncan, O., Li, L., Troesch, J., and Harvey Millar, A. (2019). Refining the composition of the *Arabidopsis thaliana* 80S cytosolic ribosome. *BioRxiv*.

Salih, K.J., Duncan, O., Li, L., Trösch, J., and Millar, A.H. (2020). The composition and turnover



of the *Arabidopsis thaliana* 80S cytosolic ribosome. *Biochem. J.* 477, 3019–3032.

Sen, A., and Cox, R.T. (2016). Clueless is a conserved ribonucleoprotein that binds the ribosome at the mitochondrial outer membrane. *Biol. Open* 5, 195–203.

Senkler, J., Senkler, M., Eubel, H., Hildebrandt, T., Lengwenus, C., Schertl, P., Schwarzländer, M., Wagner, S., Wittig, I., and Braun, H.-P. (2017). The mitochondrial complexome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* 89, 1079–1092.

Vincent, T., Vingadassalon, A., Ubrig, E., Azeredo, K., Srour, O., Cognat, V., Graindorge, S., Salinas, T., Maréchal-Drouard, L., and Duchêne, A.-M. (2017). A genome-scale analysis of mRNAs targeting to plant mitochondria: upstream AUGs in 5' untranslated regions reduce mitochondrial association. *Plant J.* 92, 1132–1142.

Waltz, F., Nguyen, T.-T., Arrivé, M., Bochler, A., Chicher, J., Hammann, P., Kuhn, L., Quadrado, M., Mireau, H., Hashem, Y., et al. (2019). Small is big in *Arabidopsis* mitochondrial ribosome. *Nat. Plants* 5, 106–117.

Warmke, H.E., and Lee, S.-L.J. (1978). Pollen Abortion in T Cytoplasmic Male-Sterile Corn (*Zea mays*): A Suggested Mechanism. *Science* (80- ). 200, 561–563.

Zanetti, M.E., Chang, I.-F., Gong, F., Galbraith, D.W., and Bailey-Serres, J. (2005). Immunopurification of Polyribosomal Complexes of *Arabidopsis* for Global Analysis of Gene Expression. *Plant Physiol.* 138, 624–635.

El Zawily, A.M., Schwarzlander, M., Finkemeier, I., Johnston, I.G., Benamar, A., Cao, Y., Gissot, C., Meyer, A.J., Wilson, K., Datla, R., et al. (2014). FRIENDLY Regulates Mitochondrial Distribution, Fusion, and Quality Control in *Arabidopsis*. *Plant Physiol.* 166, 808–828.

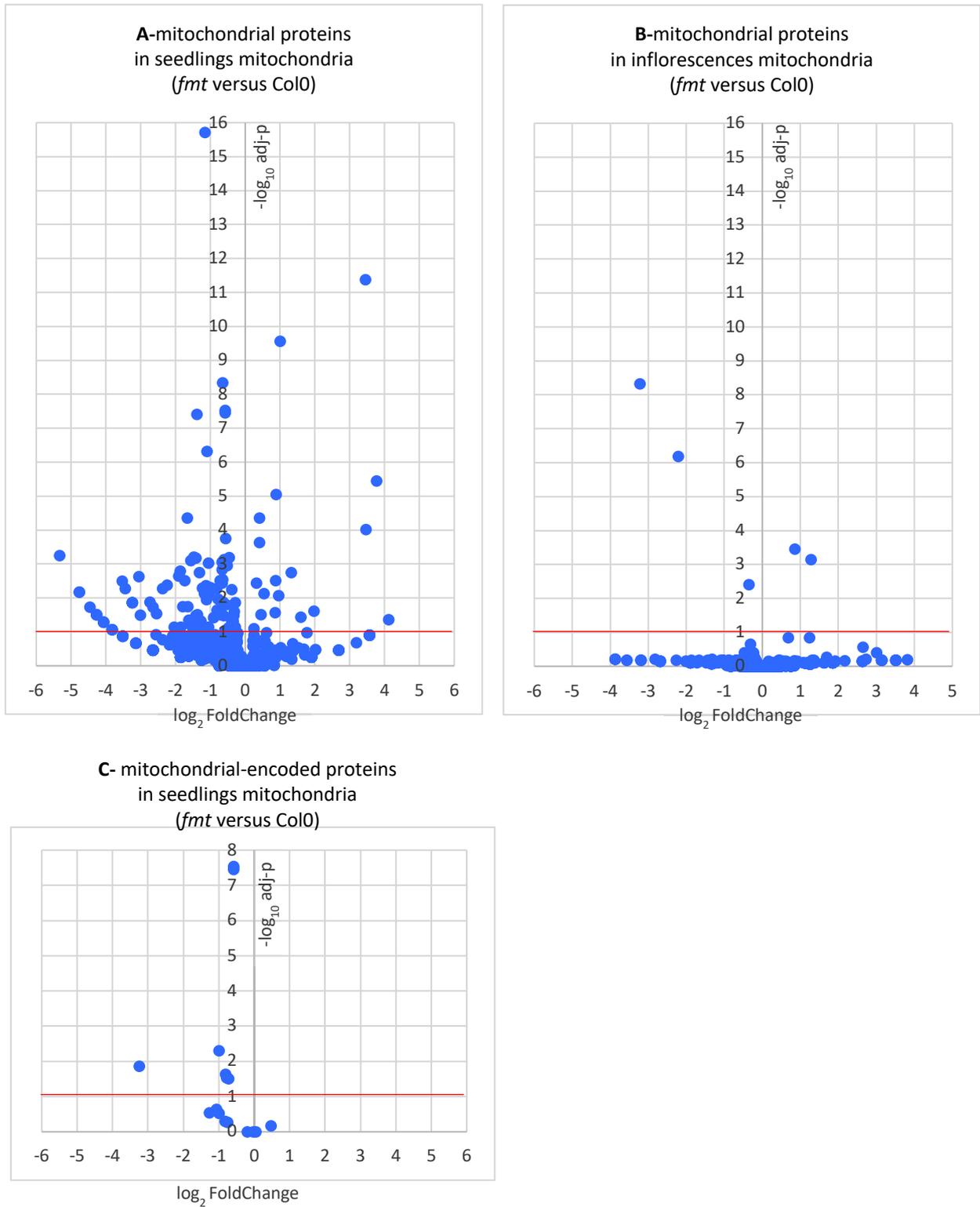


| in <i>fmt</i> seedlings | Accession    | Uniprot Name | Description                            | functional group   | LogFC seedlings : FMT vs Col0 | adjp seedlings : FMT vs Col0 | spectral count / 100 aa in Col0 seedlings | LogFC inflores : FMT vs Col0 | adjp inflores : FMT vs Col0 |
|-------------------------|--------------|--------------|--|--------------------|-------------------------------|------------------------------|---|------------------------------|-----------------------------|
| down                    | AT5G44710.1  | Q8GXH5       | unknown protein                        | mitorib            | -2.549                        | 0.029                        | 4.575                                     | 1.080                        | 0.772                       |
| down                    | AT4G39880.1  | Q9SMR5       | Ribosomal protein L23/L15e family ...  | mitorib            | -2.367                        | 0.005                        | 4.307                                     | 1.705                        | 0.650                       |
| down                    | AT2G20060.1  | Q8VY61       | Ribosomal protein L4/L1 family         | mitorib            | -1.872                        | 0.002                        | 4.333                                     | -0.051                       | 1.000                       |
| down                    | AT4G35490.1  | Q9SVW7       | mitochondrial ribosomal protein L1...  | mitorib            | -1.854                        | 0.072                        | 3.441                                     | -0.217                       | 1.000                       |
| down                    | AT1G07830.1  | Q94IQ7       | ribosomal protein L29 family protein   | mitorib            | -1.613                        | 0.046                        | 5.324                                     | 0.098                        | 1.000                       |
| down                    | AT1G19520.1  | NFD5         | pentatricopeptide (PPR) repeat-con...  | mitorib            | -1.472                        | 0.001                        | 2.943                                     | -0.313                       | 0.772                       |
| down                    | AT1G76200.1  | NDUB2        | unknown protein                        | OXPHOS-complex I   | -5.332                        | 0.001                        | 7.246                                     | 0.000                        | 1.000                       |
| down                    | AT4G20150.1  | Q94AL6       | unknown protein                        | OXPHOS-complex I   | -3.237                        | 0.014                        | 5.350                                     | -0.752                       | 0.747                       |
| down                    | AT3G62790.1  | ND55B        | NADH-ubiquinone oxidoreductase-rel...  | OXPHOS-complex I   | -1.550                        | 0.066                        | 8.835                                     | -0.172                       | 1.000                       |
| down                    | AT1G04630.1  | NDADA        | GRIM-19 protein, Symbols: MEE4         | OXPHOS-complex I   | -1.313                        | 0.002                        | 15.152                                    | -0.122                       | 1.000                       |
| down                    | AT1G67350.1  | Q9FYF8       | unknown protein                        | OXPHOS-complex I   | -1.166                        | 0.008                        | 20.748                                    | -0.324                       | 0.809                       |
| down                    | AT5G67590.1  | NDUS4        | NADH-ubiquinone oxidoreductase-rel...  | OXPHOS-complex I   | -1.112                        | 0.011                        | 13.203                                    | -0.603                       | 0.650                       |
| down                    | AT2G33220.1  | NDADB        | GRIM-19 protein                        | OXPHOS-complex I   | -1.044                        | 0.009                        | 16.550                                    | -0.052                       | 1.000                       |
| down                    | ATMG00070.1  | NDUS3        | NADH dehydrogenase subunit 9, Symb...  | OXPHOS-complex I   | -0.991                        | 0.005                        | 15.263                                    | -0.212                       | 0.946                       |
| down                    | ATMG000510.1 | NDUS2        | NADH dehydrogenase subunit 7, Symb...  | OXPHOS-complex I   | -0.803                        | 0.023                        | 7.530                                     | -0.264                       | 0.803                       |
| down                    | AT3G48580.1  | GCAL2        | gamma carbonic anhydrase-like 2, S...  | OXPHOS-complex I   | -0.783                        | 0.011                        | 14.453                                    | -0.372                       | 0.772                       |
| down                    | AT5G08530.1  | NDUV1        | 51 kDa subunit of complex I, Symb...   | OXPHOS-complex I   | -0.658                        | 0.001                        | 15.844                                    | -0.471                       | 0.403                       |
| down                    | AT5G63510.2  |              | gamma carbonic anhydrase like 1, S...  | OXPHOS-complex I   | -0.618                        | 0.034                        | 16.667                                    | -0.351                       | 0.772                       |
| down                    | AT3G12260.1  | NDUA6        | LYR family of Fe/S cluster biogene...  | OXPHOS-complex I   | -0.590                        | 0.095                        | 24.311                                    | -0.355                       | 0.772                       |
| down                    | AT1G14450.1  | NDB3B        | NADH dehydrogenase (ubiquinone)s       | OXPHOS-complex I   | -0.588                        | 0.096                        | 45.662                                    | -0.196                       | 1.000                       |
| down                    | AT3G27240.1  | CYC1A        | Cytochrome C1 family                   | OXPHOS-complex III | -0.647                        | 0.003                        | 21.716                                    | 0.078                        | 1.000                       |
| down                    | ATMG000410.1 | ATP61        | ATPase, FO complex, su...              | OXPHOS-complex V   | -3.237                        | 0.014                        | 1.126                                     | 0.000                        | 1.000                       |
| down                    | ATMG00640.1  | MI25         | hydrogen ion transporting ATP synt...  | OXPHOS-complex V   | -0.774                        | 0.029                        | 15.451                                    | 0.240                        | 1.000                       |
| down                    | ATMG00480.1  | YMF19        | Plant mitochondrial AT...              | OXPHOS-complex V   | -0.725                        | 0.031                        | 20.675                                    | -0.052                       | 1.000                       |
| down                    | AT2G33040.1  | ATPG3        | gamma subunit of Mt ATP synthase, ...  | OXPHOS-complex V   | -0.669                        | 0.004                        | 18.462                                    | -0.095                       | 1.000                       |
| down                    | AT5G08670.1  | ATPBPM       | ATP synthase alpha/beta family pro...  | OXPHOS-complex V   | -0.650                        | 0.000                        | 72.842                                    | -0.228                       | 0.401                       |
| down                    | AT5G13450.1  | ATPO         | delta subunit of Mt ATP synthase, ...  | OXPHOS-complex V   | -0.636                        | 0.013                        | 21.709                                    | -0.179                       | 0.876                       |
| down                    | AT2G17130.1  | IDH2         | isocitrate dehydrogenase subunit 2...  | TCA                | -0.727                        | 0.003                        | 14.532                                    | -0.421                       | 0.758                       |
| down                    | AT4G35260.1  | IDH1         | isocitrate dehydrogenase 1, Symb...    | TCA                | -0.656                        | 0.001                        | 19.619                                    | 0.097                        | 1.000                       |
| down                    | AT2G44350.2  | CISY4        | Citrate synthase family protein, S...  | TCA                | -0.604                        | 0.001                        | 22.128                                    | -0.035                       | 1.000                       |
| down                    | AT5G49210.1  | Q945P2       | unknown protein                        |                    | -4.765                        | 0.007                        | 1.709                                     | -0.443                       | 1.000                       |
| down                    | AT5G37590.1  |              | Tetrapetrapeptide repeat (TPR)-lik...  |                    | -4.765                        | 0.007                        | 0.605                                     | -0.047                       | 1.000                       |
| down                    | AT1G24610.1  | Q9FYK3       | Rubisco methyltransferase family p...  |                    | -3.529                        | 0.003                        | 1.120                                     | -1.119                       | 0.700                       |
| down                    | AT4G34310.1  | Q9SY26       | alpha/beta-Hydrolases superfamily ...  |                    | -3.438                        | 0.005                        | 0.407                                     | 0.000                        | 1.000                       |
| down                    | AT5G56730.1  | PQOL         | Insulinase (Peptidase family M16) ...  |                    | -3.237                        | 0.014                        | 0.453                                     | -1.148                       | 0.772                       |
| down                    | AT1G16000.1  | P93048       | unknown protein                        |                    | -3.052                        | 0.002                        | 7.752                                     | -1.894                       | 0.772                       |
| down                    | AT2G20390.2  | Q9SK63       | unknown protein                        |                    | -3.003                        | 0.032                        | 2.004                                     | 2.641                        | 0.700                       |
| down                    | AT2G04940.1  | Q9S132       | scramblase-related                     |                    | -2.737                        | 0.013                        | 1.361                                     | -0.350                       | 0.958                       |
| down                    | AT4G30490.1  | Q8LS17       | AFG1-like ATPase family protein        |                    | -2.646                        | 0.019                        | 1.006                                     | -0.443                       | 1.000                       |
| down                    | AT1G72020.1  | Q9C7G5       |  |                    | -2.041                        | 0.072                        | 4.811                                     | 2.641                        | 0.700                       |
| down                    | AT5G12290.1  | DGS1         | dgd1 suppressor 1, Symbols: DGS1       |                    | -1.904                        | 0.002                        | 1.993                                     | -0.563                       | 0.876                       |
| down                    | AT1G15480.1  | PPR44        | Tetrapetrapeptide repeat (TPR)-lik...  |                    | -1.787                        | 0.018                        | 1.459                                     | -0.485                       | 0.918                       |
| down                    | AT4G01660.1  | ABC1         | ABC transporter 1, Symbols: ATABC1...  |                    | -1.739                        | 0.003                        | 2.087                                     | -0.117                       | 1.000                       |
| down                    | AT4G35850.1  | PP351        | Pentatricopeptide repeat (PPR) sup...  |                    | -1.667                        | 0.000                        | 5.255                                     | -2.204                       | 0.000                       |
| down                    | AT3G08860.1  | AGT23        | PYRIMIDINE 4, Symbols: PYD4            |                    | -1.645                        | 0.018                        | 2.079                                     | 0.000                        | 1.000                       |
| down                    | AT3G24200.2  | Q2V3S9       | FAD/NAD(P)-binding oxidoreductase ...  |                    | -1.565                        | 0.001                        | 3.696                                     | -0.212                       | 1.000                       |
| down                    | AT1G26460.1  | PPR58        | Tetrapetrapeptide repeat (TPR)-lik...  |                    | -1.414                        | 0.001                        | 3.545                                     | -3.220                       | 0.000                       |
| down                    | AT1G28510.1  | Q9SGP9       | Optic atrophy 3 protein (OPA3)         |                    | -1.412                        | 0.034                        | 6.043                                     | 0.071                        | 1.000                       |
| down                    | AT3G03910.1  | DHE3         | glutamate dehydrogenase 3, Symbols...  |                    | -1.386                        | 0.000                        | 11.922                                    | -0.080                       | 1.000                       |
| down                    | AT5G23200.1  | Q9FMY0       | unknown protein                        |                    | -1.379                        | 0.031                        | 2.757                                     | 0.248                        | 1.000                       |
| down                    | AT3G58840.1  | PMD1         | Tropomyosin-related                    |                    | -1.294                        | 0.085                        | 2.725                                     | -0.178                       | 1.000                       |
| down                    | AT5G14580.1  | PNP2         | polyribonucleotide nucleotidyltran...  |                    | -1.267                        | 0.048                        | 1.110                                     | 0.437                        | 0.807                       |
| down                    | AT3G15640.1  | CX5B1        | Rubredoxin-like superfamily protein    |                    | -1.222                        | 0.005                        | 11.553                                    | 0.067                        | 1.000                       |
| down                    | AT5G07440.1  | DHE2         | glutamate dehydrogenase 2, Symbols...  |                    | -1.153                        | 0.000                        | 32.036                                    | -0.073                       | 1.000                       |
| down                    | AT2G29080.1  | FTSH3        | FTSH protease 3, Symbols: ftsh3        |                    | -1.133                        | 0.004                        | 2.925                                     | -0.427                       | 0.700                       |
| down                    | AT5G10860.1  | CBSX3        | Cystathionine beta-synthase (CBS) ...  |                    | -1.096                        | 0.000                        | 33.819                                    | -0.033                       | 1.000                       |
| down                    | AT5G13430.1  | UCR11        | Ubiquinol-cytochrome C reductase i...  |                    | -1.061                        | 0.001                        | 12.255                                    | -0.023                       | 1.000                       |
| down                    | AT2G25140.1  | CLPB4        | casein lytic proteinase B4, Symbol...  |                    | -1.047                        | 0.072                        | 1.349                                     | -0.829                       | 0.772                       |
| down                    | AT3G07480.1  | Q9SRR8       | 2Fe-2S ferredoxin-like superfamily...  |                    | -0.915                        | 0.038                        | 12.788                                    | -0.026                       | 1.000                       |
| down                    | AT1G79230.1  | STR1         | mercaptopyruvate sulfurtransferase...  |                    | -0.816                        | 0.005                        | 10.466                                    | -0.255                       | 0.772                       |
| down                    | AT4G05020.2  | NDB2         | NAD(P)H dehydrogenase B2, Symbols...   |                    | -0.717                        | 0.025                        | 6.071                                     | 0.055                        | 1.000                       |
| up                      | AT3G22370.1  | AOX1A        | alternative oxidase 1A, Symbols: A...  | AOX                | 3.453                         | 0.000                        | 0.565                                     | 2.647                        | 0.277                       |
| up                      | AT3G27620.1  | AOX1C        | alternative oxidase 1C, Symbols: A...  | AOX                | 3.466                         | 0.000                        | 0.203                                     | 2.170                        | 0.687                       |
| up                      | AT3G22360.1  | AOX1B        | alternative oxidase 1B, Symbols: A...  | AOX                | 3.772                         | 0.000                        | 0.205                                     | 2.726                        | 0.626                       |
| up                      | AT3G47930.1  | GLDH         | L-galactono-1,4-lactone dehydrogen...  | OXPHOS-complex I   | 1.008                         | 0.000                        | 10.219                                    | 0.855                        | 0.000                       |
| up                      | AT5G54100.1  | Q9LWV0       | SPFH/Band 7/PHB domain-containing ...  |                    | 0.860                         | 0.028                        | 3.408                                     | 1.285                        | 0.001                       |
| up                      | AT4G08900.1  | ARG11        | arginase                               |                    | 0.869                         | 0.003                        | 6.238                                     | 0.047                        | 1.000                       |
| up                      | AT4G08870.1  | ARG12        | Arginase/deacetylase superfamily p...  |                    | 0.886                         | 0.000                        | 13.953                                    | -0.108                       | 1.000                       |
| up                      | AT3G22330.1  | RH53         | putative mitochondrial RNA helicase... |                    | 0.958                         | 0.009                        | 2.273                                     | 0.262                        | 0.772                       |
| up                      | AT5G55200.1  | MGE1         | Co-chaperone GrpE family protein       |                    | 1.317                         | 0.002                        | 2.870                                     | 0.579                        | 0.700                       |
| up                      | AT4G17650.1  | Q8LAA4       | Polyketide cyclase / dehydrase and...  |                    | 1.593                         | 0.037                        | 1.042                                     | 0.624                        | 1.000                       |
| up                      | AT4G00026.1  | Q2V3L9       | unknown protein                        |                    | 1.973                         | 0.025                        | 0.620                                     | -0.049                       | 1.000                       |

**Table S1: Comparison of mitochondrial proteome in *fmt* and Col0 seedlings.**

With a Fold-Change cut-off above 1.5 and an adjusted p-value below 0.1, 72 proteins were found affected in *fmt* compared to Col0.

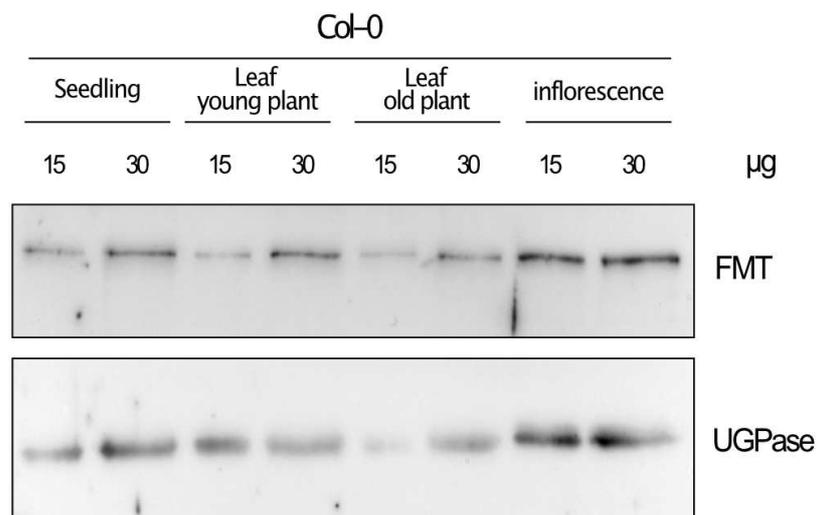




**Fig. S1: Mitochondrial proteomes in seedlings and inflorescences**

Proteins from purified mitochondria were analyzed by MS/MS, and spectral count label-free quantifications were performed (*fmt* line compared to Col0). The adjusted p-value is presented on y-axes ( $-\log_{10}(\text{adj-p})$ ), and the fold change on x-axes ( $\log_2(\text{FoldChange})$ ). **A-** mitochondrial proteome from seedlings. **B-** mitochondrial proteome from inflorescences. **C-** mitochondrial encoded proteins in seedling mitochondria.





**Fig. S2: FMT level in *A. thaliana* tissues.**

Western blots with Col0 proteins extract from 18-day-old seedlings, 35-day-old young leaves, 55-day-old leaves, and inflorescences. 15 and 30 µg of proteins were loaded for each sample. Western blots were performed with FMT and UGPase antibodies.



| AGI       | Uniprot Name | Description                             | cyto Ribosome (Salih 2019) | localisation (SUBA4) | in seedlings | in inflorescences | Seedlings FMT- GFP LogFC | Seedling FMT- GFP adj-p | Seedling GFP- FMT LogFC | Seedling GFP- FMT adj-p | Inflorescence FMT- GFP LogFC | Inflorescence FMT- GFP adj-p | Inflorescences GFP-FMT LogFC | Inflorescence GFP-FMT adj-p |
|-----------|--------------|---|----------------------------|----------------------|--------------|-------------------|--------------------------|-------------------------|-------------------------|-------------------------|------------------------------|------------------------------|------------------------------|-----------------------------|
| AT3G52140 | FRIENDLY     | tetratricopeptide repeat (TPR)-con...   |                            | cytosol              |              |                   |                          |                         |                         |                         |                              |                              |                              |                             |
| AT2G27710 | RPP2B        | 60S acidic ribosomal protein family     | bl12                       | cytosol              | yes          | yes               | 1.14809355               | 0.298810                | 9.742815543             | 5.39631E-42             | 11.85861223                  | 2.81274E-14                  | 12.16483821                  | 3.23492E-16                 |
| AT3G49010 | RL131        | breast basic conserved 1, Symbols:...   | el13                       | cytosol              | yes          | yes               |                          |                         | 1.141652431             | 0.430472755             | 1.093879631                  | 0.599305173                  |                              |                             |
| AT5G27850 | RL183        | Ribosomal protein L18e/L15 superfa...   | el18                       | cytosol              | yes          | yes               |                          |                         | 1.396354298             | 0.430472755             | 4.376927694                  | 0.389826471                  | 1.874469118                  | 0.607029405                 |
| AT3G05590 | RPL18B       | ribosomal protein L18, Symbols: RPL1... | el18                       | cytosol              |              |                   |                          |                         | 1.210106606             | 0.430472755             |                              |                              |                              |                             |
| AT1G02780 | RPL19A       | Ribosomal protein L19e family prot...   | el19                       | cytosol              | yes          |                   |                          |                         |                         |                         |                              |                              |                              |                             |
| AT2G34480 | R18A2        | Ribosomal protein L18a/LX family ...    | el20                       | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.842122802                  | 0.454712002                  |                              |                             |
| AT2G19730 | RL281        | Ribosomal L28e protein family           | el28                       | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 4.273884558                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT1G18540 | RPL6A        | Ribosomal protein L6 family protein     | e6                         | cytosol              | yes          |                   |                          |                         | 1.183884352             | 0.430472755             |                              |                              |                              |                             |
| AT2G04840 | RPS3A4       | Ribosomal protein S3Ae                  | e51                        | cytosol              | yes          |                   | 1.531825509              | 0.59148528              | 1.914123745             | 0.354083398             |                              |                              |                              |                             |
| AT1G15930 | RS121        | Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/G...   | e512                       | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 4.65653859                   | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT1G13660 | RS41         | Ribosomal protein S4 (RPS4A) fami...    | e54                        | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 5.20563505                   | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT4G31700 | RS61         | ribosomal protein S6, Symbols: RPS...   | e56                        | cytosol              |              | yes               |                          |                         | 1.493505902             | 0.362053569             | 1.780165448                  | 0.430031466                  |                              |                             |
| AT5G10360 | RPS6B        | Ribosomal protein S6e, Symbols: EM...   | e56                        | cytosol              | yes          | yes               | 2.049082713              | 0.192606428             |                         |                         | 2.4866997                    | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT5G20290 | RS81         | Ribosomal protein S8e family protei...  | e58                        | cytosol/nucleus      | yes          | yes               | 1.480651954              | 0.59148528              | 1.230034365             | 0.44240874              | 0.439831251                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT1G48080 | GBLPA        | Transducin/WD40 repeat-like super...    | RACK1                      | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 2.409294071                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT3G09200 | RLA02        | Ribosomal protein L10 family protei...  | ul10                       | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 4.817423727                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT1G04480 | RPL23A       | Ribosomal ...                           | ul14                       | cytosol/nucleus      | yes          |                   |                          |                         | 1.123603914             | 0.439831251             |                              |                              |                              |                             |
| AT5G39740 | RPL5B        | ribosomal protein L5 B, Symbols: O...   | ul18                       | cytosol              | yes          |                   | 1.008538956              | 0.59148528              |                         |                         |                              |                              |                              |                             |
| AT2G18020 | RPL8A        | Ribosomal protein L2 family, Symb...    | ul15                       | cytosol              | yes          |                   |                          |                         | 1.385601169             | 0.321128579             |                              |                              |                              |                             |
| AT1G43170 | RL31         | ribosomal protein 1, Symbols: ARP1...   | ul3                        | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.252670194                  | 0.489070438                  |                              |                             |
| AT2G01250 | RL72         | Ribosomal protein L30/L17 family p...   | ul30                       | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 4.047609                     | 0.389826471                  | 2.662965013                  | 0.607029405                 |
| AT1G33120 | RL91         | Ribosomal protein L6 f...               | ul6                        | cytosol              | yes          | yes               | 1.12540058               | 0.600587023             | 2.038082048             | 0.273520194             | 3.142098461                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT1G22780 | RPS18C       | Ribosomal ...                           | e513                       | cytosol              | yes          | yes               | 1.083455263              | 0.59148528              | 1.29024355              | 0.350298466             |                              |                              |                              |                             |
| AT4G00100 | RPS13B       | ribosomal protein S13a, Symbols: A...   | e515                       | cytosol              | yes          | yes               | 1.29838142               | 0.59148528              |                         |                         |                              |                              |                              |                             |
| AT1G27370 | RSSA1        | 40s ribosomal protein S4, Symbols:...   | u52                        | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.983626466                  | 0.389826471                  | 1.099535674                  | 0.76760394                  |
| AT5G15200 | RS91         | Ribosomal protein S9                    | u54                        | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 4.65801273                   | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT1G58380 | RPS2A        | Ribosomal protein S5 family protei...   | u55                        | cytosol              | yes          | yes               | 2.291117033              | 0.430436224             | 1.486713465             | 0.367790682             |                              |                              |                              |                             |
| AT2G37270 | RPS5A        | ribosomal protein S5b, Symbols: ATR...  | u57                        | cytosol              | yes          | yes               | 1.480651954              | 0.59148528              | 1.230034365             | 0.44240874              |                              |                              |                              |                             |
| AT3G11940 | RPS5B        | Ribosomal protein S5a family protei...  | u57                        | cytosol              | yes          | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.125142003                  | 0.572312855                  |                              |                             |
| AT1G05190 | RKE          | Ribosomal protein L6 family, Symb...    | plastid                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.614835733                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT1G07890 | APX1         | ascorbate peroxidase 1, Symbols: A...   | cytosol                    | nucleus              | yes          | yes               | 2.980745725              | 0.535526602             |                         |                         | 2.097695484                  | 0.40118097                   |                              |                             |
| AT1G08880 | HTA5         | Histone superfamily protein, Symb...    | nucleus                    | cytosol              | yes          | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.614835733                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT1G14830 | DRP1C        | DYNAMIN-like 1C, Symbols: ADL1C, A...   | cytosol                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 4.74193825                   | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT1G20130 | APC          | GDSL-like Lipase/Acylhydrolase sup...   | extracellular              | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 4.588973066                  | 0.389826471                  | 2.662965013                  | 0.607029405                 |
| AT1G20620 | CAT3A        | catalase 3, Symbols: CAT3, SEN2, A...   | peroxisome                 | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.488381274                  | 0.427565876                  |                              |                             |
| AT1G21750 | PDH11        | PDH-like 1-1, Symbols: ATPDHL1-1, ...   | endoplasmic reticulum      | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 2.015355246                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT1G24020 | ML423        | MLP-like protein 423, Symbols: MLP42... | golgi                      | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 3.906624111                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT1G27650 | UZFAF        | U2 snRNP auxiliary factor small fac...  | nucleus                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 2.407104996                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT1G31330 | PSAF         | photosystem I subunit F, Symbols:...    | plastid                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 4.477518295                  | 0.389826471                  | 3.169925001                  | 0.607029405                 |
| AT1G31440 | SHSP1        | SH3 domain-containing protein           | plastid                    | plasma membrane      |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.049270591                  | 0.590592393                  |                              |                             |
| AT1G42970 | G3PB         | glyceroldehyde 3-phosphate dehydro...   | plastid                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 2.81972752                   | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT1G47980 | QBLA08       | unknown protein                         | extracellular              | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 4.163454419                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT1G54000 | BGLU18       | beta glucosidase 18, Symbols: BGL1...   | peroxisome                 | cytosol              |              | yes               | 1.094831807              | 0.59148528              |                         |                         |                              |                              |                              |                             |
| AT1G55490 | CPN61        | chaperonin 60 beta, Symbols: CPN60...   | nucleus                    | cytosol              | yes          | yes               |                          |                         |                         |                         | 5.217423032                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT1G56110 | Q9SGT7       | homolog of nuclear protein NCP56...     | nucleus                    | cytosol              |              | yes               | 1.050206365              | 0.59148528              |                         |                         | 1.502957007                  | 0.515723407                  |                              |                             |
| AT1G56190 | DRP2B        | dynammin-like 3, Symbols: ADL3, CF1...  | plasma membrane            | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 2.312118223                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT1G65930 | ICDH         | cytosolic NADP+-dependent isocitra...   | cytosol                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 2.087133396                  | 0.40118997                   |                              |                             |
| AT1G67990 | RPS1A        | ribulose biphosphate carboxylase        | plastid                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 3.24652489                   | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT1G68560 | XYL1         | alpha-xylidase 1, Symbols: ATXYL...     | extracellular              | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.281148564                  | 0.464799488                  |                              |                             |
| AT1G71695 | PER12        | Peroxidase superfamily protein          | extracellular              | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.196867731                  | 0.50093794                   |                              |                             |
| AT1G75930 | EXL6         | extracellular lipase 6, Symbols: EXL... | extracellular              | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.968222554                  | 0.428169233                  | 1.966833136                  | 0.607029405                 |
| AT1G78300 | 14332        | general regulator factor 2, Symb...     | cytosol                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 4.273884558                  | 0.389826471                  | 1.874469118                  | 0.607029405                 |
| AT1G80070 | RPR8A        | Pre-mRNA processing splicing facto...   | nucleus                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 4.817423727                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT2G07560 | PMA6         | H(+)-ATPase 6, Symbols: AHG6, HAG       | plasma membrane            | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 2.743701846                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT2G07680 | Q27G18       | ATPase, F1 complex, alpha subunit ...   | plastid                    | mitochondrion        |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.262907569                  | 0.516605556                  | 1.245756414                  | 0.718311653                 |
| AT2G21330 | ALFC1        | fructose-biphosphate aldolase 1, ...    | plastid                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 4.57117612                   | 0.389826471                  | 1.874469118                  | 0.607029405                 |
| AT2G28000 | CPN61        | chaperonin-60alpha, Symbols: CPN60...   | cytosol                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 2.81972752                   | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT2G29790 | QBL09        | Pathogenesis-related thaumatin sup...   | extracellular              | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 5.164258341                  | 0.389826471                  | 2.662965013                  | 0.607029405                 |
| AT2G33340 | PR13B        | MDM4-associated complex 8b, Symb...     | cytosol                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.862614874                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT2G36530 | ENO2         | Enolase, Symbols: LOS2, ENO2            | cytosol                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 5.707883723                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT2G39330 | JAL23        | jacalin-related lectin 23, Symbols...   | cytosol                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 2.500733605                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT3G01280 | VDAC1        | voltage dependent anion channel 1, ...  | mitochondrion              | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 4.04113296                   | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT3G09820 | ADK1         | adenosine kinase 1, Symbols: ADK1...    | cytosol                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 4.74193825                   | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT3G09840 | CD8A         | cell division cycle 8b, Symbols: C...   | cytosol                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.053848176                  | 0.613202114                  |                              |                             |
| AT3G11630 | BAS1A        | Thioredoxin superfamily protein         | plastid                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 4.267142152                  | 0.389826471                  | 1.874469118                  | 0.607029405                 |
| AT3G12145 | FLOR1        | Leucine-rich repeat (LRR) family p...   | extracellular              | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 2.423903652                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT3G12780 | PGKH1        | phosphoglycerate kinase 1, Symbols...   | plastid                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.825223187                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT3G13930 | DDP22        | Dihydrolipoyamide acetyltransferase...  | mitochondrion              | cytosol              | yes          | yes               | 2.180420167              | 0.344601891             | 2.429205593             | 0.03777339              | 7.590259789                  | 0.867970356                  |                              |                             |
| AT3G14310 | PMK3         | pectin methylesterase 3, Symbols: ...   | extracellular              | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.171508698                  | 0.571308985                  |                              |                             |
| AT3G15730 | PLDA1        | phospholipase D alpha 1, Symbols: ...   | cytosol                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.761907952                  | 0.389826471                  | 1.230075658                  | 0.607029405                 |
| AT3G18035 | QBLK7        | winged-helix DNA-binding transcrip...   | nucleus                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 3.908268247                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT3G18080 | BGLU44       | B-5 glucosidase 44, Symbols: BGLU44     | extracellular              | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.565992561                  | 0.433987501                  |                              |                             |
| AT3G19760 | RH2          | ukaryotic initiation factor 4A-II...    | nucleus                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 4.273884558                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT3G20820 | QBLT9        | Leucine-rich repeat (LRR) family pr...  | extracellular              | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.142767498                  | 0.526417478                  |                              |                             |
| AT3G26650 | G3PA1        | glyceroldehyde 3-phosphate dehydro...   | plastid                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 2.087133396                  | 0.40118997                   |                              |                             |
| AT3G28790 | QBLH5        | Protein of unknown function (DUF1216)   | extracellular              | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.509676197                  | 0.503894128                  | 1.424497829                  | 0.692174214                 |
| AT3G45140 | LOX2         | lipoygenase 2, Symbols: LOX2, ATLOX...  | plastid                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 1.380439964                  | 0.441567035                  |                              |                             |
| AT3G47470 | CA4          | light-harvesting chlorophyll-prote...   | plastid                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 4.157789752                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT3G47800 | QBS13        | Galactose mutarotase-like superfam...   | extracellular              | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 2.486391496                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT3G52150 | PSRP2        | RNA-binding (RRM/RBD/RNP motifs) f...   | plastid                    | cytosol              |              | yes               |                          |                         |                         |                         | 4.376927694                  | 0.389826471                  |                              |                             |
| AT3G52300 | ATPSH        | ATP synthase D chain, mitochondria...   | mitochondrion              | cytosol              | </           |                   |                          |                         |                         |                         |                              |                              |                              |                             |

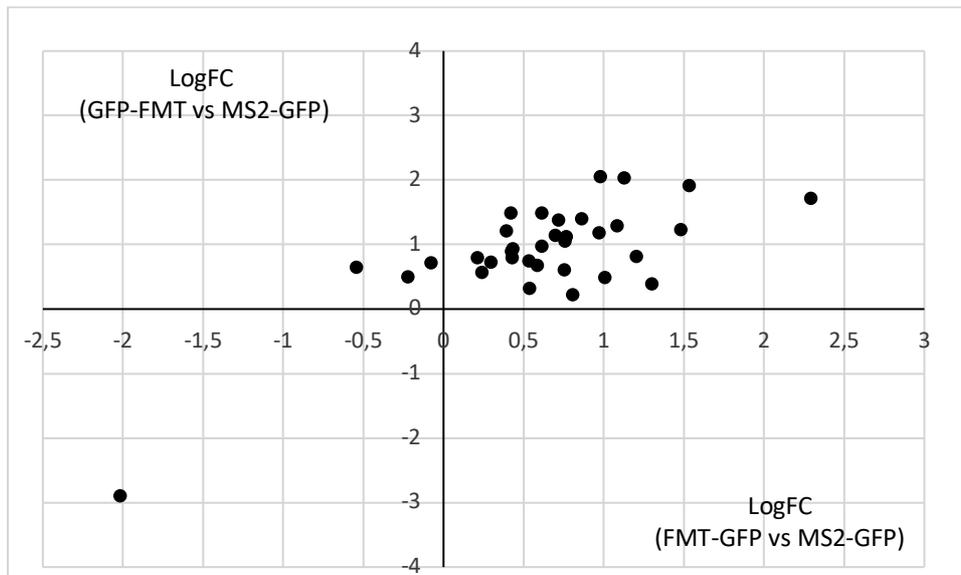


| AGI       | Description                           | Gene names | Seedlings FMT-<br>GFP LogFC | Seedling FMT-<br>GFP adj-p | Seedling GFP-<br>FMT LogFC | Seedling GFP-<br>FMT adj-p | Inflorescence<br>FMT-GFP LogFC | Inflorescence<br>FMT-GFP adj-p | Inflorescence<br>GFP-FMT LogFC | Inflorescence<br>GFP-FMT adj-p |
|-----------|---------------------------------------|------------|-----------------------------|----------------------------|----------------------------|----------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|--------------------------------|
| AT1G23410 | Ribosomal protein S27a / Ubiquitin... | RPS27AA    | -2.018339156                | 0.356637615                | -2.89530389                | 2.58702E-05                |                                |                                |                                |                                |
| AT1G43170 | ribosomal protein 1, Symbols: ARP1... | ARP1       | -0.54282286                 | 0.731519635                | 0.649323727                | 0.44240874                 | 1.252670194                    | 0.489070438                    | -1.966833136                   | 0.607029405                    |
| AT3G15150 | Ribosomal protein S11 family protein  | RPS14B     | -0.223784082                | 0.941466934                | 0.502968807                | 0.485227161                |                                |                                |                                |                                |
| AT3G48930 | Nucleic acid-binding, OB-fold-like... | RPS11A     | -0.076423858                | 0.959295545                | 0.719506065                | 0.44240874                 |                                |                                |                                |                                |
| AT2G17360 | Ribosomal protein S4 (RPS4A) famil... | RPS4A      | 0.210598717                 | 0.953569391                | 0.793127782                | 0.44240874                 |                                |                                |                                |                                |
| AT1G04270 | cytosolic ribosomal protein S15, S... | RPS15A     | 0.24140547                  | 0.922769908                | 0.569898918                | 0.500750539                |                                |                                |                                |                                |
| AT1G72370 | 40s ribosomal protein S4, Symbols:... | RPS4A      | 0.294672084                 | 0.889349237                | 0.73046162                 | 0.44240874                 | 1.983626466                    | 0.389826471                    | 1.095535674                    | 0.76760394                     |
| AT1G02780 | Ribosomal protein L19e family prot... | RPL19A     | 0.392913457                 | 0.859176198                | 1.210106606                | 0.430472755                |                                |                                |                                |                                |
| AT4G31700 | ribosomal protein S6, Symbols: RPS... | RPS6A      | 0.421889873                 | 0.867483185                | 1.493505902                | 0.362053569                | 1.780165448                    | 0.430031466                    | -8.00857E-17                   | 1                              |
| AT2G41840 | Ribosomal protein S5 family protein   | RPS2C      | 0.423193799                 | 0.813614419                | 0.897358128                | 0.439831251                |                                |                                |                                |                                |
| AT3G53890 | Ribosomal protein S21e                | RPS21B     | 0.426840632                 | 0.853785904                | 0.798613714                | 0.44240874                 |                                |                                |                                |                                |
| AT3G09630 | Ribosomal protein L4/L1 family        | RPL4A      | 0.430791946                 | 0.801864856                | 0.937241531                | 0.439831251                |                                |                                |                                |                                |
| AT5G27700 | Ribosomal protein S21e                | RPS21C     | 0.534178123                 | 0.753139628                | 0.743860203                | 0.44240874                 |                                |                                |                                |                                |
| AT2G34480 | Ribosomal protein L18ae/LX family ... | RPL18AB    | 0.534669455                 | 0.731157513                | 0.322245701                | 0.720736951                | 1.842122802                    | 0.454712002                    | -1.874469118                   | 0.607029405                    |
| AT5G15200 | Ribosomal protein S4                  | RPS9B      | 0.586858095                 | 0.698138135                | 0.679657248                | 0.44240874                 | 4.65801273                     | 0.389826471                    |                                |                                |
| AT1G58380 | Ribosomal protein S5 family protei... | RPS2A      | 0.614150641                 | 0.760133609                | 1.486713465                | 0.367790682                |                                |                                |                                |                                |
| AT3G09200 | Ribosomal protein L10 family protein  | RPP0B      | 0.614289619                 | 0.756212464                | 0.977429488                | 0.44240874                 | 4.817423727                    | 0.389826471                    |                                |                                |
| AT3G49010 | breast basic conserved 1, Symbols:... | RPL13B     | 0.696107247                 | 0.656254397                | 1.141652431                | 0.430472755                | 1.093879631                    | 0.599305173                    | -1.295455884                   | 0.76760394                     |
| AT2G18020 | Ribosomal protein L2 family, Symbo... | RPL8A      | 0.716313581                 | 0.593851472                | 1.385601169                | 0.321128579                |                                |                                |                                |                                |
| AT3G53430 | Ribosomal protein L11 family protein  | RPL12B     | 0.753629277                 | 0.59148528                 | 0.607955286                | 0.51233745                 |                                |                                |                                |                                |
| AT5G20290 | Ribosomal protein S8e family protein  | RPS8A      | 0.757258708                 | 0.59148528                 | 1.057896909                | 0.439831251                | 2.4866697                      | 0.389826471                    | 0                              | 1                              |
| AT1G04480 | Ribosomal ...                         | RPL23A     | 0.76579933                  | 0.656254397                | 1.123603914                | 0.439831251                |                                |                                |                                |                                |
| AT2G16160 | Ribosomal protein S3 family protein   | RPS3A      | 0.806471079                 | 0.643240718                | 0.225240722                | 0.861176456                |                                |                                |                                |                                |
| AT3G05590 | ribosomal protein L18, Symbols: RPL18 | RPL18B     | 0.862797896                 | 0.646531252                | 1.396354298                | 0.430472755                |                                |                                |                                |                                |
| AT1G18540 | Ribosomal protein L6 family protein   | RPL6A      | 0.968644986                 | 0.59148528                 | 1.183684352                | 0.430472755                |                                |                                |                                |                                |
| AT5G10360 | Ribosomal protein S6e, Symbols: EM... | RPS6B      | 0.979700708                 | 0.623081197                | 2.049082713                | 0.192606428                |                                |                                |                                |                                |
| AT5G39740 | ribosomal protein L5 B, Symbols: O... | RPL5B      | 1.008538956                 | 0.59148528                 | 0.48750462                 | 0.663728702                |                                |                                |                                |                                |
| AT1G22780 | Ribosomal ...                         | RPS18      | 1.083455263                 | 0.59148528                 | 1.29024355                 | 0.350298466                | 0.595459931                    | 0.766188359                    | -1.178337241                   | 0.768716432                    |
| AT1G33120 | Ribosomal protein L6 f...             | RPL9B      | 1.12540058                  | 0.600587023                | 2.038082048                | 0.273520194                | 3.142098461                    | 0.389826471                    | 0.788495895                    | 0.907168035                    |
| AT2G27710 | 60S acidic ribosomal protein family   | RPP2B      | 1.20151069                  | 0.59148528                 | 0.811767379                | 0.44240874                 |                                |                                |                                |                                |
| AT4G00100 | ribosomal protein S13A, Symbols: A... | RPS13B     | 1.29838142                  | 0.59148528                 | 0.394252762                | 0.781781874                |                                |                                |                                |                                |
| AT3G11940 | ribosomal protein 5A, Symbols: ATR... | RPS5B      | 1.480651954                 | 0.59148528                 | 1.230034365                | 0.44240874                 |                                |                                |                                |                                |
| AT3G04840 | Ribosomal protein S3Ae                | RPS3AA     | 1.531825509                 | 0.59148528                 | 1.914123745                | 0.354083398                |                                |                                |                                |                                |
| AT2G37270 | ribosomal protein 5B, Symbols: ATR... | RPS5A      | 2.291117033                 | 0.430436224                | 1.718474806                | 0.430472755                |                                |                                |                                |                                |
| AT2G17360 | Ribosomal protein S4 (RPS4A) famil... | RPS4A      |                             |                            |                            |                            | 5.20563505                     | 0.389826471                    |                                |                                |
| AT1G15930 | Ribosomal protein L7Ae/L30e/S12e/G... | RPS12A     |                             |                            |                            |                            | 4.65653859                     | 0.389826471                    |                                |                                |
| AT5G27850 | Ribosomal protein L18e/L15 superfa... | RPL18C     |                             |                            |                            |                            | 4.376927694                    | 0.389826471                    | 1.874469118                    | 0.607029405                    |
| AT2G19730 | Ribosomal L28e protein family         | RPL28A     |                             |                            |                            |                            | 4.273884558                    | 0.389826471                    |                                |                                |
| AT2G01250 | Ribosomal protein L30/L7 family pr... | RPL7B      |                             |                            |                            |                            | 4.047609                       | 0.389826471                    | 2.662965013                    | 0.607029405                    |
| AT1G18080 | Transducin/WD40 repeat-like superf... | RACK1A     |                             |                            |                            |                            | 2.409294071                    | 0.389826471                    | -1.874469118                   | 0.607029405                    |

**Table S3: Ribosomal proteins in FMT coIP from total extracts**

According to (Salih et al., 2020), 40 proteins from the cytosolic ribosome were identified in FMT coIP, 34 from seedlings extracts and 16 from inflorescences extracts. Most of them were enriched in FMT coIP eluates compared to control.

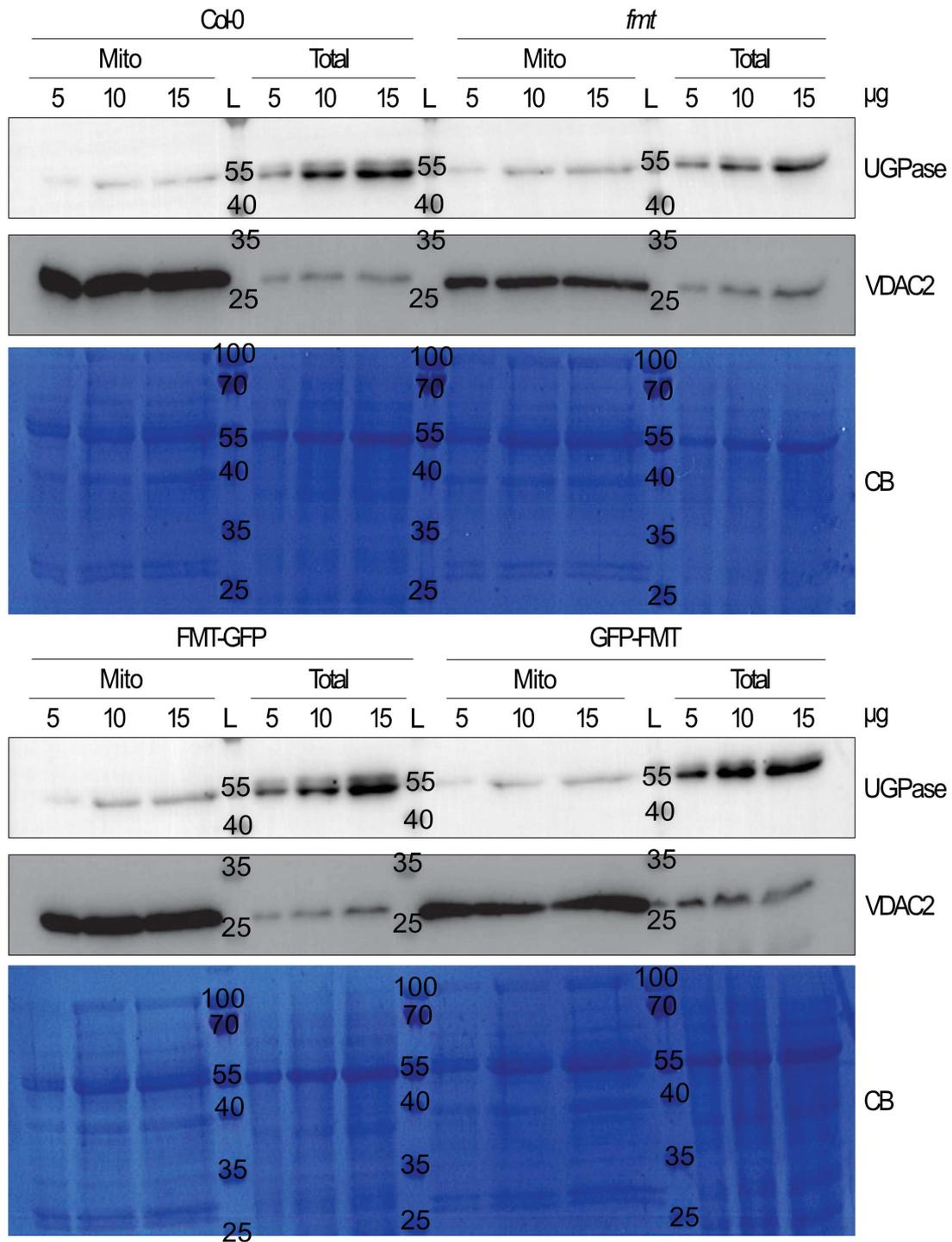




**Fig. S3: Ribosomal proteins identified in colP from seedlings total extracts**

34 ribosomal proteins were determined seedlings colP. The fold change in FMT-GFP colP compared to MS2-GFP one is shown in x-axis (LogFC (FMT-GFP vs MS2-GFP)), and the fold change in GFP-FMT compared to MS2-GFP is shown in y-axis (LogFC (GFP-FMT vs MS2-GFP)). Most ribosomal proteins have a positive LogFC with both constructs.



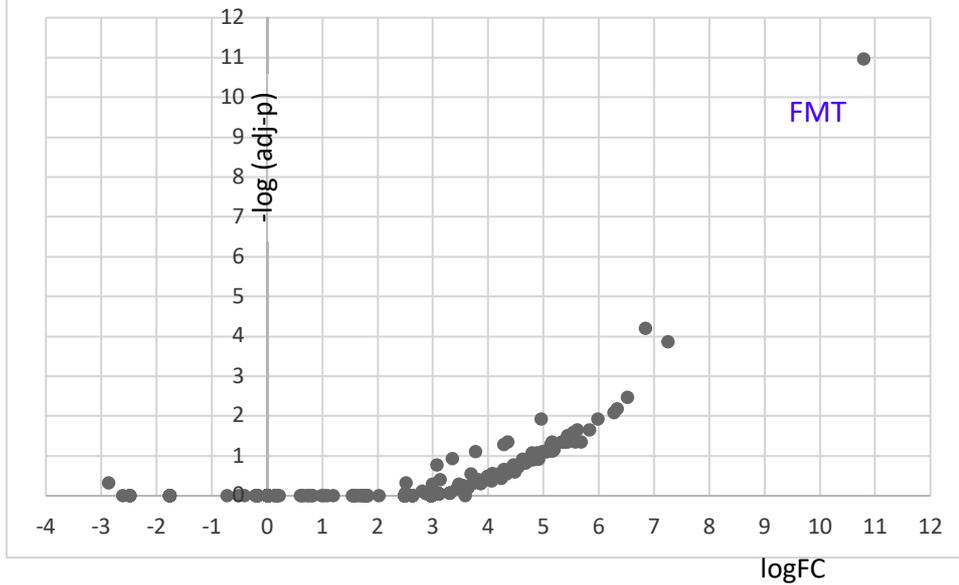


**Fig. S4: Quality control of mitochondrial preparation.**

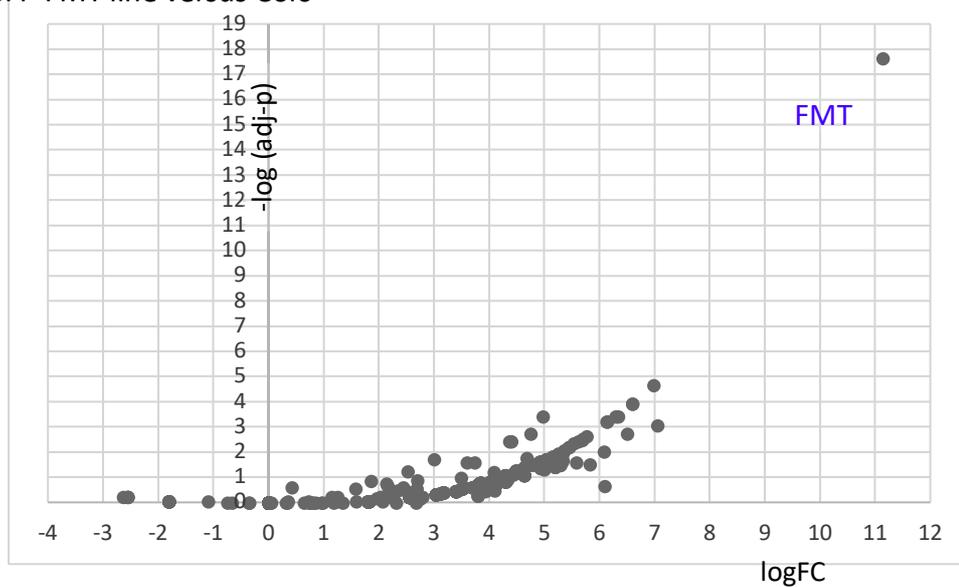
Western blots with *A. thaliana* inflorescences protein extracts. For each line (*Col-0*, *fmt*, GFP-FMT and FMT-GFP), 5, 10 or 15 µg of total and mitochondrial protein extracts were loaded. Immunodetections were performed with antibodies against UGPase (cytosolic protein), VDAC (mitochondrial protein). CB Coomassie Blue staining of the membrane.



A-FMT-GFP line versus Col0



B- GFP-FMT line versus Col0



**Fig. S5: Volcano plots of colIP with inflorescence mitochondrial extracts**

Proteins from IP eluates were analyzed by MS/MS, and spectral count label-free quantifications were performed (FMT constructs compared to Col0). The adjusted p-value is presented on y-axis (-log (adj-p)), and the fold change on x-axis (logFC). **A-** FMT-GFP line versus Col0. **B-** GFP-FMT line versus Col0.

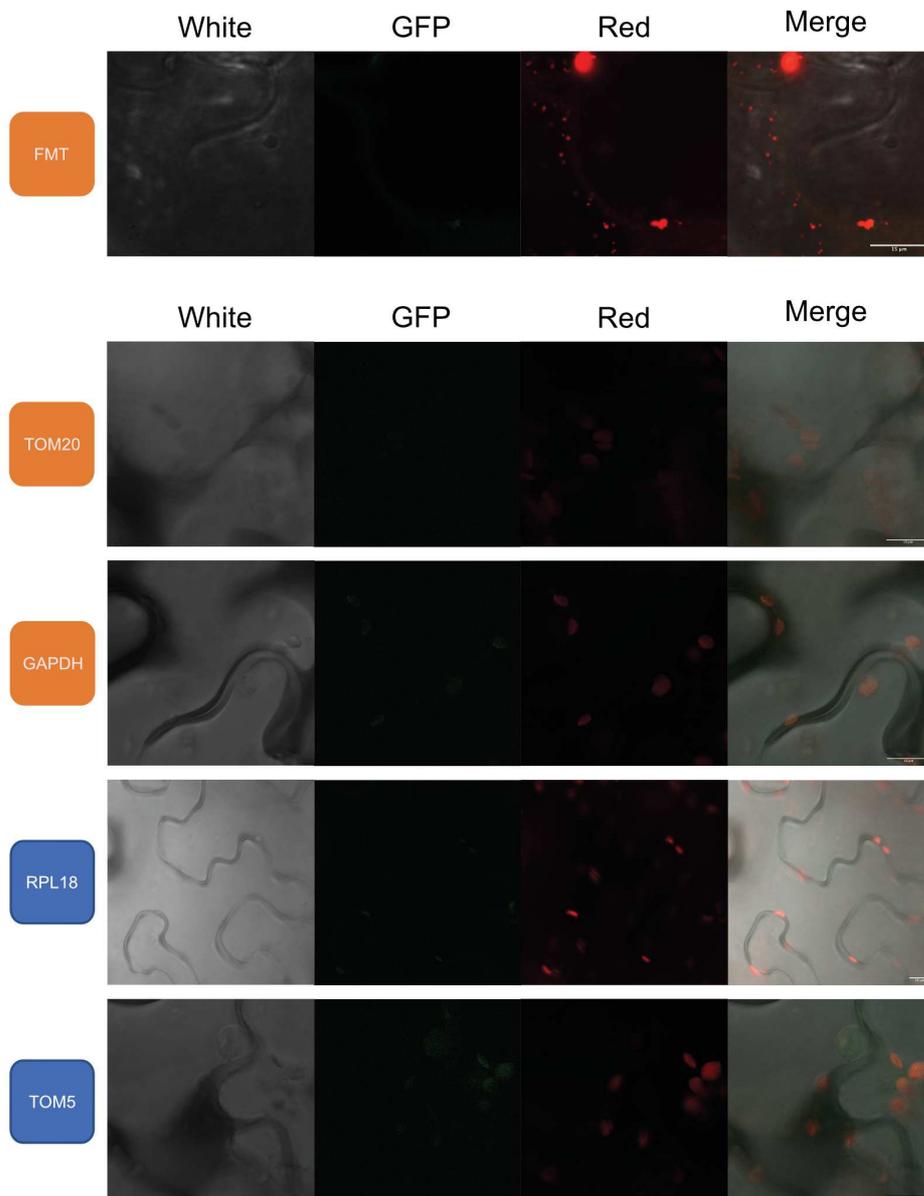


| AGI       | Description                            | cytoRib Salih 2019 | Gene names  | localization (SUBA4)    | other        | FMT-GFP LogFC | FMT-GFP adjp | GFP-FMT LogFC | GFP-FMT adjp |
|-----------|--|--------------------|-------------|-------------------------|--------------|---------------|--------------|---------------|--------------|
| AT3G52140 | tetratricopeptide repeat (TPR)-con...  |                    | FMT         | cytosol                 |              | 10.7908915    | 2.08832E-43  | 11.1401907    | 5.93841E-05  |
| AT3G49010 | breast basic conserved 1, Symbols:...  | eL13               | RPL13B      | cytosol                 |              | 5.61470984    | 0.064947623  | 5.15650449    | 0.006850609  |
| AT5G27850 | Ribosomal protein L18e/L15 superfa...  | eL18               | RPL18C      | cytosol                 |              | 5.357552      | 0.079889439  | 5.04439412    | 0.006116719  |
| AT1G02780 | Ribosomal protein L19e family prot...  | eL19               | RPL19A      | cytosol                 |              | 4.92283214    | 0.152344085  | 4.64385619    | 0.02064633   |
| AT2G34480 | Ribosomal protein L18ae/LX family ...  | eL20               | RPL18AB     | cytosol                 |              | 5.83289001    | 0.064040533  | 5.4484605     | 0.005628738  |
| AT2G19730 | Ribosomal L28e protein family          | eL28               | RPL28A      | cytosol                 |              | 4.79007693    | 0.197017215  | 5.15650449    | 0.005628738  |
| AT1G41880 | Ribosomal protein L35Ae family pro...  | eL33               | RPL35AB     | cytosol                 |              | 5.04439412    | 0.158465949  | 4.92283214    | 0.005628738  |
| AT1G18540 | Ribosomal protein L6 family protein    | eL6                | RPL6A       | cytosol                 |              | 4.79007693    | 0.197017215  | 4.08746284    | 0.057350188  |
| AT4G34670 | Ribosomal protein S3Ae                 | eS1                | RPS3AB      | cytosol                 |              | 4.48112669    | 0.252544389  | 4.64385619    | 0.040627739  |
| AT3G04840 | Ribosomal protein S3Ae                 | eS1                | RPS3AA      | cytosol                 |              | 4.08746284    | 0.290030348  | 4.64385619    | 0.008945153  |
| AT3G53890 | Ribosomal protein S21e                 | eS21               | RPS21B      | cytosol                 |              | 5.15650449    | 0.108683397  | 5.04439412    | 0.005628738  |
| AT5G27700 | Ribosomal protein S21e                 | eS21               | RPS21C      | cytosol                 |              | 4.48112669    | 0.241506263  | 4.64385619    | 0.006850609  |
| AT2G45710 | Zinc-binding ribosomal protein fam...  | eS27               | RPS27A      | cytosol                 |              | 5.53397857    | 0.065830816  | 4.48112669    | 0.014759112  |
| AT2G17360 | Ribosomal protein S4 (RPS4A) famil...  | eS4                | RPS4A       | cytosol                 |              | 6.55969574    | 0.006783537  | 6.29155445    | 0.005628738  |
| AT5G21380 | Ribosomal protein S6e, Symbols: EM...  | eS6                | RPS6B       | cytosol                 |              | 5.4484605     | 0.079889439  | 4.48112669    | 0.0061051    |
| AT4G31700 | ribosomal protein S6, Symbols: RPS...  | eS6                | RPS6A       | cytosol                 |              | 5.15650449    | 0.137329069  | 4.64385619    | 0.02064633   |
| AT5G20290 | Ribosomal protein S8e family protein   | eS8                | RPS8A       | cytosol,nucleus         |              | 5.53397857    | 0.079889439  | 4.92283214    | 0.005934353  |
| AT1G18080 | Transducin/WD40 repeat-like super...   | RACK1              | RACK1A      | cytosol                 |              | 5.61470984    | 0.067708331  | 5.26052755    | 0.005628738  |
| AT1G27530 | Ribosomal protein L1p/L10e family...   | uL1                | RPL10AB     | cytosol                 |              | 5.04439412    | 0.152979925  | 4.64385619    | 0.007370473  |
| AT1G08360 | Ribosomal protein L1p/L10e family      | uL1                | RPL10AA     | cytosol                 |              | 4.08746284    | 0.285137608  | 4.92283214    | 0.005628738  |
| AT3G09200 | Ribosomal protein L10 family protein   | uL10               | RPP0B       | cytosol                 |              | 6.38658105    | 0.014281087  | 6.13613669    | 0.005628738  |
| AT3G24830 | Ribosomal protein L13 family protein   | uL13               | RPL13AB     | cytosol                 |              | 4.79007693    | 0.197017215  | 4.08746284    | 0.069583475  |
| AT1G04480 | Ribosomal ...                          | uL14               | RPL23A      | cytosol,nucleus         |              | 5.26052755    | 0.116518536  | 4.79007693    | 0.006850609  |
| AT1G14320 | Ribosomal protein L16p/L10e family...  | uL16               | RPL10A      | cytosol                 |              | 4.64385619    | 0.212080095  | 4.92283214    | 0.005628738  |
| AT2G18020 | Ribosomal protein L2 family, Symbo...  | uL2                | RPL8A       | cytosol                 |              | 4.79007693    | 0.192300935  | 4.79007693    | 0.005628738  |
| AT2G39460 | ribosomal protein L23AA, Symbols: ...  | uL23               | RPL23AA     | cytosol                 |              | 5.26052755    | 0.108683397  | 5.357552      | 0.005628738  |
| AT1G43170 | ribosomal protein 1, Symbols: ARP1...  | uL3                | ARP1        | cytosol                 |              | 7.25738784    | 0.000193771  | 6.98109154    | 0.006385776  |
| AT5G02870 | Ribosomal protein L4/L1 family         | uL4                | RPL4D       | cytosol                 |              | 6.33985       | 0.015026578  | 6.59991284    | 0.006385776  |
| AT3G09630 | Ribosomal protein L4/L1 family         | uL4                | RPL4A       | cytosol                 |              | 5.89885328    | 0.051637782  | 5.76376565    | 0.005628738  |
| AT2G42740 | ribosomal protein large subunit 16...  | uL5                | RPL11A      | cytosol                 |              | 5.357552      | 0.079889439  | 3.54432052    | 0.312243311  |
| AT1G33120 | Ribosomal protein L6 f...              | uL6                | RPL9B       | cytosol                 |              | 6.85382935    | 0.001746826  | 6.59991284    | 0.006165229  |
| AT3G45030 | Ribosomal protein S10p...              | uS10               | RPS20A      | cytosol                 |              | 5.26052755    | 0.083649819  | 3.84130225    | 0.154383145  |
| AT1G22780 | Ribosomal ...                          | uS13               | RPS18A      | cytosol                 |              | 4.46538088    | 0.051815394  | 4.31535544    | 0.014875657  |
| AT3G48930 | Nucleic acid-binding, OB-fold-like...  | uS17               | RPS11A      | cytosol                 |              | 5.15650449    | 0.137329069  | 5.4484605     | 0.005628738  |
| AT1G72370 | 40s ribosomal protein SA, Symbols:...  | uS2                | RPSaA       | cytosol                 |              | 5.07584376    | 0.006340285  | 4.94570984    | 0.011203175  |
| AT5G15200 | Ribosomal protein S4                   | uS4                | RPS9B       | cytosol                 |              | 5.6911619     | 0.065830816  | 5.04439412    | 0.005628738  |
| AT2G41840 | Ribosomal protein S5 family protein    | uS5                | RPS2C       | cytosol                 |              | 5.4484605     | 0.074339192  | 4.64385619    | 0.007370473  |
| AT2G37270 | ribosomal protein S8, Symbols: ATR...  | uS7                | RPS5A       | cytosol                 |              | 4.48112669    | 0.241506263  | 5.6911619     | 0.005628738  |
| AT3G11940 | ribosomal protein SA, Symbols: ATR...  | uS7                | RPS5B       | cytosol                 |              | 1.75290714    | 0.442187461  | 2.5212369     | 0.021583809  |
| AT1G26630 | Eukaryotic translation initiation ...  |                    | ELF5A-2     | cytosol                 | translation  | 4.29768055    | 0.268161796  | 5.53397857    | 0.005628738  |
| AT1G56070 | Ribosomal protein S5/Elongation fa...  |                    | LOS1        | cytosol                 | translation  | 3.47317168    | 0.108683397  | 4.59442283    | 0.024840285  |
| AT5G67500 | voltage dependent anion channel 2,...  |                    | VDAC2       | mitochondrion           | OMM          | 4.08746284    | 0.280847608  | 5.357552      | 0.009773951  |
| AT5G46800 | Mitochondrial substrate carrier fa...  |                    | BOU         | mitochondrion           | IMM          | 3.05559233    | 0.079889439  | 3.43677102    | 0.120978868  |
| AT2G07698 | ATPase, F1 complex, alpha subunit ...  |                    |             | plastid,mitocho         | IMM          | 3.04836302    | 0.290030348  | 5.25137482    | 0.048469565  |
| AT4G01100 | adenine nucleotide transporter 1, ...  |                    | ADNT1       | mitochondrion           | IMM          | 3.169925      | 0.41333055   | 5.15650449    | 0.005628738  |
| AT5G14040 | phosphate transporter 3;1, Symbols:... |                    | MPT3        | mitochondrion           | IMM          | 3.02819689    | 0.197017215  | 2.78549549    | 0.058234597  |
| AT3G08580 | ADP/ATP carrier 1, Symbols: AAC1       |                    | AAC1        | mitochondrion           | IMM          | 0.75842484    | 0.442187461  | 1.63132909    | 0.097639439  |
| AT1G04985 | Triacylglycerol lipase-like protein    |                    | At1g04985 F | mitochondrion           |              | 4.08746284    | 0.280847608  | 4.64385619    | 0.006850609  |
| AT3G22330 | putative mitochondrial RNA helicase... |                    | RH53        | mitochondrion           |              | 4.36711687    | 0.064040533  | 4.41708533    | 0.015866712  |
| AT5G65720 | nitrogen fixation 5 (NIFS)-like 1,...  |                    | NIFS1       | mitochondrion           |              | 3.54432052    | 0.392931553  | 5.04439412    | 0.00674899   |
| AT4G02930 | GTP binding Elongation factor Tu f...  |                    | TUFA        | mitochondrion           |              | 2.69458699    | 0.280847608  | 3.4174084     | 0.083911253  |
| AT3G18780 | actin 2, Symbols: ACT2, DER1, LSR2...  |                    | ACT2        | cytosol                 | cytoskeleton | 3.54432052    | 0.392931553  | 4.92283214    | 0.005628738  |
| AT5G62690 | tubulin beta chain 2, ...              |                    |             | cytosol                 | cytoskeleton | 3.52685955    | 0.079889439  | 3.4174084     | 0.062541934  |
| AT1G04820 | tubulin alpha-4 chain,...              |                    |             | cytosol                 | cytoskeleton | 3.38605843    | 0.241506263  | 6.35950945    | 0.026395442  |
| AT1G20620 | catalase 3, Symbols: CAT3, SEN2, A...  |                    | CAT3        | peroxisome              |              | 3.36489813    | 0.034995536  | 2.94442265    | 0.091786616  |
| AT5G42080 | dynammin-like protein, Symbols: ADL... |                    | DRP1A       | plasma membrane         |              | 6.02236781    | 0.036535888  | 6.33985       | 0.005628738  |
| AT1G10290 | dynammin-like protein 6, Symbols: A... |                    | DRP2A       | golgi                   |              | 3.84130225    | 0.329462738  | 4.64385619    | 0.006850609  |
| AT5G48880 | peroxisomal 3-keto-acyl-CoA thiola...  |                    | KAT5        | peroxisome              |              | 3.169925      | 0.41333055   | 4.79007693    | 0.005628738  |
| AT2G36880 | methionine adenosyltransferase 3, ...  |                    | METK3       | cytosol                 |              | 4.29768055    | 0.268372165  | 5.6911619     | 0.005628738  |
| AT3G17390 | S-adenosylmethionine synthetase fa...  |                    | METK4       | nucleus,plasma membrane |              | 5.15650449    | 0.115404341  | 5.15650449    | 0.005628738  |
| AT1G24020 | MLP-like protein 423, Symbols: MLP423  |                    | MLP423      | golgi                   |              | 2.66296501    | 0.442187461  | 4.64385619    | 0.006850609  |
| AT2G39800 | delta1-pyrroline-5-carboxylate syn...  |                    | P5CSA       | peroxisome              |              | 4.64385619    | 0.212080095  | 4.08746284    | 0.057350188  |
| AT1G78570 | rhamnose biosynthesis 1, Symbols: ...  |                    | RHM1        | cytosol                 |              | 4.64385619    | 0.212080095  | 6.13613669    | 0.006037684  |
| AT4G13930 | serine hydroxymethyltransferase 4,...  |                    | SHM4        | cytosol                 |              | 4.92283214    | 0.184987537  | 5.61470984    | 0.005628738  |

**Table S4: Enriched proteins in FMT colP with mitochondrial extracts**

Ribosomal proteins are in blue and mitochondrial ones in green.





**Fig. S6: Controls for Split-GFP experiments.**

*N. benthamiana* leaves transiently expressing one protein fused with one part of GFP (orange, with GFP- $\beta$ 1-10; blue, with GFP- $\beta$ 11). White: Bright light; Green: GFP fluorescence; Red: chloroplast autofluorescence and mitochondrial pSU9-RFP fluorescence (first line) and chloroplast autofluorescence alone (other lines).



## 2.2. Conclusion et discussion sur FMT.

### 2.2.1. Inactivation de FMT et développement des plantes chez *Arabidopsis thaliana*.

Nous avons utilisé un mutant d'insertion de T-DNA SALK\_056717, dans lequel le gène FMT est inactivé, pour comprendre le rôle de la protéine FMT. Dans ce mutant *fmt*, nous observons un regroupement des mitochondries (étude de jeunes feuilles de 4 à 5 semaines). Ce regroupement est caractéristique des cellules ayant une inactivation des protéines CLU (Cox and Spradling, 2009; Fields et al., 1998; Gao et al., 2014; Logan et al., 2003; Zhu et al., 1997). De plus nous observons une altération de la croissance notamment au niveau des racines. Ce phénotype a également été mis en évidence lors de l'étude d'une lignée inactivée pour FMT par mutation chimique (El Zawily et al., 2014). L'effet de FMT sur la croissance de l'organisme semble limité à la croissance racinaire des plantules. En effet, dans notre mutant, il n'y a pas de différence de croissance au niveau des jeunes plantes, ni au niveau des plantes plus âgées (environ 2-3 mois). L'effet de l'absence de la protéine FMT a déjà été analysé dans une étude précédente (El Zawily et al., 2014). Dans celle-ci, on observait une diminution de la taille des racines et une diminution de la taille des jeunes plantes, avec des feuilles plus petites et plus rondes et une biomasse réduite dans les 21 premiers jours de culture (El Zawily et al., 2014). Nos résultats sont globalement cohérents avec cette étude, et montrent que l'absence de FMT impacte principalement les stades précoces de la croissance. Enfin, comme pour le phénotype, le protéome mitochondrial est lui aussi normal en absence de FMT dans les inflorescences, ce qui suggère une nouvelle fois un rôle de FMT limité à certains stades du développement. Il serait intéressant de savoir si l'organisation du réseau mitochondrial est elle aussi restaurée dans les inflorescences, ce qui confirmerait le rôle limité de FMT dans la biogenèse mitochondriale dans ces tissus ou ce stade de développement. Ce rôle limité des protéines CLU n'est pas une nouveauté car il a été montré que chez les mammifères, l'absence de CLUH aboutissait à la mort des souris à la naissance, probablement au moment du changement du mode de production d'énergie qui passe de la glycolyse anaérobie *in utero* à l'OXPPOS aérobie à la naissance. Par contre, l'inactivation de CLUH dans le foie de souris adultes (8 semaines) n'altère pas la viabilité de celles-ci (Schatton et al., 2017). Ces résultats suggèrent que, comme chez les plantes, l'impact des protéines CLU est principalement observé au niveau des stades précoces du développement.



La létalité observée chez la souris en absence de la protéine CLUH (Schatton et al., 2017) ne semble pas être observée chez les plantes. L'une des explications possibles pourrait être liée à l'existence d'un deuxième organite, le chloroplaste, chez les végétaux, qui est lui aussi capable de produire de l'énergie et qui pourrait, quand il y en a besoin, fournir de l'ATP aux cellules (Gardeström and Igamberdiev, 2016).

### **2.2.2. L'absence de la protéine FMT impacte les fonctions mitochondriales.**

Au niveau mitochondrial, l'absence de FMT ne semble pas impacter la quantité d'ADN mitochondrial ni l'expression des ARNm codés par le génome mitochondrial. L'analyse du protéome mitochondrial des plantes *fmt* et sauvage met en évidence une différence au niveau de certaines protéines mitochondriales dans les plantules. La plupart des protéines impactées par l'absence de FMT sont sous-exprimées et sont impliquées dans la traduction mitochondriale et dans l'OXPPOS. L'analyse de la respiration mitochondriale met en évidence une augmentation de l'AOX, signe d'un stress mitochondrial. L'ensemble de ces résultats montre donc une altération mitochondriale, en particulier une altération du protéome mitochondrial. Cette altération du protéome mitochondrial semble être limitée à certains tissus ou certains stades du développement puisqu'il y a très peu de différences entre lignées *fmt* et sauvages au niveau du protéome mitochondrial des inflorescences. Malgré une altération des protéines impliquées dans l'OXPPOS, seule une augmentation de l'activité de l'AOX est observée lors de l'analyse du fonctionnement de la chaîne respiratoire. Néanmoins, la méthode utilisée consiste à mesurer la consommation d'oxygène. Une fois encore, la présence du chloroplaste pourrait, malgré les précautions que nous avons prises (conservation des plantes à l'obscurité avant et pendant l'expérience), minimiser l'effet observé de FMT sur l'OXPPOS. Pour être sûre de l'effet de FMT sur la chaîne respiratoire, une solution serait de travailler sur des extraits de mitochondries purifiées. Lors de notre étude, nous avons suivi le fonctionnement de l'OXPPOS via le fonctionnement du complexe IV, grâce à l'utilisation de cyanure. L'analyse de la consommation d'oxygène sur des mitochondries purifiées permettrait également d'analyser le fonctionnement des autres complexes de l'OXPPOS, et notamment l'activité du complexe CI grâce à l'utilisation de roténone. En effet, l'analyse du protéome mitochondrial de plantule montre une sous-expression de sous-unités du complexe CI.



### **2.2.3. FMT a une localisation dynamique.**

Malgré l'effet de FMT sur les mitochondries, cette protéine est cytosolique avec une localisation diffuse et/ou ponctuelle. FMT est retrouvé de manière occasionnelle à la surface mitochondriale, par exemple dans les fractions mitochondriales d'inflorescences mais pas dans celles de plantules. Cela suggère une différence de localisation de la protéine en fonction du tissu ou du stade de développement. La localisation ponctuelle de FMT parfois associée à la mitochondrie a déjà été mise en évidence chez les plantes (El Zawily et al., 2014) mais aussi dans d'autres organismes pour les orthologues de FMT, par exemple chez la drosophile (Cox and Spradling, 2009; Sen et al., 2015; Sheard et al., 2020) et chez les mammifères (Gao et al., 2014; Vardi-Oknin and Arava, 2019). La différence de localisation de FMT entre les plantules et les inflorescences suggère que la localisation mitochondriale de FMT n'est pas liée au rôle de FMT sur la mitochondrie. En effet, dans les plantules où le protéome, l'AOX et le phénotype racinaire sont affectés, FMT n'est pas présente dans la fraction mitochondriale, alors qu'elle l'est dans les inflorescences qui ont un phénotype normal. Cela suggère que FMT, qu'elle soit cytosolique ou mitochondriale, n'est plus essentielle et/ou que sa fonction est compensée dans les inflorescences. Une autre hypothèse est que la localisation mitochondriale de FMT pourrait être liée à un phénomène de rétention. L'immobilisation de FMT à la mitochondrie pourrait servir à limiter sa fonction. Dans cette hypothèse de rétention, on pourrait supposer qu'il y a une différence de structure ou une différence de modifications post-traductionnelles entre les protéines FMT présentes à la surface mitochondriale et celles présentes dans le cytosol. En effet, l'acétylation des lysines 1022 et 1029 dans la protéine FMT a été montrée comme étant importante pour la fonction de cette protéine (El Zawily et al., 2014) (Voir INTRODUCTION paragraphe 3.4.2.2.). Il est possible que les protéines présentes à la surface mitochondriale ne possèdent pas ces modifications, ce qui impliquerait une forme inactive de la protéine FMT quand elle est à la surface mitochondriale.



#### **2.2.4. FMT est lié à la traduction à la surface mitochondriale.**

Pour comprendre la fonction de FMT, nous avons analysé les interactants de cette protéine. Cette analyse dans les plantules et dans les inflorescences met en évidence l'association de FMT avec le ribosome. Dans les inflorescences, les résultats sont significatifs et mettent en évidence l'association de FMT avec le ribosome à la surface mitochondriale. Ces résultats ont été confirmés par des co-IP réverses. De plus, des expériences de split-GFP montrent que l'interaction entre la mitochondrie et FMT et entre FMT et le ribosome est possible (expériences en modèle hétérologue : *Nicotiana benthamiana*). L'absence de significativité statistique des interactants de FMT dans les fractions totales de plantules et d'inflorescence suggère que soit FMT interagit de manière faible avec le ribosome, soit que seulement une fraction de FMT interagit avec le ribosome. Le fait qu'une fraction de FMT seulement interagisse avec le ribosome pourrait aussi expliquer pourquoi l'interaction de FMT avec le ribosome à la surface mitochondriale est significative. Dans cette hypothèse, on imagine que la fraction de FMT présente à la surface mitochondriale est similaire à la fraction de FMT interagissant avec le ribosome. Néanmoins, cela n'explique pas les résultats observés chez les plantules où FMT ne se retrouve pas à la surface mitochondriale. Dans la 2<sup>e</sup> hypothèse, où FMT n'interagirait que faiblement avec le ribosome, cela impliquerait que FMT n'a pas d'interactant fort. Cette deuxième hypothèse n'explique pas la formation occasionnelle de granules pour FMT, qui suggère qu'il y a bien des interactions impliquant FMT (hormis si FMT interagit principalement avec elle-même).

#### **2.2.5. FMT semble impliqué dans la localisation mitochondriale des MITO ARNm.**

Nous avons analysé le rôle de FMT dans la localisation mitochondriale des MITO ARNm. Chez *Arabidopsis thaliana*, seule la version longue du MITO ARNm VDAC3 est localisée à la surface mitochondriale (Michaud et al., 2014a). En absence de FMT, on observe une délocalisation de cet ARNm dans les plantules. Ce résultat suggère que FMT serait impliqué dans la localisation mitochondriale de certains MITO ARNm. Pour l'instant, nous ne savons pas si cet effet de FMT sur la localisation des MITO ARNm à la surface mitochondriale est un effet direct ou indirect. Les protéines CLU semblent être capables de lier les ARNm et principalement les MITO ARNm (Gao et al., 2014; Sen and Cox, 2016). Pour aller plus loin dans la compréhension du rôle de FMT dans la localisation des MITO ARNm, il faudrait déterminer



si FMT est capable de lier les ARNm, et quels ARNm, grâce à des expériences de RIP. Par la suite, l'analyse de la localisation des ARNm spécifiquement liés à FMT pourrait nous permettre de comprendre de manière précise le rôle de FMT dans la localisation des MITO ARNm.

La délocalisation de MITO ARNm pourrait expliquer l'altération du protéome mitochondrial et de l'organisation du réseau mitochondrial en absence de FMT, c'est à dire à une altération globale de la biogenèse mitochondriale. D'après nos résultats, bien qu'impliqué dans la localisation mitochondriale de la version longue de VDAC3, FMT n'est pas localisé à la surface mitochondriale dans les plantules. Ce résultat exclut FMT dans le rôle de protéine d'accrochage des ARNm à la surface mitochondriale. Il n'est pas exclu que FMT puisse permettre la reconnaissance spécifique de certains MITO ARNm par une protéine permettant leur localisation à la surface mitochondriale. Il est possible que cette régulation ait lieu lors de la traduction puisque l'on retrouve FMT associé faiblement avec le ribosome dans les extraits totaux de plantules.

#### **2.2.6. Conclusion.**

En conclusion, nous avons mis en évidence une différence de fonction de FMT en fonction du stade de développement, avec un rôle plus prononcé de cette protéine dans les plantules où son absence affecte l'organisation du réseau mitochondrial, le protéome mitochondrial, la croissance racinaire et la localisation mitochondriale de la version longue du MITO ARNm VDAC3. Dans les inflorescences, malgré l'absence d'effet de FMT sur le protéome mitochondrial et sur le phénotype, nous retrouvons néanmoins une association significative de FMT avec la surface mitochondriale et avec le ribosome.

Enfin, d'après la bibliographie, FMT serait impliqué dans la mitophagie grâce à son association avec ATG8. En présence de mitochondries défectueuses, FMT serait localisé à la surface mitochondriale (Ma et al., 2020). Ce rôle dans la mitophagie n'est pas exclu dans notre étude, comme pour le complexe protéique LARP-MDI chez la drosophile (Zhang et al., 2016, 2019) (voir INTRODUCTION paragraphe 2.2.2.2.). FMT pourrait être impliqué dans la régulation des MITO ARNm et, dans le cas de dysfonction mitochondriale, servir de senseur de la mitophagie suite à l'altération de son rôle dans la régulation de ces MITO ARNm. Dans notre cas, cela pourrait suggérer qu'il y a plus de mitochondries défectueuses dans les



inflorescences, ce qui expliquerait la localisation de FMT à la surface mitochondriale. Cependant l'analyse du protéome mitochondrial d'inflorescences sauvages ne va pas dans ce sens, puisque les protéines indicatrices de stress comme l'AOX ou les NADH-déshydrogénases alternatives NDA2 et NDB2 n'apparaissent pas induites (Van Aken et al., 2009).



## DISCUSSION FINALE



Durant ma thèse j'ai cherché à comprendre le rôle des protéines CLU chez les mammifères et chez les plantes.

Pour cela, j'ai analysé des lignées inactivées pour les gènes codant pour les protéines CLU dans des cellules de mammifères (CLUH dans HCT 116 humaines et mCLUH dans mES-E14 de souris obtenues par CRISPR-Cas9) et chez *Arabidopsis thaliana* (FRIENDY ou FMT obtenu par insertion d'un T-DNA dans un fond génétique Col0). L'inactivation des protéines CLU aboutit à la formation de regroupement de mitochondries dans les différents organismes étudiés. Ce regroupement des mitochondries est caractéristique de l'inactivation des protéines de la famille CLU (Clueless chez la drosophile (Cox and Spradling, 2009), Clu1p chez la levure (Fields et al., 1998), CLUH chez les mammifères (Gao et al., 2014), FMT chez les plantes (Logan et al., 2003) et CluA chez les amibes (Zhu et al., 1997)) et permet la validation de l'inactivation dans les cellules de mammifères et chez les plantes. L'inactivation des protéines CLU met également en évidence une altération des fonctions mitochondriales. En effet, on observe une augmentation de la production d'ATP en absence de CLUH dans les cellules HCT116 ainsi qu'une augmentation de l'AOX (caractéristique d'un stress mitochondrial) et une altération du protéome mitochondrial (baisse de l'expression des protéines impliquées dans l'OXPPOS et le mitoribosome) dans des plantules d'*Arabidopsis thaliana* en absence de FMT. De plus l'absence des protéines CLU semble impacter les différents organismes analysés avec une baisse de la croissance cellulaire en absence de CLUH dans les cellules humaines HCT 116 et une altération de la croissance racinaire en absence de FMT chez *Arabidopsis thaliana*. L'ensemble de ces résultats suggère un rôle des protéines CLU important pour la fonction mitochondriale et la cellule.

Pour comprendre la fonction des protéines CLU dans ces différents organismes, nous avons réalisé des Co-IP et des BioID sur des cellules de mammifères et des Co-IP chez *Arabidopsis thaliana*. Chez les mammifères, l'analyse des interactants de CLUH par Co-IP met en évidence son interaction avec les protéines SPAG5 et KNSTRN, deux protéines formant un complexe et impliquées dans la formation des granules de stress (Thedieck et al., 2013). De plus, l'analyse des interactants faibles et/ou transitoires de CLUH par BioID met en évidence une proximité de cette protéine avec des protéines mitochondriales ainsi qu'avec des protéines impliquées dans la traduction cytosolique. Ces résultats suggèrent que CLUH pourrait être impliqué dans la régulation de la traduction des protéines mitochondriales. Chez



*Arabidopsis thaliana*, des co-IP réalisées sur des extraits totaux de plantules et d'inflorescences ne montrent pas d'interactants forts associés à FMT (résultats peu ou pas significatifs). Néanmoins, il semble y avoir un enrichissement des protéines impliquées dans la traduction cytosolique associée à FMT. De plus l'analyse des interactants de FMT dans une fraction mitochondriale isolée à partir d'inflorescences met en évidence une association significative de FMT avec les protéines impliquées dans la traduction cytosolique. Ces résultats ont été confirmés par une Co-IP réverse en utilisant la sous unité du ribosome RPL18. L'ensemble de ces résultats suggère que FMT serait aussi impliqué dans la régulation de la traduction et plus particulièrement au niveau de la surface mitochondriale ce qui laisse supposer que cette protéine pourrait être elle aussi impliquée dans la régulation de la traduction des protéines mitochondriales.

D'après nos résultats, la localisation des protéines CLU est variable entre les organismes et entre les tissus. En effet, CLUH n'est pas retrouvé dans la fraction mitochondriale dans les cellules HCT 116. Dans ce modèle, CLUH a une localisation diffuse dans le cytosol. Chez les plantes, FMT semble être elle aussi cytosolique bien que formant occasionnellement des particules parfois trouvées à proximité des mitochondries. La localisation de FMT dans les fractions mitochondriales de plantules et d'inflorescences met en évidence une localisation dans la fraction mitochondriale dans les inflorescences seulement. Cette différence de localisation ne s'explique pas par une différence d'expression qui semble être similaire entre plantules et inflorescences. Ces résultats suggèrent que CLU est une protéine mobile. Cette dynamique de localisation pourrait être liée aux tissus ou cellules analysés ainsi qu'aux conditions de cultures. Chez les plantes, la localisation mitochondriale de FMT et son association avec le ribosome cytosolique dans les inflorescences est surprenante puisque l'absence de FMT n'a pas d'effet dans ces tissus (que ce soit au niveau du phénotype ou du protéome mitochondrial). Néanmoins, cela pourrait être possible dans le cas d'une fonction de rétention de la protéine FMT quand elle se trouve à la surface mitochondriale.

Nous avons analysé le rôle de CLUH dans la régulation de la traduction dans les cellules de mammifères et plus particulièrement les cellules humaines HCT 116. Dans ce modèle, on observe une baisse de l'expression de certains MITO ARNm codant pour les protéines mitochondriales trouvées à proximité de CLUH en BioID. Ces MITO ARNm ont la particularité



d'être associés à CLUH qui a une fonction de liaison aux ARNm et plus particulièrement aux MITO ARNm (Gao et al., 2014). L'analyse de la stabilité et de l'association de ces MITO ARNm avec la fraction polysomale dans des extraits totaux ne montre pas d'effet de CLUH. De la même manière, nous n'observons pas d'effet de CLUH sur l'expression de ces différentes protéines mitochondriales. Ces résultats suggèrent que CLUH n'est pas impliqué dans la stabilité et la traduction de ces MITO ARNm. Néanmoins, l'analyse de l'association de ces ARNm avec la fraction mitochondriale et de leur traduction dans la fraction mitochondriale montre une augmentation de celles-ci (association et traduction) en absence de CLUH. Ces résultats suggèrent que CLUH pourrait être impliqué dans la rétention de ces MITO ARNm ce qui permettrait ainsi la régulation de leur traduction à la surface mitochondriale. Chez *Arabidopsis thaliana*, nos résultats semblent être différents. Nous avons testé l'effet de FMT sur l'expression et la localisation mitochondriale de l'ARNm VDAC3 existant sous deux formes (courte et longue) dont seule l'une (la version longue) est connue pour être localisée à la surface mitochondriale chez cet organisme (Michaud et al., 2014a). Pour ces deux versions de l'ARNm VDAC3, nous n'observons pas d'effet de FMT sur leur expression cependant, pour la version longue de l'ARNm VDAC3, nous observons une baisse de sa localisation mitochondriale. Ces résultats suggèrent que FMT serait lui aussi impliqué dans la localisation mitochondriale de certains MITO ARNm dont la version longue de VDAC3. Cette différence de comportement entre les MITO ARNm dans les cellules humaines et chez *Arabidopsis thaliana* peut être liée aux MITO ARNm testés. En effet, nous ne pouvons pas exclure que la différence d'adressage de ces MITO ARNm à la surface mitochondriale chez ces deux organismes soit liée à une fonction des protéines CLU différentes en fonction des ARNm testés ou à une fonction de CLU sur la localisation des MITO ARNm à la surface mitochondriale différente entre mammifères et plantes. Les MITO ARNm que nous avons analysés dans les cellules HCT116 ont été testés car ils sont associés à la surface mitochondriale de manière dépendante de la traduction (Fazal et al., 2019) mais aussi car ils sont associés à CLUH (Gao et al., 2014) et que les protéines correspondantes sont trouvées à proximité de CLUH (BioID). Chez les plantes nous avons choisi le MITO ARNm VDAC3 car c'est le seul MITO ARNm bien connu à la surface mitochondriale chez *Arabidopsis thaliana* (Michaud et al., 2014a). De plus, l'un des MITO ARNm testé chez les cellules HCT 116, *ALDH18A1* ne montre ni association à la fraction mitochondriale ni traduction à la surface mitochondriale augmentée en absence de CLUH, alors que cet ARNm est adressé à la surface mitochondriale, associé à CLUH et dont la protéine



correspondante est trouvée à proximité de CLUH comme les autres MITO ARNm analysés. L'absence d'effet de CLUH sur l'association et la traduction mitochondriale de l'ARNm ALDH18A1 suggère que CLUH aurait des effets différents en fonction des ARNm testés. L'effet de CLUH étant variable entre les MITO ARNm, il est possible que cela soit le cas des protéines CLU de manière générale et que la baisse de la localisation mitochondriale de la version longue de VDAC3 ne concerne qu'une certaine partie des MITO ARNm présents à la surface mitochondriale.

En conclusion, durant ma thèse j'ai mis en évidence la fonction des protéines CLU dans la régulation de la traduction à la surface mitochondriale chez *Arabidopsis Thaliana* et chez les mammifères. Les protéines de la famille CLU semblent impliquées dans la même voie de régulation néanmoins la fonction de CLU dans cette régulation n'est pas encore déterminée. Mes résultats montrent une implication différente de cette protéine entre les organismes ce qui suggère une grande complexité de la fonction de CLU dans la régulation de la traduction des ARNm et plus particulièrement des MITO ARNm.

Pour comprendre cette complexité, il serait intéressant de faire des études globales des ARN présents à la surface mitochondriale chez les mammifères et chez les plantes. En réalisant ces études en présence ou en absence de CLU, nous pourrions voir l'influence de CLU sur l'adressage de chaque ARNm. D'après les résultats que nous avons obtenus, il est possible que l'analyse globale des ARNm présents dans la fraction mitochondriale par RNA-Seq mette en évidence différents groupes d'ARNm : certains ARNm qui auraient une augmentation de leur adressage en présence de CLU et d'autres qui auraient une baisse de leur adressage dans les mêmes conditions. De la même manière, étudier les ARNm associés à la fraction polysomale dans des fractions totales et mitochondriales en présence ou non des protéines CLU nous permettrait de voir l'effet de CLU sur la traduction et plus particulièrement sur la traduction localisée. Dans ce cas aussi, il serait possible d'observer différents comportements des ARNm en fonction de la présence de CLU.

Certaines études ont mis en évidence le rôle des protéines CLU dans la mitophagie et plus particulièrement dans les premières étapes de ce mécanisme de recyclage des mitochondries défectueuses (Ma et al., 2020; Pla-Martín et al., 2020; Wang et al., 2016). Leur rôle dans la mitophagie suggère que CLUH serait important en cas de stress qui aboutit à la présence de mitochondries défectueuses. Dans ce cas, il serait intéressant de chercher si le



rôle des protéines CLU dans la mitophagie serait lié à leur rôle au niveau de la régulation de la traduction. Pour cela, de nouvelles études globales par RNA-Seq des ARNm associés à la surface mitochondriale et associés aux polysomes seraient intéressantes à mettre en place dans des cas de stress et donc d'induction de la mitophagie. Il serait possible que les protéines CLU soient impliquées dans un changement de ces associations qui pourrait servir de signal pour l'induction de la mitophagie.

Enfin, mon étude a mis en évidence une grande hétérogénéité de la localisation des protéines CLU particulièrement chez *Arabidopsis thaliana*. En effet, l'étude d'un organisme entier comme la plante *Arabidopsis thaliana* a permis de mettre en évidence une différence de localisation de la protéine FMT entre les tissus qui seraient liés à une différence de fonction de FMT. En effet, la présence de FMT dans la fraction mitochondriale s'accompagne d'une absence de phénotype des plantes et d'une absence d'altération du protéome mitochondrial dans les inflorescences au contraire des plantules. Ces résultats sont plus difficiles à mettre en évidence lors de l'analyse de lignées cellulaires. Néanmoins malgré l'absence de CLUH dans la fraction mitochondriale dans les cellules humaines HCT 116 dans notre étude ainsi que dans l'étude de Ando *et al* sur les cellules HEK293 (Ando *et al.*, 2016), cette protéine semble être présente dans les fractions mitochondriales de foies et de cerveaux de souris et dans des cellules HEK293T (Gao *et al.*, 2014; Vardi-Oknin and Arava, 2019). Ces différents résultats suggèrent que chez les mammifères également les fonctions de CLUH pourraient être tissus ou conditions dépendantes. Cela est d'autant plus probable que l'absence de mCLUH chez les souris aboutit à la létalité néonatale des souris alors que des organes de souris adultes (foie) sont normaux si la délétion de mCLUH est réalisée après la naissance (délétion conditionnelle) (Schatton *et al.*, 2017). Ces résultats chez les plantes et chez les mammifères suggèrent que la localisation et la fonction de CLUH est très hétérogène entre les tissus et les stades de développement. Cette hétérogénéité pourrait être liée à la fonction mitochondriale : la protéine CLU serait nécessaire dans des tissus ou des stades de développement à forte demande énergétique. De la même manière, si CLU est impliqué dans la régulation de la traduction en cas de stress et dans l'induction de la mitophagie, cette protéine serait plus importante dans les tissus ayant le plus de mitochondries défectueuses. Les fonctions mitochondriales et notamment l'OXPPOS produisant des espèces réactives aux oxygènes (ROS) susceptibles d'altérer les mitochondries (Murphy, 2009). Il est possible une fois encore



que les protéines CLU soient particulièrement nécessaires dans les tissus à fortes demandes énergétiques (où les ROS sont les plus susceptibles d'être présents et de générer des mitochondries défectueuses).

En conclusion, l'étude des protéines CLU met en évidence un rôle de cette protéine dans la traduction, particulièrement la traduction localisée à la surface mitochondriale (notre étude, (Sen and Cox, 2016; Sheard et al., 2020; Vardi-Oknin and Arava, 2019)). Les protéines CLU semblent également impliquées dans la mitophagie grâce à leur interaction avec Parkin pour Clueless chez la drosophile (Wang et al., 2016), avec mTORC pour CLUH chez les mammifères (Pla-Martín et al., 2020) ou avec ATG8 pour FMT chez *Arabidopsis thaliana* (Ma et al., 2020). Les protéines CLU sont aussi impliquées dans les fonctions mitochondriales (Cox and Spradling, 2009; Schatton et al., 2017; Schimmel et al., 2012; Wakim et al., 2017; El Zawily et al., 2014). L'ensemble de ces résultats suggèrent que le rôle des protéines CLU est complexe. Il serait intéressant d'analyser le lien entre le rôle des protéines CLU dans la traduction et leur rôle dans la mitophagie.



## ANNEXE (ARTICLE 1)



Lors de ma thèse, j'ai contribué à la réalisation de certaines des expériences présentées dans l'article « *Arabidopsis* Voltage-Dependent Anion Channels (VDACs): Overlapping and Specific Functions in Mitochondria » ce qui m'a permis d'être la première auteure de cette publication.

Cet article apporte de nouvelles informations sur les protéines mitochondriales VDACs et sur la spécificité des différentes VDAC et notamment VDAC1, VDAC3 et VDAC4 dans le processus d'import des ARN de transfert (ARNt). D'après ces résultats, chaque VDACs semble interagir différemment avec les ARNt avec VDAC4 qui semble interagir de manière plus spécifique avec ceux-ci. Cela suggère que VDAC4 est le composant majeur du canal d'import des ARNt. De plus, l'induction de l'expression de l'ARNm VDAC3 lors de différents stress laisse supposer que cette protéine pourrait être spécifiquement impliquée dans les premières étapes du mécanisme de réponse au stress. Enfin, l'analyse de VDAC1 met en évidence une complémentation de certaines de ses fonctions par VDAC3.

J'ai participé plus particulièrement à l'étude de VDAC1 et de la complémentation de certaines de ces fonctions par VDAC3. J'ai mis en évidence l'absence d'effet de VDAC1 sur l'import des tRNA par northernblot. J'ai également confirmé par western blot l'induction de l'alternative oxydase (AOX) en absence de VDAC1 qui est représentative d'un stress mitochondrial et qui est compensée par VDAC3. Ce résultat suggère que VDAC3 et VDAC1 partagent certaines fonction. Enfin, l'analyse de la consommation d'oxygène permet de mettre en évidence une altération de l'OXPPOS en absence de VDAC1 qui n'est pas compensée par l'ajout de VDAC3. L'ensemble de ces résultats suggère que VDAC1 et VDAC3 partagent certaines de leurs fonctions mais ne sont pas interchangeables.



Article

# *Arabidopsis* Voltage-Dependent Anion Channels (VDACs): Overlapping and Specific Functions in Mitochondria

Mickaële Hemono, Élodie Ubrig, Kevin Azeredo, Thalia Salinas-Giegé, Laurence Drouard  and Anne-Marie Duchêne \*

Institut de Biologie Moléculaire des Plantes, UPR 2357 du CNRS, Université de Strasbourg, 12 rue du Général Zimmer, 67084 Strasbourg Cedex, France; mickaele.hemono@etu.unistra.fr (M.H.); Elodie.Ubrig@ibmp-cnrs.unistra.fr (É.U.); kevin.azeredo@etu.unistra.fr (K.A.); thalia.salinas@ibmp-cnrs.unistra.fr (T.S.-G.); Laurence.Drouard@ibmp-cnrs.unistra.fr (L.D.)  
\* Correspondence: anne-marie.duchene@ibmp-cnrs.unistra.fr

Received: 21 February 2020; Accepted: 17 April 2020; Published: 21 April 2020



**Abstract:** Voltage-dependent anion channels (VDACs) are essential components of the mitochondrial outer membrane. VDACs are involved in the exchange of numerous ions and molecules, from ATP to larger molecules such as tRNAs, and are supposed to adjust exchanges in response to cell signals and stresses. Four major VDACs have been identified in *Arabidopsis thaliana*. The goal of this study was to explore the specific functions of these proteins, in particular, in tRNA import into mitochondria and stress response. The main results were: (i) VDACs appeared to differentially interact with tRNAs, and VDAC4 could be the major tRNA channel on the outer membrane, (ii) a VDAC3 mRNA isoform was found induced by different stresses, suggesting that VDAC3 might be specifically involved in early steps of stress response and (iii) an analysis of *vdac3* and *vdac1* mutant lines showed that VDAC3 and VDAC1 shared some, but not all functions. In conclusion, this work brings new knowledge on VDACs, which do not appear as interchangeable pores of the outer membrane and each VDAC has its own specificity.

**Keywords:** outer membrane; tRNA import; cold stress; heat stress; oxidative stress; phosphate; salt; proteome; oxidative phosphorylation; OXPHOS; oxygen uptake

## 1. Introduction

The voltage-dependent anion channels (VDACs) are the major protein components of the mitochondrial outer membrane (MOM). VDACs are involved in the exchange of numerous compounds between the cytosol and the inter membrane space. These compounds are ions such as  $\text{Ca}^{2+}$ , metabolites such as succinate or ATP, and also larger molecules such as tRNA or DNA [1–3]. VDACs are pore-forming proteins organized in  $\beta$ -barrels of 19  $\beta$ -strands, with an N-terminal  $\alpha$ -helix. The pore dimensions are roughly 3–4 nm diameter and 4 nm height. The channels can adopt an open state or a closed one, which controls the permeability of the pores. In vivo VDAC opening/closure is supposed to play an important regulatory role to adjust organelle metabolism. In addition to function in the regulation of metabolite transport, VDACs are involved in programmed cell death [1].

In *Arabidopsis thaliana* (*Arabidopsis*), VDACs are encoded by a small gene family of five members: *VDAC1* (At3g01280), *VDAC2* (At5g67500), *VDAC3* (At5g15090), *VDAC4* (At5g57490) and *VDAC5* (At3g49920). The *VDAC1–4* proteins have similar sizes (274–276 aa) and similar putative structures. More than 40% identity is found between these four proteins, and *VDAC1* and *VDAC3* are the most closely related proteins (68% identity) (Figure S1). Different splice variants are proposed for *VDAC5*, and all resulting protein models are truncated compared to *VDAC1–4* [4,5], (<http://plants.ensembl.org/index.html>).



The level of each protein has been evaluated in *rabidopsis* mitochondrion [6]. The most abundant VD C is VD C1, with an estimated 44,400 copies per mitochondrion [6], followed by VD C3 (23,200 copies per mitochondrion), VD C2 (11,400 copies), VD C4 (1600 copies) and VD C5 (30 copies). Fuchs et al. have estimated that, altogether, VD Cs represent 34% of MOM surface. In comparison, the translocase of the outer membrane (TOM) complex, involved in protein import, represents 12% of MOM area [6]. In addition to MOM localization, several studies have also found non-mitochondrial localizations of VD C proteins, in particular, in plastids with some contradictory results [1] and in plasma membrane [5].

T-DN insertion mutant lines in VD C1–4 have been characterized. The phenotype of knockout (KO) mutant plants is highly variable. *vdac3* plants look like wild-type plants. By contrast, *vdac1*, *vdac2* and *vdac4* mutants present an altered phenotype (smaller rosettes, delayed development and poor seed production), with increasing defects from *vdac1* to *vdac2*, then *vdac4* [4,5]. The *vdac4* phenotype is particularly severe, with stunted plants and dramatically reduced seed production. Moreover, mitochondria appear enlarged in *vdac1* and *vdac4*: nearly 90% of Col0 mitochondria have a surface area less than 0.8  $\mu\text{m}^2$ , but this size is found in only 30% of *vdac1* and 25% of *vdac4* mitochondria [5]. These observations suggest that the different VD C genes are not strictly redundant. However, the specific functions of each VD C are still unclear.

Here, we show that VD C4 strongly interacts with tRNAs, so it has probably acquired a specialized function in tRNA import into mitochondria. VD C1 interacts with tRNAs with a lower efficiency, but it does not seem to participate in tRNA import in vivo. VDC 3 is characterized by an early induction in stress conditions, and both *vdac1* and *vdac3* KO lines are weakly affected in oxidative phosphorylation (OXPHOS), but they cannot rescue each other for this defect. Taken together, this work elucidates distinct and overlapping functions of VD Cs in the regulation of mitochondrial metabolism.

## 2. Materials and Methods

### 2.1. Plant Material and Growth Conditions

The insertion mutants S\_LK\_034653 for *vdac1* and S\_LK\_127899.41.10.x for *vdac3* [5] were from the Columbia ecotype. Both lines were kindly provided by Dr. Filleur (I2BC, Gif/Yvette, France). *vdac1\_OEV3* corresponds to a *vdac1* mutant transformed with the VD C3 genomic sequence (from its promoter to the end of its short 3' UTR, and with a His tag at the beginning of the coding sequence (CDS) [7]. *rabidopsis* cell cultures were from the Landsberg ecotype [8].

Plants were grown in long-day conditions (16 h day at 21 °C/8 h night at 18 °C cycles, LED tubes Philips 1500 mm SO 20W 840 T8, photon flux density of 120  $\mu\text{mol}/\text{s}/\text{m}^2$  at the plant level). Seedling cultures and cell cultures were grown at 23 °C with constant light. Seedlings were grown in Murashige and Skoog MS231 medium (Duchefa Biochemie, Haarlem, The Netherlands) (8 days in hydroponic cultures or 10 days on plates for O<sub>2</sub> consumption experiments). Cell cultures were grown in Murashige and Skoog MS256 medium.

Stress conditions were performed on 8-day-old cell cultures. Cold and heat shocks were for 3 h at 4 °C or 37 °C, respectively. NaCl (150 mM) and H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (20 mM) stresses and phosphate starvation were for 24 h at 23 °C. For phosphate starvation studies, media used were MSP01 (with phosphate) and MSP11 (without phosphate) (Caisson Labs, Smithfield, UT, US ).

### 2.2. Cloning, Overexpression and Purification of VD C Proteins

*rabidopsis* VD C1–4 CDSs were amplified by RT-PCR and cloned into pDON207 entry vector and then into p0GW destination vector [9] using the Gateway recombination cloning technology. Constructs corresponding to potato VD C34 and VD C36 have been previously obtained [10]. All CDSs were in fusion with a His tag at the C-terminal end of the protein.

Primers used for PCR (*attB* sequences in italics):



|       |           |  |
|-------|-----------|--|
| VD C1 | (direct)  | ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctgggtgaaaggtcccggctc    |
| VD C1 | (reverse) | ggggaccactttgtacaagaagctgggtaaggctgagtgcgagagcc    |
| VD C2 | (direct)  | ggggacaagttgtacaaaaaagcaggcttgagcaaaggtccaggactctt |
| VD C2 | (reverse) | ggggaccactttgtacaagaagctgggtaaggcttgagcaaagagag    |
| VD C3 | (direct)  | ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctgggttaaaggtccaggactcta |
| VD C3 | (reverse) | ggggaccactttgtacaagaagctgggtagggcttgagagcgagagc    |
| VD C4 | (direct)  | ggggacaagttgtacaaaaaagcaggctggggaagcagtcagctccg    |
| VD C4 | (reverse) | ggggaccactttgtacaagaagctgggtatggtttgagggcgagggc    |

VD C proteins were overexpressed in *Escherichia coli* and purified with His60 Ni Superflow Resin (Takara #635660, Takara Bio Europe, Saint-Germain en Laye, France) in 1 mL columns under denaturing conditions (8 M urea) according to manufacturer's recommendations.

### 2.3. Northwestern Experiments

The construct containing *rabidopsis* cytosolic tRNA<sup>la</sup> gene sequence has been previously obtained [11]. The tRNA<sup>la</sup> gene sequence was bordered with a T7 RN<sup>o</sup> polymerase promoter in 5' part and a BstNI restriction site in 3' part. The construct was used as a substrate for T7 polymerase to synthesize radiolabeled transcripts in vitro.

Northwestern blots were performed as described in [10]. Overexpressed VD C proteins were electrophoresed on SDS-PAGE and transferred onto Immobilon-P membranes. For renaturation, membranes were incubated in 0.1 M Tris-HCl (pH 7.5) and 0.1% NP40 overnight at 4 °C, then washed 4 times in the same buffer for 15 min at 4 °C. After washing, membranes were incubated in binding buffer (10 mM Tris-HCl (pH 7.5), 5 mM magnesium acetate, 2 mM dithiothreitol (DTT), 0.01% (v/v) Triton X-100) with 5% (w/v) bovine serum albumin (BSA) for 5 min at 4 °C, then overnight at 4 °C in binding buffer with the in vitro synthesized radiolabeled tRNA<sup>la</sup> transcripts. Washing was performed 4 times for 5 min at 4 °C in binding buffer. For each experiment, signals were detected with an Amersham Typhoon imager and quantified with the ImageJ software (<https://imagej.nih.gov/ij/download.html>).

### 2.4. Mitochondria Preparation

Mitochondria were prepared from 8-day-old water-cultured seedlings [12]. Seedlings were filtered and ground in a mortar in grinding buffer (0.3 M sucrose, 25 mM tetrasodium pyrophosphate, 2 mM EDTA, 10 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 1% (w/v) PVP-40 (polyvinylpyrrolidone), 1% (w/v) BSA, 20 mM sodium ascorbate, 20 mM L-cysteine, pH 7.5). Homogenate was filtered in 50 µm nylon meshes and one layer of Miracloth (Merck Millipore, Molsheim, France). Filtered homogenate was centrifuged successively for 5 min at 1600g and 2000g to eliminate cellular debris. The supernatant was then centrifuged at 17,200g for 20 min. The mitochondria pellet was resuspended in 1 mL of washing buffer (0.3 M sucrose, 10 mM MOPS (3-(N-morpholino)propanesulfonic acid), pH 7.2) with 1% (w/v) BSA, and purified on a continuous PVP-40 0–4.4% (w/v) gradient by centrifugation at 40,000g for 40 min. The continuous gradient was prepared from 15 mL of heavy gradient solution (4.4% (w/v) PVP-40, 32% (v/v) Percoll in washing buffer with 1% (w/v) BSA) and 15 mL of light gradient solution (32% (v/v) Percoll in washing buffer with 1% (w/v) BSA). Mitochondria in the bottom of the gradient were washed once in washing buffer with 1% (w/v) of BSA and twice in washing buffer without BSA.

To eliminate RNase contaminants at the surface of mitochondria (for northern blots), the purified mitochondria were incubated with RNases (1 µL of Thermo Fisher RNases A/T1 mix per mg of mitochondrial proteins) for 10 min on ice, centrifuged and then total RN was extracted with Tri-reagent® (Molecular Research Center, Cincinnati, OH, US) according to manufacturer's recommendations.

### 2.5. Northern Blots

RN was separated on 15% polyacrylamide gel in denaturing conditions and electro-transferred onto a nylon membrane. Hybridizations were performed overnight at 45 °C in 6X SSC and 0.5% (w/v)



SDS. Washes were for 30 min in 2X SSC and 0.1% SDS [13]. The oligonucleotide probes were labeled with  $^{32}\text{P}$  using T4 polynucleotide kinase:

- Cytosolic tRNA<sup>Lys</sup>: 5' CGCCC CCGTGGGGCTCG CCC 3'
- Imported tRNA<sup>Leu</sup>: 5' CC TCTG GCT C TCCCC 3'
- Imported tRNA<sup>Gly</sup><sub>CCC</sub>: 5' TGCGC TCC GGG TCG C 3'
- Native tRNA<sup>Gly</sup><sub>GCC</sub>: 5' GCGG GG GGG CTTG CCCTC 3'

## 2.6. RN Extraction, Reverse Transcription and RT-qPCR

RNA was extracted from mitochondria and whole cells using TRI Reagent® (Molecular Research Center, Cincinnati, US) according to the manufacturer's instructions, then treated with RNase-free Dnase RQ1 (Promega, Fitchburg, WI, US) and quantified with NanoDrop. RNA quality was checked by electrophoresis in MOPS buffer/formaldehyde/agarose gel. Reverse transcription was performed with Reverse Transcription SuperScript III (Invitrogen, ThermoFisher Scientific, Waltham, MA, US) in the presence of hexamers and oligo-dT primers [14]. For qPCR, the RT was used directly and diluted 10 times, and 2–3 technical replicates were performed for each dilution. Primers are listed in Table 1.

At least three biological replicates, corresponding to mitochondrial and total RNA extracted from the same material, were prepared. The qPCR efficiency for each primer couple was determined by serial dilutions of cDNA. The qPCR results were normalized with cytosolic ribosomal protein L12 (RPL12) or glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase (GAPDH) mRNAs.

Table 1. qPCR primers.

| Gene                | Efficiency | Direct/Reverse    | Sequence (5' to 3')                           |
|---------------------|------------|-------------------|---|
| RPL2<br>(mito)      | 1.945      | Direct<br>Reverse | CCG G CGG TC GGT<br>CGC TTC TC CC TTTTG       |
| GAPDH<br>(t1g13440) | 1.967      | Direct<br>Reverse | GGCTGCTGCTC CTTC<br>C TGGGCCG TCTTTG          |
| RPL12               | 1.887      | Direct<br>Reverse | G CGTGT CGTCCG GT CC<br>G CCG TTTTGGG GCT G   |
| VD C3 long          | 2.008      | Direct<br>Reverse | TCC T TCTTTT CTGGTTCCTCTT<br>GGG CTCC TGG C   |
| VD C3               | 1.974      | Direct<br>Reverse | C CTG TCGGC GG<br>TGTTCCCGTTGT GTG TCG        |
| VD C1               | 1.984      | Direct<br>Reverse | GCTCTGTCTTTCG TTCTC G<br>TGGTC CTGTGTGGCCTTTG |
| VD C2               | 1.974      | Direct<br>Reverse | CCG TCTCTCTC TCTCCG<br>GTCTCTCGTC C G TCTTTGG |
| VD C4               | 1.914      | Direct<br>Reverse | CGTCG TCTTCC TTTTCG<br>TCCTTGTTT GG G TCTTTGG |

## 2.7. O<sub>2</sub> Consumption

Oxygen consumption of seedlings was measured in 2 mL of deionized water with a liquid-phase Oxytherm oxygen electrode system (Hansatech Instruments, Pentney, UK). Ten-day-old seedlings grown on plates (30–40 mg) were directly imbibed in the electrode chamber and rates of oxygen consumption were measured. After 6 min, KCN was added (final concentration: 2.5 mM) and oxygen consumption was re-measured. Differences between these two rates corresponded to cyanide-sensitive oxygen uptake (OXPHOS O<sub>2</sub> uptake) (N = 3–5).



## 2.8. Proteomics

Two independent mitochondrial preparations (see above) were obtained from each plant line. Each preparation was then split into two or three parts. Proteins (1 mg) were extracted from each part, digested with trypsin and then analyzed by nanoLCMS/MS. Data were searched against the TrIR . *thaliana* database. All steps were performed at the “Plateforme Prot omique Strasbourg-Esplanade” (<http://www-ibmc.u-strasbg.fr/proteo/Web/accueil.htm>).

To identify significantly affected proteins, a statistical analysis based on spectral counts was performed using a homemade R package (<https://www.r-project.org/>) as described in [15], except that the size factors used to scale samples were calculated according to the DESeq2 normalization method (i.e., median of ratios method, [16]). The R package performs a negative binomial test using an edgeR-based GLM (Generalized Linear Models) regression [17], and calculates the fold change and an adjusted *p*-value corrected by Benjamini–Hochberg for each identified protein.

Mitochondrial localization was determined according to SUB 4 (<http://suba.live/>). For functional annotations (see Table S2), proteins were assigned as tricarboxylic acid cycle (TC ) enzymes according to [18] (class no. 1), OXPHOS according to [19] (class no. 2), or RN process and translation according to [19–21] (class no. 3).

## 2.9. Western Blot and Antibodies

Western blot analysis was conducted according to the standard protocol. Antibodies against the ribosomal rPPR1 protein ( t1g64870) and the alternative oxidase ( OX) were from P. Gieg (IBMP, Strasbourg, France) [22] and T. Elthon (GT monoclonal antibodies, University of Nebraska, Lincoln, NE, US ) [23], respectively.

## 3. Results

### 3.1. VD C4 Strongly Interacts with tRN s

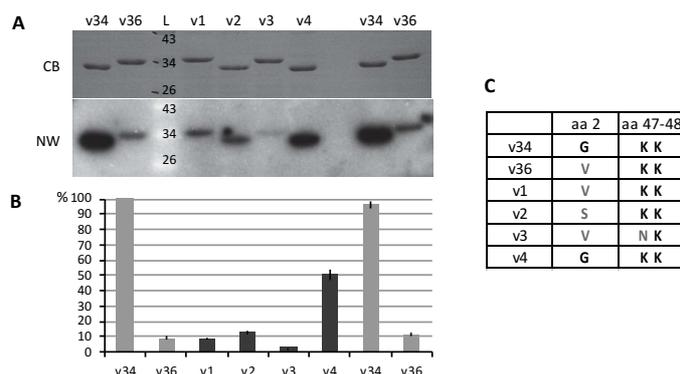
Plant mitochondria have the particularity to import numerous tRN s (one third to one half of tRN species) [24]. The mechanism of import has been elucidated at the level of MOM, involving both TOM and VD C. TOM appears to be implicated in the binding of tRN s at the mitochondrial surface, and VD C in the translocation step through MOM [3]. *Solanum tuberosum* (potato) mitochondria contain two major VD C proteins, VD C34 and VD C36. The two proteins were shown to differentially interact with tRN s in vitro, with VD C34 being the more efficient [10]. By comparing the binding efficiency of wild-type and mutated VD Cs, a few positions were shown to be mandatory for the interaction, even if a clear binding site could not be identified.

In order to evaluate VD C–tRN interactions, *rabidopsis* VD C1–4 and potato VD C34 and VD C36 proteins were overexpressed in *Escherichia coli*. Northwestern experiments were performed to detect the direct binding of tRNA transcripts to purified VD Cs immobilized on a membrane (Figure 1). As already shown, the signal obtained with VD C34 was far higher than that obtained with VD C36 [10]. Concerning *rabidopsis* VD Cs, a strong signal was observed with VD C4, moderate ones with VD C1 and VD C2, and a very weak one with VD C3. Compared to VD C4, signals with VD C1 or VD C2 were about 5 times lower, and that with VD C3 were about 20 times lower. Thus, *rabidopsis* VD Cs appeared to differentially interact with the tRNA transcripts, suggesting a functional specialization of these proteins.

The binding of tRN s to VD C4 appeared to be half of that observed for VD C34. In VD C34, three amino acids were shown to be essential for the interaction, a glycine residue in position 2 and two lysine residues in positions 47 and 48. The mutation of Gly<sub>2</sub> in VD C34 reduced the interaction to half, and the mutation of the two lysine residues induced a loss of 2/3 of the interaction [10]. These three positions are conserved in VD C4, so the difference in binding should be linked to other sequence differences. The two lysine residues are also found in VD C1, VD C2 and VD C36, but not Gly<sub>2</sub>.



One lysine residue and Gly<sub>2</sub> are not present in VD C3 (Figure 1C and Figure S1). These differences could explain the moderate binding of VD C1, VD C2 and VD C36, and the weak binding of VD C3.

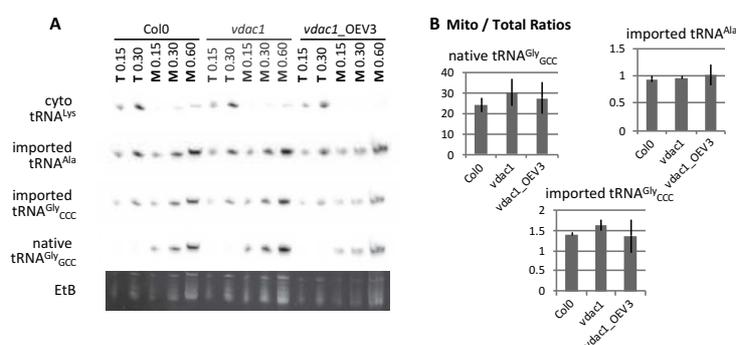


**Figure 1.** Voltage-dependent anion channel (VD C) proteins differentially interact with tRN in vitro. The six VD C proteins, potato VD C34 and VD C36 (v34, v36) and *rabidopsis* VD C1–4 (v1, v2, v3 and v4) were overexpressed with a His tag in *Escherichia coli* and purified. The purified proteins were separated on SDS/PAGE and transferred onto membranes. (A) Northwestern (NW) blots with radioactive tRNA transcripts. CB, Coomassie blue staining of the membrane; L, ladder (in kDa). (B) Quantification. Three similar blots were hybridized with tRNA transcripts. The signals were quantified and normalized on the first v34 loading, and means were calculated. (C) Amino acids in positions 2, 47 and 48. Gly<sub>2</sub> and K<sub>47</sub>K<sub>48</sub> have been shown to be involved in tRNA interaction [10]. Error bars, standard error of the mean (SEM).

VD C4 appeared to strongly interact with tRN in vitro. The *vdac4* KO plant phenotype is very strong (Figure S2). Hence, it was not possible to prepare highly purified mitochondria from this material. *vdac1* VD C1 moderately interacts with tRN, but is also the major VD C in MOM [6], its role in tRN import into mitochondria was evaluated. For that, three *rabidopsis* lines were used, the wild-type Col0, a *vdac1* KO mutant that presents altered growth, and the *vdac1* mutant overexpressing VD C3 (*vdac1\_OEV3*). This *vdac1\_OEV3* line corresponds to a *vdac1* mutant transformed with the VD C3 genomic sequence, from its promoter to the end of its short 3' UTR [7] (see below). The phenotype of *vdac1\_OEV3* plants is similar to that of wild-type plants (Figure S2), as is the size of their mitochondria [7]. Proteomic analysis of mitochondria (see Section 3.3.) showed that the steady state levels of VD C2 and VD C4 were similar in the three lines, and that VD C3 level was similar in wild-type (WT) and *vdac1*, and roughly twice higher in *vdac1\_OEV3* (Figure S2).

Mitochondria were prepared from Col0, *vdac1* and *vdac1\_OEV3* lines. After purification on a Percoll gradient, mitochondria were treated with RNase to eliminate residual RNase at their surface. Total and mitochondrial tRNAs were extracted, and northern blots were performed. The mitochondria/total ratio was determined for a mitochondrial-encoded tRNA (native tRNA<sup>Gly<sub>CCC</sub></sup>), and two imported tRNAs (tRNA<sup>Leu</sup> and tRNA<sup>Gly<sub>CCC</sub></sup>) (Figure 2). No clear difference could be observed between the three plant lines, suggesting that the deletion of VD C1 did not affect the import of tRNAs into mitochondria.





**Figure 2.** In vivo import of tRNAs into mitochondria. Mitochondria were extracted from Col0, *vdac1* and *vdac1\_OEV3* seedlings. Total (T) and mitochondrial (M) tRNAs were prepared and loaded onto a urea-polyacrylamide gel (0.15–0.60  $\mu$ g). (A) Northern blots. Four tRNA probes were used. The native tRNA<sup>Gly</sup> corresponds to a mitochondrial-encoded tRNA. The tRNA<sup>Ala</sup> and tRNA<sup>Gly</sup><sub>CCC</sub> are nuclear-encoded and imported into mitochondria. The tRNA<sup>Lys</sup> is nuclear-encoded, but restricted to the cytosol [24]. This last probe shows that the level of cytosolic contamination is low in mitochondria from every plant line. EtB, ethidium bromide staining. (B) Quantification. Two similar blots were performed and the signals were quantified. The M/T ratios were calculated for loadings of 0.15 and 0.3 mg of total and mitochondrial RNAs, respectively. Imported tRNA<sup>Ala</sup> and native tRNA<sup>Gly</sup>,  $N = 4$ ; imported tRNA<sup>Gly</sup>,  $N = 2$ . Error bars, SEM.

### 3.2. VD C3 mRNA Isoform is Specifically Induced in Stress Conditions

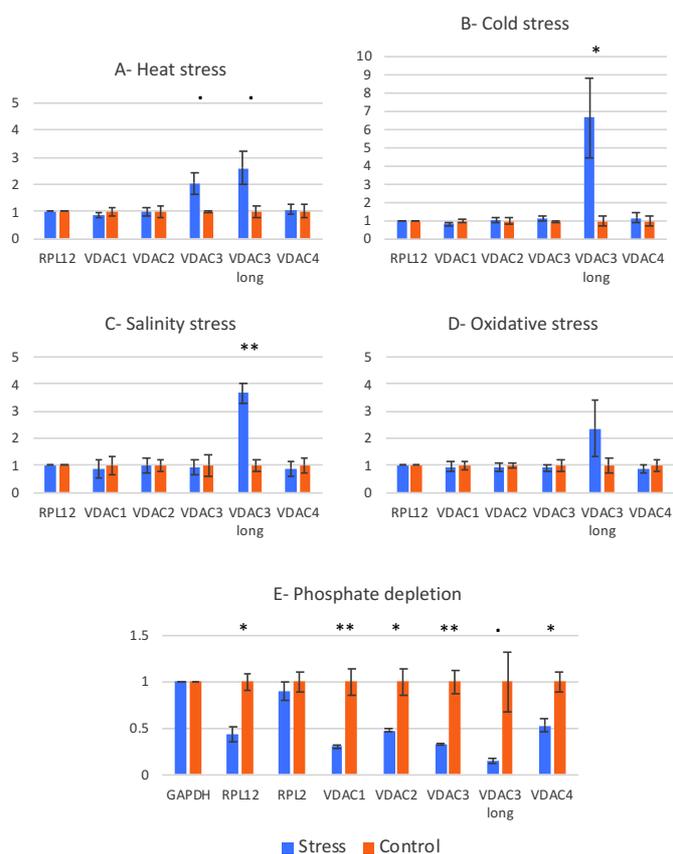
VD Cs are at the interface between mitochondria and cytosol, and are supposed to adjust exchanges between these two compartments in response to cell signals and stresses. Moreover, VD C1 and VD C3 have been independently found to be induced by stresses [25,26]. According to information found in the Bio-analytic Resource for Plant Biology (<https://bar.utoronto.ca/efp/cgi-bin/efpWeb.cgi>), we evaluated the impact of different stresses on VD C expression in WT cell cultures.

Cold (4 °C) and heat (37 °C) shocks were performed for 3 h, and salt and oxidative stresses for 24 h. Total RNA was then extracted and VD C mRNAs were quantified by RT-qPCR (Figure 3). Primers hybridizing with VD C1, VD C2 and VD C4 CDSs were used for qPCR. For VD C3, identical proteins have been shown to be translated from two mRNA isoforms, which differ by their 3' UTR and localization in the cell [7]. The major mRNA isoform, which has the shorter 3' UTR, is cytosolic. The long mRNA, which has a longer 3' UTR and is about 100 times less abundant than the short one, is associated with the mitochondrial surface [7]. Two couples of primers were used. The first one (VD C3) recognizes the two isoforms, and the second one (VD C3 long) only hybridizes with the long isoform (hybridization with the 3' extension).

None of the stress conditions affected VD C1, VD C2 and VD C4 mRNA levels. VD C3 total mRNA (the short isoform in majority) was weakly increased in response to heat. More interestingly, VD C3 long mRNA isoform (with the long 3' UTR) was found overexpressed in many conditions (2- to 6-fold increase), suggesting that this isoform is specifically involved in stress response (Figure 3–D).

Phosphate starvation was also performed for 24 h (Figure 3E). The consequence was dramatic for all VD C mRNAs, with a 50–85% reduction of mRNA levels, but also for other messengers such as RPL12, suggesting a global stress in the cell.





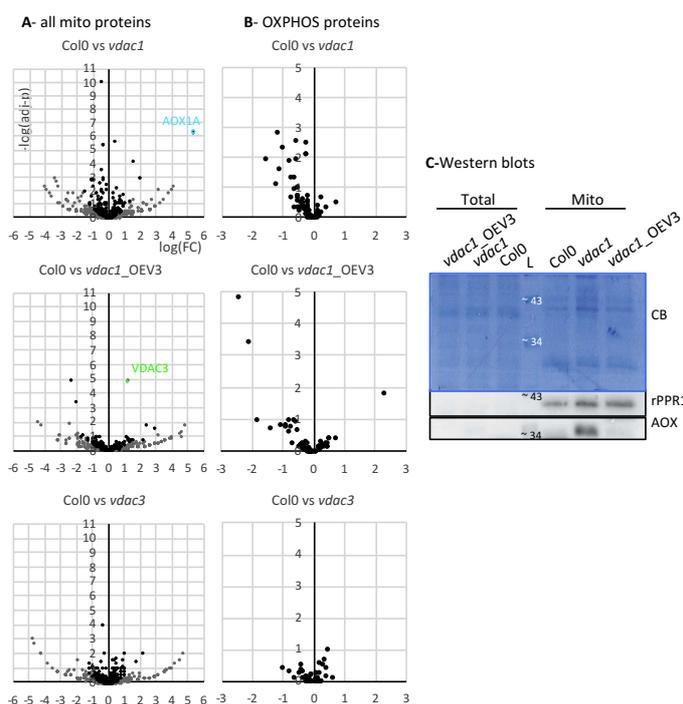
**Figure 3.** VDAC response to stress. Stress conditions, performed on 8-day-old cell cultures, were 3 h at 37 °C or 4 °C for heat (A) and cold stress (B), respectively, or 24 h at 23 °C for salinity (150 mM NaCl) (C) and oxidative (20 mM H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) (D) stresses and for phosphate depletion (E). Total RNAs were extracted and used for RT-qPCR. Normalization was done on RPL12 mRNA (A–D), except for phosphate depletion (E). In that case, RPL12 messenger was found downregulated and normalization was done on GAPDH. Error bars, SEM. Student’s test *p*-value: between 5% and 10%, \* between 1% and 5%, \*\* below 1%.

### 3.3. Mitochondrial Proteomes and OXPHOS Respiration

To evaluate the role of the abundant VDAC1, the mitochondrial proteome of the *vdac1* KO line was determined. Mitochondria were thus prepared from *vdac1* and Col0 lines. As the phenotype of *vdac1*-OEV3 plants is normal, mitochondria were also prepared from *vdac1*-OEV3 and *vdac3* lines, to explore which functions could be complemented by VDAC3.



Mass spectrometry analyses identified about 700 mitochondrial proteins (according to SUB 4 annotation) in each mitochondrial extract. The total number of MS/MS fragmentation spectra was then used for label-free quantification, comparing *vdac1* to Col0. For each protein, a protein fold-change (FC) and an adjusted *p*-value (adj-*p*) were calculated. Similar quantifications were also performed with *vdac1\_OEV3* and *vdac3* mitochondria, compared to Col0 (Figure 4 and Figure S3).



**Figure 4.** Mitochondrial proteomes. Proteins from purified mitochondria were analyzed by MS/MS, and spectral count label-free quantifications were performed relative to Col0. In volcano plots, the fold change is presented on the x-axis ( $\log_2(\text{FC})$ ) and the adjusted *p*-value on the y-axis ( $-\log_{10}(\text{adj-}p)$ ). (A) Mitochondrial proteins. Due to their high *x* and *y* values, VD C1 is not shown on graphs corresponding to *vdac1* and *vdac1\_OEV3*, and VD C3 on graph corresponding to *vdac3* (Figure S3). Plot scales were adjusted according to the other proteins. Proteins with a mean of less than three spectra in the most expressed condition are in grey. They will not be considered in (B) and Figure S3. (B) OXPHOS proteins, according to [19]. (C) Western blots with antibodies against the ribosomal protein rPPR1 and OX. Proteins at 10  $\mu\text{g}$  were loaded in each lane. CB, Coomassie blue staining; L, ladder.

In all three comparisons, only a few proteins were identified as significantly enriched or depleted (i.e., with adjusted *p*-value < 0.1) in each *vdac* line compared with Col0 (Table S2, Sheet 6). VD C1 and VD C3 were of course among them (VD C1 underexpression in *vdac1* and *vdac1\_OEV3*, and VD C3 underexpression in *vdac3* and overexpression in *vdac1\_OEV3*). It should be noted that FC and adj-*p* value should be considered with caution for proteins with a low spectral count. To avoid too much

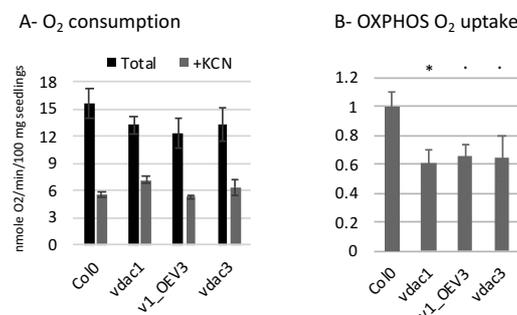


bias, only proteins with at least three spectra in the most expressed condition were further considered. With these criteria (adjusted  $p$ -value  $< 0.1$ ; spectral count  $> 3$ ), 30 and 19 proteins were found to be underexpressed and overexpressed in *vdac1* mitochondrial proteome, respectively. In *vdac1*\_OEV3 and *vdac3*, 4 and 10 proteins were underexpressed, and 3 and 14 proteins were overexpressed, respectively.

Functional annotation clustering (DAVID Bioinformatics Resources 6.8; <https://david.ncifcrf.gov/>) of the *vdac1* underexpressed proteins pointed out functional groups such as “oxidative phosphorylation”, “complex I” and “mitochondrion membrane”, and no convincing enrichment scores were obtained in other lines or conditions (under/over). This clustering suggested that some proteins involved in oxidative phosphorylation (OXPHOS) could be affected in *vdac1*. Hence, OXPHOS proteins were analyzed more deeply. In *vdac1*, compared to Col0, 53 out of the 73 OXPHOS proteins had a negative logFC, with an adj- $p$  value below 0.1 for 11 of the proteins (Figure 4B,  $-\log(\text{adj-}p) > 1$ ) (Table S1, Sheet 3). This bias was not observed in *vdac1*\_OEV3 or *vdac3*, and in other pathways such as the TC cycle, RN processing and translation (Figure S3). Among the 11 underexpressed OXPHOS proteins in *vdac1*, 6 proteins were from Complex I, 4 proteins were from Complex V and 1 protein was from Complex II. These results suggested that many OXPHOS proteins were weakly affected in *vdac1* line, and restored in *vdac1*\_OEV3.

In addition, four proteins involved in ATP transport through the inner membrane and identified in the same complex [19] were also found underexpressed in *vdac1*, but not in other lines (Table S2, Sheet 6). The alternative oxidase OX1a was found as the most overexpressed protein in *vdac1*, and its overexpression was confirmed with a western blot (Figure 4C). OX1a is usually considered as an indicator of stress and mitochondria dysfunctions [5,27,28], which is in accordance with the altered phenotype of *vdac1* mitochondria and plants.

To evaluate OXPHOS function, oxygen uptake was then measured in seedlings from Col0, *vdac1*, *vdac1*\_OEV3 and *vdac3* lines. The total O<sub>2</sub> consumption was not strongly affected in the mutant lines compared to Col0. However, O<sub>2</sub> uptake by the OXPHOS pathway was clearly reduced in *vdac1*, and also in *vdac1*\_OEV3 and *vdac3* (Figure 5, B).



**Figure 5.** O<sub>2</sub> uptake in seedlings. The oxygen consumption was measured on seedlings (30–40 mg) with an oxygen electrode system. After a first recording of 6 min, KCN, which blocks OXPHOS activity, was added. (A) Total oxygen consumption, and after KCN addition (nmol O<sub>2</sub>/min/100 mg seedlings) (mean values of 3–5 assays). (B) OXPHOS O<sub>2</sub> uptake was determined by subtracting residual KCN consumption to total, and expressed relatively to Col0. Student’s test  $p$ -value: between 5% and 10%, \* between 1% and 5%. Error bars, SEM.

#### 4. Discussion

Four VDCs are found in *rabidopsis* MOM and all of them are expected to exchange metabolites between cytosol and mitochondria. However, the *vdac* KO phenotypes are clearly distinct, and do not



correlate with VD C protein abundance observed in WT cells [5,6]. This suggests that VD C proteins have specific functions.

In order to identify the functions of the different VD Cs, we first explored their capacity to interact with tRN s. The in vitro test showed that the four VD C proteins had different behaviors. VD C4 was found to be the strongest tRN interactant, which suggested that VD C4 could be important in tRN import into mitochondria.

VD C1 moderately interacts with tRN s and is highly abundant in MOM, but it has not been found essential for in vivo import of tRN s into mitochondria. VD C2 interaction with tRN is similar to that of VD C1, but VD C2 is less abundant than VD C1 in MOM [6], so it is unlikely that it plays an important role in tRN import into mitochondria. VD C3 very weakly binds to tRN s. Two other mitochondrial proteins, Tric1 and Tric2, (tRN import components) have been found to interact with tRN s but, as for *vdac1*, the steady state level of imported tRN s does not seem affected in mitochondria of *tric1 tric2* double KO line [29]. Thus, VD C4 remains the best candidate for a tRN channel in MOM. If tRN import is strongly impaired, the mitochondrial translation would also be affected and in consequence, the whole plant metabolism. This is in accordance with the very strong phenotype of *vdac4* plants.

Second, VD C response to stress was investigated. Phosphate (Pi) starvation induced a repression of all VD C mRNAs, but also of other mRNAs. Pi-starved plants are known to extensively remodel their transcriptome and proteome to coordinate metabolic and morphological adaptations. Misson et al. have shown the induction and suppression of 612 and 254 Pi-responsive genes, respectively, in *rabidopsis* [30]. These genes are involved in transcriptional regulation, ion transport and various metabolic pathways. Indeed, alternative pathways for cytosolic glycolysis and mitochondrial electron transport promote the survival of Pi-deprived plants [31]. The effect of Pi starvation on VD Cs is thus not surprising.

Other tested stresses were found to specifically induce the VD C3 long mRNA isoform. biotic and abiotic stresses [25,26] have already been shown to induce VD C proteins, in particular, VD C1 or VD C3, but the results have been sometimes contradictory [32]. One explanation could be that the growth and stress conditions (in particular, time) were not identical, as well as the plant material (seedlings, mature plants, etc.). In our experiments, we used cell cultures and observed that the VD C3 long mRNA isoform responded to many stresses. This long mRNA isoform has been shown to be targeted to the mitochondrial surface, thanks to its 3' extension [7]. Targeting of cytosolic mRNAs to the mitochondrial surface has been demonstrated in various organisms, and a co-translational pathway for protein import is now proposed in parallel to the conventional post-translational model [33]. VD C3 mRNA targeting does not change the efficiency of VD C3 protein import [7]. A hypothesis for VD C3 mRNA localization at MOM is that it could favor a specific localization of the protein into particular MOM microdomains or specific interactions with other proteins, similar to that proposed for prolamin and glutelin mRNAs at the endoplasmic reticulum [34]. VD C3, more than any other VD C, has been shown to interact with different proteins such as glycolytic enzymes [35,36], proteins involved in ROS response [26,37] or proteins associated with cytoskeleton [38]. Interactions with glycolytic enzymes would favor the channeling of metabolites to mitochondria, but these interactions appear to be redox-dependant. Wojtera-Kuritz et al. and Schneider et al. have proposed that these interactions would be involved in adaptation to oxidative stress [36,39]. It is thus tempting to propose that stress, by inducing VD C3 long mRNA, would induce a quick translation of VD C3 at MOM, thus favoring its interaction with glycolytic enzymes or other proteins, and finally a quick response to stress.

Last, O<sub>2</sub> uptake by the OXPHOS pathway was reduced in *vdac1*, and also probably in *vdac3*. Reduced ATP synthesis and reduced membrane potential have already been observed in *vdac1* mutants [4,40], and reduced membrane potential has been found in *vdac3*, but also in *vdac2* and *vdac4* KO lines [4]. VD C3 overexpression did not seem able to restore OXPHOS respiration in *vdac1\_OEV3*, suggesting that VD C1 and VD C3 have some specialized functions that do not overlap. On the other hand, the overexpression of VD C3 in *vdac1* background restored OXPHOS protein level,



mitochondria size and plant phenotype (this work, [7]), suggesting that VD C1 and VD C3 also have some overlapping functions.

Similarly, plant phenotype of *vdac1* can be restored by the overproduction of VD C4 [5]. Robert et al. [5] have also crossed *vdac1* and *vdac4* KO mutants. They have obtained double heterozygous F1 plants (i.e., with one WT and one mutant allele at each locus), but no double homozygous F2 plants from self-fertilization of this F1. This suggests that VD C1 and VD C4 share functions that are essential for plant viability.

In conclusion, VD Cs have partially redundant functions in mitochondria, but they are not fully interchangeable pores at MOM, and each VD C seems to also have its own specificity. This work brings new knowledge in these particular functions, even if further investigations are clearly needed to decipher all these functions.

**Supplementary Materials:** The following are available online at <http://www.mdpi.com/2073-4409/9/4/1023/s1>, Figure S1: *rabidopsis* VD C sequence similarities and identities, Figure S2: Col0 and *vdac* KO mutants. (A) Phenotypes of plants that were 7–8 weeks old. As already shown [4,5,7], *vdac4* phenotype is dramatic. *vdac3* line looks like wild-type. *vdac1* plants are smaller with a delayed development, but *vdac1\_OEV3* plants are normal. (B) VD C protein levels in the mitochondria of Col0, *vdac1* and *vdac1\_OEV3*. The spectral counts obtained from proteomic analyses were normalized according to Col0, Figure S3: Mitochondrial proteomes. Proteins from purified mitochondria were analyzed by MS/MS, and spectral count label-free quantifications were performed relative to Col0. Fold change (FC) and adjusted *p*-value (adj-*p*) were calculated. Due to their high FC and adj-*p* values (A), VD C1 and VD C3 are not shown on graphs, and scales are adjusted according to the other *x* and *y* values. (B) TC enzymes and (C) proteins involved in RN processing and translation. The adjusted *p*-value is presented on the *y*-axis ( $\log_{10}(\text{adj-}p)$ ) and the fold change on the *x*-axis ( $\log_2(\text{FC})$ ). Only proteins with a mean of more than three spectra in the most expressed condition were considered, Figure S4: Raw data and quantifications, Table S1: Proteomics: raw data and differential analysis. Sheet 1: raw data, Sheets 2–5: differential analyses of mitochondrial proteins in *vdac* lines compared to Col0, Sheet 6: proteins significantly affected in *vdac* lines (adj-*p* value below 0.1; at least three spectra in the most expressed condition), Sheet 7: number of identified proteins in each pathway.

**Author Contributions:** Experiments, M.H., É.U., K., T.S.-G. and A.-M.D.; writing and editing, A.-M.D., T.S.-G. and L.D.; funding acquisition, A.-M.D. and L.D. All authors have read and agreed to the published version of the manuscript.

**Funding:** This work was supported by the Université de Strasbourg and Centre National de la Recherche Scientifique (CNRS), the French Agence Nationale de la Recherche (ANR-18-CE12-0021-01 “Polyglot”) and the French National Program “Investissement d’avenir” (Labex MitoCross). M.H. has a fellowship from MitoCross, and K. from the French Ministère de l’Enseignement Supérieur et de la Recherche.

**Acknowledgments:** We thank H. Zuber (IBMP, Strasbourg, France) for help in proteomic analysis.

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

1. Homble, F.; Krammer, E.M.; Prevost, M. Plant VD C: Facts and speculations. *Biochem. Biophys. Acta* **2012**, *1818*, 1486–1501. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
2. Koulintchenko, M.; Konstantinov, Y.; Dietrich, J. Plant mitochondria actively import DN via the permeability transition pore complex. *EMBO J.* **2003**, *22*, 1245–1254. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
3. Salinas, T.; Duchene, J.M.; Delage, L.; Nilsson, S.; Glaser, E.; Zaepfel, M.; Marechal-Drouard, L. The voltage-dependent anion channel, a major component of the tRN import machinery in plant mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2006**, *103*, 18362–18367. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
4. Tateda, C.; Watanabe, K.; Kusano, T.; Takahashi, Y. Molecular and genetic characterization of the gene family encoding the voltage-dependent anion channel in *rabidopsis*. *J. Exp. Bot.* **2011**, *62*, 4773–4785. [[CrossRef](#)]
5. Robert, N.; D’Erfurth, L.; Marmagne, J.; Erhardt, M.; Ilot, M.; Boivin, K.; Gissot, L.; Monachello, D.; Michaud, M.; Duchène, J.M.; et al. Voltage-Dependent Anion-Channels (VD Cs) in *rabidopsis* have a dual localization in the cell but show a distinct role in mitochondria. *Plant Mol. Biol.* **2012**, *78*, 431–446. [[CrossRef](#)]
6. Fuchs, P.; Rugen, N.; Carrie, C.; Elsasser, M.; Finkemeier, I.; Giese, J.; Hildebrandt, T.M.; Kuhn, K.; Maurino, V.G.; Ruberti, C.; et al. Single organelle function and organization as estimated from *rabidopsis* mitochondrial proteomics. *Plant J.* **2020**, *101*, 420–441. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]



7. Michaud, M.; Ubrig, E.; Filleur, S.; Erhardt, M.; Ephritikhine, G.; Marechal-Drouard, L.; Duchene, M. Differential targeting of VD C3 mRNA isoforms influences mitochondria morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2014**, *111*, 8991–8996. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
8. Yoo, S.D.; Cho, Y.H.; Sheen, J. Arabidopsis mesophyll protoplasts: versatile cell system for transient gene expression analysis. *Nat. Protoc.* **2007**, *2*, 1565–1572. [[CrossRef](#)]
9. Busso, D.; Delagoutte-Busso, B.; Moras, D. Construction of a set Gateway-based destination vectors for high-throughput cloning and expression screening in Escherichia coli. *Mol. Biochem.* **2005**, *343*, 313–321. [[CrossRef](#)]
10. Salinas, T.; El Farouk, M.; Ubrig, E.; Sauter, C.; Duchene, M.; Marechal-Drouard, L. Molecular basis for the differential interaction of plant mitochondrial VD C proteins with tRNAs. *Nucleic Acids Res.* **2014**, *42*, 9937–9948. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
11. Carneiro, V.; Dietrich, J.; Marechal-Drouard, L.; Cosset, J.; Pelletier, G.; Small, I. Characterization of some major identity elements in plant alanine and phenylalanine transfer RNAs. *Plant Mol. Biol.* **1994**, *26*, 1843–1853. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
12. Day, D.; Neuburger, M.; Douce, R. Biochemical Characterization of Chlorophyll-Free Mitochondria From Pea Leaves. *Can. J. Plant Physiol.* **1985**, *12*, 219–228. [[CrossRef](#)]
13. Brubacher-Kaumann, S.; Marechal-Drouard, L.; Cosset, J.; Dietrich, J.; Duchene, M. Differential import of nuclear-encoded tRNA<sup>Gly</sup> isoacceptors into *Solanum tuberosum* mitochondria. *Nucleic Acids Res.* **1999**, *27*, 2037–2042. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
14. Michaud, M.; Marechal-Drouard, L.; Duchene, M. RN trafficking in plant cells: Targeting of cytosolic mRNAs to the mitochondrial surface. *Plant Mol. Biol.* **2010**, *73*, 697–704. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
15. Chicois, C.; Scheer, H.; Garcia, S.; Zuber, H.; Mutterer, J.; Chicher, J.; Hammann, P.; Gagliardi, D.; Garcia, D. The UPF1 interactome reveals interaction networks between RNA degradation and translation repression factors in Arabidopsis. *Plant J.* **2018**, *96*, 119–132. [[CrossRef](#)]
16. Love, M.I.; Huber, W.; Anders, S. Moderated estimation of fold change and dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* **2014**, *15*, 50. [[CrossRef](#)]
17. Robinson, M.D.; McCarthy, D.J.; Smyth, G.K. edgeR: Bioconductor package for differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* **2010**, *26*, 139–140. [[CrossRef](#)]
18. Zhang, Y.; Beard, K.F.M.; Swart, C.; Bergmann, S.; Krahnert, I.; Nikoloski, Z.; Graf, S.; Ratcliffe, R.G.; Sweetlove, L.J.; Fernie, A.R.; et al. Protein-protein interactions and metabolite channelling in the plant tricarboxylic acid cycle. *Nat. Commun.* **2017**, *8*, 15212. [[CrossRef](#)]
19. Senkler, J.; Senkler, M.; Eubel, H.; Hildebrandt, T.; Lengwenaus, C.; Schertl, P.; Schwarzlander, M.; Wagner, S.; Wittig, I.; Braun, H.P. The mitochondrial complexome of Arabidopsis thaliana. *Plant J.* **2017**, *89*, 1079–1092. [[CrossRef](#)]
20. Rao, R.S.; Salvato, F.; Thal, B.; Eubel, H.; Thelen, J.J.; Moller, I.M. The proteome of higher plant mitochondria. *Mitochondrion* **2017**, *33*, 22–37. [[CrossRef](#)]
21. Waltz, F.; Nguyen, T.T.; Rive, M.; Bochler, J.; Chicher, J.; Hammann, P.; Kuhn, L.; Quadrado, M.; Mireau, H.; Hashem, Y.; et al. Small is big in Arabidopsis mitochondrial ribosome. *Nat. Plants* **2019**, *5*, 106–117. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
22. Uyttewaal, M.; Mireau, H.; Rurek, M.; Hammani, K.; Rinal, N.; Quadrado, M.; Giege, P. PPR336 is associated with polysomes in plant mitochondria. *J. Mol. Biol.* **2008**, *375*, 626–636. [[CrossRef](#)]
23. Elthon, T.E.; Nickels, R.L.; McIntosh, L. Monoclonal antibodies to the alternative oxidase of higher plant mitochondria. *Plant Physiol.* **1989**, *89*, 1311–1317. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
24. Duchêne, M.; Marechal-Drouard, L. The chloroplast-derived *trnW* and *trnM-e* genes are not expressed in Arabidopsis mitochondria. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **2001**, *285*, 1213–1216. [[CrossRef](#)]
25. Li, Z.Y.; Xu, Z.S.; He, G.Y.; Yang, G.X.; Chen, M.; Li, L.C.; Ma, Y. The voltage-dependent anion channel 1 (tVD C1) negatively regulates plant cold responses during germination and seedling development in Arabidopsis and interacts with calcium sensor CBL1. *Int. J. Mol. Sci.* **2013**, *14*, 701–713. [[CrossRef](#)]
26. Zhang, M.; Takano, T.; Liu, S.; Zhang, X. Arabidopsis mitochondrial voltage-dependent anion channel 3 (tVD C3) protein interacts with thioredoxin m2. *FEBS Lett.* **2015**, *589*, 1207–1213. [[CrossRef](#)]
27. Juszczak, I.M.; Szal, B.; Rychter, M. Oxidation-reduction and reactive oxygen species homeostasis in mutant plants with respiratory chain complex I dysfunction. *Plant Cell Environ.* **2012**, *35*, 296–307. [[CrossRef](#)]



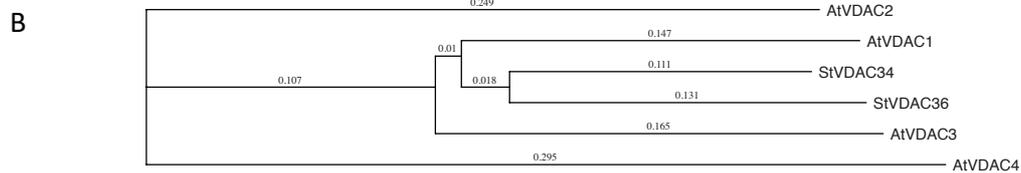
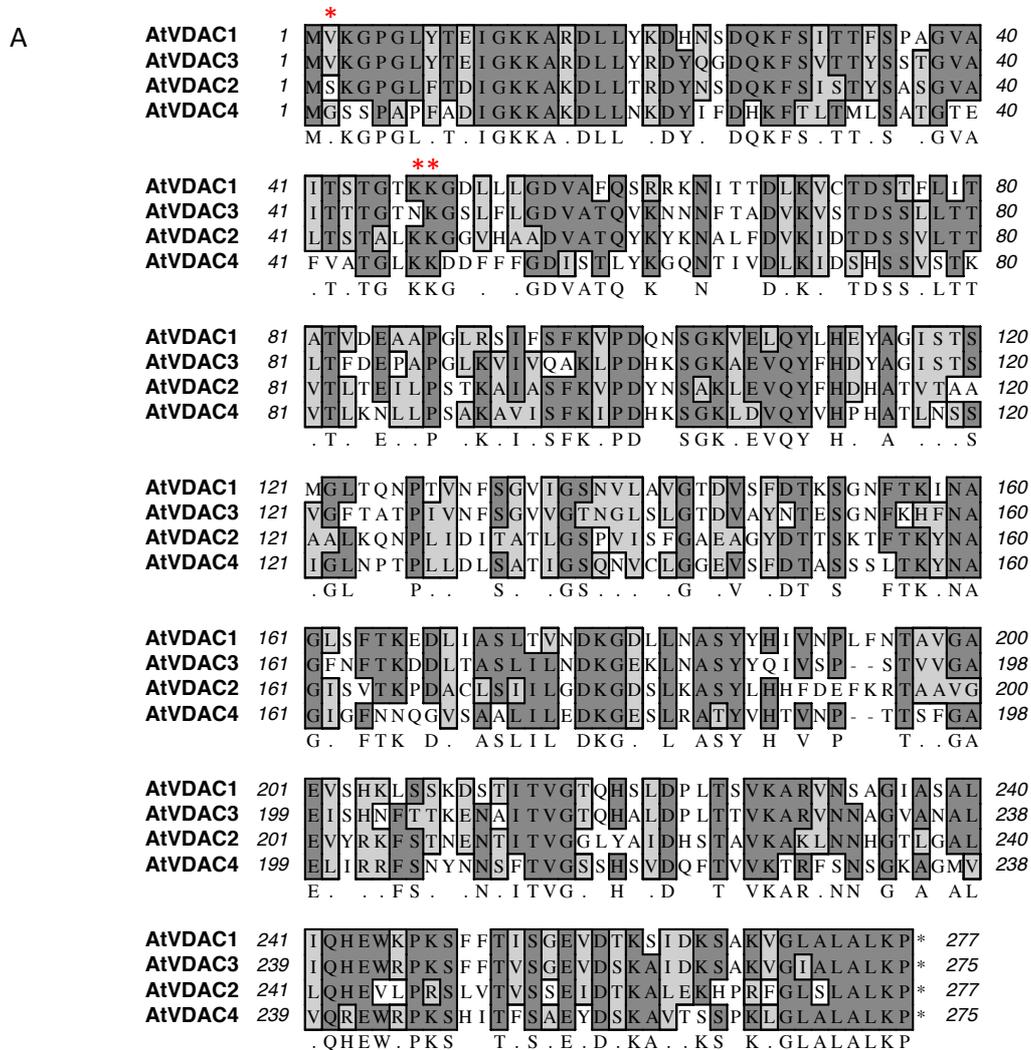
28. Saha, B.; Borovskii, G.; Panda, S.K. Alternative oxidase and plant stress tolerance. *Plant Signal. Behav.* **2016**, *11*, e1256530. [[CrossRef](#)]
29. Murcha, M.W.; Kubiszewski-Jakubiak, S.; Teixeira, P.F.; Gugel, I.L.; Kmiec, B.; Narsai, R.; Ivanova, N.; Meigel, C.; Schock, A.; Kraus, S.; et al. Plant-Specific Preprotein and Mitochondrial Transporter Proteins are Required for tRNA Import into Mitochondria. *Plant Physiol.* **2016**, *172*, 2471–2490. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
30. Misson, J.; Raghothama, K.G.; Jain, S.; Jouhet, J.; Block, M.; Bligny, R.; Ortet, P.; Crepeau, S.; Somerville, S.; Rolland, N.; et al. genome-wide transcriptional analysis using *Arabidopsis thaliana* cDNA microarray gene chips determined plant responses to phosphate deprivation. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* **2005**, *102*, 11934–11939. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
31. Plaxton, W.C.; Tran, H.T. Metabolic adaptations of phosphate-starved plants. *Plant Physiol.* **2011**, *156*, 1006–1015. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
32. Lee, S.M.; Hoang, M.H.; Han, H.J.; Kim, H.S.; Lee, K.; Kim, K.E.; Kim, D.H.; Lee, S.Y.; Chung, W.S. Pathogen inducible voltage-dependent anion channel (VDAC) isoforms are localized to mitochondria membrane in *Arabidopsis*. *Mol. Cells* **2009**, *27*, 321–327. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
33. Vincent, T.; Vingadassalon, S.; Ubrig, E.; Zeredo, K.; Srour, O.; Cognat, V.; Graindorge, S.; Salinas, T.; Marechal-Drouard, L.; Duchene, M. genome-scale analysis of mRNAs targeting to plant mitochondria: Upstream UGs in 5' untranslated regions reduce mitochondrial association. *Plant J.* **2017**, *92*, 1132–1142. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
34. Tian, L.; Chou, H.L.; Fukuda, M.; Kumamaru, T.; Okita, T.W. mRNA Localization in Plant Cells. *Plant Physiol.* **2020**, *182*, 97–109. [[CrossRef](#)] [[PubMed](#)]
35. Graham, J.W.; Williams, T.C.; Morgan, M.; Fernie, A.R.; Ratcliffe, R.G.; Sweetlove, L.J. Glycolytic enzymes associate dynamically with mitochondria in response to respiratory demand and support substrate channeling. *Plant Cell* **2007**, *19*, 3723–3738. [[CrossRef](#)]
36. Wojtera-Kwiczor, J.; Gross, F.; Leers, H.M.; Kang, M.; Schneider, M.; Scheibe, R. Transfer of a Redox-Signal through the Cytosol by Redox-Dependent Microcompartmentation of Glycolytic Enzymes at Mitochondria and Actin Cytoskeleton. *Front. Plant Sci.* **2012**, *3*, 284. [[CrossRef](#)]
37. Zhang, M.; Liu, S.; Takano, T.; Zhang, X. The interaction between tMT2b and tVDAC3 affects the mitochondrial membrane potential and reactive oxygen species generation under NaCl stress in *Arabidopsis*. *Planta* **2019**, *249*, 417–429. [[CrossRef](#)]
38. Yang, X.Y.; Chen, Z.W.; Xu, T.; Qu, Z.; Pan, X.D.; Qin, X.H.; Ren, D.T.; Liu, G.Q. *Arabidopsis* kinesin KP1 specifically interacts with VDAC3, a mitochondrial protein, and regulates respiration during seed germination at low temperature. *Plant Cell* **2011**, *23*, 1093–1106. [[CrossRef](#)]
39. Schneider, M.; Knuesting, J.; Birkholz, O.; Heinisch, J.J.; Scheibe, R. Cytosolic G6PDH as a redox-dependent regulator of energy metabolism. *BMC Plant Biol.* **2018**, *18*, 184. [[CrossRef](#)]
40. Pan, X.; Chen, Z.; Yang, X.; Liu, G. *Arabidopsis* voltage-dependent anion channel 1 (VDAC1) is required for female development and maintenance of mitochondrial functions related to energy-transaction. *PLoS ONE* **2014**, *9*, e106941. [[CrossRef](#)]



© 2020 by the authors. Licensee MDPI, Basel, Switzerland. This article is an open access article distributed under the terms and conditions of the Creative Commons Attribution (CC BY) license (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>).



**Figure S1: Sequences of AtVDAC1-4 (A) and comparison with StVDAC34 and -36 (B)**  
The red stars correspond to positions that are essential for tRNA interaction



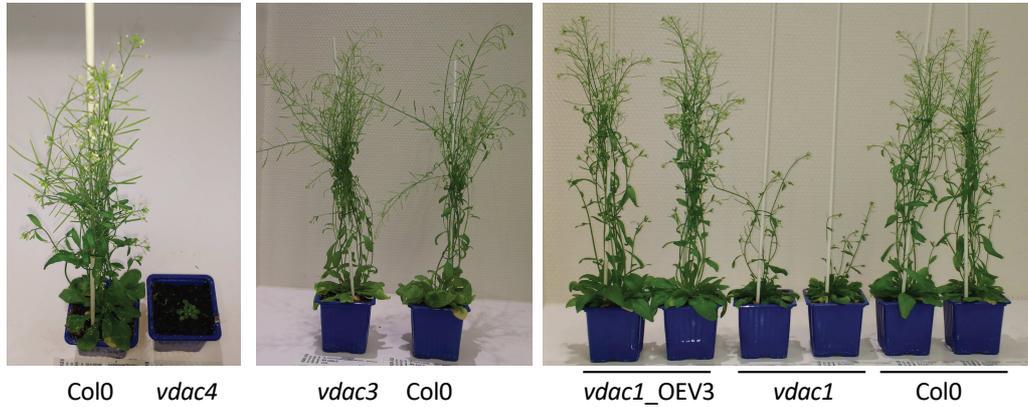
| % similarity |        |        |       |       |       |       |
|--------------|--------|--------|-------|-------|-------|-------|
| %            | VDAC34 | VDAC36 | VDAC1 | VDAC3 | VDAC2 | VDAC4 |
| VDAC34       | 100    | 92     | 86    | 82    | 68    | 65    |
| VDAC36       | 76     | 100    | 86    | 83    | 68    | 68    |
| VDAC1        | 72     | 71     | 100   | 83    | 69    | 63    |
| VDAC3        | 69     | 66     | 68    | 100   | 66    | 62    |
| VDAC2        | 52     | 48     | 50    | 49    | 100   | 65    |
| VDAC4        | 46     | 47     | 42    | 43    | 46    | 100   |

% identity

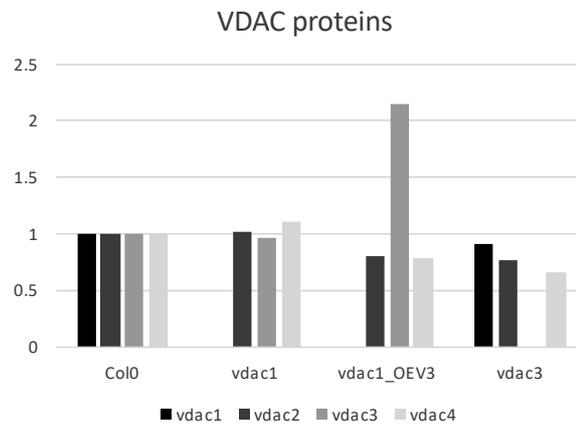


**Figure S2 : Col0 and *vdac* KO mutants**

A- Phenotypes of 7-8 weeks old plants. As already shown[4,5,7], *vdac4* phenotype is dramatic. *Vdac3* line looks like wild type. *Vdac1* plants are smaller with a delayed development, but *vdac1\_OEV3* plants are normal.



B- VDAC proteins level in mitochondria of Col0, *vdac1* and *vdac1\_OEV3* plant lines. The mean spectral count for each protein was obtained from proteomic analyses, and was normalized according to Col0. The KO of VDAC1 and VDAC3 did not induce a change in expression of other VDACs.





**Figure S3: Mitochondrial proteomes**

Proteins from purified mitochondria were analyzed by MS/MS, and spectral count label-free quantifications were performed relative to Col0. Fold change (FC) and adjusted p-value (adj-p) were calculated.

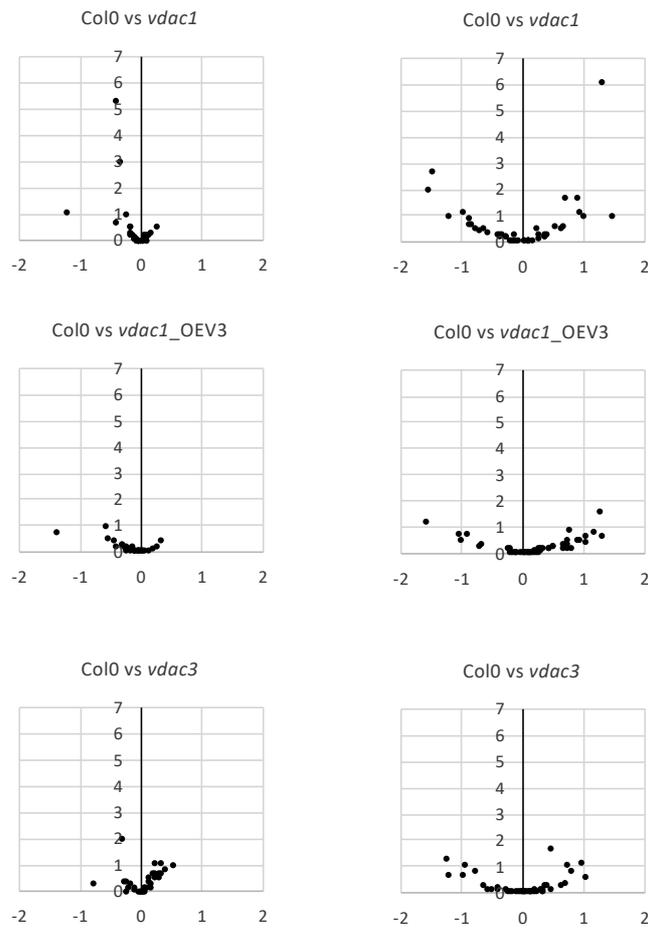
(A)  $\log_2(\text{FC})$  and  $-\log_{10}(\text{adj-p})$  values for VDAC1 and VDAC3 that are not shown on graphs in Fig. 4

(B) TCA enzymes and (C) proteins involved in RNA processing and translation. The adjusted p-value is presented on y-axis ( $-\log_{10}(\text{adj-p})$ ), and the fold change on x-axis ( $\log_2(\text{FC})$ ). Only proteins with a mean of more than 3 spectra in the most expressed condition are considered.

| A- | protein | AGI         | plant line | logFC      | $-\log(\text{adjp})$ |
|----|---------|-------------|------------|------------|----------------------|
|    | VDAC1   | AT3G01280.1 | vdac1      | -9.9228696 | 180.881798           |
|    | VDAC1   | AT3G01280.1 | vdac1_OEV3 | -10.148913 | 184.646298           |
|    | VDAC3   | AT5G15090.1 | vdac3      | -9.5751509 | 136.144034           |

**B- TCA enzymes**

**C- Proteins involved in RNA processing and translation**

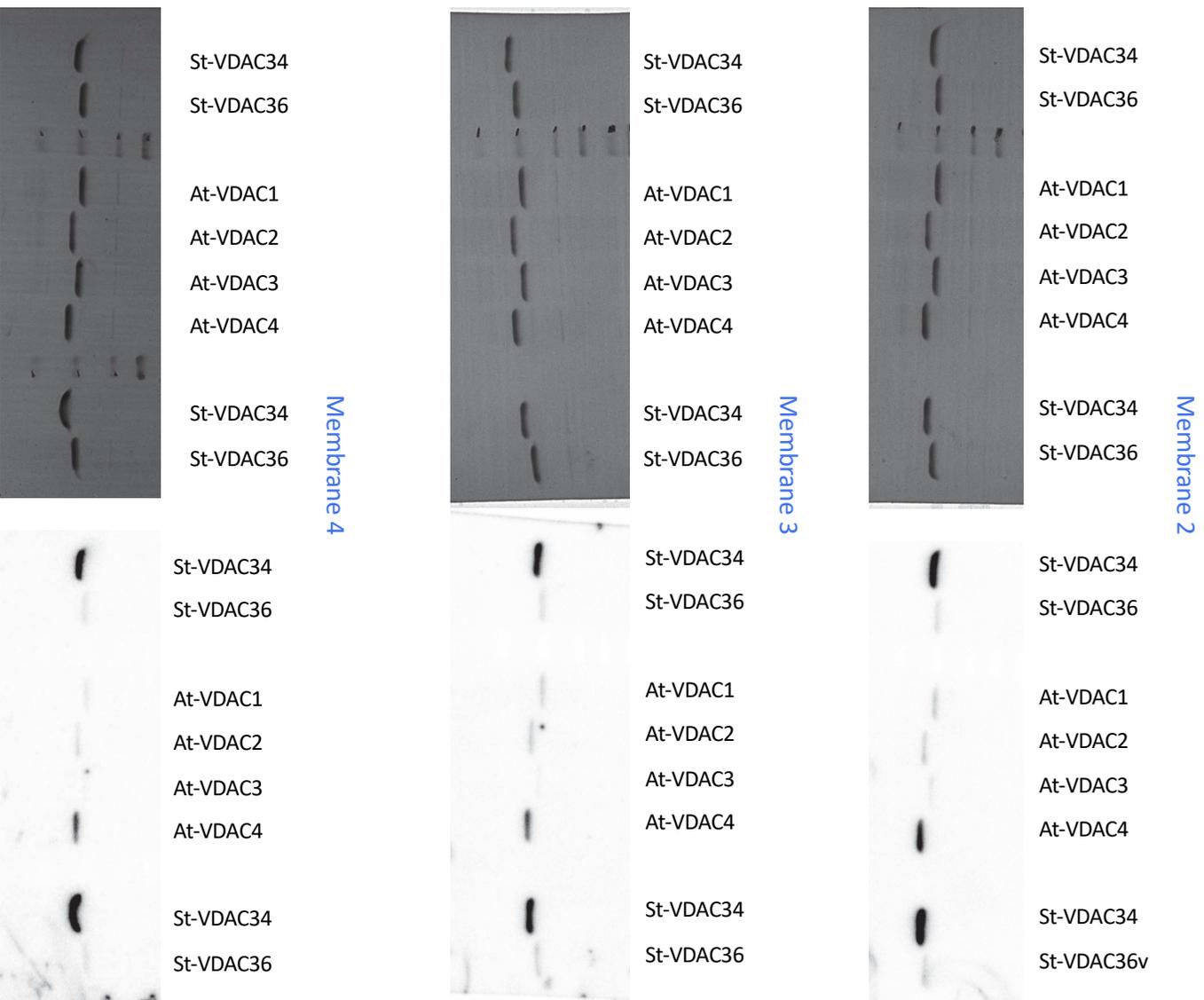




Raw data for Figure 1: Northwestern blots

A- Coomassie blue staining of the membrane

B- Northwestern blots with radioactive tRNA<sup>Ala</sup> transcript





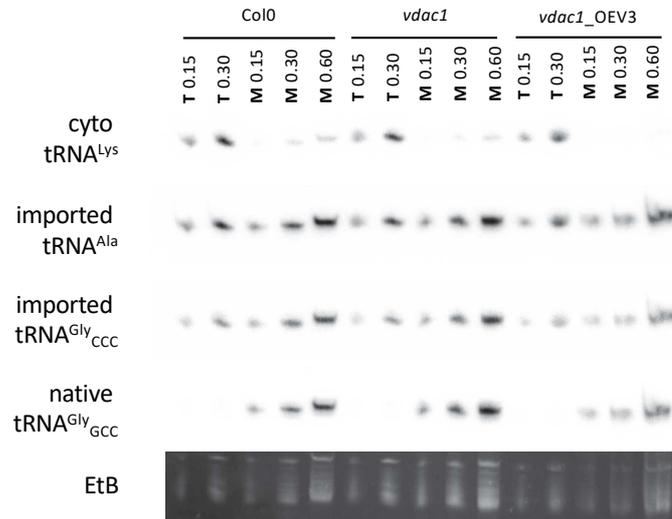
### C- quantification

| membrane | sample | lane | Coomassie staining of membrane: quantification (arbitrary units) | tRNA-Ala radioactive signal: quantification (arbitrary units) |
|----------|--------|------|--|---|
| 2        | v34    | 1    | 2704.9   | 32671.5   |
| 2        | v36    | 2    | 2236.0   | 1967.2  |
| 2        | v1     | 3    | 2495.9   | 2947.9  |
| 2        | v2     | 4    | 2055.4   | 2474.4  |
| 2        | v3     | 5    | 2363.9   | 1077.7  |
| 2        | v4     | 6    | 2923.1   | 20955.6   |
| 2        | v34    | 7    | 3009.9   | 38094.5   |
| 2        | v36    | 8    | 2595.6   | 2915.7  |
| 3        | v34    | 1    | 2476.4   | 30075.5   |
| 3        | v36    | 2    | 2706.0   | 2033.4  |
| 3        | v1     | 3    | 2420.2   | 2394.1  |
| 3        | v2     | 4    | 2005.4   | 3242.5  |
| 3        | v3     | 5    | 2392.1   | 566.3   |
| 3        | v4     | 6    | 2846.2   | 13672.6   |
| 3        | v34    | 7    | 2787.8   | 31684.4   |
| 3        | v36    | 8    | 2722.3   | 2941.0  |
| 4        | v34    | 1    | 2452.3   | 31305.2   |
| 4        | v36    | 2    | 2231.5   | 3817.4  |
| 4        | v1     | 3    | 2362.2   | 2459.3  |
| 4        | v2     | 4    | 1692.4   | 3271.0  |
| 4        | v3     | 5    | 2547.0   | 448.9   |
| 4        | v4     | 6    | 2730.1   | 18311.6   |
| 4        | v34    | 7    | 3709.6   | 42541.9   |
| 4        | v36    | 8    | 2364.5   | 4524.7  |

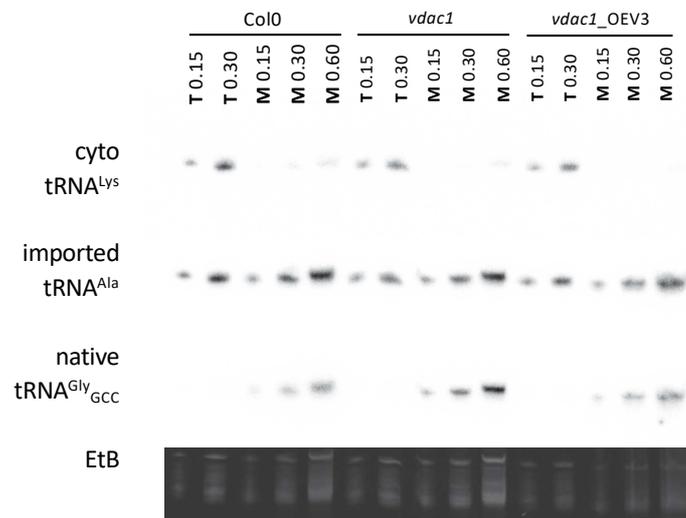


Raw data for Figure 2: Northern blots

Membrane NB02:



Membrane NB03:





Raw data for Figure 2: quantification

| NB   | microg | lignée             | extrait | mito Gly  | imported Ala | cyto Lys | imported Gly |
|------|--------|--------------------|---------|-----------|--------------|----------|--------------|
| NB02 | 0.15   | Col0               | cyto    | 388496    |              | 4613787  | 2410440      |
| NB02 | 0.3    | Col0               | cyto    | 942384    | 2766520      | 11981621 | 6630624      |
| NB02 | 0.15   | Col0               | mito    | 7276139   | 1095295      | 342626   | 3280330      |
| NB02 | 0.3    | Col0               | mito    | 17402589  | 2569583      | 1126957  | 9481583      |
| NB02 | 0.6    | Col0               | mito    | 30999370  | 4639728      | 2432013  | 16143623     |
| NB02 | 0.15   | <i>vdac1</i>       | cyto    | 414787    | 1258027      | 4221895  | 2122389      |
| NB02 | 0.3    | <i>vdac1</i>       | cyto    | 884080    | 2410254      | 10617612 | 5942374      |
| NB02 | 0.15   | <i>vdac1</i>       | mito    | 9533721   | 1160934      | 227315   | 3690952      |
| NB02 | 0.3    | <i>vdac1</i>       | mito    | 21610449  | 2537812      | 568897   | 8903140      |
| NB02 | 0.6    | <i>vdac1</i>       | mito    | 41177915  | 4909016      | 1522434  | 18132908     |
| NB02 | 0.15   | <i>vdac1</i> _OEV3 | cyto    | 352179    | 959623       | 3243513  | 1703176      |
| NB02 | 0.3    | <i>vdac1</i> _OEV3 | cyto    | 600893    | 2586915      | 9906286  | 5066745      |
| NB02 | 0.15   | <i>vdac1</i> _OEV3 | mito    | 7504364   | 1448023      | 164884   | 2988675      |
| NB02 | 0.3    | <i>vdac1</i> _OEV3 | mito    | 12724345  | 2096905      | 208011   | 4866984      |
| NB02 | 0.6    | <i>vdac1</i> _OEV3 | mito    | 35478324  | 5756270      | 716973   | 15917821     |
| NB03 | 0.15   | Col0               | cyto    | 232113    | 4914684      | 8494841  |              |
| NB03 | 0.3    | Col0               | cyto    | 915820    | 17835080     | 37137300 |              |
| NB03 | 0.15   | Col0               | mito    | 7309319   | 5191706      | 1072435  |              |
| NB03 | 0.3    | Col0               | mito    | 26384769  | 14933578     | 2682995  |              |
| NB03 | 0.6    | Col0               | mito    | 59373203  | 28586592     | 5876823  |              |
| NB03 | 0.15   | <i>vdac1</i>       | cyto    | 590746    | 5676120      | 10606466 |              |
| NB03 | 0.3    | <i>vdac1</i>       | cyto    | 918224    | 12332363     | 25581276 |              |
| NB03 | 0.15   | <i>vdac1</i>       | mito    | 14439183  | 5166538      | 802088   |              |
| NB03 | 0.3    | <i>vdac1</i>       | mito    | 45276172  | 12428440     | 1322948  |              |
| NB03 | 0.6    | <i>vdac1</i>       | mito    | 100804977 | 24869645     | 3508463  |              |
| NB03 | 0.15   | <i>vdac1</i> _OEV3 | cyto    | 471862    | 5628948      | 8996178  |              |
| NB03 | 0.3    | <i>vdac1</i> _OEV3 | cyto    | 636347    | 12291468     | 23904685 |              |
| NB03 | 0.15   | <i>vdac1</i> _OEV3 | mito    | 8334093   | 3936156      | 532571   |              |
| NB03 | 0.3    | <i>vdac1</i> _OEV3 | mito    | 31704297  | 12855667     | 901824   |              |
| NB03 | 0.6    | <i>vdac1</i> _OEV3 | mito    | 77112474  | 29036564     | 2224320  |              |







Raw data for Figure 5: in nmol O<sub>2</sub> / min /100 mg seedlings

| Raw Data (in nmol O <sub>2</sub> / min /100 mg seedlings) |   |                   |       |                    |
|---|---|-------------------|-------|--------------------|
| day   | # | line              | Total | After KCN addition |
| d1  | a | Col0              | 21.06 | 6.29               |
| d1  | a | <i>vdac1</i>      | 16.20 | 7.21               |
| d1  | a | <i>vdac1_OEV3</i> | 15.59 | 5.55               |
| d1  | a | <i>vdac3</i>      | 17.03 | 5.40               |
| d2  | a | Col0              | 14.63 | 4.58               |
| d2  | b | Col0              | 11.57 | 5.91               |
| d2  | a | <i>vdac1_OEV3</i> | 10.43 | 5.55               |
| d2  | a | <i>vdac1</i>      | 13.94 | 6.81               |
| d2  | b | <i>vdac1</i>      | 13.37 | 8.22               |
| d2  | a | <i>vdac3</i>      | 11.44 | 8.07               |
| d3  | a | Col0              | 17.05 | 6.15               |
| d3  | b | Col0              | 14.03 | 5.03               |
| d3  | a | <i>vdac1_OEV3</i> | 10.99 | 4.97               |
| d3  | a | <i>vdac1</i>      | 12.68 | 6.08               |
| d3  | b | <i>vdac1</i>      | 10.26 | 7.64               |
| d3  | a | <i>vdac3</i>      | 11.56 | 5.63               |



## BIBLIOGRAPHIE



Ando, T., Yamayoshi, S., Tomita, Y., Watanabe, S., Watanabe, T., and Kawaoka, Y. (2016). The host protein CLUH participates in the subnuclear transport of influenza virus ribonucleoprotein complexes. *Nat. Microbiol.* *1*, 16062.

Andréasson, C., Ott, M., and Büttner, S. (2019). Mitochondria orchestrate proteostatic and metabolic stress responses. *EMBO Rep.* *20*, e47865.

Arimura, S.-I. (2018). Fission and Fusion of Plant Mitochondria, and Genome Maintenance. *Plant Physiol.* *176*, 152–161.

Ayabe, H., Kawai, N., Shibamura, M., Fukao, Y., Fujimoto, M., Tsutsumi, N., and Arimura, S. (2021). FMT, a protein that affects mitochondrial distribution, interacts with translation-related proteins in *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Rep.* *40*, 327–337.

Baker, M.J., Frazier, A.E., Gulbis, J.M., and Ryan, M.T. (2007). Mitochondrial protein-import machinery: correlating structure with function. *Trends Cell Biol.* *17*, 456–464.

Bakkum, A.L., and Hill, R.B. (2017). Removal of a consensus proline is not sufficient to allow tetratricopeptide repeat oligomerization. *Protein Sci.* *26*, 1974–1983.

Birnboim, H.C., and Doly, J. (1979). A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res.* *7*, 1513–1523.

Bradford, M.M. (1976). A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.* *72*, 248–254.

Broda, M., Millar, A.H., and Van Aken, O. (2018). Mitophagy: A Mechanism for Plant Growth and Survival. *Trends Plant Sci.* *23*, 434–450.

Bykov, Y.S., Rapaport, D., Herrmann, J.M., and Schuldiner, M. (2020). Cytosolic Events in the Biogenesis of Mitochondrial Proteins. *Trends Biochem. Sci.* *45*, 650–667.

Chicois, C., Scheer, H., Garcia, S., Zuber, H., Mutterer, J., Chicher, J., Hammann, P., Gagliardi, D., and Garcia, D. (2018). The UPF1 interactome reveals interaction networks between RNA degradation and translation repression factors in *Arabidopsis*. *Plant J.* *96*, 119–132.

Cho, E., Jung, W., Joo, H.-Y., Park, E.-R., Kim, M.-Y., Kim, S.-B., Kim, K.S., Lim, Y. Bin, Lee, K.H., and Shin, H.J. (2019). Cluh plays a pivotal role during adipogenesis by regulating the activity of



mitochondria. *Sci. Rep.* **9**, 6820.

Clough, S.J., and Bent, A.F. (1998). Floral dip: a simplified method for *Agrobacterium*-mediated transformation of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* **16**, 735–743.

Cogliati, S., Enriquez, J.A., and Scorrano, L. (2016). Mitochondrial Cristae: Where Beauty Meets Functionality. *Trends Biochem. Sci.* **41**, 261–273.

Colombatti, F., Gonzalez, D.H., and Welchen, E. (2014). Plant mitochondria under pathogen attack: a sigh of relief or a last breath? *Mitochondrion* **19 Part B**, 238–244.

Cox, R.T., and Spradling, A.C. (2009). clueless, a conserved *Drosophila* gene required for mitochondrial subcellular localization, interacts genetically with parkin. *Dis. Model. Mech.* **2**, 490–499.

Crouch, S.P.M., Kozlowski, R., Slater, K.J., and Fletcher, J. (1993). The use of ATP bioluminescence as a measure of cell proliferation and cytotoxicity. *J. Immunol. Methods* **160**, 81–88.

Crowley, K.S., and Payne, R.M. (1998). Ribosome Binding to Mitochondria Is Regulated by GTP and the Transit Peptide. *J. Biol. Chem.* **273**, 17278–17285.

Curtis, M.D., and Grossniklaus, U. (2003). A gateway cloning vector set for high-throughput functional analysis of genes in planta. *Plant Physiol.* **133**, 462–469.

Czachor, A., Failla, A., Lockey, R., and Kolliputi, N. (2016). Pivotal role of AKAP121 in mitochondrial physiology. *Am. J. Physiol. Physiol.* **310**, C625–C628.

Dard, L., Blanchard, W., Hubert, C., Lacombe, D., and Rossignol, R. (2020). Mitochondrial functions and rare diseases. *Mol. Aspects Med.* **71**, 100842.

Del Alamo, M., Hogan, D.J., Pechmann, S., Albanese, V., Brown, P.O., and Frydman, J. (2011). Defining the specificity of cotranslationally acting chaperones by systematic analysis of mRNAs associated with ribosome-nascent chain complexes. *PLoS Biol.* **9**, e1001100.

Diaz-Ruiz, R., Rigoulet, M., and Devin, A. (2011). The Warburg and Crabtree effects: On the origin of cancer cell energy metabolism and of yeast glucose repression. *Biochim. Biophys. Acta - Bioenerg.* **1807**, 568–576.



Doan, K.N., Grevel, A., Mårtensson, C.U., Ellenrieder, L., Thornton, N., Wenz, L.-S., Opaliński, Ł., Guiard, B., Pfanner, N., and Becker, T. (2020). The Mitochondrial Import Complex MIM Functions as Main Translocase for  $\alpha$ -Helical Outer Membrane Proteins. *Cell Rep.* *31*, 107567.

Doudna, J.A., and Charpentier, E. (2014). Genome editing. The new frontier of genome engineering with CRISPR-Cas9. *Science* *346*, 1258096.

Edwards, K., Johnstone, C., and Thompson, C. (1991). A simple and rapid method for the preparation of plant genomic DNA for PCR analysis. *Nucleic Acids Res.* *19*, 1349.

Egea, G., Izquierdo, J.M., Ricart, J., Martin, C.S., and Cuezva, J.M. (1997). mRNA encoding the  $\beta$ -subunit of the mitochondrial F1-ATPase complex is a localized mRNA in rat hepatocytes. *Biochem. J.* *322*, 557–565.

Eliyahu, E., Pnueli, L., Melamed, D., Scherrer, T., Gerber, A.P., Pines, O., Rapaport, D., and Arava, Y. (2010). Tom20 Mediates Localization of mRNAs to Mitochondria in a Translation-Dependent Manner. *Mol. Cell. Biol.* *30*, 284–294.

Elthon, T.E., Nickels, R.L., and McIntosh, L. (1989). Monoclonal Antibodies to the Alternative Oxidase of Higher Plant Mitochondria. *Plant Physiol.* *89*, 1311–1317.

El Zawily, A.M., Schwarzlander, M., Finkemeier, I., Johnston, I.G., Benamar, A., Cao, Y., Gissot, C., Meyer, A.J., Wilson, K., Datla, R., et al. (2014). FRIENDLY Regulates Mitochondrial Distribution, Fusion, and Quality Control in Arabidopsis. *Plant Physiol.* *166*, 808–828.

Estaquier, J., Vallette, F., Vayssiere, J.-L., and Mignotte, B. (2012). The Mitochondrial Pathways of Apoptosis. In *Advances in Experimental Medicine and Biology*, pp. 157–183.

Facucho-Oliveira, J.M., Alderson, J., Spikings, E.C., Egginton, S., and St John, J.C. (2007). Mitochondrial DNA replication during differentiation of murine embryonic stem cells. *J. Cell Sci.* *120*, 4025–4034.

Fazal, F.M., Han, S., Parker, K.R., Kaewsapsak, P., Xu, J., Boettiger, A.N., Chang, H.Y., and Ting, A.Y. (2019). Atlas of Subcellular RNA Localization Revealed by APEX-Seq. *Cell* *178*, 473–490.e26.

Fields, S.D., Conrad, M.N., and Clarke, M. (1998). The *S. cerevisiae* CLU1 and *D. discoideum* cluA genes are functional homologues that influence mitochondrial morphology and



distribution. *J. Cell Sci.* *111*, 1717–1727.

Fields, S.D., Arana, Q., Heuser, J., and Clarke, M. (2002). Mitochondrial membrane dynamics are altered in *cluA*- mutants of *Dictyostelium*. *J. Muscle Res. Cell Motil.* *23*, 829–838.

Gabrovsek, L., Collins, K.B., Aggarwal, S., Saunders, L.M., Lau, H.-T., Suh, D., Sancak, Y., Trapnell, C., Ong, S.-E., Smith, F.D., et al. (2020). A-kinase-anchoring protein 1 (dAKAP1)-based signaling complexes coordinate local protein synthesis at the mitochondrial surface. *J. Biol. Chem.* *295*, 10749–10765.

Gadir, N., Haim-Vilmovsky, L., Kraut-Cohen, J., and Gerst, J.E. (2011). Localization of mRNAs coding for mitochondrial proteins in the yeast *Saccharomyces cerevisiae*. *RNA* *17*, 1551–1565.

Gamerding, M., Hanebuth, M.A., Frickey, T., and Deuerling, E. (2015). The principle of antagonism ensures protein targeting specificity at the endoplasmic reticulum. *Science* (80-). *348*, 201–207.

Gao, J., Schatton, D., Martinelli, P., Hansen, H., Pla-Martin, D., Barth, E., Becker, C., Altmueller, J., Frommolt, P., Sardiello, M., et al. (2014). CLUH regulates mitochondrial biogenesis by binding mRNAs of nuclear-encoded mitochondrial proteins. *J. Cell Biol.* *207*, 213–223.

García-Rodríguez, L.J., Gay, A.C., and Pon, L.A. (2007). Puf3p, a Pumilio family RNA binding protein, localizes to mitochondria and regulates mitochondrial biogenesis and motility in budding yeast. *J. Cell Biol.* *176*, 197–207.

Garcia, M., Darzacq, X., Delaveau, T., Jourden, L., Singer, R.H., and Jacq, C. (2007). Mitochondria-associated Yeast mRNAs and the Biogenesis of Molecular Complexes. *Mol. Biol. Cell* *18*, 362–368.

Gardeström, P., and Igamberdiev, A.U. (2016). The origin of cytosolic ATP in photosynthetic cells. *Physiol. Plant.* *157*, 367–379.

Gehrke, S., Wu, Z., Klinkenberg, M., Sun, Y., Auburger, G., Guo, S., and Lu, B. (2015). PINK1 and parkin control localized translation of respiratory chain component mRNAs on mitochondria outer membrane. *Cell Metab.* *21*, 95–108.

George, R., Beddoe, T., Landl, K., and Lithgow, T. (1998). The yeast nascent polypeptide-associated complex initiates protein targeting to mitochondria in vivo. *Proc. Natl. Acad. Sci.*



95, 2296–2301.

Gerber, A.P., Herschlag, D., and Brown, P.O. (2004). Extensive association of functionally and cytotoptically related mRNAs with Puf family RNA-binding proteins in yeast. *PLoS Biol.* 2, E79.

Gibson, D.G., Young, L., Chuang, R.-Y., Venter, J.C., Hutchison, C.A., and Smith, H.O. (2009). Enzymatic assembly of DNA molecules up to several hundred kilobases. *Nat. Methods* 6, 343–345.

Giegé, P., Heazlewood, J.L., Roessner-Tunali, U., Millar, A.H., Fernie, A.R., Leaver, C.J., and Sweetlove, L.J. (2003). Enzymes of glycolysis are functionally associated with the mitochondrion in Arabidopsis cells. *Plant Cell* 15, 2140–2151.

Ginsberg, M.D., Feliciello, A., Jones, J.K., Avvedimento, E. V., and Gottesman, M.E. (2003). PKA-dependent Binding of mRNA to the Mitochondrial AKAP121 Protein. *J. Mol. Biol.* 327, 885–897.

Gold, V.A., Chrosicki, P., Bragoszewski, P., and Chacinska, A. (2017). Visualization of cytosolic ribosomes on the surface of mitochondria by electron cryo-tomography. *EMBO Rep.* 18, 1786–1800.

Hanein, S., Garcia, M., Fares-Taie, L., Serre, V., De Keyzer, Y., Delaveau, T., Perrault, I., Delphin, N., Gerber, S., Schmitt, A., et al. (2013). TMEM126A is a mitochondrial located mRNA (MLR) protein of the mitochondrial inner membrane. *Biochim. Biophys. Acta - Gen. Subj.* 1830, 3719–3733.

Hemond, M., Ubrig, É., Azeredo, K., Salinas-Giegé, T., Drouard, L., and Duchêne, A.-M. (2020). Arabidopsis Voltage-Dependent Anion Channels (VDACs): Overlapping and Specific Functions in Mitochondria. *Cells* 9, 1023.

Inoue, H., Nojima, H., and Okayama, H. (1990). High efficiency transformation of Escherichia coli with plasmids. *Gene* 96, 23–28.

Jacobs, J.L., and Coyne, C.B. (2013). Mechanisms of MAVS Regulation at the Mitochondrial Membrane. *J. Mol. Biol.* 425, 5009–5019.

Jao, D.L.-E., and Chen, K.Y. (2006). Tandem affinity purification revealed the hypusine-dependent binding of eukaryotic initiation factor 5A to the translating 80S ribosomal complex.



J. Cell. Biochem. 97, 583–598.

Jiang, H., Guan, W., and Gu, Z. (2010). Tinkering Evolution of Post-Transcriptional RNA Regulons: Puf3p in Fungi as an Example. *PLoS Genet.* 6, e1001030.

Kaltimbacher, V. (2006). mRNA localization to the mitochondrial surface allows the efficient translocation inside the organelle of a nuclear recoded ATP6 protein. *RNA* 12, 1408–1417.

Kamalian, L., Douglas, O., Jolly, C.E., Snoeys, J., Simic, D., Monshouwer, M., Williams, D.P., Park, B.K., and Chadwick, A.E. (2019). Acute Metabolic Switch Assay Using Glucose/Galactose Medium in HepaRG Cells to Detect Mitochondrial Toxicity. *Curr. Protoc. Toxicol.* 80, e76.

Karimi, M., Inzé, D., and Depicker, A. (2002). GATEWAY vectors for Agrobacterium-mediated plant transformation. *Trends Plant Sci.* 7, 193–195.

Katzen, F. (2007). Gateway<sup>®</sup> recombinational cloning: a biological operating system. *Expert Opin. Drug Discov.* 2, 571–589.

Kejiou, N.S., and Palazzo, A.F. (2017). mRNA localization as a rheostat to regulate subcellular gene expression. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* 8, e1416.

Kellems, R.E., Allison, V.F., and Butow, R.A. (1975). Cytoplasmic type 80S ribosomes associated with yeast mitochondria. IV. Attachment of ribosomes to the outer membrane of isolated mitochondria. *J. Cell Biol.* 65, 1–14.

Kern, D.M., Monda, J.K., Su, K.-C., Wilson-Kubalek, E.M., and Cheeseman, I.M. (2017). Astrin-SKAP complex reconstitution reveals its kinetochore interaction with microtubule-bound Ndc80. *Elife* 6, e26866.

Kim, D.I., Jensen, S.C., Noble, K.A., Kc, B., Roux, K.H., Motamedchaboki, K., and Roux, K.J. (2016). An improved smaller biotin ligase for BioID proximity labeling. *Mol. Biol. Cell* 27, 1188–1196.

Lai, W.S., Arvola, R.M., Goldstrohm, A.C., and Blackshear, P.J. (2019). Inhibiting transcription in cultured metazoan cells with actinomycin D to monitor mRNA turnover. *Methods* 155, 77–87.

Lapointe, C.P., Stefely, J.A., Jochem, A., Hutchins, P.D., Wilson, G.M., Kwiecien, N.W., Coon, J.J., Wickens, M., and Pagliarini, D.J. (2018). Multi-omics Reveal Specific Targets of the RNA-



Binding Protein Puf3p and Its Orchestration of Mitochondrial Biogenesis. *Cell Syst.* *6*, 125-135.e6.

Larkin, R.M., Stefano, G., Ruckle, M.E., Stavoe, A.K., Sinkler, C.A., Brandizzi, F., Malmstrom, C.M., and Osteryoung, K.W. (2016). REDUCED CHLOROPLAST COVERAGE genes from *Arabidopsis thaliana* help to establish the size of the chloroplast compartment. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* *113*, E1116-25.

Lee, D., Ohn, T., Chiang, Y.-C., Quigley, G., Yao, G., Liu, Y., and Denis, C.L. (2010). PUF3 Acceleration of Deadenylation in Vivo Can Operate Independently of CCR4 Activity, Possibly Involving Effects on the PAB1–mRNP Structure. *J. Mol. Biol.* *399*, 562–575.

Lelandais, G., Saint-Georges, Y., Geneix, C., Al-Shikhley, L., Dujardin, G., and Jacq, C. (2009). Spatio-temporal dynamics of yeast mitochondrial biogenesis: transcriptional and post-transcriptional mRNA oscillatory modules. *PLoS Comput. Biol.* *5*, e1000409.

Lesnik, C., Cohen, Y., Atir-Lande, A., Schuldiner, M., and Arava, Y. (2014). OM14 is a mitochondrial receptor for cytosolic ribosomes that supports co-translational import into mitochondria. *Nat. Commun.* *5*, 5711.

Liberatore, K.L., Dukowic-Schulze, S., Miller, M.E., Chen, C., and Kianian, S.F. (2016). The role of mitochondria in plant development and stress tolerance. *Free Radic. Biol. Med.* *100*, 238–256.

Lin, A.C., and Holt, C.E. (2007). Local translation and directional steering in axons. *EMBO J.* *26*, 3729–3736.

Logan, D.C. (2006). Plant mitochondrial dynamics. *Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell Res.* *1763*, 430–441.

Logan, D.C. (2007). The mitochondrial compartment. *J. Exp. Bot.* *58*, 1225–1243.

Logan, D.C. (2010). Mitochondrial fusion, division and positioning in plants. *Biochem. Soc. Trans.* *38*, 789–795.

Logan, D.C., Scott, I., and Tobin, A.K. (2003). The genetic control of plant mitochondrial morphology and dynamics. *Plant J.* *36*, 500–509.

Love, M.I., Huber, W., and Anders, S. (2014). Moderated estimation of fold change and



dispersion for RNA-seq data with DESeq2. *Genome Biol.* *15*, 550.

Lyabin, D.N., Eliseeva, I.A., and Ovchinnikov, L.P. (2014). YB-1 protein: functions and regulation. *Wiley Interdiscip. Rev. RNA* *5*, 95–110.

Ma, J., Liang, Z., Zhao, J., Wang, P., Ma, W., Fernandez Andrade, J., Zeng, Y., Grujic, N., Jiang, L., Dagdas, Y., et al. (2020). Friendly regulates membrane depolarization induced mitophagy in *Arabidopsis*. *BioRxiv*.

MacKenzie, J.A., and Payne, R.M. (2004). Ribosomes Specifically Bind to Mammalian Mitochondria via Protease-sensitive Proteins on the Outer Membrane. *J. Biol. Chem.* *279*, 9803–9810.

Marc, P., Margeot, A., Devaux, F., Blugeon, C., Corral-Debrinski, M., and Jacq, C. (2002). Genome-wide analysis of mRNAs targeted to yeast mitochondria. *EMBO Rep.* *3*, 159–164.

Margeot, A. (2002). In *Saccharomyces cerevisiae*, ATP2 mRNA sorting to the vicinity of mitochondria is essential for respiratory function. *EMBO J.* *21*, 6893–6904.

Martin, K.C., and Ephrussi, A. (2009). mRNA Localization: Gene Expression in the Spatial Dimension. *Cell* *136*, 719–730.

Matsumoto, S., Uchiumi, T., Saito, T., Yagi, M., Takazaki, S., Kanki, T., and Kang, D. (2012). Localization of mRNAs encoding human mitochondrial oxidative phosphorylation proteins. *Mitochondrion* *12*, 391–398.

Meyer, E.H., Welchen, E., and Carrie, C. (2019). Assembly of the Complexes of the Oxidative Phosphorylation System in Land Plant Mitochondria. *Annu. Rev. Plant Biol.* *70*, 23–50.

Michaud, M., Maréchal-Drouard, L., and Duchêne, A.M. (2010). RNA trafficking in plant cells: Targeting of cytosolic mRNAs to the mitochondrial surface. *Plant Mol. Biol.* *73*, 697–704.

Michaud, M., Ubrig, E., Filleur, S., Erhardt, M., Ephritikhine, G., Marechal-Drouard, L., and Duchene, A.-M. (2014a). Differential targeting of VDAC3 mRNA isoforms influences mitochondria morphology. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *111*, 8991–8996.

Michaud, M., Maréchal-Drouard, L., and Duchêne, A.M. (2014b). Targeting of cytosolic mRNA to mitochondria: Naked RNA can bind to the mitochondrial surface. *Biochimie* *100*, 159–166.



- Mishra, P., and Chan, D.C. (2016). Metabolic regulation of mitochondrial dynamics. *J. Cell Biol.* *212*, 379–387.
- Mitchell, S.F., Jain, S., She, M., and Parker, R. (2013). Global analysis of yeast mRNPs. *Nat. Struct. Mol. Biol.* *20*, 127–133.
- Murcha, M.W., Kmiec, B., Kubiszewski-Jakubiak, S., Teixeira, P.F., Glaser, E., and Whelan, J. (2014). Protein import into plant mitochondria: signals, machinery, processing, and regulation. *J. Exp. Bot.* *65*, 6301–6335.
- Murphy, M.P. (2009). How mitochondria produce reactive oxygen species. *Biochem. J.* *417*, 1–13.
- Nakamura, S., Hagihara, S., Otomo, K., Ishida, H., Hidema, J., Nemoto, T., and Izumi, M. (2020). Autophagy contributes to quality control of leaf mitochondria. *Plant Cell Physiol.*
- Narendra, D., Tanaka, A., Suen, D.-F., and Youle, R.J. (2008). Parkin is recruited selectively to impaired mitochondria and promotes their autophagy. *J. Cell Biol.* *183*, 795–803.
- Narendra, D.P., Jin, S.M., Tanaka, A., Suen, D.-F., Gautier, C.A., Shen, J., Cookson, M.R., and Youle, R.J. (2010). PINK1 is selectively stabilized on impaired mitochondria to activate Parkin. *PLoS Biol.* *8*, e1000298.
- Ngondo, R.P., Cirera-Salinas, D., Yu, J., Wischnewski, H., Bodak, M., Vandormael-Pournin, S., Geiselmann, A., Wettstein, R., Luitz, J., Cohen-Tannoudji, M., et al. (2018). Argonaute 2 Is Required for Extra-embryonic Endoderm Differentiation of Mouse Embryonic Stem Cells. *Stem Cell Reports* *10*, 461–476.
- Nicastro, G., Taylor, I.A., and Ramos, A. (2015). KH–RNA interactions: back in the groove. *Curr. Opin. Struct. Biol.* *30*, 63–70.
- Nicolai, M., Duprat, A., Sormani, R., Rodriguez, C., Roncato, M.-A., Rolland, N., and Robaglia, C. (2007). Higher plant chloroplasts import the mRNA coding for the eucaryotic translation initiation factor 4E. *FEBS Lett.* *581*, 3921–3926.
- Niles, A.L., Moravec, R.A., Eric Hesselberth, P., Scurria, M.A., Daily, W.J., and Riss, T.L. (2007). A homogeneous assay to measure live and dead cells in the same sample by detecting different protease markers. *Anal. Biochem.* *366*, 197–206.



Ortega, A.D., Willers, I.M., Sala, S., and Cuezva, J.M. (2010). Human G3BP1 interacts with -F1-ATPase mRNA and inhibits its translation. *J. Cell Sci.* *123*, 2685–2696.

Park, E., Lee, H.-Y., Woo, J., Choi, D., and Dinesh-Kumar, S.P. (2017). Spatiotemporal Monitoring of *Pseudomonas syringae* Effectors via Type III Secretion Using Split Fluorescent Protein Fragments. *Plant Cell* *29*, 1571–1584.

Peeters, N.M., Chapron, A., Giritch, A., Grandjean, O., Lancelin, D., Lhomme, T., Vivrel, A., and Small, I. (2000). Duplication and quadruplication of *Arabidopsis thaliana* cysteinyl- and asparaginyl-tRNA synthetase genes of organellar origin. *J. Mol. Evol.* *50*, 413–423.

Pfanner, N., Warscheid, B., and Wiedemann, N. (2019). Mitochondrial proteins: from biogenesis to functional networks. *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* *20*, 267–284.

Pivovarova, N.B., and Andrews, S.B. (2010). Calcium-dependent mitochondrial function and dysfunction in neurons. *FEBS J.* *277*, 3622–3636.

Pla-Martín, D., Schatton, D., Wiederstein, J.L., Marx, M., Khiati, S., Krüger, M., and Rugarli, E.I. (2020). CLUH granules coordinate translation of mitochondrial proteins with mTORC1 signaling and mitophagy. *EMBO J.* *39*, e102731.

Popoff, V., Adolf, F., Brugger, B., and Wieland, F. (2011). COPI Budding within the Golgi Stack. *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* *3*, a005231–a005231.

Pringle, E.S., McCormick, C., and Cheng, Z. (2019). Polysome Profiling Analysis of mRNA and Associated Proteins Engaged in Translation. *Curr. Protoc. Mol. Biol.* *125*, e79.

Ravera, S., Podestà, M., Sabatini, F., Fresia, C., Columbaro, M., Bruno, S., Fulcheri, E., Ramenghi, L.A., and Frassoni, F. (2018). Mesenchymal stem cells from preterm to term newborns undergo a significant switch from anaerobic glycolysis to the oxidative phosphorylation. *Cell. Mol. Life Sci.* *75*, 889–903.

Robert, N., D'Erfurth, I., Marmagne, A., Erhardt, M., Allot, M., Boivin, K., Gissot, L., Monachello, D., Michaud, M., Duchêne, A.-M., et al. (2012). Voltage-dependent-anion-channels (VDACs) in *Arabidopsis* have a dual localization in the cell but show a distinct role in mitochondria. *Plant Mol. Biol.* *78*, 431–446.

Robinson, M.D., McCarthy, D.J., and Smyth, G.K. (2010). edgeR: a Bioconductor package for



differential expression analysis of digital gene expression data. *Bioinformatics* 26, 139–140.

Ryder, P. V., and Lerit, D.A. (2018). RNA localization regulates diverse and dynamic cellular processes. *Traffic* 19, 496–502.

Saint-Georges, Y., Garcia, M., Delaveau, T., Jourden, L., Le Crom, S., Lemoine, S., Tanty, V., Devaux, F., and Jacq, C. (2008). Yeast mitochondrial biogenesis: a role for the PUF RNA-binding protein Puf3p in mRNA localization. *PLoS One* 3, e2293.

Salih, K.J., Duncan, O., Li, L., Troesch, J., and Harvey Millar, A. (2019). Refining the composition of the *Arabidopsis thaliana* 80S cytosolic ribosome. *BioRxiv*.

Salih, K.J., Duncan, O., Li, L., Trösch, J., and Millar, A.H. (2020). The composition and turnover of the *Arabidopsis thaliana* 80S cytosolic ribosome. *Biochem. J.* 477, 3019–3032.

Sanger, F., Nicklen, S., and Coulson, A.R. (1977). DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 74, 5463–5467.

Santangelo, P.J., Nitin, N., and Bao, G. (2005). Direct visualization of mRNA colocalization with mitochondria in living cells using molecular beacons. *J. Biomed. Opt.* 10, 044025.

Schatton, D., Pla-Martin, D., Marx, M.C., Hansen, H., Mourier, A., Nemazanyy, I., Pessia, A., Zentis, P., Corona, T., Kondylis, V., et al. (2017). CLUH regulates mitochondrial metabolism by controlling translation and decay of target mRNAs. *J. Cell Biol.* 216, 675–693.

Schimmel, B.G., Berbusse, G.W., and Naylor, K. (2012). Mitochondrial fission and fusion in *Dictyostelium discoideum*: a search for proteins involved in membrane dynamics. *BMC Res. Notes* 5, 505.

Sears, R.M., May, D.G., and Roux, K.J. (2019). BioID as a Tool for Protein-Proximity Labeling in Living Cells. *Methods Mol. Biol.* 2012, 299–313.

Sen, A., and Cox, R.T. (2016). Clueless is a conserved ribonucleoprotein that binds the ribosome at the mitochondrial outer membrane. *Biol. Open* 5, 195–203.

Sen, A., Damm, V.T., and Cox, R.T. (2013). *Drosophila* Clueless Is Highly Expressed in Larval Neuroblasts, Affects Mitochondrial Localization and Suppresses Mitochondrial Oxidative Damage. *PLoS One* 8, e54283.



Sen, A., Kalvakuri, S., Bodmer, R., and Cox, R.T. (2015). Clueless, a protein required for mitochondrial function, interacts with the PINK1-Parkin complex in *Drosophila*. *Dis. Model. Mech.* *8*, 577–589.

Senkler, J., Senkler, M., Eubel, H., Hildebrandt, T., Lengwenus, C., Schertl, P., Schwarzländer, M., Wagner, S., Wittig, I., and Braun, H.-P. (2017). The mitochondrial complexome of *Arabidopsis thaliana*. *Plant J.* *89*, 1079–1092.

Seo, B., Yoon, S., and Do, J. (2018). Mitochondrial Dynamics in Stem Cells and Differentiation. *Int. J. Mol. Sci.* *19*, 3893.

Sheard, K.M., Thibault-Sennett, S.A., Sen, A., Shewmaker, F., and Cox, R.T. (2020). Clueless forms dynamic, insulin-responsive bliss particles sensitive to stress. *Dev. Biol.* *459*, 149–160.

Smith, P.K., Krohn, R.I., Hermanson, G.T., Mallia, A.K., Gartner, F.H., Provenzano, M.D., Fujimoto, E.K., Goeke, N.M., Olson, B.J., and Klenk, D.C. (1985). Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal. Biochem.* *150*, 76–85.

Suter, B. (2018). RNA localization and transport. *Biochim. Biophys. Acta. Gene Regul. Mech.* *1861*, 938–951.

Sylvestre, J., Margeot, A., Jacq, C., Dujardin, G., and Corral-Debrinski, M. (2003). The Role of the 3' Untranslated Region in mRNA Sorting to the Vicinity of Mitochondria Is Conserved from Yeast to Human Cells. *Mol. Biol. Cell* *14*, 3848–3856.

Tanaka, R., and Tanaka, A. (2007). Tetrapyrrole biosynthesis in higher plants. *Annu. Rev. Plant Biol.* *58*, 321–346.

Tanaka, A., Cleland, M.M., Xu, S., Narendra, D.P., Suen, D.-F., Karbowski, M., and Youle, R.J. (2010). Proteasome and p97 mediate mitophagy and degradation of mitofusins induced by Parkin. *J. Cell Biol.* *191*, 1367–1380.

Tcherkezian, J., Cargnello, M., Romeo, Y., Huttlin, E.L., Lavoie, G., Gygi, S.P., and Roux, P.P. (2014). Proteomic analysis of cap-dependent translation identifies LARP1 as a key regulator of 5'TOP mRNA translation. *Genes Dev.* *28*, 357–371.

Thedieck, K., Holzwarth, B., Prentzell, M.T., Boehlke, C., Kläsener, K., Ruf, S., Sonntag, A.G., Maerz, L., Grellscheid, S.-N., Kremmer, E., et al. (2013). Inhibition of mTORC1 by astrin and



stress granules prevents apoptosis in cancer cells. *Cell* 154, 859–874.

Thein, K.H., Kleylein-Sohn, J., Nigg, E.A., and Gruneberg, U. (2007). Astrin is required for the maintenance of sister chromatid cohesion and centrosome integrity. *J. Cell Biol.* 178, 345–354.

Tiku, V., Tan, M.-W., and Dikic, I. (2020). Mitochondrial Functions in Infection and Immunity. *Trends Cell Biol.* 30, 263–275.

Tourrière, H., Gallouzi, I.E., Chebli, K., Capony, J.P., Mouaikel, J., van der Geer, P., and Tazi, J. (2001). RasGAP-associated endoribonuclease G3Bp: selective RNA degradation and phosphorylation-dependent localization. *Mol. Cell. Biol.* 21, 7747–7760.

Tourrière, H., Chebli, K., Zekri, L., Courselaud, B., Blanchard, J.M., Bertrand, E., and Tazi, J. (2003). The RasGAP-associated endoribonuclease G3BP assembles stress granules. *J. Cell Biol.* 160, 823–831.

Tsuboi, T., Viana, M.P., Xu, F., Yu, J., Chanchani, R., Arceo, X.G., Tutucci, E., Choi, J., Chen, Y.S., Singer, R.H., et al. (2020). Mitochondrial volume fraction and translation duration impact mitochondrial mRNA localization and protein synthesis. *Elife* 9, e57814.

Tu, B.P., Kudlicki, A., Rowicka, M., and McKnight, S.L. (2005). Logic of the yeast metabolic cycle: temporal compartmentalization of cellular processes. *Science* 310, 1152–1158.

Tucker, M., Staples, R.R., Valencia-Sanchez, M.A., Muhlrud, D., and Parker, R. (2002). Ccr4p is the catalytic subunit of a Ccr4p/Pop2p/Notp mRNA deadenylase complex in *Saccharomyces cerevisiae*. *EMBO J.* 21, 1427–1436.

Van Aken, O., Zhang, B., Carrie, C., Uggalla, V., Paynter, E., Giraud, E., and Whelan, J. (2009). Defining the Mitochondrial Stress Response in *Arabidopsis thaliana*. *Mol. Plant* 2, 1310–1324.

Vardi-Oknin, D., and Arava, Y. (2019). Characterization of Factors Involved in Localized Translation Near Mitochondria by Ribosome-Proximity Labeling. *Front. Cell Dev. Biol.* 7, 305.

Vincent, T., Vingadassalon, A., Ubrig, E., Azeredo, K., Srour, O., Cognat, V., Graindorge, S., Salinas, T., Maréchal-Drouard, L., and Duchêne, A.-M. (2017). A genome-scale analysis of mRNAs targeting to plant mitochondria: upstream AUGs in 5' untranslated regions reduce mitochondrial association. *Plant J.* 92, 1132–1142.

Vornlocher, H.P., Hanachi, P., Ribeiro, S., and Hershey, J.W.B. (1999). A 110-kilodalton subunit



of translation initiation factor eIF3 and an associated 135-kilodalton protein are encoded by the *Saccharomyces cerevisiae* TIF32 and TIF31 genes. *J. Biol. Chem.* *274*, 16802–16812.

Wakim, J., Goudenege, D., Perrot, R., Gueguen, N., Desquirit-Dumas, V., Chao de la Barca, J.M., Dalla Rosa, I., Manero, F., Le Mao, M., Chupin, S., et al. (2017). CLUH couples mitochondrial distribution to the energetic and metabolic status. *J. Cell Sci.* *130*, 1940–1951.

Waltz, F., Nguyen, T.-T., Arrivé, M., Bochler, A., Chicher, J., Hammann, P., Kuhn, L., Quadrado, M., Mireau, H., Hashem, Y., et al. (2019). Small is big in *Arabidopsis* mitochondrial ribosome. *Nat. Plants* *5*, 106–117.

Wang, Z.-H., Clark, C., and Geisbrecht, E.R. (2016). *Drosophila* clueless is involved in Parkin-dependent mitophagy by promoting VCP-mediated Marf degradation. *Hum. Mol. Genet.* *25*, 1946–1964.

Warmke, H.E., and Lee, S.-L.J. (1978). Pollen Abortion in T Cytoplasmic Male-Sterile Corn (*Zea mays*): A Suggested Mechanism. *Science* (80- ). *200*, 561–563.

Williams, C.C., Jan, C.H., and Weissman, J.S. (2014). Targeting and plasticity of mitochondrial proteins revealed by proximity-specific ribosome profiling. *Science* (80- ). *346*, 748–751.

Williamson, C.D., Wong, D.S., Bozidis, P., Zhang, A., and Colberg-Poley, A.M. (2015). Isolation of Endoplasmic Reticulum, Mitochondria, and Mitochondria-Associated Membrane and Detergent Resistant Membrane Fractions from Transfected Cells and from Human Cytomegalovirus-Infected Primary Fibroblasts. *Curr. Protoc. Cell Biol.* *68*, 3.27.1-3.27.33.

Wise, A.A., Liu, Z., and Binns, A.N. (2006). Three methods for the introduction of foreign DNA into *Agrobacterium*. *Methods Mol. Biol.* *343*, 43–53.

Woods, L.C., Berbusse, G.W., and Naylor, K. (2016). Microtubules Are Essential for Mitochondrial Dynamics-Fission, Fusion, and Motility-in *Dictyostelium discoideum*. *Front. Cell Dev. Biol.* *4*, 19.

Zabehzinsky, D., Slobodin, B., Rapaport, D., and Gerst, J.E. (2016). An Essential Role for COPI in mRNA Localization to Mitochondria and Mitochondrial Function. *Cell Rep.* *15*, 540–549.

Zamore, P.D., Williamson, J.R., and Lehmann, R. (1997). The Pumilio protein binds RNA through a conserved domain that defines a new class of RNA-binding proteins. *RNA* *3*, 1421–



1433.

Zanetti, M.E., Chang, I.-F., Gong, F., Galbraith, D.W., and Bailey-Serres, J. (2005). Immunopurification of Polyribosomal Complexes of Arabidopsis for Global Analysis of Gene Expression. *Plant Physiol.* *138*, 624–635.

Zhang, H., Si, X., Ji, X., Fan, R., Liu, J., Chen, K., Wang, D., and Gao, C. (2018). Genome editing of upstream open reading frames enables translational control in plants. *Nat. Biotechnol.* *36*, 894–898.

Zhang, Y., Chen, Y., Gucek, M., and Xu, H. (2016). The mitochondrial outer membrane protein MDI promotes local protein synthesis and mtDNA replication. *EMBO J.* *35*, 1045–1057.

Zhang, Y., Wang, Z.-H., Liu, Y., Chen, Y., Sun, N., Gucek, M., Zhang, F., and Xu, H. (2019). PINK1 Inhibits Local Protein Synthesis to Limit Transmission of Deleterious Mitochondrial DNA Mutations. *Mol. Cell* *73*, 1127-1137.e5.

Zhu, D., Stumpf, C.R., Krahn, J.M., Wickens, M., and Hall, T.M.T. (2009). A 5' cytosine binding pocket in Puf3p specifies regulation of mitochondrial mRNAs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *106*, 20192–20197.

Zhu, Q., Hulen, D., Liu, T., and Clarke, M. (1997). The *cluA*- mutant of *Dictyostelium* identifies a novel class of proteins required for dispersion of mitochondria. *Proc. Natl. Acad. Sci.* *94*, 7308–7313.





## Etude des protéines de la famille « clustered mitochondria » (CLU) dans les cellules animales et les plantes : rôle dans la biogenèse mitochondriale.

### Résumé

La mitochondrie a de multiples fonctions vitales pour les cellules eucaryotes. Les protéines de la famille « clustered mitochondria » (CLU) sont présentes dans de nombreuses espèces, des levures aux mammifères en passant par les plantes. L'inactivation de cette protéine dans ces organismes aboutit à une altération du réseau mitochondrial, ce qui suggère une fonction de CLU dans la biogenèse mitochondriale. Lors de ma thèse, j'ai cherché les fonctions des protéines CLU dans deux organismes modèles, dans des cellules de mammifères et chez la plante *Arabidopsis thaliana*.

Chez les mammifères et chez *Arabidopsis thaliana*, les protéines CLU semblent être impliquées dans la régulation de la localisation et de la traduction d'ARNm d'origine nucléaire codant pour des protéines mitochondriales (MITO ARNm). De plus, chez les plantes, CLU, appelée FRIENDLY ou FMT, semble avoir une fonction dépendant du stade de développement.

Par leur rôle sur les MITO ARNm, les protéines CLU participent donc à la régulation de la biogenèse mitochondriale.

Mots clés : protéines CLU, mitochondries, traduction cytosolique.

### Résumé en anglais

Mitochondria have multiple vital functions in eukaryotic cells. Proteins of the clustered mitochondria (CLU) family are present in many species from yeasts to mammals passing by plants. The inactivation of this protein in the various corresponding organisms results in an alteration of the mitochondrial network, which suggests a mitochondrial biogenesis function of CLU.

During my thesis, I have investigated the functions of CLU proteins in both mammalian cells and *Arabidopsis thaliana*. In these models, CLU proteins appear to be involved in the localization and translation regulation of nuclear encoded mitochondrial protein mRNAs (MITO mRNAs). Moreover, in *Arabidopsis thaliana*, CLU protein seems to have a function depending on the stage of development.

Through their role on MITO mRNAs, CLU proteins therefore participate in the mitochondrial biogenesis regulation.

Keywords : CLU proteins, mitochondria, cytosolic translation.