

Université de Montréal

**Caractérisation fonctionnelle de nouveaux gènes
mitochondriaux chez les espèces à DUI**
Étude du gène *f-orf* chez la moule marine *Mytilus edulis*

par Philip Ouimet

Département de sciences biologiques

Faculté des arts et des sciences

Mémoire présenté
en vue de l'obtention du grade de Maîtrise
en Sciences biologiques

Août 2018

© Philip Ouimet, 2018

Résumé

Dans les cellules animales, les mitochondries sont des organites responsables de la production d'énergie qui contiennent un génome distinct de celui de la cellule mais qui est normalement transmis à la descendance de manière strictement maternelle. Toutefois, plusieurs espèces de mollusques bivalves transmettent leurs mitochondries d'une manière « doublement uniparentale » (DUI), c'est-à-dire que chacun des deux sexes transmet ses mitochondries en plus d'avoir un génome mitochondrial différent de celui de l'autre sexe. Récemment, de nouveaux gènes ont été découverts dans les génomes mitochondriaux mâles (*m-orf*) et femelles (*f-orf*) d'espèces de bivalves à DUI. Ces gènes n'ont aucun homologue détectable parmi les séquences géniques répertoriées dans les bases de données, et leur fonction demeure également inconnue. Le dimorphisme sexuel poussé de ces gènes suggère qu'ils sont impliqués dans le fonctionnement du système DUI, le maintien du gonochorisme ou la détermination du sexe. Pour mieux comprendre le rôle de ces gènes, le présent projet visait d'abord à valider le potentiel codant du gène *f-orf* de la moule marine *Mytilus edulis*, puis à caractériser la protéine encodée par ce gène le cas échéant en déterminant l'emplacement subcellulaire de la protéine et les complexes protéiques qu'elle forme dans la cellule à l'aide d'un anticorps anti-F-ORF produit par un lapin. Pour ce faire, nous avons établi la distribution tissulaire de la protéine F-ORF putative grâce à de l'immunobuvardage, visualisé son emplacement subcellulaire par immunohistochimie, et tenté d'identifier ses partenaires d'interaction protéiques en utilisant la co-immunoprécipitation suivi de séquençage par spectrométrie de masse. Les résultats supportent l'idée que ce gène code effectivement pour une protéine fonctionnelle chez les spécimens mâles et femelles de *Mytilus edulis*, protéine qui serait bien intra-mitochondriale dans les cellules de la lignée germinale mâle. Par contre, nous n'avons pu identifier de partenaire d'interaction. Malgré cela, ces résultats s'accordent avec ce qui est observé dans d'autres modèles de DUI, et incitent fortement à poursuivre davantage les efforts de caractérisation fonctionnelle de ces gènes chez toutes les espèces qui expriment ce mode de transmission mitochondriale.

Mots-clés : Mitochondrie, génome, bivalve, ORFans, *f-orf*, *Mytilus edulis*

Abstract

In animal cells, mitochondria are organelles responsible for energy production. They carry their own genome, which is distinct from the nuclear genome but is normally passed on to progeny in a strictly maternal fashion. Interestingly, many species of bivalve mollusks instead pass on their mitochondrial genome through a process known as doubly uniparental inheritance, or DUI. This system implies that male and female individuals each possess their own unique mitochondrial transfer pathway and have a mitochondrial genome which differs greatly from its opposite-sex counterpart. Recently, new genes were discovered within male (*m-orf*) and female (*f-orf*) mitochondrial genomes of DUI bivalve species. However, these genes have no homologues in sequence databases, meaning the functions of these genes have not been clearly established. Because these genes demonstrate a high level of sexual dimorphism, they are suspected to be involved in processes pertaining to DUI function, persistence of gonochorism throughout generations or sex determination. Here we have attempted to characterize the protein encoded by the *f-orf* gene in the blue mussel *Mytilus edulis* by preparing an antibody against a 20 amino acid sequence motif in the predicted protein. The antibody reacted with a protein of 60 kDa on Western blots, instead of the expected 25 kDa, but a signal was found in all tissues as anticipated. The subcellular distribution of the antigen recognised by the antibody, as determined by immunohistochemistry, was found to be uniquely mitochondrial. Immunoprecipitation of the 60 kDa band, followed by LC-MS/MS sequencing of the band excised from an SDS gel, did not identify any peptides expected for the F-ORF. Although a complete functional analysis of the protein could not be realized, the experiments described here represent a coherent and complete experimental protocol for this purpose.

Keywords : Mitochondria, genome, bivalve, ORFans, *f-orf*, *Mytilus edulis*

Table des matières

Résumé.....	i
Abstract.....	ii
Table des matières.....	iii
Liste des tableaux.....	vi
Liste des figures	vii
Liste des abréviations.....	ix
1. Introduction.....	11
1.1 Le génome mitochondrial chez les animaux : conservation et exceptions	11
1.2 Doubly Uniparental Inheritance (DUI).....	12
1.3 DUI et détermination du sexe	14
1.4 Nouveaux gènes mitochondriaux chez les espèces de bivalves à DUI.....	15
1.5 Les gènes de type ORFans	16
1.6 Analyse préliminaire des nouveaux ORFans chez les bivalves à DUI.....	17
1.7 Stérilité cytoplasmique mâle chez les plantes et parallèles avec les ORFans de bivalves	22
1.8 Hypothèses quant à l'origine de ORFans mitochondriaux.....	22
1.9 Rôle potentiel des ORFans dans l'identité sexuelle.....	24
1.10 Modèle suggéré pour la fonction des ORFans chez les moules d'eau douce	24
1.11 Le gène <i>f-orf</i> chez la moule marine <i>Mytilus edulis</i>	25
1.12 Objectifs et hypothèses	26
2. Matériel et méthode	28
2.1 Obtention des anticorps contre F-ORF	28
2.1.1 Immunisation du lapin	28
2.1.2 Purification des anticorps.....	28
2.1.2 Vérification de la purification par <i>dot-blot</i>	28
2.2 Collecte des spécimens et récolte des tissus	29
2.3 Détection de la protéine F-ORF chez <i>Mytilus edulis</i> – Approche par buvardage	30
2.3.1 Préparation de l'extrait protéique.....	30

2.3.2 Fractionnement de l'extrait protéique	30
2.3.3 Migration sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)	30
2.3.4 Transfert sur membrane de nitrocellulose.....	31
2.3.5 Immunobuvardage et détection de la protéine	31
2.4 Détection de la protéine F-ORF chez <i>Mytilus edulis</i> – Approche par immunohistochimie	32
2.4.1 Mise en culture des cellules	32
2.4.2 Exposition aux anticorps et observation	32
2.5 Identification des partenaires d'interaction protéiques par co-immunoprécipitation	33
2.5.1 Préparation de l'extrait protéique brut	33
2.5.2 Fractionnement de l'extrait protéique brut	34
2.5.3 <i>Pre-clearing</i> de l'extrait et co-immunoprécipitation	34
2.5.4 Migration sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)	34
2.5.4 Coloration, décoloration et découpage du gel, puis séquençage par spectrométrie de masse.....	35
2.6 Préparation du système d'expression artificielle dans les bactéries	35
2.6.1 Insertion de la séquence du gène dans le vecteur pGEX-6p1	35
2.6.2 Transformation des bactéries avec le vecteur	36
2.6.3 Préparation du système artificiel avec protéine tronquée	37
2.6.4 Tests d'expression.....	37
3. Résultats	38
3.1 Obtention des anticorps.....	38
3.1.1 Vérification de la purification par <i>dot-blot</i>	38
3.2 Détection de la protéine F-ORF putative chez <i>Mytilus edulis</i> – Approche par buvardage	39
3.2.1 Immunobuvardage et détection de la protéine	39
3.3 Détection de la protéine F-ORF putative chez <i>Mytilus edulis</i> – Approche par immunohistochimie.....	44
3.4 Identification des partenaires d'interaction protéiques par co-immunoprécipitation	45
3.5 Préparation du système d'expression artificielle dans les bactéries	49
4. Discussion.....	52

Conclusion	59
Bibliographie.....	i

Liste des tableaux

Tableau I.	Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés.....	29
Tableau II.	Amorces utilisées lors des réactions de PCR.....	36
Tableau III.	Répertoire des protéines ayant été jumelées à 99% ou plus aux séquences obtenues lors du séquençage des protéines contenues dans le morceau de gel illustré à la figure 13.	48

Liste des figures

Figure 1. Principe du système DUI chez les bivalves (modifiée de Breton et al 2014).	13
Figure 2. Cartes génétiques des génomes femelle, mâle et hermaphrodite chez la moule d'eau douce (Breton et al 2011b).....	16
Figure 3. Immunobuvardage illustrant l'expression de <i>f-orf</i> et <i>m-orf</i> chez la moule d'eau douce <i>Venustaconcha ellipsiformis</i> (Breton et al 2009).	18
Figure 4. Emplacement subcellulaire de la protéine F-ORF dans les oeufs de la moule d'eau douce <i>Venustaconcha ellipsiformis</i> (Breton et al 2011).	20
Figure 5. Domaines fonctionnels anticipés dans les protéines F-ORF et M-ORF (modifiée de Milani et al 2013).	21
Figure 6. Emplacement du gène <i>f-orf</i> dans le domaine variable 1 (lui-même non-codant) de la région de contrôle du génome mitochondrial femelle chez la moule marine <i>Mytilus edulis</i> (modifiée de Minoiu et al 2016).	26
Figure 7. Vérification par dot-blot de la présence d'anticorps anti-ORF de <i>M. edulis</i> dans les échantillon purifié (Pur) et de sérum anti-F-ORF au jour 56 (Sérum).	38
Figure 8. Détection par immunobuvardage de la protéine F-ORF putative dans les différentes fractions cellulaires d'extraits protéiques mâle et femelle (combinés) du manteau, du pied, du muscle adducteur et de la branchie chez <i>Mytilus edulis</i>	40
Figure 9. Détection par immunobuvardage de la protéine F-ORF putative dans les différentes fractions d'extraits protéiques mâles et femelles (combinés) du manteau par l'entremise de deux anticorps anti F-ORF dirigés vers des épitopes différents..	41
Figure 10. Détection par immunobuvardage de la protéine F-ORF putative dans les différentes fractions d'extraits protéiques mâles et femelles (séparés) du manteau.	43
Figure 11. Localisation intracellulaire de la protéine F-ORF putative dans des cellules de manteau en culture chez trois spécimens mâles de <i>Mytilus edulis</i>	44
Figure 12. Détection par immunobuvardage de la protéine F-ORF putative dans les différentes fractions d'extraits protéiques mâles et femelles immunoprécipités du manteau.....	46

Figure 13. Migration sur gel de polyacrylamide des extraits protéiques du manteau mâle et femelle enrichis en mitochondries et immunoprécipités pour la protéine F-ORF putative.....47

Figure 14. Expression des protéines F-ORF de *Mytilus edulis* complète puis sans domaine transmembranaire dans un système d'expression artificielle chez *E. coli* BL-21.50

Figure 15. Distribution de la protéine F-ORF dans les mitochondries (M) d'un spermatozoïde de moule d'eau douce *Venustaconcha ellipsiformis* tel qu'observé par microscopie électronique (Shepardson et al 2012). 55

Liste des abréviations

ADN : Acide désoxyribonucléique

ADNmt : ADN mitochondrial

ARN : Acide ribonucléique

ATP : Adénosine triphosphate

CMS : *Cytoplasmic male sterility*, ou stérilité cytoplasmique chez les mâles

DUI : *Doubly uniparental inheritance*, ou transmission uniparentale double

F-ORF : *Female open reading frame*, ou cadre de lecture ouvert femelle

GST : Glutathion S-transférase

H-ORF : *Hermaphrodite open reading frame*, ou cadre de lecture ouvert hermaphrodite

IPTG : Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

LB : *Lysogeny broth*, ou bouillon de lysogénie

M-ORF : *Male open reading frame*, ou cadre de lecture ouvert mâle

MS/MS : Spectrométrie de masse en tandem

PBS : *Phosphate-buffered saline*, ou tampon phosphate salin

PCR : *Polymerase chain reaction*, ou réaction en chaîne par polymérase

RIPA : *Radioimmunoprecipitation assay buffer*, ou tampon d'essai d'immunoprécipitation

SDS-PAGE : *Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis*

SMI : *Strictly maternal inheritance*, ou transmission strictement maternelle

Remerciements

Je souhaite d'abord remercier ma directrice et ma co-directrice, Sophie Breton et Annie Angers, qui se sont dévouées à la réalisation de ce projet, m'ont fourni un encadrement des plus attentionnés et ont su me guider dans la bonne direction à chaque étape de mon travail, en plus d'avoir contribué de manière très importante au développement de mes connaissances et de ma rigueur scientifique. Merci d'avoir cru en moi!

Je remercie également toutes les personnes que j'ai rencontré lors de mon passage de quatre ans au Département de sciences biologiques, tant au premier qu'au deuxième cycle, tant étudiants que professeurs et membres du personnel. Vous avez ajouté un sens supplémentaire à mon parcours et m'avez aidé à garder un bon moral du début à la fin. Une mention spéciale pour les membres de mon labo : Charlotte, Stefano, Karim, Georges, Andréanne, puis un souvenir pour le grand Davide et nos stagiaires Yannick, Kenigen, Ariane et Suga. Je mentionne aussi « Le Couloir » : Guillaume, Étienne, Marie, Rudy, Nayan. Puis, Édith, Ariane et Jean-François qui m'ont encadré lors de mes expériences d'immunohistochimie. Merci à mes amis les démos d'histologie, et à Jay et MPB de Old Orchard. Merci à tous avant tout pour votre amitié sincère.

J'aimerais aussi remercier le Conseil de recherches en sciences naturelles et en génie du Canada (CRSNG), qui m'a enlevé énormément de pression en me fournissant le financement nécessaire à la réalisation de mon projet.

Enfin, je remercie mes parents et ma grande sœur, qui m'ont suivi tout au long de cette belle aventure et m'ont fourni tous les outils nécessaires pour réussir et pour soutirer le maximum de ces années d'étude, de même que les années à venir. J'en suis très reconnaissant.

1. Introduction

1.1 Le génome mitochondrial chez les animaux : conservation et exceptions

La mitochondrie, compartiment cellulaire responsable de la production d'énergie, possède son propre génome (ADNmt) distinct du génome nucléaire et dont le contenu génique est fortement conservé chez les animaux (Gissi et al. 2008). De manière générale, le génome mitochondrial animal encode 2 ARN ribosomiaux, 22 ARN de transfert et 13 protéines impliquées dans la production d'ATP (Boore 1999). Les protéines impliquées dans la réplication et l'expression de l'ADNmt sont quant à elles encodées par le génome nucléaire (Boore 1999). Il existe cependant des exceptions connues à cette formule de 37 gènes. Des cadres de lecture ouverts (ORF) supplémentaires peuvent être attribuables, entre autres mécanismes, à la duplication de gènes mitochondriaux existants. C'est le cas, par exemple, chez le bivalve *Musculista senhousia*, qui a vu son gène *cox2* dupliqué (Passamonti et al. 2011).

La découverte récente de courts peptides d'origine mitochondriale (*mitochondrial-derived peptides*, ou MDPs) qui joueraient un rôle physiologique change la perspective quant au potentiel codant du génome mitochondrial animal. Par exemple, l'humanine est un peptide anti-apoptotique de 24 acides aminés retrouvé dans le génome mitochondrial chez l'humain (Hashimoto et al. 2001). La séquence du gène se retrouve intégrée dans celle de l'ARNr 16s. MOTS-c est un autre peptide d'origine mitochondriale retrouvée chez l'humain, au niveau de l'ARNr 12s (Lee et al. 2015). Ce petit peptide de 16 acides aminés est impliqué dans l'homéostasie métabolique et dans la sensibilité à l'insuline. Le peptide Gau est encodé sur le

brin complémentaire du gène *cox1* de tous les génomes mitochondriaux répertoriés. Bien que son rôle demeure à déterminer, ce peptide a été détecté *in vitro* par immunohistochimie au niveau de la mitochondrie dans des cellules endothéliales veineuses du cordon ombilical humain (Faure et al. 2011). Ces exemples portent à croire que le potentiel codant du génome mitochondrial a été largement sous-estimé et que certains peptides en dehors du cadre des 13 protéines « classiques » peuvent avoir des fonctions physiologiques intéressantes.

1.2 Doubly Uniparental Inheritance (DUI)

Chez les animaux, l'ADNmt est généralement transmis de manière strictement maternelle (*Strictly Maternal Inheritance*, ou SMI) (Birky 2001). L'avantage évolutif apparent ayant permis le maintien du SMI à travers le règne animal est que ce système facilite la co-évolution avec le génome nucléaire; or, cette co-évolution est nécessaire étant donné l'implication du génome nucléaire dans le bon fonctionnement de la chaîne de transport d'électrons dans la mitochondrie (Wallace 2007). Cependant, chez certaines espèces de mollusques bivalves appartenant aux ordres Unionoida, Nuculanoida, Mytiloida et Veneroida, on observe un mode de transmission dit uniparentale double (*Doubly Uniparental Inheritance*, DUI), qui diffère largement du SMI (Boyle & Etter 2013, Breton et al. 2007, Passamonti & Ghiselli 2009, Zouros 2013). En effet, dans ce mode de transmission, les parents des deux sexes peuvent transmettre des mitochondries à leur descendance, ce qui implique d'une part que chacun des sexes possède sa propre variante d'ADNmt et d'autre part que ces deux variantes ont un mode de transmission qui est propre au sexe. Ces génomes mâle (M) et femelle (F) ont, chez plusieurs espèces, une divergence nucléotidique entre eux qui excède 40% (Zouros 2013). Le génome F est transmis de la mère vers la progéniture mâle et femelle. Le génome mâle est

quant à lui transmis du père vers la progéniture mâle uniquement, où il s'établira surtout dans la lignée germinale (figure 1) (Breton et al. 2007). Les individus femelles sont donc dits homoplasmiques pour le génome de type F alors que les mâles sont hétéroplasmiques pour les génomes F et M.

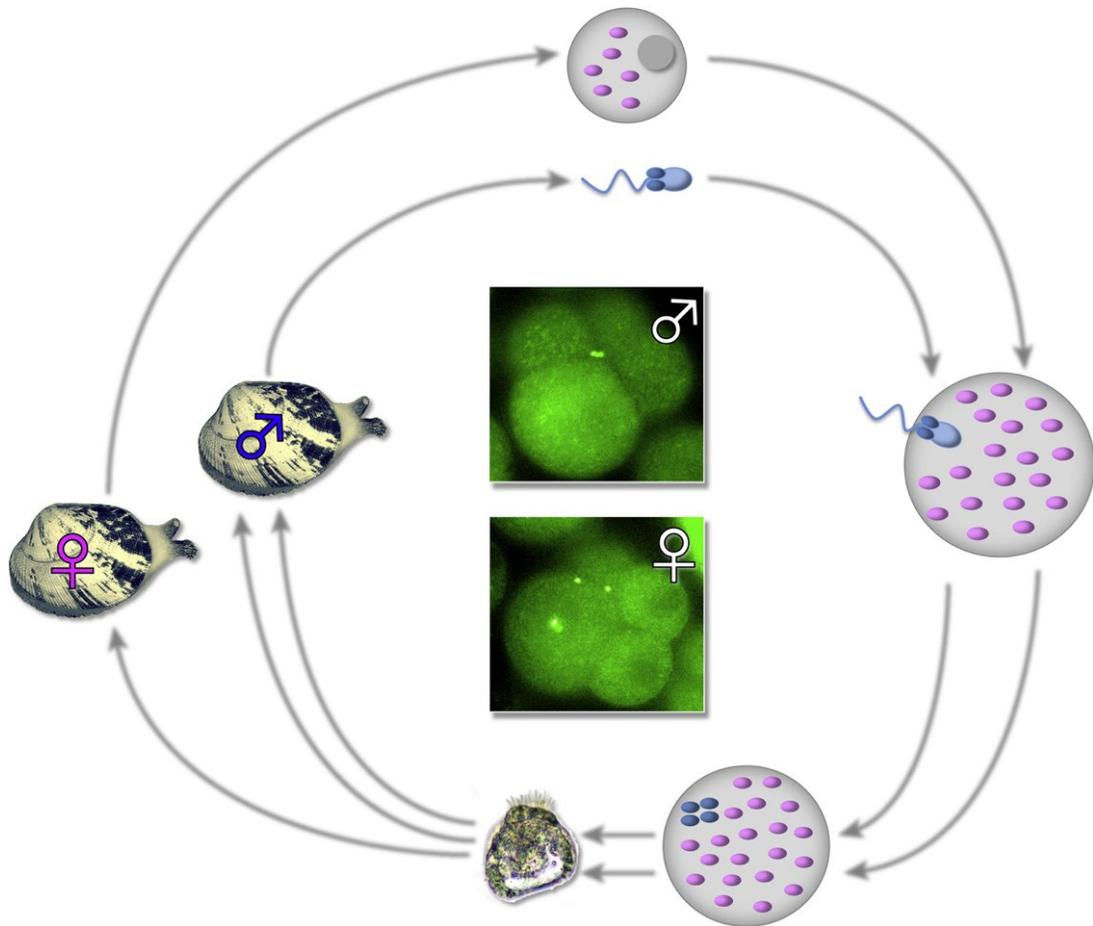


Figure 1. Principe du système DUI chez les bivalves (modifiée de Breton et al. 2014). Lorsque les mitochondries des spermatozoïdes subissent une agrégation dans une région spécifique de l'embryon précoce, l'individu sera un mâle. Lorsqu'elles sont plutôt dispersées, l'individu sera une femelle.

La découverte de la DUI est assez récente (Zouros et al. 1992), ce qui fait qu'elle est encore mal comprise. Parmi les hypothèses avancées pour expliquer la raison de son maintien chez

certaines espèces, il y a qu'elle permettrait à la sélection d'agir directement sur l'ADNmt chez les mâles, ce qui est impossible chez les espèces à SMI puisque le génome du mâle ne sera pas transmis à la progéniture (Breton et al. 2007). Les espèces de type SMI sont donc soumises au phénomène nommé le « Mother's Curse », qui implique que les mutations du génome mitochondrial qui sont délétères pour les mâles mais neutres ou bénéfiques pour les femelles seront toujours maintenues dans la population, au détriment des individus mâles seulement (Gemmell et al. 2004). Ainsi, la DUI pourrait avoir évolué de manière à éviter les effets délétères des mutations d'ADNmt sur la fonction des spermatozoïdes, ou bien parce que certains éléments présents dans les ADNmt pourraient jouer un rôle au niveau de la détermination du sexe (Breton et al. 2007).

1.3 DUI et détermination du sexe

Il existe certains indices qui suggèrent que la DUI et la détermination du sexe chez les espèces qui effectuent ce mode de transmission mitochondriale seraient deux phénomènes liés. Chez les moules d'eau douce de la famille des Unionidae, les espèces gonochoriques emploient toutes la DUI alors que les espèces hermaphrodites utilisent strictement la SMI (Breton et al. 2011b). Étant donné l'absence de chromosomes sexuels hétéromorphes chez ce taxon, il a été suggéré que des éléments présents dans le génome mitochondrial des espèces à DUI pourraient permettre de maintenir le gonochorisme chez ces espèces, ce qui ferait de la DUI le tout premier système de détermination du sexe à impliquer directement le génome mitochondrial chez les animaux (Breton et al. 2014). Un des éléments géniques mitochondriaux que l'on croit susceptible d'intervenir dans la détermination du sexe se retrouve chez le génome mâle des bivalves de la superfamille des Unionoidea. Il s'agit d'une extension en 3' au niveau du gène de

la sous-unité II de la cytochrome *c* oxydase (Chakrabarti et al. 2007). Cependant, en absence d'évidences supplémentaires appuyant cette hypothèse, le mécanisme spécifique par lequel la détermination du sexe est dépendant de la DUI n'a toujours pas été élucidé.

1.4 Nouveaux gènes mitochondriaux chez les espèces de bivalves à DUI

Suite aux études de séquençage réalisées sur les espèces à DUI, il a été établi que des séquences d'ADNmt, qu'elles soient sexe-spécifiques ou porteuses de divergences nucléotidiques importantes entre les génomes F et M, sont susceptibles d'intervenir pour déterminer si un génome mitochondrial sera transmis par la voie paternelle ou par la voie maternelle (Breton et al. 2007). Dans le cadre d'une recherche visant à déterminer les facteurs influençant la transmission de l'ADNmt via le gamète femelle ou le gamète mâle, un 38^e gène a récemment été découvert chez toutes les espèces de bivalves à DUI analysées (figure 2) (Breton et al. 2009, Breton et al. 2011a, Breton et al. 2011b). Ce gène, qualifié d'ORFans (voir section suivante) est retrouvé au niveau des ADNmt M (*m-orf*) et F (*f-orf*). Il est à noter qu'une version de ce gène existe également au niveau des espèces hermaphrodites appartenant à l'ordre Unionoida, malgré la perte de la DUI chez ces espèces : ce gène a ainsi été nommé *h-orf*.

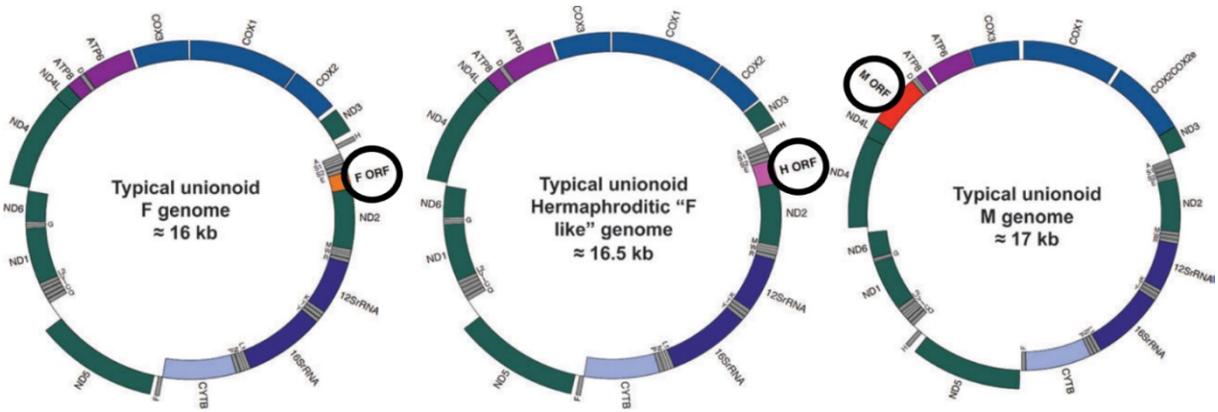


Figure 2. Cartes génétiques des génomes femelle, mâle et hermaphrodite chez la moule d’eau douce (Breton et al. 2011b). Les gènes spécifiques à chaque type d’ADNmt sont encerclés.

1.5 Les gènes de type ORFans

Lorsque le génome d’un organisme est séquencé, la majorité des cadres de lecture ouverts que l’on y trouve codent pour des protéines appartenant à des familles montrant une certaine homologie de fonction, bien conservée chez différents organismes (Siew & Fischer 2003). Ces gènes ont une similarité de séquence avec des gènes homologues retrouvés chez d’autres organismes. Les protéines homologues ont souvent des structures similaires même si les gènes qui les encodent ne sont pas forcément identiques au niveau de leurs séquences respectives, puisque les structures divergent beaucoup plus lentement que les séquences (Chothia & Lesk 1986). De plus, les protéines homologues peuvent aussi avoir de fortes similarités au niveau de leurs ligands, leurs partenaires d’interaction protéiques et/ou leurs mécanismes enzymatiques (Todd et al. 2001). Cependant, lorsqu’il ne possède aucune similarité importante de séquence avec l’ensemble des séquences retrouvées dans les bases de données, un cadre de lecture ouvert est caractérisé comme étant de type ORFans (*orphan ORF*, ou cadre

de lecture ouvert orphelin) (Siew & Fischer 2003). Étant donné l'absence de comparaison possible, les protéines encodées par ces gènes ORFans ne peuvent être caractérisées que de manière expérimentale, afin de révéler leur origine et leur fonction.

1.6 Analyse préliminaire des nouveaux ORFans chez les bivalves à DUI

Depuis la découverte de ces nouveaux gènes mitochondriaux chez les bivalves, l'espèce principale qui a servi aux analyses biochimiques et immunohistochimiques préliminaires est la moule d'eau douce *Venustaconcha ellipsiformis*. Chez cette espèce, l'existence des protéines F-ORF et M-ORF a été confirmée par immunobuvardage de type western : la présence de F-ORF a été détectée au niveau des gonades femelles, alors que M-ORF a été détectée au niveau des gonades mâles (figure 3) (Breton et al. 2009).

L'observation au microscope électronique de tissus préalablement immunotraités pour révéler F-ORF a montré que cette protéine est présente au niveau des mitochondries, de la membrane nucléaire et du nucléoplasme (figure 4) (Breton et al. 2011b).

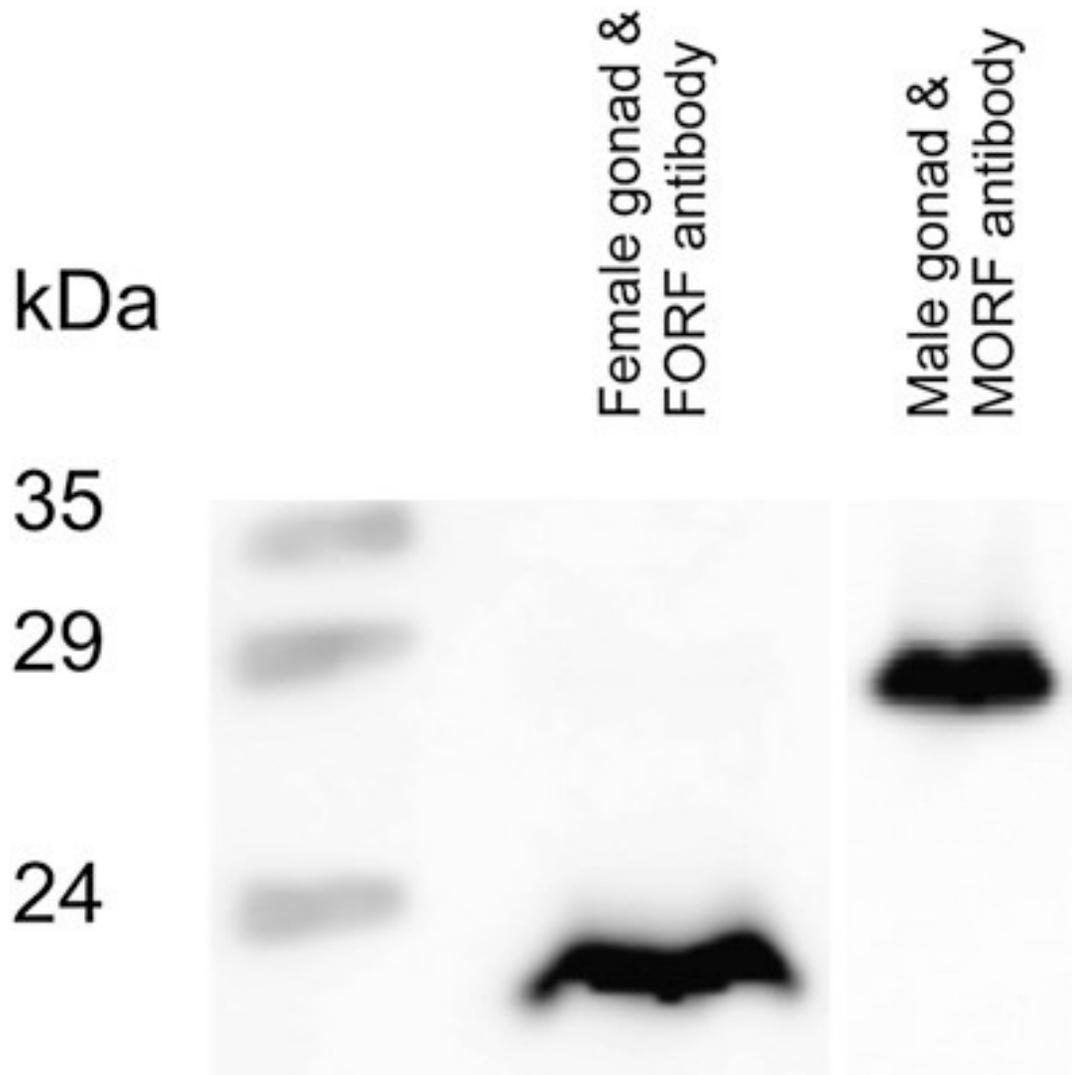


Figure 3. Immunobuvardage illustrant l'expression de *f-orf* et *m-orf* chez la moule d'eau douce *Venustaconcha ellipsiformis* (Breton et al. 2009). Le gène femelle est exprimé dans les gonades femelles, et le gène mâle dans les gonades mâles.

Des analyses bio-informatiques comparatives ont été faites sur les gènes *f-orf* et *m-orf* d'une variété d'espèces qui possèdent ces ORFans mitochondriaux, entre autres chez la moule d'eau douce *Venustaconcha ellipsiformis* et la moule marine *Mytilus edulis* (Milani et al. 2013, Mitchell et al. 2016). Différents logiciels ont permis d'établir les domaines putatifs des protéines

à partir des séquences de ces gènes, permettant ainsi de brosser un portrait plus clair de leur évolution et de leurs fonctions potentielles (figure 5). D'abord, les comparaisons entre espèces qui possèdent des ORFans mitochondriaux montrent que leurs séquences sont très variables, ce qui pointe vers une variation évolutive très importante. Toutefois, leurs structures protéiques prédites semblent plutôt similaires entre elles, ce qui suggère que leurs fonctions seraient également similaires à travers les différents taxons (Mitchell et al. 2016). Ces analyses ont aussi permis de mieux caractériser ces ORFs en annotant les différentes parties de leur séquence selon leurs domaines prédits. Notamment, toutes les séquences *f-orf* analysées portaient une séquence correspondant à un peptide signal à leur extrémité N-terminale (Milani et al. 2013). Chez le genre *Mytilus*, *m-orf* porte une chaîne poly A (Milani et al. 2013) qui, lorsque traduite, devient une série de lysines; or, un motif poly-lysine est nécessaire pour la liaison aux membranes lipidiques (Bouaouina et al. 2012). Il s'agit donc potentiellement d'une région correspondant à une hélice transmembranaire. De plus, une courte série de lysines constitue un élément-clé du signal de localisation nucléaire classique, PKKKRKV (Kalderon et al. 1984).

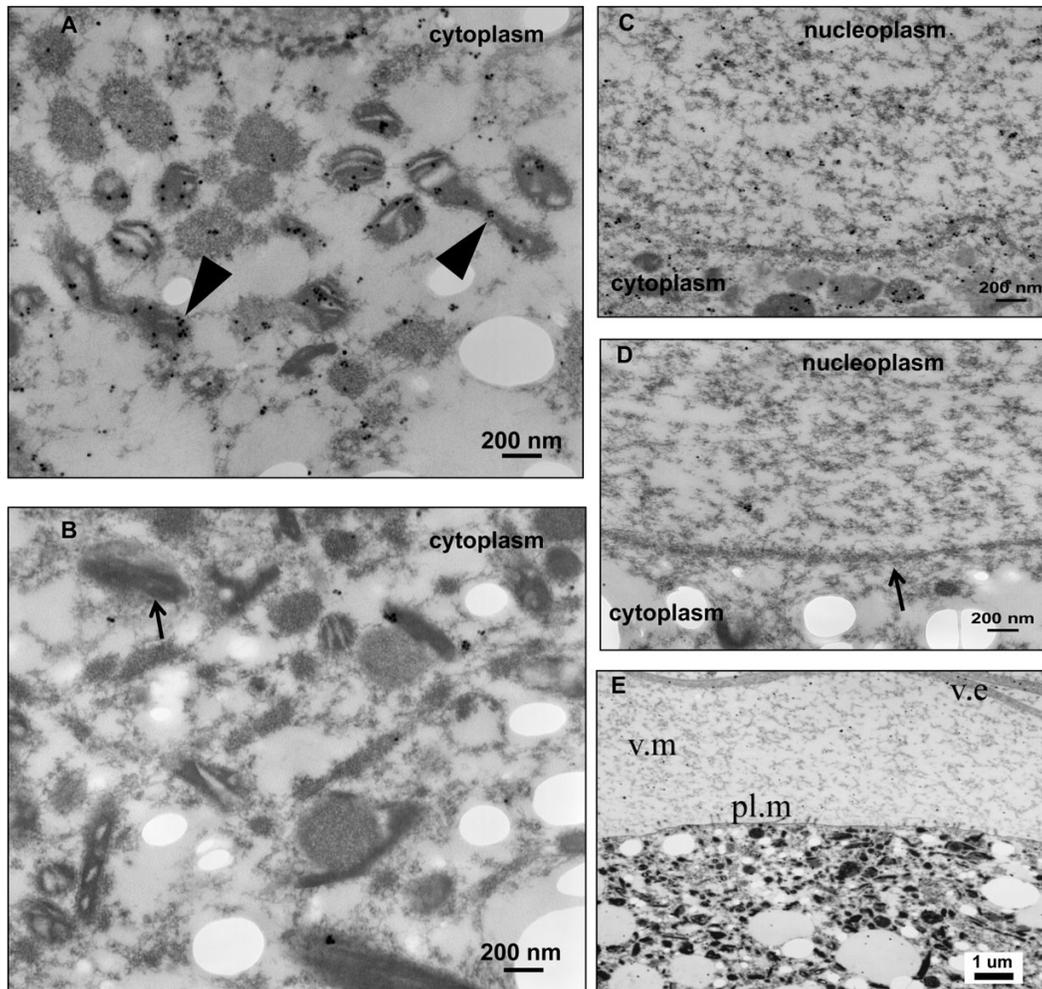


Figure 4. Emplacement subcellulaire de la protéine F-ORF dans les oeufs de la moule d'eau douce *Venustaconcha ellipsiformis* (Breton et al. 2011). La présence de la protéine, indiquée par les points noirs et mise en évidence par les flèches triangulaires (A), a été détectée au niveau des mitochondries (A et C), du nucléoplasme (C) et de la membrane nucléaire (C). Les panneaux B et D représentent des contrôles négatifs. De courtes flèches pointent vers une mitochondrie (B) et la membrane nucléaire (D). Le panneau E illustre la membrane plasmique (pl.m), la matrice vitelline (v.m) et l'enveloppe vitelline (v.e) d'une section d'oeuf.

Le portrait global des fonctions prédites pour ces ORF chez toutes les espèces soumises aux analyses bio-informatiques fait apparaître quelques patrons récurrents (Milani et al. 2013). Les protéines F-ORFs semblent être impliquées dans la régulation de la transcription, la réponse

immunitaire et dans l'adhésion, la migration et la prolifération cellulaires. Quant à elles, les protéines M-ORFs semblent intervenir principalement dans l'organisation du cytosquelette, mais aussi dans la liaison aux acides nucléiques et la régulation de la transcription. On note aussi une similarité avec des protéines impliquées dans la réparation, la réplication et la recombinaison de l'ADN. Les deux lignées de protéines, M et F, sont susceptibles d'être impliquées dans la signalisation hormonale, la régulation de la réponse immunitaire, l'ubiquitination et la régulation de l'apoptose (Milani et al. 2013).

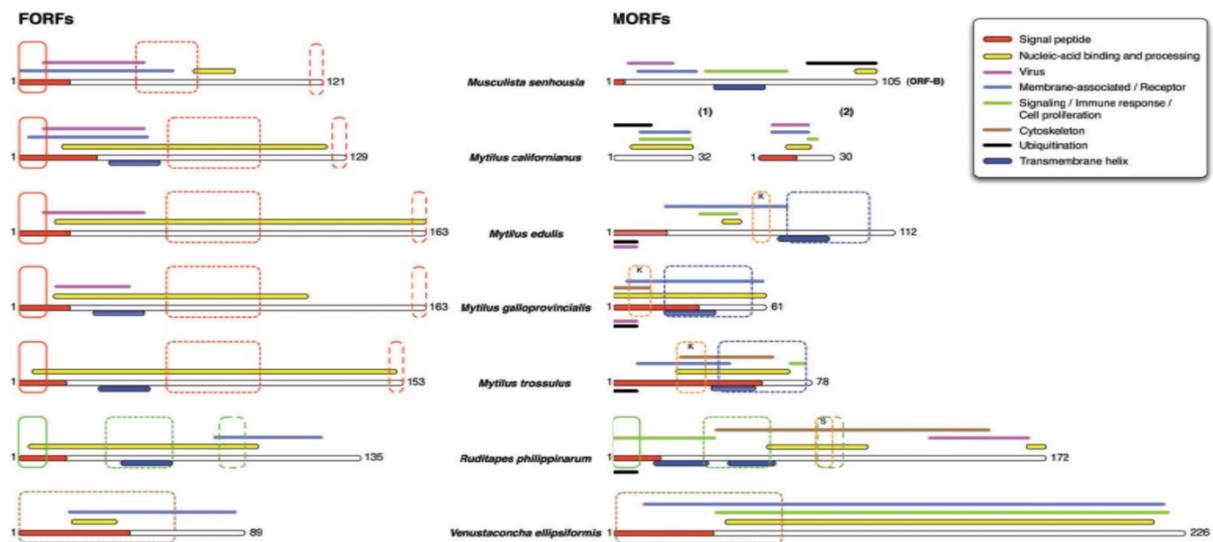


Figure 5. Domaines fonctionnels anticipés dans les protéines F-ORF et M-ORF (modifiée de Milani et al. 2013). Les lignes blanches représentent la protéine et le chiffre à la droite de chaque représentation est le nombre d'acides aminés qui composent la protéine. L'encart en haut à droite contient le code de couleur identifiant les domaines fonctionnels récurrents dans les diverses protéines: par exemple, le rouge pour un peptide signal, le bleu pour une hélice transmembranaire, etc.

1.7 Stérilité cytoplasmique mâle chez les plantes et parallèles avec les ORFans de bivalves

La stérilité cytoplasmique mâle (CMS) chez les plantes constitue un exemple d'un système où des peptides mitochondriaux peuvent affecter la reproduction. Chez les plantes présentant la CMS, la stérilité des plantes mâles est induite par l'accumulation spatio-temporelle appropriée de protéines issues de gènes ORFans mitochondriaux (Horn et al. 2014). Une hypothèse sur le fonctionnement de ce système est que le domaine hydrophobe N-terminal de ces protéines est fait des protéines de la membrane mitochondriale, où elles nuisent à l'intégrité de cette membrane au niveau de l'anthere et ainsi induisent la mort du pollen (Nizampatnam et al. 2009). Il est intéressant de constater que plusieurs des protéines ayant une certaine homologie avec les ORFans de bivalve sont des protéines ayant une fonction du côté cytoplasmique de la membrane mitochondriale externe (Milani et al. 2013). Par ailleurs, nous savons qu'il existe un ou des mécanismes d'export de protéines depuis la mitochondrie (Soltys & Gupta 2000). Or, plusieurs ORFans de bivalve portent un peptide signal N-terminal : ces protéines pourraient être transportées ailleurs dans la cellule, alors que celles ne portant pas le signal, ou bien ayant subi un clivage post-transcriptionnel du signal, se retrouveraient attachées à la membrane mitochondriale.

1.8 Hypothèses quant à l'origine de ORFans mitochondriaux

Par un processus nommé l'endogénéisation, plusieurs virus peuvent s'intégrer au génome de leur hôte et, lorsque l'intégration affecte la lignée germinale de celui-ci, leur génome peut être transmis verticalement et ainsi se fixer dans une population (Boeke & Stoye 1997). Après leur insertion, les séquences virales peuvent être co-optées pour des fonctions de la cellule

hôte et ainsi contribuer à l'évolution du génome hôte (Feschotte & Gilbert 2012). Or, les séquences des ORFans chez les bivalves à DUI ont des ressemblances de séquence avec plusieurs gènes viraux. Parmi ces ressemblances, on note le domaine de dimérisation de la capsidite rétrovirale (chez *M. edulis*), la protéine VP1 servant à coiffer les ARN messagers viraux puis une protéine virale structurelle, la fibritine (toutes deux chez *V. ellipsiformis*) (Milani et al. 2013). Parmi les protéines virales ayant une ressemblance avec les gènes *m-orf* au niveau de leurs domaines encodés, on retrouve là encore des protéines de capsidite (Milani et al. 2013). Il a donc été suggéré que des séquences virales endogénéisées auraient acquis de nouvelles fonctions dans l'hôte et se manifesteraient aujourd'hui sous la forme de ces ORFans. Cette hypothèse est renforcée par le fait que, tout comme plusieurs séquences virales incorporées aux génomes de mammifères (Feschotte 2008), ces ORFans pourraient être impliquées dans la régulation de la transcription (Milani et al. 2013).

Outre l'hypothèse de l'origine virale, une autre origine possible pour ces gènes pourrait être la duplication de gènes mitochondriaux pré-existants puis la divergence subséquente d'une des deux copies (Mitchell et al. 2016). Par exemple, le gène *m-orf* possède une ressemblance importante de séquence avec le gène mitochondrial *atp8* et, de plus, ces gènes se retrouvent l'un à côté de l'autre au niveau du génome mâle des moules d'eau douce. Pour sa part, le gène *f-orf* porte une ressemblance au gène *nad2*, et ces deux gènes sont eux aussi voisins sur le génome mitochondrial femelle des moules d'eau douce. Le dernier indice supportant l'hypothèse que ces gènes soient issus de duplications est que le gène *h-orf* des espèces hermaphrodites de moules d'eau douce semble être une version fortement mutée du gène *f-orf* des femelles, ce qui suggère que le taux d'évolution de ces gènes est très rapide, donc que les séquences auraient pu diverger très rapidement suivant l'évènement hypothétique de duplication (Mitchell et al. 2016).

1.9 Rôle potentiel des ORFans dans l'identité sexuelle

Les deux hypothèses mises de l'avant pour expliquer l'origine de ces gènes ORFans mitochondriaux présentent chacune une opportunité de décrire le lien entre la DUI et la détermination du sexe discuté à la section 1.3. Concernant la ressemblance entre les ORFans mitochondriaux et les protéines de la capsid, il est à noter que ce type de protéine induit généralement une agrégation périnucléaire des mitochondries par une altération de la conformation du cytosquelette (Galluzzi et al. 2008). D'ailleurs, les mitochondries répondent parfois à une infection virale en migrant dans le même sens que des protéines du tégument viral (Ohta & Nishiyama 2011). Sur la base de ces observations, Milani et al. (2013) ont postulé que ces ORFans pourraient influencer le niveau d'agrégation et ainsi la localisation des mitochondries issues des spermatozoïdes chez les embryons précoces de bivalves à DUI, ce qui dicterait le sexe de l'embryon. Pour ce qui est de l'hypothèse de la duplication génique, la forte divergence nucléotidique de *h-orf* par rapport à *f-orf*, jumelé à la perte de la DUI chez les moules d'eau douce hermaphrodites, semblent constituer un indice supplémentaire renforçant l'idée que ces nouveaux ORFans soient impliqués dans le maintien du gonochorisme (donc nécessairement dans la détermination sexuelle) chez les espèces qui les possèdent (Breton et al. 2014).

1.10 Modèle suggéré pour la fonction des ORFans chez les moules d'eau douce

Les fonctions anticipées de ces protéines, telles que fournies par les analyses bio-informatiques, de même que leur emplacement subcellulaire observé au microscope (pour ce qui est des moules d'eau douce), ont permis d'établir un modèle qui tente d'expliquer comment ces protéines agissent afin de maintenir le gonochorisme chez les espèces qui les possèdent, et

comment cette action est liée à la DUI et à la détermination du sexe (Breton et al. 2007, Milani et al. 2013). Le modèle implique d'abord que la protéine M-ORF utiliserait son domaine de liaison au cytosquelette afin de permettre l'agrégation des mitochondries issues des spermatozoïdes dans une cellule qui serait précurseur au tissu gonadique de l'individu, permettant ainsi leur transmission à la génération qui suivra (c'est le principe-même de la DUI). Par le fait même, M-ORF agirait comme facteur masculinisant. En parallèle, F-ORF serait un facteur féminisant qui servirait à inhiber le développement de tissu testiculaire chez les embryons destinés à devenir des femelles. Cela pourrait expliquer pourquoi les hermaphrodites n'inhibent pas entièrement le développement de ce tissu : les mutations dans leur gène *h-orf* par rapport au gène mère *f-orf* empêche la protéine résultante d'être entièrement fonctionnelle, et il en résulte un certain développement de tissu gonadique mâle (Mitchell et al. 2016).

1.11 Le gène *f-orf* chez la moule marine *Mytilus edulis*

Chez la moule marine *Mytilus edulis*, des analyses préliminaires se sont intéressées au potentiel codant du gène *f-orf* (figure 6) en examinant ses transcrits (Minoiu et al. 2016). Des transcrits de taille appropriée ont effectivement été découverts au niveau des gonades femelles. Ces transcrits possédaient tous un codon ATG (codon d'initiation de la traduction) à leur extrémité 5', ce qui suggère qu'ils pourraient ensuite être pris en charge par les ribosomes et être traduits en protéines. Le gène présente ainsi un potentiel codant intéressant. Cependant, en absence de résultats d'immunobuvardage, il demeure possible que ces transcrits ne soient pas traduits mais aient quand même une fonction dans la cellule sous forme d'ARN.

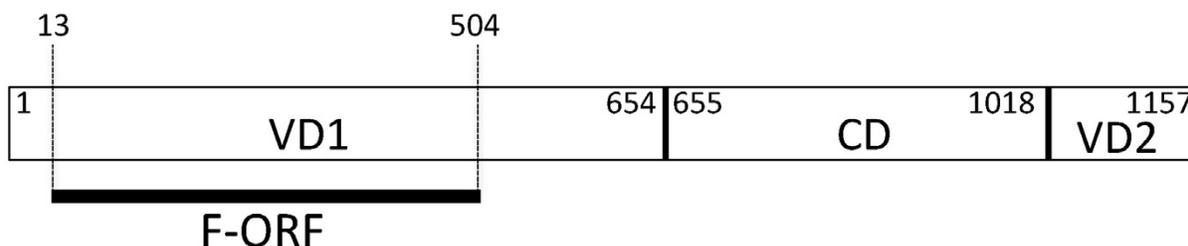


Figure 6. Emplacement du gène *f-orf* dans le domaine variable 1 (lui-même non-codant) de la région de contrôle du génome mitochondrial femelle chez la moule marine *Mytilus edulis* (modifiée de Minoiu et al. 2016).

1.12 Objectifs et hypothèses

À la lumière du modèle suggéré pour la fonction des ORFans qui demeure spéculatif, l'intérêt d'étudier au niveau moléculaire ces gènes et les protéines qu'ils encodent devient d'autant plus important pour en déterminer les fonctions. Ainsi, l'objectif de cette étude était d'abord de valider que le gène *f-orf* chez la moule marine *Mytilus edulis* code effectivement pour une protéine, puis de réaliser ensuite la caractérisation fonctionnelle de cette protéine. C'est une espèce intéressante à étudier dans ce contexte puisque son gène *f-orf* présente un fort potentiel codant. De plus, étant donné que plusieurs des essais biochimiques et immunohistochimiques précédents ont été réalisés seulement au niveau de la moule d'eau douce *V. ellipsiformis*, ce projet visait à combler l'information manquante chez *M. edulis*.

L'hypothèse globale du projet était tout d'abord que le gène *f-orf* chez *M. edulis* soit effectivement codant et qu'il ait un emplacement subcellulaire semblable à celui de son homologue chez la moule d'eau douce. En termes de fonction, nous anticipons que le produit de ce gène aurait un rôle à jouer dans les mécanismes qui sous-tendent la détermination du sexe, la DUI et/ou le maintien du gonochorisme. Il était donc attendu que la nature des protéines qui

sont en complexe avec F-ORF puissent être prédits par ses domaines anticipés et son emplacement subcellulaire, en nous fiant à ce qui est connu de F-ORF chez l'espèce apparentée d'eau douce *V. ellipsiformis*. Ainsi, nous nous attendions à observer des interactions avec, entre autres, les protéines du cytosquelette, la machinerie de réplication et de transcription de l'ADN et d'autres protéines de la membrane nucléaire et du nucléoplasme.

L'approche expérimentale utilisée dans le cadre du projet impliquait des expériences d'immunobuvardage de western afin de valider le potentiel codant du gène et la distribution tissulaire de la protéine, de l'immunohistochimie afin de visualiser son emplacement subcellulaire, puis une série d'expériences ayant pour objectif de déterminer ses partenaires d'interaction. Cela s'est fait par l'entremise d'une co-immunoprécipitation à partir d'extraits protéiques de tissus, suivi de séquençage par spectrométrie de masse des protéines complexées et leur identification par comparaison avec les bases de données. L'identification de ces partenaires est censée nous donner des indices importants au sujet des rôles que jouent cette protéine dans la cellule, et son implication potentielle dans les mécanismes de détermination du sexe, de la DUI et du maintien du gonochorisme. Ces indices doivent s'ajouter à ceux qui ont été fournis par les analyses précédentes de *f-orf* chez la moule d'eau douce *V. ellipsiformis* afin de brosser un portrait plus complet de la fonction de cette protéine et ainsi mettre à jour le modèle illustrant son fonctionnement.

2. Matériel et méthode

2.1 Obtention des anticorps contre F-ORF

2.1.1 Immunisation du lapin

Afin d'obtenir des anticorps dirigés spécifiquement contre notre protéine d'intérêt, deux lapins ont été immunisés (Life Technologies Corporation) en utilisant un épitope spécifique à F-ORF chez *Mytilus edulis* (LISEASGAINAGKESFSDC). Le sérum a été récolté à différents stades de l'immunisation des lapins (jours 0, 35 et 56). Toutefois, seul le sérum récolté au jour 56 a été utilisé dans le cadre de ce projet.

2.1.2 Purification des anticorps

Les anticorps contenus dans le sérum récolté au jour ultime (56) ont été purifiés en utilisant le Antibody Purification Kit (Protein A) (Abcam), selon les instructions du fabricant.

2.1.2 Vérification de la purification par *dot-blot*

Afin de vérifier la présence de l'anticorps dans l'éluat à la suite de la purification, un *dot-blot* a été réalisé. 2µl de la solution d'anticorps purifiée puis 2µl du sérum ont été déposés en parallèle sur une membrane de nitrocellulose (GVS Life Sciences) puis laissées 10 minutes à sécher à température pièce. La membrane a ensuite été bloquée avec une solution de lait (5% lait en poudre, 0.05% Tween 20 dans du tampon phosphate salin (PBS)) pendant 1h. La membrane a été incubée dans la solution d'anticorps secondaire anti-lapin couplé à la peroxydase de raifort (Tableau I) pendant 1h. 3 lavages de 15 minutes dans la solution de lait ont été réalisés, puis la révélation du marquage protéique par l'ajout du substrat de la peroxydase

et sa conversion subséquente en précipité coloré a été faite avec une solution de révélation (MBI)

et la membrane photographiée par un appareil Fusion (MBI).

Tableau I. Liste des anticorps primaires et secondaires utilisés. L'anticorps monoclonal est issu du sérum anti-F-ORF, jour 56.

Anticorps primaires
Sérum anti F-ORF, jour 56 (Life Technologies Corporation)
Anticorps monoclonal anti F-ORF purifié (P. Ouimet) (Épitope: LISEASGAINAGKESFSDC)
Anticorps polyclonal anti F-ORF purifié (M. Lubosny, Institute of Oceanology, Polish Academy of Sciences, Department of Genetics and Marine Biotechnology)
Anti-ATP5A antibody [15H4C4] - Mitochondrial Marker (Abcam)
Anticorps secondaires
Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Rabbit IgG (H+L) (Jackson Immuno)
Peroxidase AffiniPure Goat Anti-Mouse IgG (H+L) (Jackson Immuno)
Goat anti-Rabbit IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 488 (Invitrogen)
Goat anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, Alexa Fluor 594 (Invitrogen)

2.2 Collecte des spécimens et récolte des tissus

Les spécimens de l'espèce *Mytilus edulis* ont été obtenus dans des marchés locaux tout au long du projet, au fur et à mesure, en fonction des besoins. La moule commune comestible vendue en épicerie provient de l'Île-du-Prince-Édouard et il s'agit de l'espèce *M. edulis*. Les spécimens ont été disséqués à l'œil nu de manière à isoler quatre tissus d'intérêt : le manteau (qui porte la gonade), le pied, le muscle adducteur et la branchie. Les instruments utilisés ont été nettoyés à l'éthanol 70% entre chaque tissu et entre chaque spécimen. Le sexe de chaque individu a été déterminé au microscope optique (Leica, objectif 100X), en examinant les gamètes retrouvés dans la sécrétion issue de la gonade et qui montrent un fort dimorphisme sexuel. Les tissus disséqués ont été utilisés frais et jamais congelés.

2.3 Détection de la protéine F-ORF chez *Mytilus edulis* – Approche par buvardage

2.3.1 Préparation de l'extrait protéique

Des extraits de 100mg de chaque type de tissu testé (manteau, pied, muscle et branchie) provenant d'un même spécimen ont chacun été ajoutés à 1ml de tampon d'homogénéisation (sucrose 0.25M, acide éthylènediaminetétraacétique (EDTA) 1mM, acide 4-(2-hydroxyéthyl)-1-pipérazine éthane sulfonique (HEPES) 10mM, inhibiteurs de protéases, pH 7.4) et homogénéisés avec un homogénéisateur de type Dounce.

2.3.2 Fractionnement de l'extrait protéique

L'extrait protéique brut a été centrifugé à 1000g (Dimauro et al 2012) afin de sédimenter les noyaux des cellules. Le culot a été re-suspendu dans 1ml de tampon d'essai d'immunoprécipitation (RIPA, contenant trishydroxyméthylaminométhane-HCl (Tris-HCl) 50mM, NaCl 150mM, EDTA 1mM, Triton X-100 1%, Na-déoxycholate 0.5%, dodécylsulfate de sodium (SDS) 0.1%, pH 7.6). Le surnageant a été centrifugé à 11000g (Dimauro et al. 2012) afin de sédimenter les mitochondries. Le culot a été re-suspendu dans 100µl de tampon RIPA.

2.3.3 Migration sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

Les différentes fractions d'extrait protéique ont été supplémentées de tampon de chargement (SDS 6%, sucrose 400mM, Tris-Cl 400mM, beta-mercaptoéthanol 1%, bleu de

bromophénol) puis chauffées 10 minutes à 95°C avant d'être chargées dans un gel de polyacrylamide dénaturant en gradient 4%-20%, suivi d'une migration à 50V pendant 18h.

2.3.4 Transfert sur membrane de nitrocellulose

Les protéines ont été transférées du gel vers une membrane de nitrocellulose à 1000mA pendant 1h30 dans un tampon de transfert (glycine 1.5%, Tris Base 0.3%, méthanol 20%). La membrane contenant les protéines a été colorée brièvement au rouge de Ponceau afin de marquer l'échelle de poids moléculaire et les pistes puis photographier la membrane.

2.3.5 Immunobuvardage et détection de la protéine

La membrane a été simultanément décolorée et bloquée dans une solution de lait (voir 2.1.2) pendant 1h. Elle a ensuite été découpée et chaque partie de membrane a été incubée durant la nuit à 4°C dans 5-10ml d'une solution de lait contenant l'un des quatre anticorps primaires dilué à 1:1000 (Tableau I). Le lendemain, les membranes ont été lavées 3 x 15 minutes dans une solution de lait puis incubées 2h à température pièce dans 5-10ml d'une solution de lait contenant soit l'anticorps secondaire Anti-Rabbit-peroxydase (pour les membranes exposées au sérum, à l'anticorps monoclonal ou à l'anticorps polyclonal) ou bien Anti-Mouse-peroxydase (pour la membrane exposée à l'anticorps Anti-ATP5A), dilué à 1:10000 (Tableau I). Elles ont ensuite été lavées 2 x 15 minutes dans une solution de lait puis 15 minutes dans du tampon tris salin (Tris base 20mM, NaCl 150mM, pH 7.4). Les protéines ont ensuite été révélées puis les membranes photographiées (voir 2.1.2).

2.4 Détection de la protéine F-ORF chez *Mytilus edulis* –

Approche par immunohistochimie

2.4.1 Mise en culture des cellules

En conditions aseptiques, des spécimens ont été lavés à l'eau du robinet, aspergés d'éthanol 70% puis laissés à sécher. Ils ont ensuite été ouverts puis disséqués avec des outils stériles, puis un morceau de manteau de 1cm³ a été transféré dans une solution d'eau salée et d'antibiotique (Antibiotic/Antimycotic Solution (Wisent), Penicillin/Streptomycin (Wisent)) et laissé 40 min à température pièce. Le tissu a ensuite été transféré dans du milieu de culture L-15 Leibovitz (Gibco) préparé dans de l'eau salée (NaCl 3.5%) contenant de la trypsine 0.25% (Wisent) puis laissé 1h. Le manteau a ensuite été agité vigoureusement dans le milieu afin de détacher un maximum de cellules, puis le milieu centrifugé à 800g pendant 10 min. Le culot de cellules a été lavé 3 x 15 minutes dans 5ml milieu L-15, puis re-suspendu dans 1ml de ce même milieu. 200µl de la suspension de cellules ont été transférés dans chaque puits d'une plaque de 24 puits contenant une lamelle circulaire ayant préalablement été incubée 45 minutes dans de la poly-L-lysine, lavée à l'eau distillée filtrée puis lavée 2 fois dans du milieu L-15 enrichi en antibiotiques et en sérum de veau fœtal 3.2%. Les cellules ont été laissées sur la lamelle à 20°C pendant 5 jours, en remplaçant le milieu de culture chaque jour.

2.4.2 Exposition aux anticorps et observation

Les lamelles ont été lavées au PBS avant d'être fixées dans du paraformaldéhyde 4% pendant 30 minutes à température pièce, puis lavées 3 x 5 minutes au PBS. Elles ont ensuite été incubées dans une solution de Triton X-100 0.2% dans du PBS pendant 5 minutes puis lavées

au PBS 5 minutes. Elles ont ensuite été bloquées grâce à une solution de blocage (albumine sérique bovine (BSA) 5%, sérum de chèvre normal 5% dans du PBS) pendant 30 minutes à température pièce, puis lavées 5 minutes au PBS. Elles ont ensuite été exposées pendant 2h à 4°C à une solution (BSA 1% dans du PBS) contenant l'anticorps approprié (sérum anti-F-ORF dilué 1:10 ou anti-ATP5A dilué 1:1000, ou bien les deux) (Tableau I). Après 3 lavages de 5 minutes au PBS, elles ont été exposées pendant 1h à température pièce à cette même solution mais contenant plutôt l'anticorps secondaire approprié (Tableau I), puis lavées 3 x 5 minutes au PBS. Elles ont finalement été lavées à l'eau distillée avant d'être montée sur une lame avec le Vectashield Mounting Medium with 4',6-diamidino-2-phenylindole (DAPI) (Vector). Elles ont ensuite été observées et photographiées au microscope confocal (Leica SP-8, objectif 63x, logiciel de contrôle LASX Core Offline version 3.3.0.). Pour chaque prise, 20 photos distinctes ont été prises, chacune correspondant à une profondeur différente dans le champ. Ces 20 photos ont ensuite été superposées avec le logiciel de traitement d'images Fiji (Schindelin et al. 2012).

2.5 Identification des partenaires d'interaction protéiques par co-immunoprécipitation

2.5.1 Préparation de l'extrait protéique brut

L'extrait brut de manteau a été préparé de manière identique à ce qui est décrit en 2.3.1, mais en utilisant 1g de tissu. Un spécimen mâle et un spécimen femelle ont été utilisés.

2.5.2 Fractionnement de l'extrait protéique brut

Le fractionnement de l'extrait protéique brut a été réalisé de manière identique à ce qui est décrit en 2.3.2, mais en re-suspendant le culot enrichi en mitochondries dans 1ml de tampon RIPA.

2.5.3 *Pre-clearing* de l'extrait et co-immunoprécipitation

Les différentes fractions ont subi un prélavage pendant 1h en ajoutant 50µl de résine Protéine A sépharose à 1ml de chacune des différentes fractions. Les fractions ont ensuite été centrifugées 5 min à 200 x g afin de sédimenter la résine. Le surnageant contenant l'extrait fractionné a ensuite été incubé avec 50µl de résine Protéine A sépharose et 50µl de sérum anti-F-ORF jusqu'au lendemain. Après une centrifugation de 5 min à 200g pour sédimenter la résine, les extraits fractionnés ont été écartés et la résine re-suspendue dans 50µl de tampon de chargement.

2.5.4 Migration sur gel de polyacrylamide dénaturant (SDS-PAGE)

La migration sur gel a été réalisée de manière identique à ce qui est décrit en 2.3.3. Le matériel a été réparti de manière égale sur deux gels, dont l'un a servi à la vérification par immunobuvardage de western de la présence de F-ORF dans les échantillons immunoprécipités. Cet immunobuvardage a été réalisé de manière identique à ce qui est décrit en 2.3.4 et 2.3.5.

2.5.4 Coloration, décoloration et découpage du gel, puis séquençage par spectrométrie de masse

L'autre gel (i.e. celui n'ayant pas servi à la vérification de F-ORF par immunobuvardage) a été coloré au Imperial Blue Protein Stain (Thermo Fisher) pendant 2h puis décoloré dans de l'eau distillée jusqu'au lendemain. La bande correspondant à la taille attendue de F-ORF a été découpée puis envoyée à la plateforme de protéomique de l'Institut de Recherche en Immunologie et en Cancérologie (Université de Montréal, [<https://www.irc.ca/>]) afin de réaliser un séquençage de type MS/MS, dont les résultats ont été analysés en aval.

2.6 Préparation du système d'expression artificielle dans les bactéries

2.6.1 Insertion de la séquence du gène dans le vecteur pGEX-

6p1

Après avoir inséré la séquence de F-ORF dans un vecteur de type pMA-T (étape réalisée en amont), cette séquence a été amplifiée par PCR à partir du vecteur (Pfu DNA polymerase, Thermo Scientific)(Amorces F-ORF - F et F-ORF - R)(Tableau II) et le produit vérifié sur gel d'agarose 1% (migration de 150V, 25 minutes) après ajout de tampon de chargement (Invitrogen) puis purifié à l'aide du PCR Purification Kit (Qiagen). Après avoir vérifié la concentration du produit à l'aide du BioDrop, le produit de même qu'un stock de vecteur pGEX-6p1 ont été digérés avec les enzymes de restriction BamHI (Thermo Scientific) et EcoRI (Invitrogen) à 37°C pendant 2h. Les produits résultants ont été purifiés à l'aide du PCR

Purification Kit (Qiagen). Ces produits ont été combinés par une réaction de ligation à 15°C jusqu'au lendemain (T4 Ligase, Invitrogen).

Tableau II. Amorces utilisées lors des réactions de PCR. Les sites de restriction ayant servi à la digestion enzymatique sont identifiés en caractères gras. L'enzyme de restriction correspondante est identifiée près du nom de l'amorce.

Nom de l'amorce	Séquence
F-ORF - F	GAAGGCCG TCAAGGCCACG
F-ORF - R	ATGAGGCCAGTCTTGTGCTC
F-ORF- ΔdTM - F (BamHI)	GAGAGGATCCAAAAAAGACCTACTGTTGAGCG

2.6.2 Transformation des bactéries avec le vecteur

10µl de la solution de vecteur contenant le gène inséré ont ensuite été ajoutés à 80µl de bactéries compétentes *Escherichia coli* BL-21 (NEB) et le tout laissé sur glace 30 min. La solution a ensuite subi un choc thermique à 42°C pendant 45 sec avant d'y ajouter 1ml de bouillon super optimal contenant du glucose. Elle a ensuite été incubée sous agitation à 37°C pendant 1h puis centrifugée 2 min à 900g, étendue sur gélose d'agar-bouillon de lysogénie (LB) contenant de l'ampicilline puis incubée à 37°C jusqu'au lendemain. 6 colonies ont ensuite été sélectionnées puis repiquées dans 10µl d'eau puis chauffées à 95°C pendant 5 min. Après une centrifugation à haute vitesse pendant 10 minutes, les surnageants ont été supplémentés du tampon de chargement ZMTech – 6X fluo-DNA loading buffer (Invitrogen) et chargés sur gel d'agarose 1% (migration 150V, 25 minutes) afin de vérifier la présence de l'insert. Les colonies pour lesquelles l'insert a effectivement été incorporé dans le plasmide ont été repiquées dans

5ml de milieu LB enrichi d'ampicilline jusqu'au lendemain. 500µl de la culture ont ensuite été supplémentés de 500µl de glycérol 50% et le tout congelé à -80°C pour utilisation ultérieure.

2.6.3 Préparation du système artificiel avec protéine tronquée

Les étapes 2.6.1 et 2.6.2 ont été refaites intégralement, mais en utilisant l'amorce F-ORF - ΔdTM - F plutôt que F-ORF - F (Tableau II). Cette amorce a été modifiée de manière à exclure le domaine transmembranaire du gène et ainsi produire une protéine tronquée.

2.6.4 Tests d'expression

Les stocks congelés de bactéries portant les vecteurs avec protéine complète et tronquée ont séparément été repiqués dans 5ml de milieu LB enrichi d'ampicilline et laissés à 37°C sous agitation durant la nuit. Le lendemain, 1ml de cette pré-culture a été inoculé dans 10ml de milieu LB enrichi d'ampicilline et laissé sous agitation à 37°C jusqu'à l'atteinte d'une densité optique de 0,5, tel que mesuré au BioDrop. L'expression de F-ORF a ensuite été induite par l'ajout d'isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside (IPTG). Après 2h, la culture a été centrifugée à vitesse maximale pendant 15 minutes, puis le culot re-suspendu dans 50µl de tampon de chargement. Les extraits protéiques résultants ont été chargés sur gel de polyacrylamide dénaturant 10%, puis ont migré à 60mA pendant 2h. Le gel a ensuite été coloré avec de l'Imperial Blue pendant 1h puis décoloré dans de l'eau distillée jusqu'au lendemain.

3. Résultats

3.1 Obtention des anticorps

3.1.1 Vérification de la purification par *dot-blot*

Afin de vérifier que la purification de l'anticorps monoclonal anti-F-ORF de *Mytilus edulis* a fonctionné et que l'anticorps a bien été élué et est présent dans la fraction conservée à la suite du processus de purification, nous avons réalisé un buvardage de type *dot-blot* (figure 7).



Figure 7. Vérification par dot-blot de la présence d'anticorps anti-ORF de *M. edulis* dans les échantillon purifié (Pur) et de sérum anti-F-ORF au jour 56 (Sérum).

Un marquage sous forme de tache noire est présent au niveau de l'échantillon d'anticorps purifié et une plus grande tache apparaît au niveau de l'échantillon de sérum, ce qui supporte l'idée que ces deux extraits contiennent de l'anticorps (le sérum étant plus concentré que l'échantillon purifié). Bien qu'il soit fort probable que ces deux extraits contiennent de l'anticorps anti-F-ORF, un essai supplémentaire réalisé avec l'épitope ciblé par l'anticorps

monoclonal aurait permis de valider qu'il s'agit bien de l'anticorps anti-F-ORF dans ces extraits. Un contrôle négatif aurait également dû être réalisé en parallèle, par exemple en apposant sur la membrane une solution d'anticorps primaire de souris, afin de valider que l'anticorps primaire détecté dans le sérum et dans l'échantillon purifié est effectivement un anticorps de lapin.

3.2 Détection de la protéine F-ORF putative chez *Mytilus*

***edulis* – Approche par buvardage**

3.2.1 Immunobuvardage et détection de la protéine

Afin de tester pour la présence de la protéine F-ORF putative dans différents tissus chez *Mytilus edulis* et ainsi valider le potentiel codant du gène *f-orf* chez cette espèce, un immunobuvardage a été réalisé sur différentes fractions cellulaires issues de quatre tissus différents : le manteau, le pied, le muscle adducteur et la branchie (figure 8). Chaque extrait est un mélange de 50% d'extrait provenant d'un spécimen mâle et 50% d'extrait provenant d'un spécimen femelle. L'anticorps utilisé est le sérum anti-F-ORF.

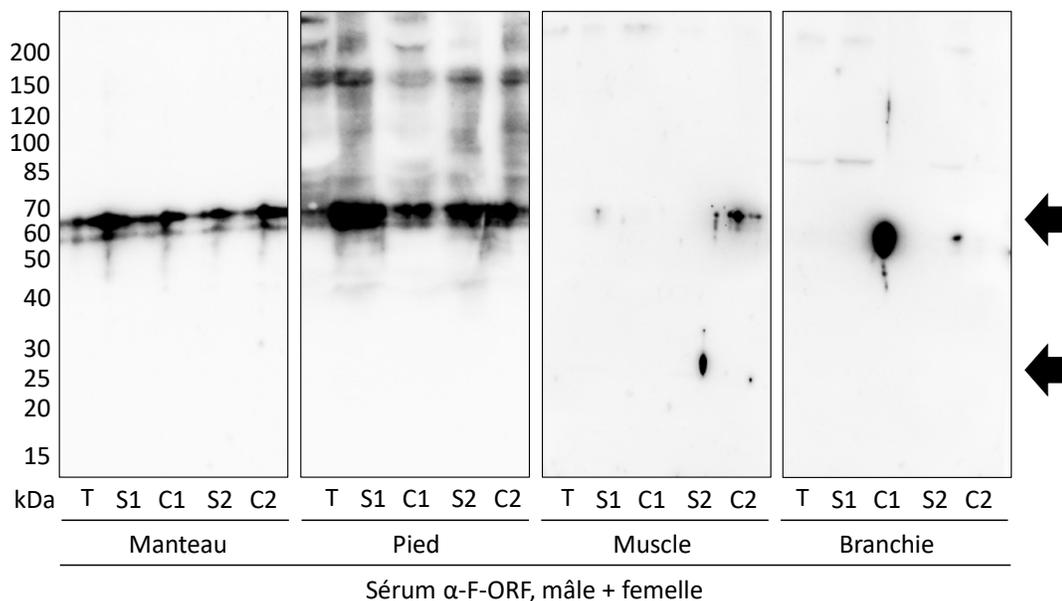


Figure 8. Détection par immunobuvardage de la protéine F-ORF putative dans les différentes fractions cellulaires d'extraits protéiques mâle et femelle (combinés) du manteau, du pied, du muscle adducteur et de la branchie chez *Mytilus edulis*. La flèche du bas indique l'emplacement attendu de F-ORF (25kDa). La flèche du haut indique l'emplacement de la bande commune à trois des quatre tissus testés (60kDa). T, extraits totaux; S1 et C1, surnageants et culots issus de la première centrifugation de l'extrait total; S2 et C2, surnageants et culots issus de la deuxième centrifugation de l'extrait total.

Une bande à la hauteur de 60kDa apparaît dans les culots enrichis en mitochondries (C2) des extraits de manteau, de pied et de muscle, puis dans les culots enrichis en noyaux (C1) du manteau et du pied. La taille de 60kDa ne correspond toutefois pas à la taille de la protéine telle que prédite par la longueur du gène en acides aminés, qui serait plutôt de 25kDa, tel que déterminé par l'outil en ligne ExPASy (Gasteiger et al. 2005). D'autres bandes, bien que moins fortement marquées, apparaissent également dans les surnageants et les extraits totaux du muscle (200kDa) et de la branchie (85kDa et 200kDa). Quant à lui, l'extrait de pied présente un marquage généralisé et peu défini dans la région supérieure de la membrane (supérieur à 60kDa).

Afin de valider davantage l'identité de la bande de 60kDa comme étant effectivement F-ORF, un immunobuvardage a été réalisé à partir de tissu gonadique mâle et femelle en utilisant deux anticorps purifiés anti-F-ORF différents : celui que nous avons développé (PO), dirigé contre un peptide de l'extrémité C-terminale de la protéine et donc virtuellement monoclonal et l'autre obtenu d'un collaborateur (ML) (Tableau I) et pour lequel la protéine complète a été utilisée pour l'immunisation des lapins, que l'on désigne donc comme polyclonal (figure 9).

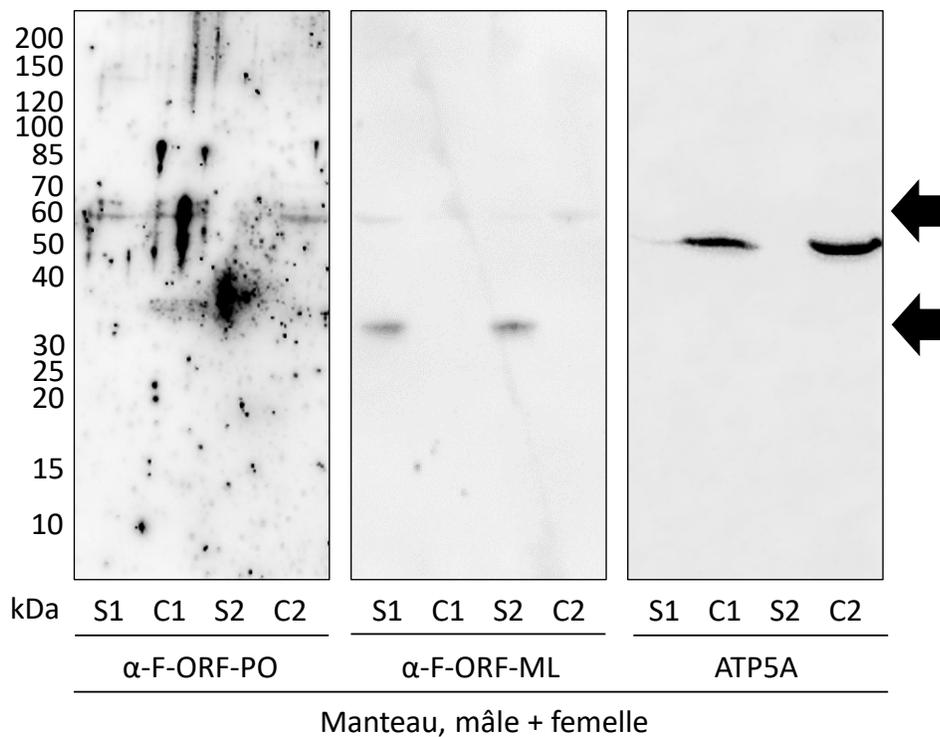


Figure 9. Détection par immunobuvardage de la protéine F-ORF putative dans les différentes fractions d'extraits protéiques mâles et femelles (combinés) du manteau par l'entremise de deux anticorps anti F-ORF dirigés vers des épitopes différents. La flèche du haut indique les bandes à 60kDa. La flèche du bas indique les bandes à 35kDa. ATP5A (55kDa) est un marqueur mitochondrial. S1 et C1, surnageants et culots issus de la première centrifugation de l'extrait total; S2 et C2, surnageants et culots issus de la deuxième centrifugation de l'extrait total.

La même protéine migrant à 60kDa détectée par le sérum anti F-ORF (figure 8) semble également être détectée par les deux anticorps purifiés (figure 9). Tout comme la protéine détectée par l'immunobuvardage précédent, cette protéine semble se retrouver à la fois dans la fraction nucléaire et la fraction mitochondriale du manteau. Toutefois, il est à noter que puisque l'ATP5 (la sous-unité 5 de l'ATP synthase utilisée ici comme marqueur mitochondrial) est détectée également dans la fraction enrichie en noyaux (C1), cette fraction contient sans doute des mitochondries, donc il est impossible de conclure si la protéine se retrouve assurément au niveau du noyau en plus de la mitochondrie. Tout de même, l'apparition d'une bande à 60kDa constitue un indice voulant que la protéine reconnue par le sérum anti-F-ORF lors de l'expérience précédente (figure 8) soit la même que celle reconnue par les anticorps purifiés ici (présumément F-ORF, bien que la protéine ne semble pas migrer à la hauteur attendue dans le gel). Une protéine détectée par l'anticorps polyclonal mais non par notre anticorps monoclonal apparaît également à la hauteur d'environ 35 kDa dans les surnageants seulement, puis cette bande est marquée encore plus fortement que celle à 60kDa.

Puisque les immunobuvardages décrits précédemment ont été réalisés sur des extraits protéiques issus de tissus mâles et femelles combinés, une expérience supplémentaire est nécessaire pour déterminer si la protéine est détectée uniquement dans les tissus d'un des deux sexes, ou bien si elle est présente au niveau des deux sexes. Ainsi, un immunobuvardage a été réalisé avec l'anticorps polyclonal (ML) sur les extraits protéiques issus des manteaux mâles et femelles séparément (figure 10).

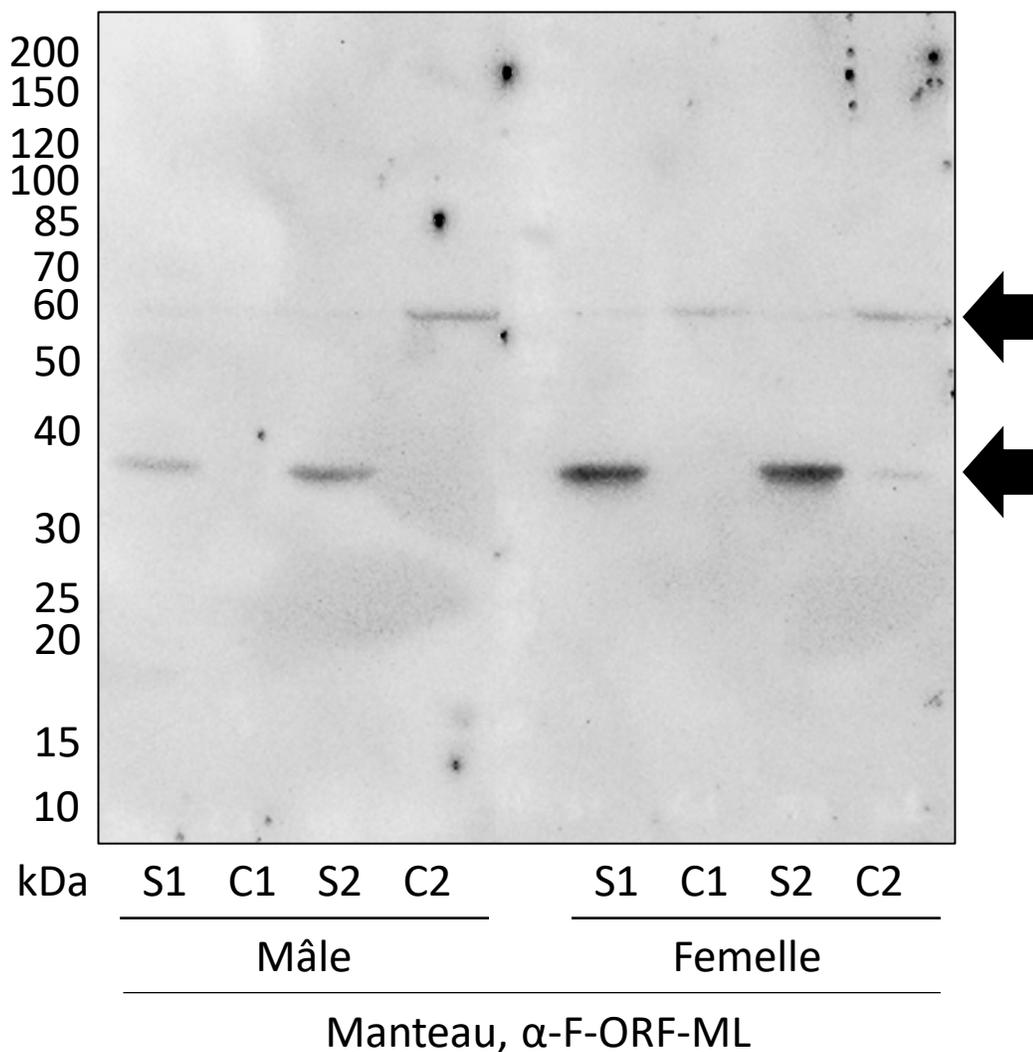


Figure 10. Détection par immunobuvardage de la protéine F-ORF putative dans les différentes fractions d'extraits protéiques mâles et femelles (séparés) du manteau. La flèche du haut indique les bandes à 60kDa. La flèche du bas indique les bandes à 35kDa. S1 et C1, surnageants et culots issus de la première centrifugation de l'extrait total; S2 et C2, surnageants et culots issus de la deuxième centrifugation de l'extrait total.

En mettant en évidence à nouveau la bande à 60kDa dans les culots enrichis en mitochondries et en noyaux des extraits mâle et femelle, cet immunobuvardage supporte l'idée que la protéine F-ORF putative est présente au niveau du manteau chez les deux sexes.

3.3 Détection de la protéine F-ORF putative chez *Mytilus*

edulis – Approche par immunohistochimie

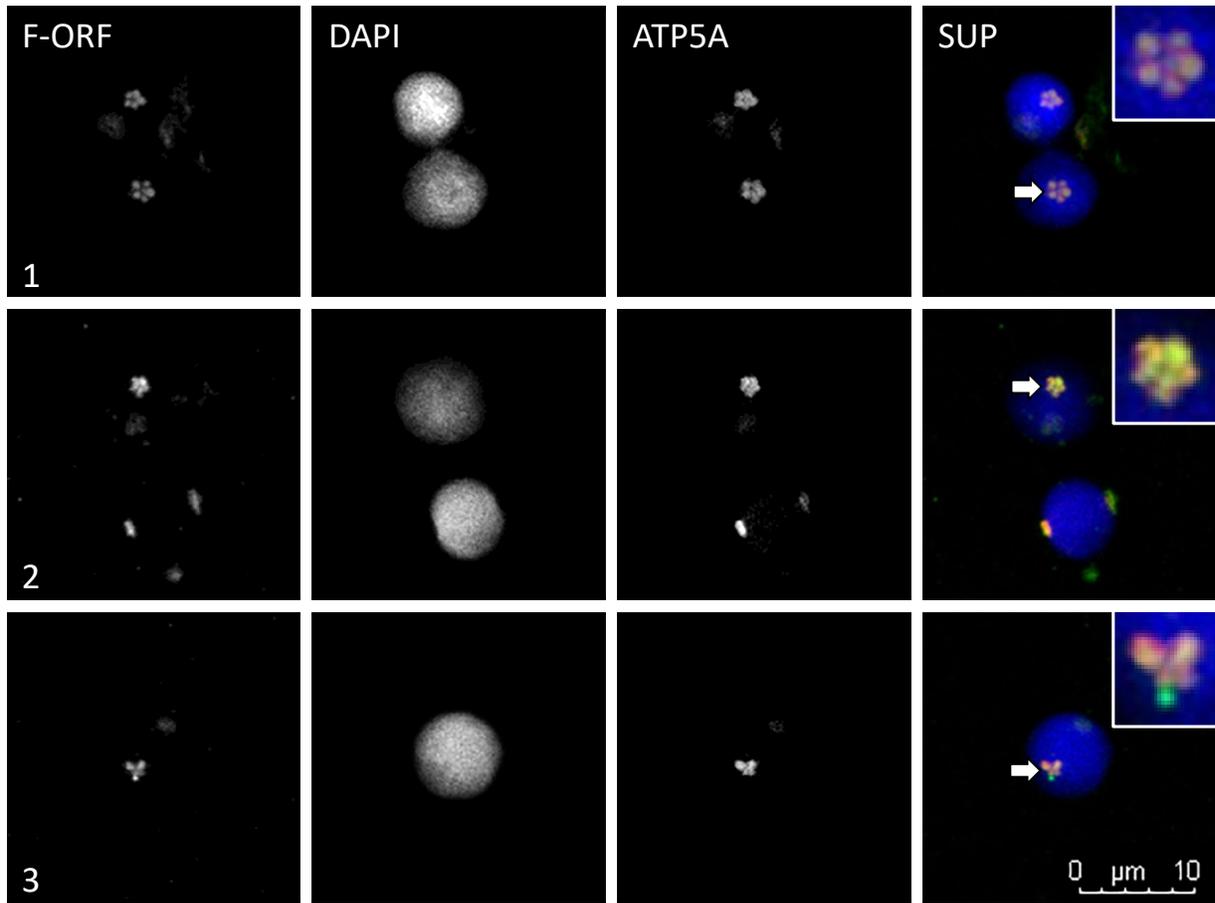


Figure 11. Localisation intracellulaire de la protéine F-ORF putative dans des cellules de manteau en culture chez trois spécimens mâles de *Mytilus edulis*. DAPI, marqueur nucléaire; ATP5A, marqueur mitochondrial; SUP, superposition des trois images précédentes; rangées 1 à 3, trois spécimens différents de *M. edulis*. Les trois couleurs retrouvées dans les images superposées représentent chacune un des marqueurs : F-ORF en vert, le DAPI en bleu et ATP5A en rouge. Les trois flèches blanches pointent chacune vers une pentade de mitochondries. Une vue agrandie de ces pentades est fournie dans les trois encarts.

Afin de valider par une approche différente de l'immunobuvardage l'emplacement intracellulaire de la protéine F-ORF putative chez *Mytilus edulis*, nous avons employé une

approche par immunohistochimie (figure 11). Ainsi, le sérum anti-F-ORF a été appliqué sur des cellules de manteau mâle ayant été mises en culture, puis le DAPI et l'anticorps anti-ATP5A ont été utilisés pour marquer respectivement l'ADN (le noyau) et les mitochondries de ces cellules.

Tel qu'illustré par le marquage de l'ATP5A, les mitochondries des trois spécimens présentent un arrangement particulier sous forme de pentade (cinq mitochondries agencées de manière circulaire). L'expérience a révélé un marquage par le sérum anti-F-ORF : la protéine reconnue par cet anticorps est située aux mêmes endroits que les mitochondries, puis avec un arrangement quasi-identique (figure 11, marquage jaunâtre indiqué par les flèches et particulièrement visible chez le spécimen 2). Quant à lui, le noyau, illustré par le marquage au DAPI, semble être distribué autour des mitochondries. Ce résultat porte à croire que, du moins chez le mâle et dans ce type cellulaire particulier, la protéine reconnue par l'anticorps anti-F-ORF se retrouve dans les mitochondries ou bien à leur surface.

3.4 Identification des partenaires d'interaction protéiques par co-immunoprécipitation

Afin de déterminer l'identité des partenaires d'interaction protéiques de la protéine reconnue par l'anticorps anti-F-ORF et ainsi mieux la caractériser, nous avons procédé par co-immunoprécipitation suivi d'un séquençage par spectrométrie de masse. Pour ce faire, nous avons co-immunoprécipité la protéine F-ORF putative à partir d'extraits protéiques de manteaux mâles et femelles. Afin de nous assurer de la présence de la protéine F-ORF putative dans les extraits immunoprécipités, nous avons gardé une partie des extraits immunoprécipités pour

réaliser un immunobuvardage préalablement au séquençage, en nous servant du sérum anti-F-ORF (Figure 12).

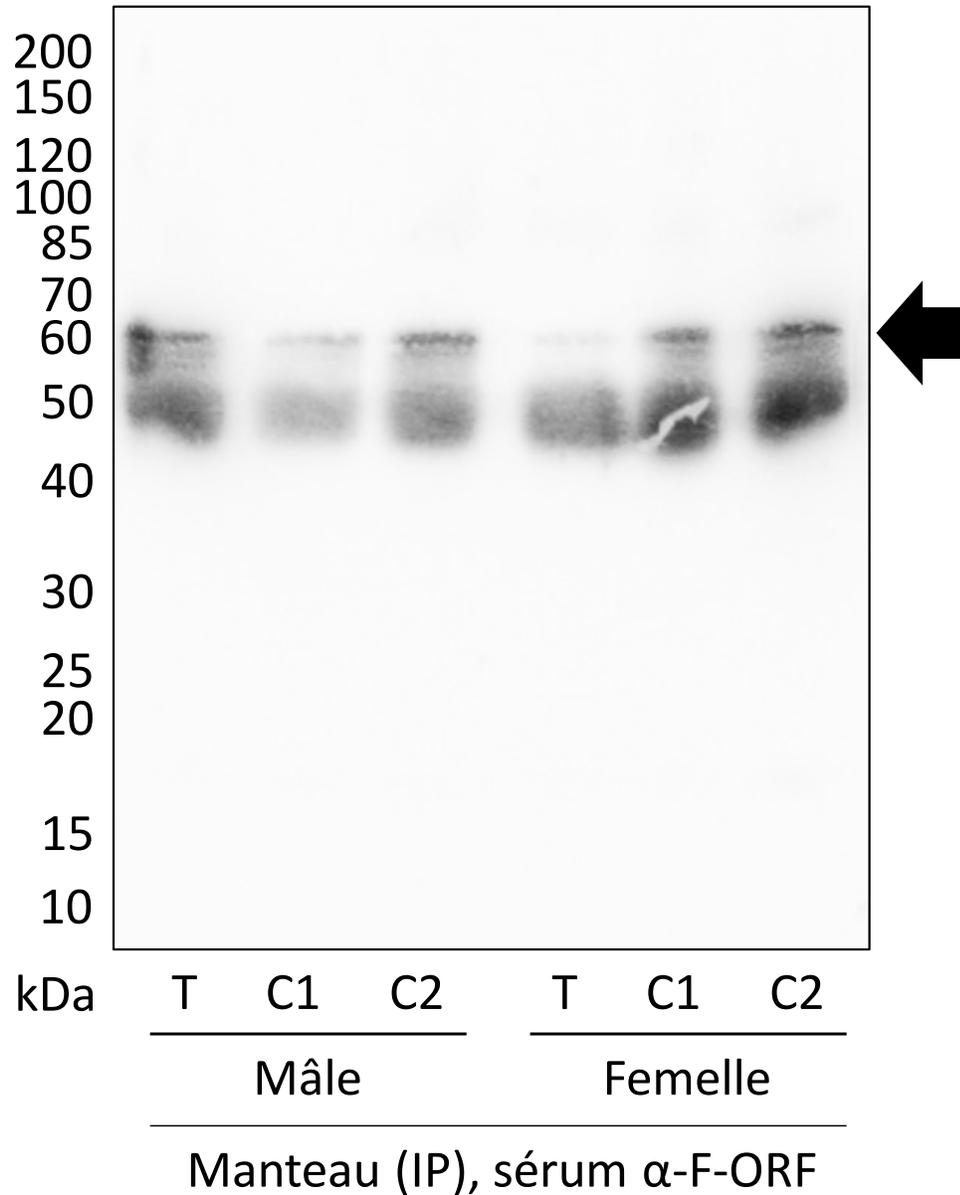


Figure 12. Détection par immunobuvardage de la protéine F-ORF putative dans les différentes fractions d'extraits protéiques mâles et femelles immunoprécipités du manteau. La flèche indique l'emplacement de la bande à 60kDa. T, extraits totaux; S1 et C1, surnageants et culots issus de la première centrifugation de l'extrait total; S2 et C2, surnageants et culots issus de la deuxième centrifugation de l'extrait total.

L'apparition d'une bande à la hauteur de 60kDa concorde avec la présence d'une bande de 60kDa retrouvée dans les différents tissus testés et détectée par les différents anticorps (figures 8, 9 et 10). La bande épaisse à environ 55kDa correspond à la réaction de l'anticorps secondaire avec la chaîne lourde de l'anticorps primaire retrouvé dans le sérum (Lal et al. 2005). Ayant confirmé que la bande à 60kDa se retrouve effectivement dans les extraits immunoprécipités, le produit de l'immunoprécipitation de la fraction enrichie en mitochondries a pu être chargé sur gel dénaturant afin d'isoler la portion du gel contenant la bande à 60kDa (figure 13) et le faire digérer en vue d'un séquençage par spectrométrie de masse. La bande à 60kDa est également parmi les plus intensément colorées sur le gel, excluant les bandes à 55kDa et à 25kDa, qui correspondent respectivement aux chaînes lourde et légère des IgG ayant migré simultanément dans le gel (Lal et al. 2005).

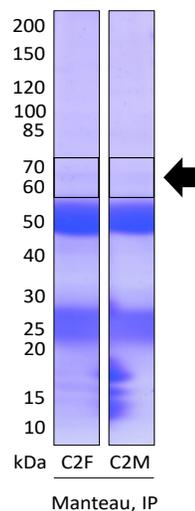


Figure 13. Migration sur gel de polyacrylamide des extraits protéiques du manteau mâle et femelle enrichis en mitochondries et immunoprécipités pour la protéine F-ORF putative. Les encadrés représentent les parties du gel susceptibles de contenir la protéine F-ORF putative et ayant été sujettes au séquençage par MS/MS. La flèche indique la bande la plus intense (excluant les IgG) qui correspond présumément à la protéine F-ORF putative. C2, culot issu de la deuxième centrifugation de l'extrait total et enrichi en mitochondries; F, femelle; M, mâle.

Tableau III. Répertoire des protéines ayant été jumelées à 99% ou plus aux séquences obtenues lors du séquençage des protéines contenues dans le morceau de gel illustré à la figure 13. % couv., pourcentage de couverture en acides aminés.

Protéine	# d'accession	Taille (kDa)	Nombre de jumelages pour C2F (% couv.)	Nombre de jumelages pour C2M (% couv.)
Tubulin alpha chain (Fragment)	A0A076N7C5_MYTGA	30	20 (53)	21 (40)
Actin	Q9Y0D6_MYTGA	42	9 (28)	12 (26)
Histone H2B	Q6WV89_MYTGA	14	8 (31)	6 (45)
Histone H4	H4_MYTGA	11	8 (41)	5 (22)
HSP70	Q5I2A7_MYTGA	71	6 (10)	2 (7)
Mytilus Egg Surface Protein-1	A0A2P0VKF0_MYTED	80	6 (7)	0 (0)
Histone H3	Q6WV87_MYTGA	15	4 (24)	2 (10)
Elongation factor 1-alpha	Q6BD10_MYTGA	50	4 (15)	1 (2)
Alpha-tubulin (Fragment)	Q3S336_MYTED	16	3 (19)	2 (19)
Tubulin beta chain (Fragment)	G0YGJ4_MYTED	18	3 (16)	2 (16)
Histone H2B	Q8I0U3_MYTED	14	2 (15)	2 (16)
Histone H3	Q7K8B9_MYTED	15	1 (7)	2 (7)

Le séquençage par spectrométrie de masse a généré un ensemble de hits (tableau III). Parmi ceux-ci, on retrouve majoritairement des composantes du cytosquelette (actine, alpha- et beta-tubuline) et des histones (H2B, H3, H4), mais on y retrouve également une protéine chaperon (HSP70), un facteur d'élongation (eEF1-alpha) puis une protéine non-caractérisée mais soupçonnée d'être impliquée dans la fusion des spermatozoïdes et des œufs, Mytilus egg surface protein-1 (Harper et al. 2017). Cependant, la séquence de la protéine F-ORF elle-même

n'est pas comprise parmi ces hits, même lorsque le seuil de jumelage est baissé en-dessous de 99% (non-présenté); or, en absence de cette séquence, il est impossible de conclure que les protéines identifiées sont effectivement des partenaires d'interaction de F-ORF.

3.5 Préparation du système d'expression artificielle dans les bactéries

Afin de réaliser des tests d'expression ultérieurs, tels que la production artificielle d'une grande quantité de F-ORF (à des fins de co-immunoprécipitation, de purification d'anticorps ou bien de cristallographie, par exemple) ou bien la production d'une protéine F-ORF tronquée (i.e. dont un ou plusieurs domaines sont absents), il peut être utile d'avoir en main un système d'expression artificielle exploitant des bactéries et permettant de produire des protéines de fusion avec une étiquette d'affinité. Ainsi, nous avons produit deux variantes d'un tel système, soit l'un pour la protéine complète, puis l'autre pour la protéine tronquée au niveau de son domaine transmembranaire. Ces deux variantes du gène ont été incorporées dans un vecteur d'expression portant une étiquette d'affinité de type glutathion S-transférase (GST). Afin de vérifier la fonctionnalité du système, un test d'expression a été réalisé en induisant l'expression du gène par l'ajout d'IPTG dans une colonie de bactéries en croissance ayant incorporé l'un ou l'autre des deux vecteurs produits. Les extraits de protéines bactériennes résultants ont ensuite migré sur un gel dénaturant (figure 14).

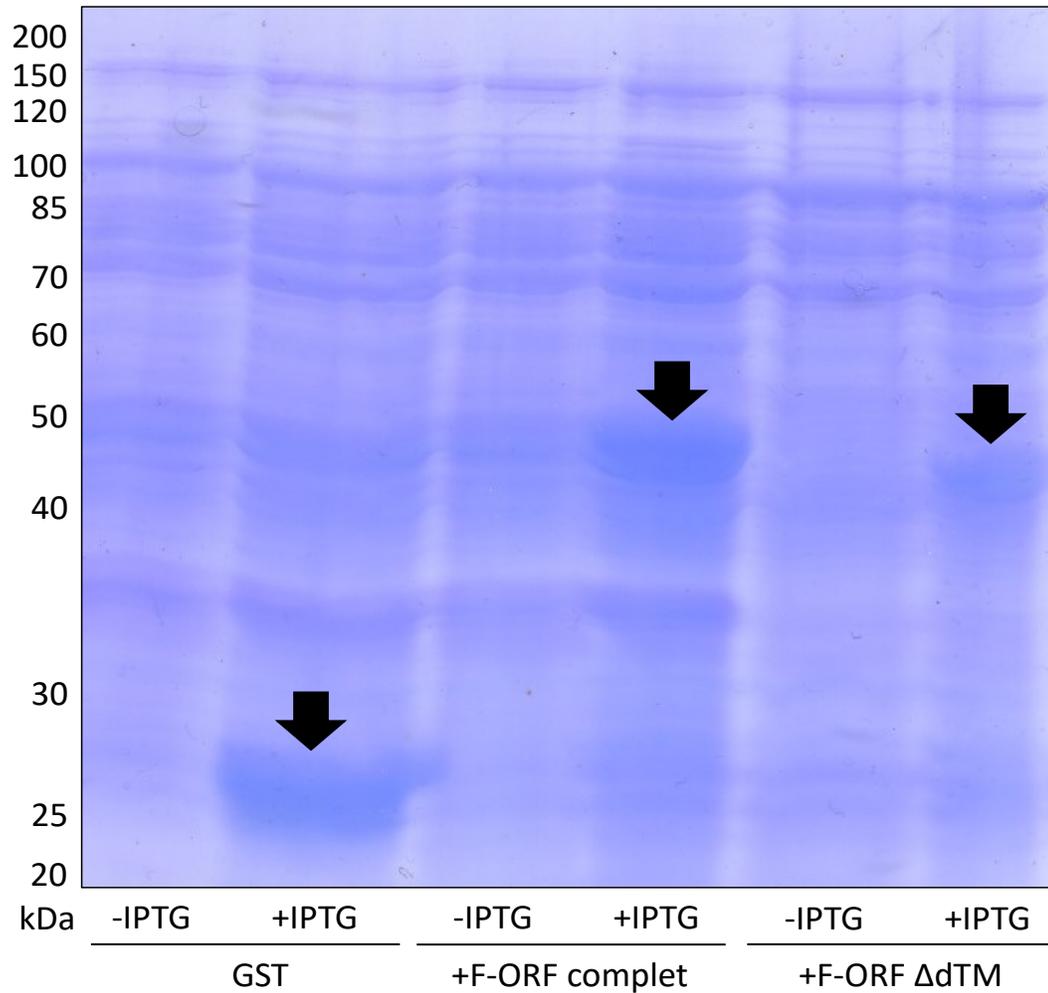


Figure 14. Expression des protéines F-ORF de *Mytilus edulis* complète puis sans domaine transmembranaire dans un système d'expression artificielle chez *E. coli* BL-21. Les flèches noires indiquent la protéine de fusion surexprimée.

La taille de la protéine GST toute seule, telle que produite par les bactéries transformées avec le vecteur pGEX-6p1 non-altéré, est de 26 kDa, ce qui correspond à la bande annotée par la flèche de gauche dans la figure 14. Pour ce qui est des protéines de fusion GST-F-ORF complète et tronquée, elles semblent également s'exprimer dans le système conçu, tels que le témoignent respectivement les flèches du centre et de droite dans la figure 14. La protéine complète a une taille anticipée de 25049 Da, ce qui explique l'emplacement de la bande à 51 kDa (26+25), alors

que la protéine tronquée a une taille anticipée de 22829 Da, ce qui reflète la bande à 48 kDa (26+ 22). Ainsi, le système bactérien semble produire des versions intégrales des deux variantes de la protéine à étudier.

4. Discussion

Une étude antérieure portant sur le potentiel codant du gène *f-orf* de *Mytilus edulis* a suggéré que les transcrits de *f-orf* seraient dégradés et ne coderaient pas pour une protéine fonctionnelle (Kyriakou et al. 2014). Une étude subséquente a plutôt trouvé que ces transcrits étaient bel et bien présents au niveau des gonades femelles et possédaient tous un codon ATG en 5', révélant ainsi la réelle possibilité que ce gène puisse coder pour une protéine (Minoiu et al. 2016). Il s'avérait donc nécessaire de valider l'existence de la protéine F-ORF par des méthodes plus directes.

Ainsi, dans le cadre de la présente étude, un immunobuvardage a été réalisé sur différents tissus chez *Mytilus edulis* afin de détecter la présence de la protéine (figure 8). Dans le manteau et le pied (extrait total, et fractions nucléaire et mitochondriale) puis dans le muscle (fraction mitochondriale), seule une protéine ayant migré à 60kDa est détectée par le sérum anti-F-ORF. Bien que cette taille ne corresponde pas à la taille attendue de la protéine (soit de 25kDa), il demeure possible qu'il s'agisse effectivement de la protéine F-ORF. Notamment, cette protéine est la seule détectée lors des essais d'immunobuvardage subséquents : elle est à la fois présente dans les extraits qui ont été immunoprécipités en se servant du sérum (figure 12), dans les extraits mâles et femelles testés séparément (figure 10), et dans les extraits testés avec un anticorps polyclonal dirigé vers la séquence complète (figure 9). S'il s'agit effectivement de F-ORF, sa présence serait anticipée dans le tissu gonadique femelle contenant le génome mitochondrial femelle, mais aussi dans les gonades mâles qui sont hétéroplasmiques et devraient ainsi contenir des copies du génome mitochondrial mâle et femelle (Breton et al. 2007).

La différence entre la taille prévue de la protéine et la taille observée sur gel peut être attribuable à différents facteurs. D'abord, il est possible que les conditions de préparation et de migration des extraits n'aient simplement pas été suffisamment dénaturantes pour détruire les complexes que F-ORF forme potentiellement avec d'autres protéines retrouvées dans la cellule. Malgré nos meilleurs efforts pour optimiser les conditions dénaturantes (différentes températures de dénaturation testées puis ajout de NaCl pré-migration), il demeure possible que ces complexes soient résistants à des traitements de dénaturation thermiques et/ou impliquant le SDS. Ce phénomène de résistance à la dénaturation a été observé chez différents types de protéines tels que les SNAREs et les nucléoporines (Fasshauer et al. 1998, Favreau et al. 2001).

Une autre hypothèse pour expliquer cette différence entre les tailles prévue et observée serait que la protéine forme des agrégats de taille totale d'environ 60 kDa dans la cellule et que ces agrégats soient résistants aux conditions dénaturantes. Il s'agit d'un phénomène ayant déjà été observé chez les protéines membranaires (Sagne et al. 1996), puis il a été établi que F-ORF chez *Mytilus edulis* contient un domaine fort susceptible d'être une hélice transmembranaire (Milani et al. 2013). Une explication alternative pour la distance de migration anormale de la protéine F-ORF putative se rapporte aussi à la nature transmembranaire de la protéine. Il a été documenté que ce type de protéine est particulièrement susceptible de migrer à une distance anormale dans un gel dénaturant à cause de sa capacité accrue à se lier au SDS (Rath et al. 2008).

Quant à la protéine d'environ 35kDa détectée par l'anticorps polyclonal (figures 9 et 10), il est possible qu'il s'agisse d'un produit de clivage de la protéine complète qui se retrouverait uniquement dans la fraction soluble. Ce produit exclurait le domaine C-terminal reconnu par l'anticorps monoclonal que nous avons purifié.

Il faut toutefois demeurer prudent lors de l'interprétation des résultats obtenus, car il est également possible que la protéine retrouvée à la hauteur de 60kDa lors des différentes expériences d'immunobuvardage ne soit pas F-ORF. Notamment, soulignons que la taille anormale de la protéine lorsqu'elle migre sur gel est surprenante lorsque l'on considère que son analogue F-ORF chez *Venustaconcha ellipsiformis* a la taille attendue lorsqu'elle migre sur gel de polyacrylamide dénaturant (Breton et al. 2009). De plus, la protéine exprimée par notre système bactérien a elle aussi la taille attendue (Figure 14), ce qui remet encore davantage en question l'identité de la protéine de 60kDa comme étant F-ORF. À la lumière des résultats obtenus, il est donc impossible de conclure avec certitude que la protéine reconnue par notre anticorps soit bien F-ORF.

Le même sérum anti-F-ORF utilisé pour les immunobuvardages a également permis la détection d'une protéine par immunohistochimie (figure 11). Ce résultat permet de brosser un portrait plus complet de la reconnaissance de la protéine reconnue par l'anticorps préparé dans le cadre du projet en fournissant un appui supplémentaire aux résultats obtenus lors des immunobuvardages puisque dans ces deux types d'expérience, l'anticorps reconnaît une protéine située dans les cellules mâles issues du manteau. Cependant, la détection de la protéine F-ORF putative au niveau du manteau mâle est difficile à interpréter puisque le type cellulaire observé lors des expériences d'immunohistochimie demeure inconnu. Notamment, la nature soit somatique ou gamétique de ces cellules issues du manteau (i.e. de la gonade, présente dans le manteau) n'a pas été cernée. S'il s'agit de cellules somatiques, la présence de F-ORF serait anticipée compte tenu du caractère hétéroplasmique des individus mâles, en l'occurrence par la présence de génomes mitochondriaux femelles dans les cellules somatiques (Breton et al. 2007).

Certains indices portent toutefois à croire qu'il s'agit de cellules de la lignée germinale. Notamment, on y observe des groupes de cinq mitochondries agencées autour d'un axe central. Un tel arrangement a été observé dans les spermatozoïdes des moules d'eau douce (figure 15; Shepardson et al. 2012) et d'autres espèces de la famille Mytilidae (Abd-El-Ghany 2011) à laquelle appartient *Mytilus edulis*.

S'il s'agit effectivement de spermatozoïdes (ou bien d'une phase intermédiaire de leur maturation), la présence de F-ORF coïnciderait avec ce qui a été observé chez la moule d'eau douce *Venustaconcha ellipsiformis* (Shepardson et al. 2012), chez laquelle on retrouve parfois des spermatozoïdes exprimant cette protéine dans les membranes internes des mitochondries (flèche sur la figure 15).

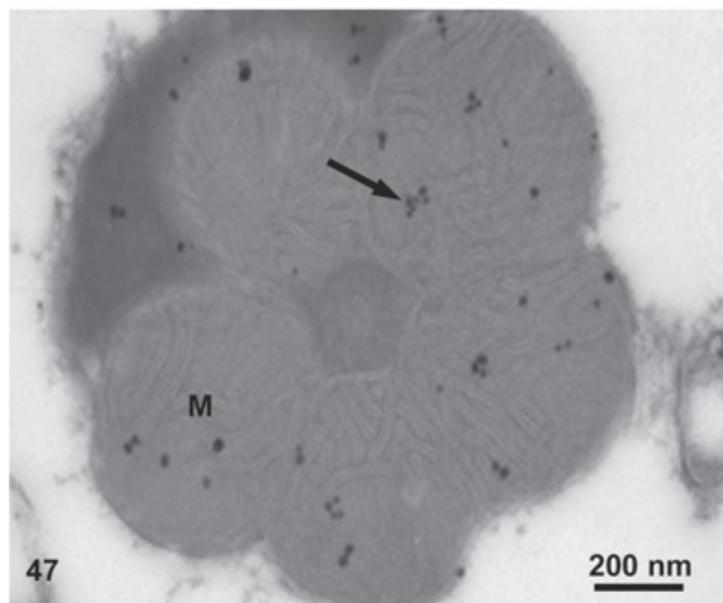


Figure 15. Distribution de la protéine F-ORF dans les mitochondries (M) d'un spermatozoïde de moule d'eau douce *Venustaconcha ellipsiformis* tel qu'observé par microscopie électronique (Shepardson et al. 2012). La flèche pointe vers un exemple de marquage de la protéine F-ORF sur la membrane interne de la mitochondrie. Les cinq mitochondries agencées autour de l'axonème représentent un patron caractéristique de la morphologie des spermatozoïdes du mois de juillet des moules d'eau douce.

Un immunobuvardage réalisé sur les extraits protéiques immunoprécipités de manteau mâle et femelle a permis de détecter la présence de la protéine de 60kDa dans ces extraits, indiquant une immunoprécipitation réussie (figure 12). Après avoir mis le produit de cette immunoprécipitation à migrer dans un gel dénaturant, une bande légèrement plus colorée que les autres bandes sur le gel (excluant celles correspondant aux IgG) est également apparue à la hauteur d'environ 60kDa (figure 13). Ainsi, il était attendu qu'en faisant séquencer le contenu de cette bande par spectrométrie de masse, F-ORF y serait détectée, potentiellement accompagnée des différentes protéines avec lesquelles elle se trouve en complexe dans les cellules de manteau. Or, la séquence de F-ORF n'a pas pu être démontrée parmi les séquences retrouvées dans cette région du gel, ce qui diminue la certitude que la bande à 60kDa soit bien F-ORF.

Différents facteurs peuvent expliquer l'absence de F-ORF dans les résultats de séquençage par spectrométrie de masse. D'abord, étant donné que, dû à la petite taille de F-ORF, seuls 7 peptides différents peuvent être détectés par ce mode de séquençage selon l'outil ExPASy (Gasteiger et al. 2005) et que la couverture en acides aminés lors de notre séquençage ne dépassait que rarement 30%, la possibilité de détecter F-ORF devient d'autant plus petite. Également, compte tenu qu'il peut exister une variation naturelle de séquence entre différents individus d'une même espèce pour un gène donné, il se peut que la différence de séquence entre le gène chez les individus testés et celui ayant été répertorié dans les bases de données informatiques soit assez importante pour empêcher le jumelage des deux séquences.

Il est également possible que la bande observée par coloration au bleu de coomassie ne soit pas du tout F-ORF. Notamment, la vitesse de centrifugation utilisée lors de la sédimentation de la résine de protéine A-sépharose (200g) était assez élevée pour sédimenter non seulement la

résine, mais également une partie du matériel biologique présent dans l'extrait. Ainsi, le matériel chargé sur gel incluait probablement une proportion non-négligeable de protéines non désirées car ne résultant pas de l'immunoprécipitation à proprement parler. Ainsi, il est possible que la portion de gel digérée puis séquencée contenait une si grande variété de protéines différentes que F-ORF était trop « diluée » par rapport à ces autres protéines pour pouvoir être détectée.

En absence de résultats de séquençage concluants, il serait envisageable de faire séquencer l'entièreté de la piste de migration SDS-PAGE du produit immunoprécipité en découpant cette piste en plusieurs morceaux et en faisant séquencer tous ces morceaux séparément. Si F-ORF est ainsi détectée, nous aurions la confirmation que le gène est bien exprimé, puis la taille de la protéine serait également révélée. Il pourrait également être intéressant de retenter l'expérience d'immunoprécipitation en modifiant ses conditions de manière à optimiser son rendement en protéine immunoprécipitée et ainsi maximiser nos chances d'obtenir une quantité suffisante de la protéine F-ORF putative pour être séquencée. On pourra alors s'assurer que les résultats du séquençage représentent effectivement des protéines formant des complexes avec F-ORF. Un des moyens d'optimiser ces conditions serait de faire une centrifugation à 200g après avoir solubilisé la fraction mitochondriale de l'extrait protéique de manteau. Il serait ainsi possible de sédimenter les débris cellulaires et tissulaires préalablement à l'ajout d'anticorps pour l'immunoprécipitation, ce qui permettra de sédimenter uniquement la protéine A-sépharose une fois l'immunoprécipitation terminée. Cela devrait réduire de manière importante la contamination présente dans l'extrait immunoprécipité, et possiblement permettre la détection de F-ORF lors de la spectrométrie de masse.

Une autre solution envisageable serait de produire une très grande quantité de la protéine F-ORF putative par l'entremise du système d'expression artificielle bactérien conçu dans le

cadre du présent projet, de le purifier grâce à son étiquette d'affinité GST puis d'ajouter la masse de protéine recombinante à un extrait protéique de manteau en vue de réaliser l'immunoprécipitation, ou bien simplement purifier les complexes par l'entremise de l'étiquette GST. Cette manière de procéder devrait elle aussi être en mesure de récolter les partenaires d'interaction de la protéine F-ORF putative afin de les séquencer, puis permettre une caractérisation fonctionnelle plus complète de la protéine.

Conclusion

Cette étude avait pour objectif de réaliser la caractérisation fonctionnelle du gène *f-orf* chez la moule marine, *Mytilus edulis*. Bien que la caractérisation complète n'ait pas pu être réalisée, il a néanmoins été possible de postuler que le gène *f-orf* de cette espèce code vraisemblablement pour une protéine, comme ce qui est observé au niveau du gène homologue chez la moule d'eau douce, *Venustaconcha ellipsiformis*.

Si, dans le contexte de travaux futurs, l'identité de la protéine de 60kDa détectée par notre anticorps se confirme comme étant bien F-ORF, le présent projet aura permis de fournir des indices par rapport à l'emplacement tissulaire et subcellulaire de cette protéine. Ces indices auront permis de constater une correspondance entre l'emplacement de la protéine chez la moule marine et chez la moule d'eau douce dans la mitochondrie. Ainsi, sa présence au niveau de cellules appartenant présumément à la lignée germinale mâle coïnciderait avec les observations faites chez la moule d'eau douce.

Les résultats du présent projet incitent fortement à une exploration plus approfondie de la fonctionnalité de cette protéine ainsi qu'à la validation du potentiel codant des variantes de *f-orf* et de *m-orf* retrouvées chez les autres espèces à DUI. Notre système bactérien pourra ainsi être utilisé lors d'expériences subséquentes pour poursuivre la caractérisation de F-ORF.

Bibliographie

- Abd-El-Ghany SR. 2011. Ultrastructure of spermatogenesis in the bivalve *Donax vittatus* (Mollusca, Bivalvia). *Egypt. J. Exp. Biol. (Zool.)* 7: 295-303
- Birky CW, Jr. 2001. The inheritance of genes in mitochondria and chloroplasts: laws, mechanisms, and models. *Annu Rev Genet* 35: 125-48
- Boeke JD, Stoye JP. 1997. Retrotransposons, Endogenous Retroviruses, and the Evolution of Retroelements In *Retroviruses*, ed. JM Coffin, SH Hughes, HE Varmus. Cold Spring Harbor (NY)
- Boore JL. 1999. Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Res* 27: 1767-80
- Bouaouina M, Goult BT, Huet-Calderwood C, Bate N, Brahme NN, et al. 2012. A conserved lipid-binding loop in the kindlin FERM F1 domain is required for kindlin-mediated α IIb β 3 integrin coactivation. *J Biol Chem* 287: 6979-90
- Boyle E, Etter R. 2013. Heteroplasmy in a deep-sea protobranch bivalve suggests an ancient origin of doubly uniparental inheritance of mitochondria in Bivalvia. *Mar Biol.* 160: 413-22
- Breton S, Beaupre HD, Stewart DT, Hoeh WR, Blier PU. 2007. The unusual system of doubly uniparental inheritance of mtDNA: isn't one enough? *Trends Genet* 23: 465-74
- Breton S, Beaupre HD, Stewart DT, Piontkivska H, Karmakar M, et al. 2009. Comparative mitochondrial genomics of freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida) with doubly uniparental inheritance of mtDNA: gender-specific open reading frames and putative origins of replication. *Genetics* 183: 1575-89

- Breton S, Ghiselli F, Passamonti M, Milani L, Stewart DT, Hoeh WR. 2011a. Evidence for a fourteenth mtDNA-encoded protein in the female-transmitted mtDNA of marine Mussels (Bivalvia: Mytilidae). *PLoS One* 6: e19365
- Breton S, Milani L, Ghiselli F, Guerra D, Stewart DT, Passamonti M. 2014. A resourceful genome: updating the functional repertoire and evolutionary role of animal mitochondrial DNAs. *Trends Genet* 30: 555-64
- Breton S, Stewart DT, Shepardson S, Trdan RJ, Bogan AE, et al. 2011b. Novel protein genes in animal mtDNA: a new sex determination system in freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida)? *Mol Biol Evol* 28: 1645-59
- Chakrabarti R, Walker JM, Chapman EG, Shepardson SP, Trdan RJ, et al. 2007. Reproductive function for a C-terminus extended, male-transmitted cytochrome c oxidase subunit II protein expressed in both spermatozoa and eggs. *FEBS Lett* 581: 5213-9
- Chothia C, Lesk AM. 1986. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J* 5: 823-6
- Dimauro I, Pearson T, Caporossi D, Jackson MJ. 2012. A simple protocol for the subcellular fractionation of skeletal muscle cells and tissue. *BMC Res Notes* 5: 513
- Fasshauer D, Eliason WK, Brunger AT, Jahn R. 1998. Identification of a minimal core of the synaptic SNARE complex sufficient for reversible assembly and disassembly. *Biochemistry* 37: 10354-62
- Faure E, Delaye L, Tribolo S, Levasseur A, Seligmann H, Barthelemy RM. 2011. Probable presence of an ubiquitous cryptic mitochondrial gene on the antisense strand of the cytochrome oxidase I gene. *Biol Direct* 6: 56

- Favreau C, Bastos R, Cartaud J, Courvalin JC, Mustonen P. 2001. Biochemical characterization of nuclear pore complex protein gp210 oligomers. *Eur J Biochem* 268: 3883-9
- Feschotte C. 2008. Transposable elements and the evolution of regulatory networks. *Nat Rev Genet* 9: 397-405
- Feschotte C, Gilbert C. 2012. Endogenous viruses: insights into viral evolution and impact on host biology. *Nat Rev Genet* 13: 283-96
- Galluzzi L, Brenner C, Morselli E, Touat Z, Kroemer G. 2008. Viral control of mitochondrial apoptosis. *PLoS Pathog* 4: e1000018
- Gasteiger E, Hoogland C, Gattiker A, Duvaud S, Wilkins MR, et al. 2005. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In *The Proteomics Protocols Handbook*, ed. JW (Ed.), pp. 571-607: Humana Press
- Gemmell NJ, Metcalf VJ, Allendorf FW. 2004. Mother's curse: the effect of mtDNA on individual fitness and population viability. *Trends Ecol Evol* 19: 238-44
- Gissi C, Iannelli F, Pesole G. 2008. Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity (Edinb)* 101: 301-20
- Harper FM, Riley KJ, Rawson PD. 2017. Novel species-specific glycoprotein on the surface of *Mytilus edulis* and *M. trossulus* eggs. *Invert Reprod Dev* 61: 1-7
- Hashimoto Y, Niikura T, Tajima H, Yasukawa T, Sudo H, et al. 2001. A rescue factor abolishing neuronal cell death by a wide spectrum of familial Alzheimer's disease genes and A β . *Proc Natl Acad Sci U S A* 98: 6336-41
- Horn R, Gupta KJ, Colombo N. 2014. Mitochondrion role in molecular basis of cytoplasmic male sterility. *Mitochondrion* 19 Pt B: 198-205

- Kalderon D, Roberts BL, Richardson WD, Smith AE. 1984. A Short Amino Acid Sequence Able to Specify Nuclear Location. *Cell* 39: 499-509
- Kyriakou E, Chatzoglou E, Zouros E, Rodakis GC. 2014. The rRNA and tRNA transcripts of maternally and paternally inherited mitochondrial DNAs of *Mytilus galloprovincialis* suggest presence of a "degradosome" in mussel mitochondria and necessitate the re-annotation of the l-rRNA/CR boundary. *Gene* 540: 78-85
- Lal A, Haynes SR, Gorospe M. 2005. Clean Western blot signals from immunoprecipitated samples. *Mol Cell Probes* 19: 385-8
- Lee C, Zeng J, Drew BG, Sallam T, Martin-Montalvo A, et al. 2015. The mitochondrial-derived peptide MOTS-c promotes metabolic homeostasis and reduces obesity and insulin resistance. *Cell Metab* 21: 443-54
- Milani L, Ghiselli F, Guerra D, Breton S, Passamonti M. 2013. A comparative analysis of mitochondrial ORFans: new clues on their origin and role in species with doubly uniparental inheritance of mitochondria. *Genome Biol Evol* 5: 1408-34
- Minoiu I, Burzynski A, Breton S. 2016. Analysis of the coding potential of the ORF in the control region of the female-transmitted *Mytilus* mtDNA. *Gene* 576: 586-8
- Mitchell A, Guerra D, Stewart D, Breton S. 2016. In silico analyses of mitochondrial ORFans in freshwater mussels (Bivalvia: Unionoida) provide a framework for future studies of their origin and function. *BMC Genomics* 17: 597
- Nizampatnam NR, Doodhi H, Kalinati Narasimhan Y, Mulpuri S, Viswanathaswamy DK. 2009. Expression of sunflower cytoplasmic male sterility-associated open reading frame, orfH522 induces male sterility in transgenic tobacco plants. *Planta* 229: 987-1001
- Ohta A, Nishiyama Y. 2011. Mitochondria and viruses. *Mitochondrion* 11: 1-12

- Passamonti M, Ghiselli F. 2009. Doubly uniparental inheritance: two mitochondrial genomes, one precious model for organelle DNA inheritance and evolution. *DNA Cell Biol* 28: 79-89
- Passamonti M, Ricci A, Milani L, Ghiselli F. 2011. Mitochondrial genomes and Doubly Uniparental Inheritance: new insights from *Musculista senhousia* sex-linked mitochondrial DNAs (Bivalvia Mytilidae). *BMC Genomics* 12: 442
- Rath A, Glibowicka M, Nadeau VG, Chen G, Deber CM. 2008. Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106: 1760-65
- Sagne C, Isambert MF, Henry JP, Gasnier B. 1996. SDS-resistant aggregation of membrane proteins: application to the purification of the vesicular monoamine transporter. *Biochem J* 316 (Pt 3): 825-31
- Schindelin J, Arganda-Carreras I, Frise E, Kaynig V, Longair M, et al. 2012. Fiji: an open-source platform for biological-image analysis. *Nat Methods* 9: 676-82
- Shepardson SP, Heard WH, Breton S, Hoeh WR. 2012. Light and transmission electron microscopy of two spermatogenic pathways and unimorphic spermatozoa in *Venustaconcha ellipsiformis* (Conrad, 1836) (Bivalvia: Unionoida). *Malacologia* 55: 263-84
- Siew N, Fischer D. 2003. Analysis of singleton ORFans in fully sequenced microbial genomes. *Proteins* 53: 241-51
- Soltys BJ, Gupta RS. 2000. Mitochondrial proteins at unexpected cellular locations: export of proteins from mitochondria from an evolutionary perspective. *Int Rev Cytol* 194: 133-96

Todd AE, Orengo CA, Thornton JM. 2001. Evolution of function in protein superfamilies, from a structural perspective. *J Mol Biol* 307: 1113-43

Wallace DC. 2007. Why do we still have a maternally inherited mitochondrial DNA? Insights from evolutionary medicine. *Annu Rev Biochem* 76: 781-821

Zouros E. 2013. Biparental Inheritance Through Uniparental Transmission: The Doubly Uniparental Inheritance (DUI) of Mitochondrial DNA. *Evol Biol*. 40: 1-31

Zouros E, Freeman KR, Ball AO, Pogson GH. 1992. Direct evidence for extensive paternal mitochondrial DNA inheritance in the marine mussel *Mytilus*. *Nature* 359: 412-4