

Université de Montréal

**Caractérisation fonctionnelle de nouvelles protéines d'origine mitochondriale chez la moule  
bleue *Mytilus edulis***

*Par*

Alizée Debelli

Département de sciences biologiques, Faculté des Arts et des Sciences

Mémoire présenté en vue de l'obtention du grade de maîtrise (M. Sc.) en sciences biologiques

Août 2023

© Alizée Debelli, 2023

Université de Montréal

Département de sciences biologiques, Faculté des Arts et des Sciences

---

*Ce mémoire intitulé*

**Caractérisation fonctionnelle de nouvelles protéines d'origine mitochondriale chez la moule  
bleue *Mytilus edulis***

*Présenté par*

**Alizée Debelli**

*A été évaluée par un jury composé des personnes suivantes*

**Bernard Angers**

Président

**Sophie Breton**

Directrice de recherche

**Annie Angers**

Codirectrice

**Éric Pante**

Membre

## Résumé

Les mitochondries sont généralement transmises de façon strictement maternelle. Chez les animaux, il existe une seule exception à ce mode de transmission mitochondriale : la transmission doublement uniparentale (DUI). La DUI est retrouvée uniquement chez certaines espèces de bivalves. Les mâles possèdent dans leurs gamètes le génome mitochondrial paternel, alors que les femelles ont dans leurs œufs le génome mitochondrial maternel. Ces génomes possèdent respectivement m-orf ou f-orf, un cadre de lecture supplémentaire (autre que les 13 codant pour les protéines mitochondriales de référence) potentiellement codant. La présence de ces ORF étant liée au sexe de l'animal, l'hypothèse a été avancée que ces protéines pourraient jouer un rôle dans le maintien de la DUI ou dans le déterminisme sexuel chez ces espèces. Ce projet consiste donc à mieux cerner les fonctions potentielles de ces orfs chez la moule bleue *Mytilus edulis*. Pour caractériser leur expression, nous avons procédé à des tests d'immunobuvardage sur des lysats de tissus gamétiques et somatiques mâles et femelles, ainsi qu'à des tests d'immunofluorescence sur des cultures cellulaires des deux sexes. Aussi, nous avons effectué des co-immunoprécipitation et des essais pull-down pour préciser les fonctions des protéines par l'entremise des partenaires d'interaction. Nous avons pu observer la présence de M-ORF dans les gonades mâles uniquement, plus particulièrement dans les mitochondries des spermatozoïdes et dans l'acrosome, et ce, uniquement durant la saison de reproduction des moules. F-ORF, cependant, était produite dans tous les tissus à tous les moments de l'année, encore une fois dans les mitochondries des cellules. Les deux protéines ont de nombreux partenaires d'interactions possibles, dont plusieurs sont liés à des processus spécifiques au sexe ou encore aux acides nucléiques. Les protéines M-ORF et F-ORF sont donc bien fonctionnelles. Leurs partenaires potentiels sont multiples, et d'autres essais doivent être effectués afin de préciser les fonctions des protéines. La présence dans l'acrosome de M-ORF est toutefois d'un grand intérêt en lien avec son rôle potentiel dans la DUI et le déterminisme sexuel.

**Mots-clés :** Mitochondrie, ADN mitochondrial, Transmission uniparentale double de l'ADNmt, gènes ORFans, Bivalves, *Mytilus edulis*, F-ORF, M-ORF

## Abstract

Mitochondria are usually transmitted by strict maternal inheritance. In animals, there is only one exception to this: doubly uniparental inheritance (DUI). DUI can be found only in some bivalve species. Males have in their sperm a paternal mitochondrial genome whereas females have in their eggs the maternal mitochondrial genome. Both genomes possess an orf (other than the 13 coding for annotated mitochondrial proteins) that can potentially code for a protein, called respectively m-orf and f-orf. These genes are sex-specific in gametes, which brought the possibility that there is a link between the orfs and the maintenance of DUI or with sex determination in DUI species. Therefore, this project aims to have a better understanding of the potential functions of these proteins in the blue mussel *Mytilus edulis*. To demonstrate the proteins' existence, we did Western blot assays on gametic and somatic tissues from males and females, along with immunohistochemistry on cellular cultures of both sexes. To look for possible interaction partners, we did co-immunoprecipitation assays and pull-downs assays. Our results show expression of M-ORF in the male mantle only, more specifically in sperm mitochondria and acrosome. This is found only during the reproductive season of *Mytilus edulis*. However, F-ORF is expressed in all tissues all year in both sexes, in cells mitochondria. Both proteins have numerous possible interaction partners. Several are linked to sex-specific processes or to interactions with nucleic acids. Both M-ORF and F-ORF are expressed. Potential partners are multiple, and other assays have to be done to further ascertain these proteins' functions. However, the presence of M-ORF in acrosome is of great interest toward a potential function in DUI or in sex determination.

**Keywords** : Mitochondria, Mitochondrial DNA, Doubly Uniparental Inheritance of mtDNA, ORFan genes, Bivalvia, *Mytilus edulis*, F-ORF, M-ORF

## Table des matières

Résumé.....	3
Abstract.....	4
Table des matières.....	5
Liste des tableaux.....	8
Liste des figures.....	9
Liste des sigles et abréviations.....	12
Remerciements.....	15
1. Introduction.....	16
1.1 La mitochondrie.....	16
1.2 Le génome mitochondrial.....	16
1.3 Transmission SMI de l'ADNmt.....	17
1.4 Transmission DUI de l'ADNmt.....	17
1.5 L'ADNmt dans la DUI et son lien avec la détermination du sexe.....	19
1.6 <i>Mytilus edulis</i> .....	23
1.7 L'ADNmt de <i>Mytilus edulis</i> .....	24
1.8 M-orf et f-orf dans la région contrôle.....	26
1.9 F-ORF chez <i>Mytilus edulis</i> .....	27
1.10 M-ORF chez <i>Mytilus edulis</i> .....	28
1.11 Objectifs et hypothèses.....	28

2. Article : Validation of the male-specific ORF of the paternally-transmitted mtDNA in <i>Mytilus edulis</i> as a protein-coding gene .....	30
Abstract .....	31
1. Introduction .....	31
2. Materials and methods .....	32
2.1 Animal collection .....	32
2.2 DNA and RNA extractions .....	33
2.3 PCR, RT-PCR, sequencing and analysis of M-ORF sequences .....	33
2.4 Western blotting .....	34
2.5 Immunofluorescence .....	34
3. Results and discussion.....	35
3. Résultats additionnels.....	40
3.1 Retour sur l'expression de M-ORF et F-ORF .....	40
3.2 Expression tissulaire et temporelle.....	42
3.3 Potentiels partenaires d'interaction de M-ORF.....	46
3.4 Potentiels partenaires d'interaction de F-ORF .....	48
4. Discussion .....	51
4.1 Retour sur l'expression de M-ORF et F-ORF .....	51
4.2 Expression tissulaire et temporelle.....	52
4.3 Partenaires de M-ORF.....	55
4.4 Partenaires de F-ORF .....	56

Conclusion .....59

Références bibliographiques.....60

Annexes .....75

    Annexe I .....75

        SUPPLEMENTARY MATERIAL .....75

        Supplementary data 1 .....77

    Annexe II.....79

    Annexe III .....82

## Liste des tableaux

Tableau I : Partenaires d'interaction potentiels de M-ORF par co-IP contre la base de données <i>Mytilus</i> .....	47
Tableau II : Partenaires d'interaction potentiels de M-ORF par <i>pull-down</i> contre la base de données <i>Mytilus</i> .....	47
Tableau III : Partenaires potentiels d'interaction de F-ORF par séquençage de trois échantillons de gonades mâles contre la base de données <i>Mytilus</i> .....	49
Tableau IV : Potentiels partenaires d'interaction de F-ORF par séquençage d'un échantillon de gonade femelle contre la base de données <i>Mytilus</i> .....	49
Tableau V : Protéines communes entre les partenaires potentiels de F-ORF dans les échantillons de gonades mâles et femelle contre la base de données Bivalvia .....	50
Matériel et Méthode.....	79
Tableau SI : Partenaires d'interaction potentiels de M-ORF par co-IP de deux échantillons mâles contre la base de données Bivalvia.....	82
Tableau SII : Partenaires d'interaction potentiels de M-ORF par <i>pull-down</i> d'un échantillon de gonade mâle contre la base de données Bivalvia.....	83
Tableau SIII : Potentiels partenaires d'interaction de F-ORF par séquençage de trois échantillons de gonades mâles contre la base de données Bivalvia.....	86
Tableau SIV : Potentiels partenaires d'interaction de F-ORF par séquençage d'un échantillon de gonade femelle contre la base de données Bivalvia.....	87



## Liste des figures

**Figure 1. – Chaîne respiratoire mitochondriale.** Les complexes sont dans la membrane interne et travaillent à produire l'énergie sous forme d'ATP (Adapté de Vercellino & Sazanov, (2022)). 17

**Figure 2. – Schéma du phénomène de DUI.** En vert sont les mitochondries maternelles F, en rose sont les mitochondries paternelles M. Les photos au microscope avec MitoTracker green montrent la position des mitochondries paternelles chez, respectivement (haut en bas) un embryon mâle et un embryon femelle. (1) Embryon avec les deux types de mitochondries. (2) Embryon continue son développement. (2) Type M est perdu durant le développement de l'individu femelle. (3) Type M est conservé chez l'individu mâle. (4) Seules le type M est présent dans les spermatozoïdes. (5) Chez le mâle, les mitochondries présentent un motif agrégé. (6) Chez la femelle, elles sont dispersées. Image adaptée de Breton et al. (2014). .....18

**Figure 3. – Stérilité cytoplasmique mâle dans une cellule végétale (A).** Stérilité induite par des produits mitochondriaux. Les points noirs en A sont les produits des ORFs mitochondriaux, donnant le CMS. Un défaut de fonction de certains ORFs mitochondriaux inhibe la production de pollen viable (Manna, 2015). (B). Restauration de la fertilité par des restaurateurs de type PPR (*pentatricopeptide repeats*). Les gènes restaurateurs de fertilité PPR, une séquence de 35 acides aminés pouvant se répéter, proviennent du noyau, et retourne à l'individu la capacité de produire les deux types de gamètes (Chase, 2007). Adapté de Osabe et al. (2012). .....21

**Figure 4. – Position subcellulaire de F-ORF chez trois mâles de *M. edulis*.** Coloré en bleu avec du DAPI est le noyau. Colorée en vert avec des anticorps est la protéine F-ORF. Colorées en rouge avec des anticorps contre ATP5 sont les mitochondries. SUP : superposition des trois couleurs. Les flèches blanches pointent un groupe de mitochondries chez chaque individu. Le carré agrandi le groupe pointé. Tiré de Ouimet (2018). .....23

**Figure 5. – Anatomie de la moule Mytilidé.** Position des branchies, du pied, du muscle adducteur postérieur, du manteau et des gonades, qui sont les tissus d'intérêt du travail présent.

24

**Figure 6. – Carte des génomes (A) F et (B) M mitochondriaux de *Mytilus edulis*.** Les gènes codant pour les ARN de transfert sont en mauves, nommés selon les trois premières lettres de

leur acide aminé correspondant. Les gènes d'OXPPOS sont, en ordre d'appartenance aux complexes (I, III, IV, V) en vert (NADH déshydrogénase 1 à 6, et 4L), gris (cytochrome B), bleu (cytochrome c oxydase I-II-III) et jaune (ATP synthase 6-8). Les gènes codants pour les sous-unités ribosomales sont en rouge. La région contrôle est en orange. Les gènes f-orf et m-orf sont en noir. No. Acc. GenBank : AY484747 (ADNmt F) (Boore et al., 2004) et AY823623 (ADNmt M) (Breton et al., 2006). ATP8 et ORFs ajoutés avec, respectivement, (Breton et al., 2010, 2011a). Produit avec GenomeVx (<http://wolfe.ucd.ie/GenomeVx/>).....26

**Figure 7. – Région contrôle des génomes F (A) et M (B).** Les séquences codant pour F-ORF et M-ORF sont dans les VD1 de leurs régions contrôles respectives. Les longueurs de chaque partie sont indiquées dans les coins des boîtes. VD1 : domaine variable 1, CD : domaine constant, VD2 : domaine variable 2. (A) tiré de (Minoiu et al., 2016), (B) produit avec annotations provenant de Breton et al. (2011a) et séquence GenBank AY823623 (Breton et al., 2006). .....26

**Figure 8. – Position sur gel d'électrophorèse de la protéine F-ORF dans des tissus gonadiques mâles (M) et femelles (F) de *M. edulis*.** S1 : surnageant de la première centrifugation. P1 : fraction de larges débris et noyau. S2 : protéines solubles P2 : fraction mitochondriale. F-ORF est retrouvé dans les fraction mitochondriale des deux sexes, et beaucoup dans P1 et P2 mâle. Il y a de légères traces dans S1 et S2. Adapté de Ouimet et al. (2020). .....28

**Figure 9. – Figure 1. Expression of M-ORF protein in *Mytilus edulis* mantle tissue and sperm.** (A) The *m-orf* gene (red) is found in the M mtDNA control region (CR, yellow). M-ORF nucleic acids and amino acids sequences with poly-K region in green and antigenic peptide underlined. (B) Western blotting of M-ORF on male and female mantle extracts. Left: proteins from male mantle, Right: proteins from female mantle. The top of the membrane was incubated with ATP5A antibody. (C) Specificity of the anti-M-ORF antibody. Left: control was incubated with anti-M-ORF antibody, Right: treatment was incubated with preadsorbed antibody. Top panel shows ATP5A immunoreactivity. (D) Enlargement of colored slide of male gonad tissue. Nucleus is in blue, mitochondria in red, and M-ORF protein in green. (E) Sperm cell from male gonad tissue. Mitospory Red CMXRos color mitochondria. Big arrowhead indicates mitochondria, small arrow indicates acrosome. 37

<b>Figure 10. – Poids moléculaire de F-ORF à différentes conditions dénaturantes.</b> Le test a été fait à différentes concentrations de $\beta$ -mercaptoéthanol (0%, 5%, 10%) et à différents temps de chauffage des échantillons (5 minutes, 3 heures). A. Le poids moléculaire de F-ORF ne changeait pas. B. La définition des bandes au Ponceau S diminuait après 3 heures de chauffage. ....	41
<b>Figure 11. – Expression d'une protéine fusion GST-M-ORF ou GST-F-ORF dans E. coli.</b> GST-M-ORF apparaît à environ 38 kDa. GST-F-ORF apparaît à 40 kDa. ....	42
<b>Figure 12. – Expression tissulaire et temporelle de M-ORF.</b> A. Expression dans des tissus de gonades, muscle, branchies et pied d'individus mâles et femelles. La protéine est exprimée dans les gonades mâles. B. Expression temporelle de M-ORF dans la gonade mâle de janvier à mai. La protéine est exprimée en avril et en mai. ....	43
<b>Figure 13. – Expression spatiale et temporelle de F-ORF.</b> A. Expression dans des tissus de gonades, muscle, branchies et pied d'individus mâles et femelles. B. Expression temporelle de F-ORF dans les gonades mâles et femelles de janvier à mai. ....	44
<b>Figure 14. – Immunofluorescence de gonades mâles et femelles contre F-ORF.</b> A. Oeuf et cellules d'une gonade femelle colorés à l'aide d'un marqueur mitochondrial (MitoSpy Red) et contre la protéine F-ORF. Coloration faite sur cellules libres. Noyau en bleu. B. Cellule somatique de gonade mâle colorée contre un marqueur mitochondrial (ATP5-A) et la protéine F-ORF. Culture faite sur lamelle. C. Spermatide coloré contre un marqueur mitochondrial (ATP5-A) et la protéine F-ORF. ....	45
<b>Figure 15. – Fig. S1. Alignment of M-ORF from nine male <i>Mytilus edulis</i> individuals.</b> (accession numbers : OQ714227 to OQ714234). ....	75
<b>Figure 16. – Fig. S2. Apparent molecular weight of M-ORF at different <math>\beta</math>-mercaptoethanol concentrations (0%, 5%, 10%) and different heating times (10 min, 30 min, 3 hours).</b> (A) Western blot of M-ORF and ATP5A. (B) Ponceau S staining of the same membrane. Molecular weight was not affected. Under strong denaturing conditions, proteins could not be recognized by their associated antibody. ....	76

## Liste des sigles et abréviations

aa: acides aminés

ADNmt : acide désoxyribonucléique mitochondrial ou ADN mitochondrial

ARNt : acide ribonucléique de transfert

ATP5 : *adenosine triphosphate synthase sub-unit 5*

BSA: *bovine serum albumin*

CD : domaine constant

CMS: *cytoplasmic male sterility* ou stérilité cytoplasmique mâle

DAPI : *4',6-diamidino-2-phenylindole*

D-loop : région contrôle de l'ADN mitochondrial

DUI : *doubly uniparental inheritance* ou transmission doublement uniparentale

EDTA: *Ethylenediaminetetraacetic acid*

EST: *expressed sequence tag*

EVOS: système d'imagerie cellulaire

FmtDNA : ADNmt femelle

*f-orf* : *female orf* ou orf femelle

GST: *glutathione s-transferase*

HEPES: *4-(2-hydroxyethyl)-1-piperazine ethane sulfonic acid*

h-orf: *hermaphrodism orf* ou orf hermaphrodite

IPTG: *Isopropyl β-D-1-thiogalactopyranoside*

kDa : kiloDaltons

Kb: kilo paires de bases

Milieu LB: Milieu de culture *Lysogeny broth*

MitoSpy red CMXROS: *red mitochondrial tracker for Chloromethyl-X-rosamine*

MmtDNA : ADNmt mâle

*m-orf* : *male orf* ou orf mâle

MW : *molecular weight* ou poids moléculaire

NaCl: *sodium chloride*

NaPO<sub>4</sub>: *sodium phosphate*

ORF : *open reading frame* ou cadre de lecture

OXPPOS : phosphorylation oxydative

PBS: *phosphate buffered saline*

PFA: *paraformaldehyde*

Poly-A: poly-adénine

Poly-K : poly-lysines

PPR : *pentatricopeptide repeats* ou répétitions de pentatricopeptides

RPM : rotation par minute

RT: *room temperature*

SDS-page: *sodium dodecyl sulfate–polyacrylamide gel electrophoresis*

SOC: *Super Optimal broth with Catabolite repression* ou Bouillon super optimal avec répression de catabolite

SMI : *strict maternal inheritance* ou transmission maternelle stricte

TBS: *Tris-buffered saline*

TBS-T: *Tris-buffered saline with Tween 20*

VD : domaine variable

## Remerciements

Je tiens d'abord à remercier ma directrice de recherche, Sophie Breton, pour l'opportunité de cette maîtrise et pour son support tout au long de ces deux années. Je remercie aussi ma co-directrice, Annie Angers, pour ses conseils et son expertise avec différentes techniques de laboratoire. Je tiens aussi à remercier mes collègues des labos Breton et Angers, Laura, Thierry, Émmélie, Vincent, Sofia, Roza, Amy, Laurie, Julia, Julie, Ariane, Ludovic, Francis, Marianne, pour les belles journées, les belles sorties, et pour avoir rendu fun mon temps de maîtrise. Merci Laura et Roza pour le mentorat en diverses techniques de laboratoires. Merci à mes amies, qui m'ont écouté parler de mes problèmes de biologie moléculaire auxquels ils ne comprenaient pas grand-chose. Enfin, merci à mes parents et ma famille pour leur support à travers ma scolarité et leur intérêt à mon sujet de recherche.

Merci à tous.

# 1. Introduction

## 1.1 La mitochondrie

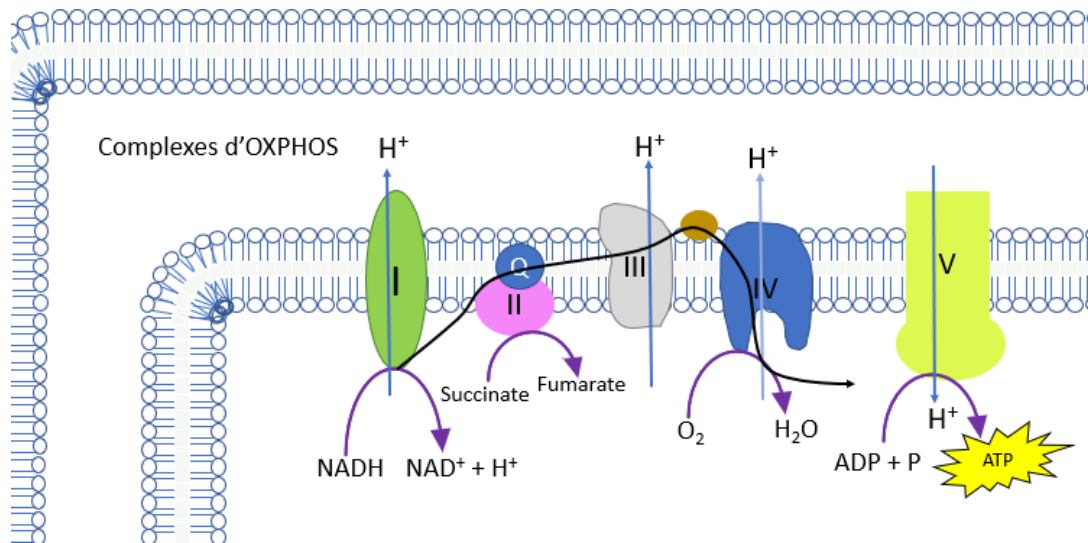
La mitochondrie est un organite de la cellule eucaryote surnommée la « centrale énergétique » de la cellule. Sa fonction principale est en effet la production d'énergie sous forme d'ATP par processus dit d'OXPPOS, pour phosphorylation oxydative (Boore, 1999). La mitochondrie possède deux membranes : la membrane interne, et la membrane externe, qui isole le tout du cytoplasme cellulaire (Chakrabarti et al., 2007). Les mitochondries sont présentes dans toutes les cellules animales, à part quelques-unes très spécialisées, comme les globules rouges des mammifères (Zhang et al., 2011). Elles ont une origine un peu particulière, provenant de l'intégration dans une cellule d'une lignée sœur aux  $\alpha$ -protéobactéries (Martijn et al., 2018). Cette théorie est appelée théorie endosymbiotique. C'est à cause de cette origine que les mitochondries possèdent encore un génome séparé du génome nucléaire, appelé génome mitochondrial ou ADNmt.

## 1.2 Le génome mitochondrial

Dû à son origine, ce génome est double brin, et comme son ancêtre bactérien, généralement circulaire (Burger et al., 2003). Il est cependant beaucoup plus petit, faisant seulement environ 16 kb chez les animaux (Anderson et al., 1981), en comparaison aux bactéries *Rickettsia* qui ont autour d'un million de paires de bases (Andersson et al., 1998). Chez les animaux, le génome mitochondrial est usuellement reconnu pour n'avoir qu'en moyenne 37 gènes, avec des variations parfois intenses causées principalement par des pertes ou des duplications des ARN de transfert (ARNt) (Gissi et al., 2008). Spécifiquement, deux des gènes mitochondriaux codent pour des sous-unités ribosomales (ARNr 16S et 12S), vingt-deux produisent des ARNt et treize produisent des protéines consacrées à l'OXPPOS. La traduction de ces protéines a lieu dans la mitochondrie (Boore, 1999). Ces 13 protéines se retrouvent dans les complexes enzymatiques I (NADH déshydrogénase), III (cytochrome c réductase), IV (cytochrome c oxydase) et V (ATP synthase) (Hatefi, 1985) (Figure 1). Les sous-unités protéiques du complexe II (succinate déshydrogénase) et certaines des autres complexes sont codées dans le génome nucléaire (Schapira, 2006). Dû à



cette codépendance entre les génomes mitochondriaux et nucléaire afin de produire l'énergie, on dit qu'ils co-évoent (Rand et al., 2004).



**Figure 1. – Chaîne respiratoire mitochondriale.** Les complexes sont dans la membrane interne et travaillent à produire l'énergie sous forme d'ATP (Adapté de Vercellino & Sazanov, (2022)).

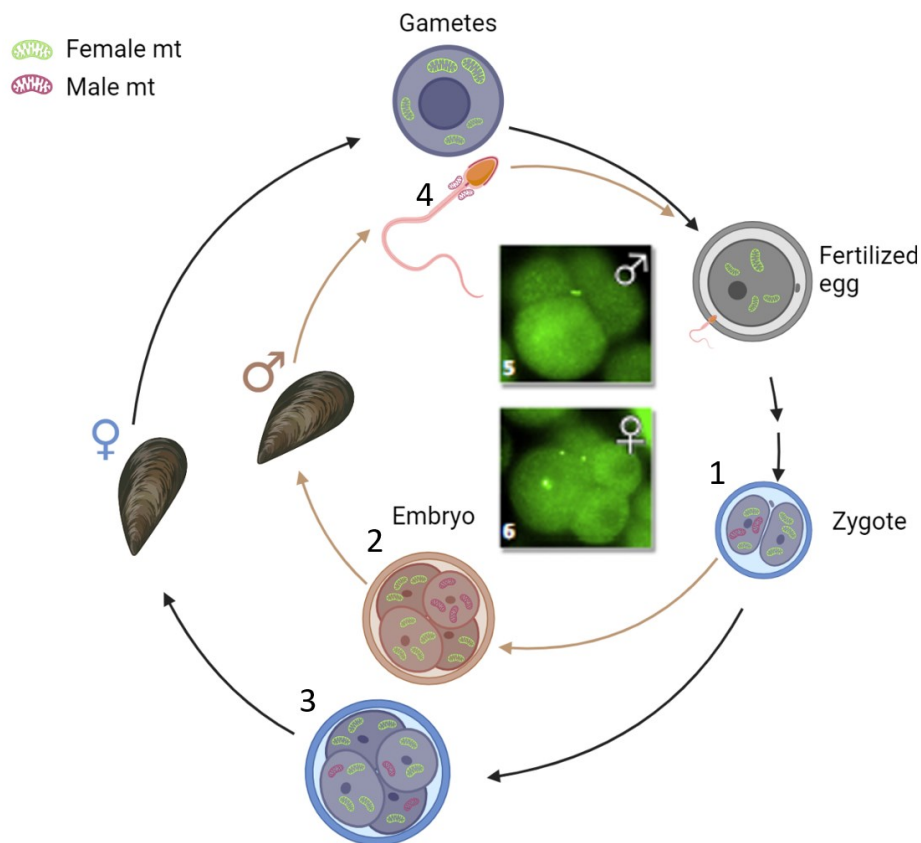
### 1.3 Transmission SMI de l'ADNmt

Chez les animaux, la transmission des mitochondries du parent à l'enfant est faite par la mère, ce qu'on appelle SMI (*strict maternal inheritance*) (Hutchison et al., 1974; Sato & Sato, 2013). Cela se fait afin d'éviter des conflits intracellulaires entre des génomes complets aux intérêts divergents, quoiqu'il y ait parfois des défauts au système, l'enfant héritant des deux génomes de ses parents quand même (Gyllensten et al., 1991). Cela s'appelle transmission paternelle accidentelle, ou *paternal leakage*.

### 1.4 Transmission DUI de l'ADNmt

Comme toute bonne règle, le SMI a une exception chez les animaux, retrouvée uniquement chez certaines espèces de bivalves : la transmission doublement uniparentale, DUI ou *doubly uniparental inheritance* (Zouros, Oberhauser Ball, et al., 1994) (Figure 2). Comme le nom l'indique, le descendant reçoit le génome mitochondrial de ses deux parents. Cela se divise ensuite en deux patrons possibles. Dans le premier, l'embryon destiné à être femelle éliminera les mitochondries

paternelles pour ne garder que les maternelles, ou du moins les diluera et dispersera dans toutes ses cellules de façon aléatoire (Cao et al., 2004a). Celui destiné à être mâle cependant conservera les deux génomes. Par contre, il isolera les mitochondries paternelles dans ses cellules germinales, afin qu'elles ne soient généralement retrouvées que dans les gonades, plus spécifiquement dans les spermatozoïdes (Cao et al., 2004a). Les mitochondries maternelles, elles, se retrouveront dans tous les tissus somatiques. Les individus mâles seront ainsi hétéroplasmiques, soit ayant plus d'un type de génomes en proportions variées (dans le cas ici, en proportions variées deux génomes, i.e. le génome paternel et le génome maternel), alors que les femelles DUI, comme les individus SMI, seront homoplasmiques, ayant une seule séquence identique dans toutes leurs mitochondries (Schapira, 2006). Toutefois, les mécanismes cellulaires permettant ces patrons et la rétention du génome mitochondrial mâle ainsi que l'exclusion du génome femelle dans les gamètes mâles restent inconnus, et doivent donc être encore étudiés.



**Figure 2. – Schéma du phénomène de DUI.** En vert sont les mitochondries maternelles F, en rose sont les mitochondries paternelles M. Les photos au microscope avec MitoTracker green

montrent la position des mitochondries paternelles chez, respectivement (haut en bas) un embryon mâle et un embryon femelle. (1) Embryon avec les deux types de mitochondries. (2) Embryon continue son développement. (2) Type M est perdu durant le développement de l'individu femelle. (3) Type M est conservé chez l'individu mâle. (4) Seules le type M est présent dans les spermatozoïdes. (5) Chez le mâle, les mitochondries présentent un motif agrégé. (6) Chez la femelle, elles sont dispersées. Image adaptée de Breton et al. (2014).

Le mâle ne transmet donc pas à ses enfants les deux génomes mitochondriaux. Il ne transmet que celui retrouvé dans ses spermatozoïdes, soit celui de son père. Il se crée ainsi deux routes de transmission a priori indépendantes. L'une est de mère en fille, et l'autre de père en fils, un sexe étant un cul-de-sac évolutif pour le génome de l'autre. Ce mode de transmission particulier est observé dans quatre ordres, douze familles (Chacón et al., 2020) et chez plus de 100 espèces de bivalves (Gusman et al., 2016), seule classe où il est retrouvé.

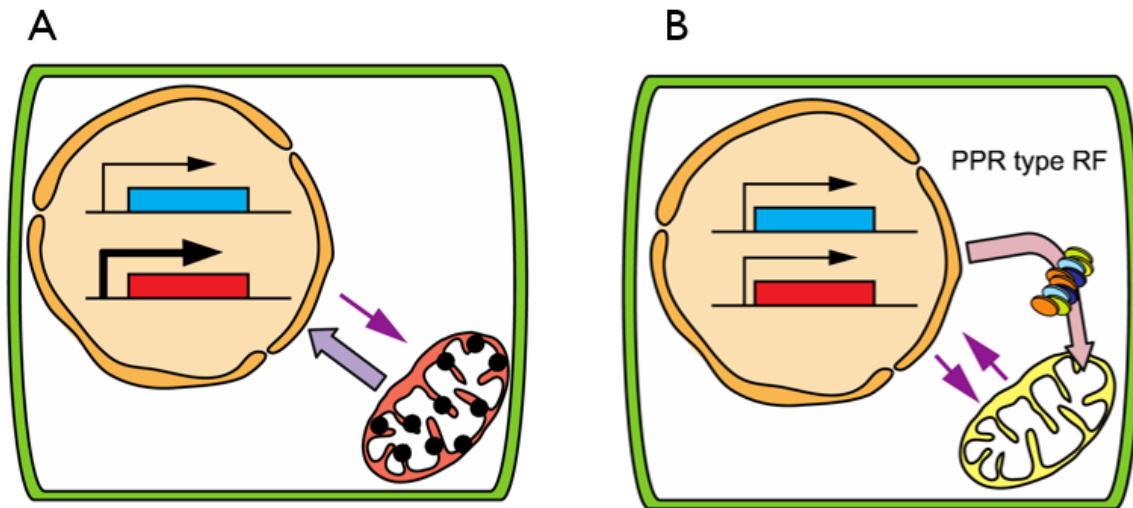
### **1.5 L'ADNmt dans la DUI et son lien avec la détermination du sexe**

Chez l'humain, l'existence de plus d'un type d'ADNmt dans une cellule ou un tissu peut être néfaste. Si la quantité d'ADNmt mutant dépasse un certain seuil par rapport à l'ADNmt normal, les fonctions de la cellule seront affectées, pouvant causer de graves maladies (Schapira, 2006). Pourtant, l'ADNmt des espèces DUI provenant du mâle (ADNmt M) et celui provenant de la femelle (ADNmt F) peuvent avoir des différences génétiques considérables tout en coexistant chez l'individu qui possède les deux, et parfois dans un même tissu. Chez certaines espèces, comme la palourde *Scrobicularia plana*, la différence génétique entre les deux molécules peut aller jusqu'à 45% (Capt et al., 2020). Chez d'autres, comme *Mytilus edulis*, espèce chez laquelle le phénomène a été originellement observé au début des années 90, la différence entre les deux ADNmt F et M est d'environ 20% (Hoeh et al., 1991). Plusieurs caractéristiques sont également particulières dans les ADNmt F et M transmis par DUI. Premièrement, il y a présence de modifications importantes dans le gène qui code pour la protéine COX2 chez l'ADNmt M (Curole & Kocher, 2005; Tassé et al., 2022). Il s'agit d'une extension de la portion C-terminale du gène chez les moules d'eau douce (Curole & Kocher 2005) ou d'une insertion importante dans le gène

chez les palourdes (Capt et al. 2020; Tassé et al. 2022). Par exemple, la plus longue insertion retrouvée chez l'espèce de palourde *Scrobicularia plana*, est transcrite et produit une protéine d'environ 220 kDa, et pourrait servir d'étiquette aux mitochondries paternelles lors de leur agrégation dans les embryons mâles (Tassé et al., 2022). Deuxièmement, on retrouve la présence d'un ORF supplémentaire, appelé f-orf ou m-orf pour la version sur l'ADNmt F ou M, respectivement (Breton et al., 2009a; Breton et al., 2011a). Le terme ORF est pour *open reading frame*, soit « cadre de lecture ouvert ». C'est une séquence codant, du moins potentiellement, pour une protéine. F et M-orf sont un type particulier d'ORF, c'est-à-dire des ORFans, du terme « *orphans* » en anglais ou « orphelin », qui sont des séquences n'ayant pas de similarité à d'autres séquences connues (Milani et al., 2013). La séquence en acides aminés d'ORF d'un type particulier (f-orf ou m-orf) est similaire entre espèces proches (Breton, et al., 2009a, 2011a; Milani et al., 2013; Mitchell et al., 2016), mais très différente entre ordres éloignés. Les séquences protéiques et les structures secondaires prédites (avec une seule portion transmembranaire pour F-ORF et pour M-ORF chez toutes les espèces analysées; (Breton et al., 2011a, 2011b; Milani et al., 2013; Mitchell et al., 2016)) étant toutefois suffisamment conservées, il était attendu qu'elles produisent des protéines fonctionnelles. La détection des protéines F-ORF et M-ORF a d'abord été rapportée chez les moules d'eau douce (ordre Unionida) (Breton et al., 2009a; Breton et al., 2011b), puis chez la palourde marine *Ruditapes phillipinarum* (ordre Veneroida) pour la protéine M-ORF (Milani et al., 2014).

Jusqu'à maintenant la ou les fonction(s) de ces protéines F-ORF et M-ORF demeurent mystérieuses. Cependant, Breton et al. (2011b) ont proposé l'hypothèse qu'elles pourraient être nécessaires au maintien du gonochorisme (c'est-à-dire le maintien de sexes mâles et femelles dans des individus distincts) suivant la découverte d'une corrélation stricte entre la présence de la DUI et le gonochorisme, et la perte de la DUI (retour à la SMI) et l'hermaphroditisme chez les bivalves d'eau douce. Renforçant cette possibilité, Breton et al. (2011b) ont observé chez les bivalves hermaphrodites, en plus d'une homoplasmie pour leur ADN mitochondrial maternel, une modification extrême du gène f-orf, en une version appelée h-orf. Les auteurs ont donc proposé que l'ADNmt F et M, précisément leurs gènes f-orf et m-orf, seraient des éléments clé liés à la détermination ou la différenciation du sexe chez les espèces à DUI ce qui serait une première

dans le monde animal. Il existe un précédent chez certains végétaux, soit le phénomène de stérilité cytoplasmique mâle (CMS pour *cytoplasmic male sterility*), où la production de pollen viable est perturbée par les produits d'ORFs mitochondriaux, rendant la plante hermaphrodite fonctionnellement « femelle » (Figure 3).



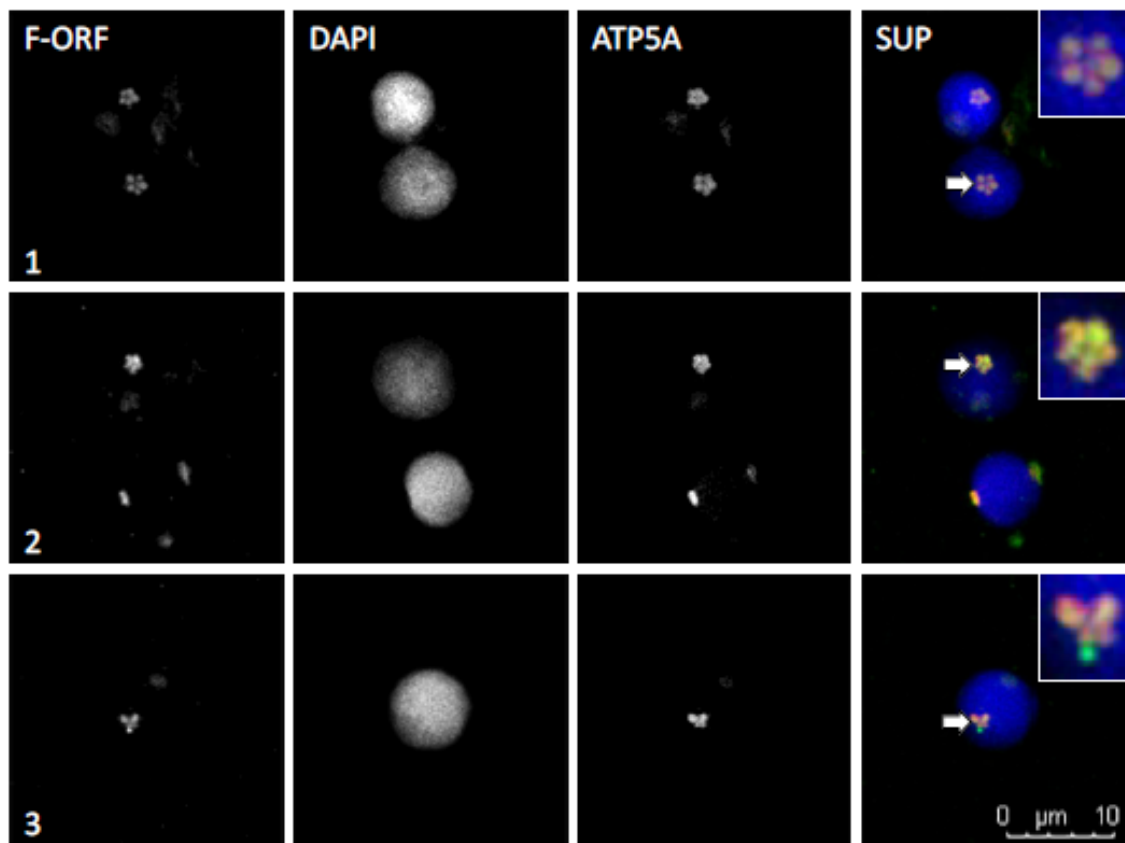
**Figure 3. – Stérilité cytoplasmique mâle dans une cellule végétale (A).** Stérilité induite par des produits mitochondriaux. Les points noirs en A sont les produits des ORFs mitochondriaux, donnant le CMS. Un défaut de fonction de certains ORFs mitochondriaux inhibe la production de pollen viable (Manna, 2015). (B). Restauration de la fertilité par des restaurateurs de type PPR (*pentatricopeptide repeats*). Les gènes restaurateurs de fertilité PPR, une séquence de 35 acides aminés pouvant se répéter, proviennent du noyau, et retourne à l'individu la capacité de produire les deux types de gamètes (Chase, 2007). Adapté de Osabe et al. (2012).

Des analyses *in silico* des protéines permettent de supposer les fonctions de F-ORF et M-ORF. Pour F-ORF, Mitchell et al. (2016) ont trouvé des rôles potentiels dans la fonction immunitaire ainsi que dans le transport cellulaire. Pour M-ORF, il y avait le transport également, l'organisation du cytosquelette ainsi que la division cellulaire. Cela se recoupe avec l'hypothèse de Milani et al. (2013) qui proposait que M-ORF pourrait aider à la conservation du génome mitochondrial mâle chez les embryons mâles. Cela pourrait en effet être lié aux rôles de transport

cellulaire ou d'organisation du cytosquelette et au motif d'agrégation des mitochondries paternelles dans les cellules germinales observé chez les embryons mâles.

Tel que mentionné plus haut, les analyses *in silico* ont aussi montré une possibilité d'hélice transmembranaire chez F-ORF et M-ORF des moules d'eau douce, moules marines et palourdes marines (Breton et al., 2011b, 2011a; Milani et al., 2013; Mitchell et al., 2016). Milani et al. (2013) ont également observé que les M-ORF chez la moule bleue *Mytilus* ont une suite de lysine (poly-K), un motif qui peut être utilisé, entre-autres, pour se lier aux lipides de la membrane (Bouaouina et al., 2012), ou encore comme signal d'envoi au noyau (Milani et al., 2013).

La présence potentielle dans F-ORF et M-ORF d'une hélice transmembranaire pourvoit des indices quant à la localisation possible des protéines. En effet, à part se retrouver dans la mitochondrie, où elles sont produites, elles pourraient se lier à la membrane externe des mitochondries. Il a été observé que la protéine F-ORF se retrouvait à la fois dans les mitochondries et dans le noyau cellulaire chez les œufs de la moule d'eau douce *Venustaconcha ellipsiformis* (Breton et al., 2011b). Ouimet et al. (2020) a aussi noté la présence de F-ORF dans les mitochondries de cellules qui ressemblent à des spermatozoïdes de *Mytilus edulis* (Figure 4). Également, la protéine M-ORF de la palourde marine *Ruditapes philippinarum* se retrouve dans les mitochondries et le noyau des spermatozoïdes (Milani et al., 2016). Cependant, on ne sait toujours pas quelles fonctions elles auraient à ces différents endroits de la cellule.

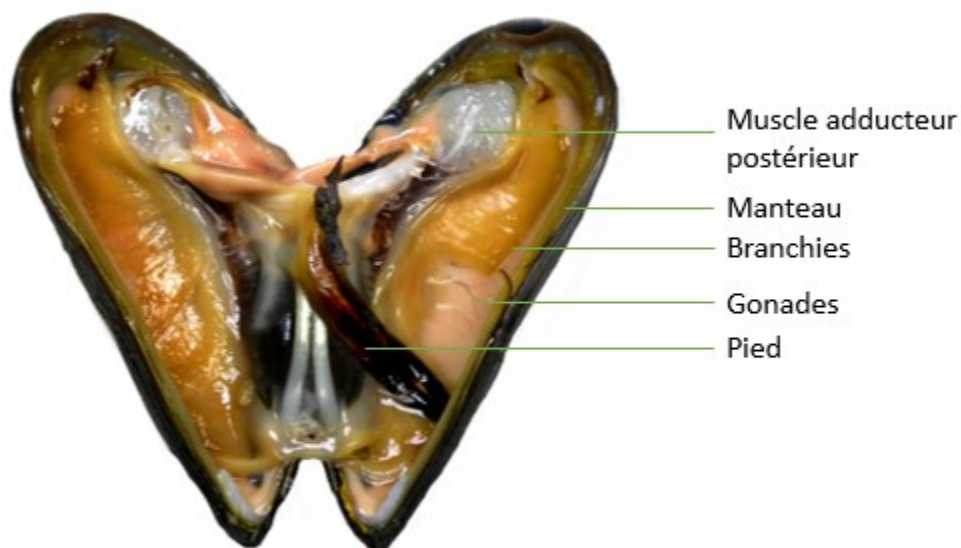


**Figure 4. – Position subcellulaire de F-ORF chez trois mâles de *Mytilus edulis*.** Coloré en bleu avec du DAPI est le noyau. Colorée en vert avec des anticorps est la protéine F-ORF. Colorées en rouge avec des anticorps contre ATP5 sont les mitochondries. SUP : superposition des trois couleurs. Les flèches blanches pointent un groupe de mitochondries chez chaque individu. Le carré agrandi le groupe pointé. Tiré de Ouimet (2018).

### 1.6 *Mytilus edulis*

La moule commune, ou moule bleue *Mytilus edulis*, est un animal bivalve de la famille des Mytilidae et de l'ordre des Mytilida (Sutherland et al., 1998). *M. edulis* est retrouvée le long des côtes avec marées, dans l'Atlantique nord, aussi bien vers l'Amérique que l'Europe. Chez cette espèce, les sexes sont séparés (espèce gonochorique avec des individus mâles et femelles) et les gonades sont retrouvées dans le manteau (Figure 5) (Ouimet et al., 2020). La saison de reproduction survient généralement durant le printemps, de mars à juin, et la fécondation est

externe (Kautsky, 1982). *M. edulis* est facilement accessible en poissonnerie car il s'agit d'une espèce consommée par l'homme et ses génomes nucléaire et mitochondriaux sont déjà séquencés (Figure 6 pour l'ADNmt). Pourtant, ses protéines F-ORF et M-ORF ont été peu étudiées.



**Figure 5. – Anatomie de la moule Mytilid.** Position des branchies, du pied, du muscle adducteur postérieur, du manteau et des gonades, qui sont les tissus d'intérêt de ce projet de recherche.

### 1.7 L'ADNmt de *Mytilus edulis*

Dans l'ADNmt de *Mytilus*, les gènes mitochondriaux sont tous sur le brin lourd (Hoffmann et al., 1992). *M. edulis* possède les 37 gènes mitochondriaux communs. Le génome a également un ARNt codant pour une méthionine supplémentaire (Hoffmann et al., 1992), en plus de f-orf et m-orf sur les ADNmt F ou M respectivement, pour un total de 39 gènes. Le génome femelle fait 16,7 kb (kilo paire de bases) (Boore et al., 2004), et le génome mâle fait 16,6 kb (Breton et al., 2006) (Figure 6).

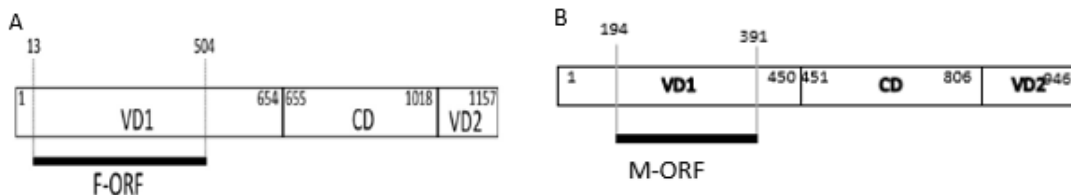




**Figure 6. – Carte des génomes (A) F et (B) M mitochondriaux de *Mytilus edulis*.** Les gènes codant pour les ARN de transfert sont en mauves, nommés selon les trois premières lettres de leur acide aminé correspondant. Les gènes d’OXPHOS sont, en ordre d’appartenance aux complexes (I, III, IV, V) en vert (NADH déshydrogénase 1 à 6, et 4L), gris (cytochrome B), bleu (cytochrome c oxydase I-II-III) et jaune (ATP synthase 6-8). Les gènes codants pour les sous-unités ribosomales sont en rouge. La région contrôle est en orange. Les gènes f-orf et m-orf sont en noir. No. Acc. GenBank : AY484747 (ADNmt F) (Boore et al., 2004) et AY823623 (ADNmt M) (Breton et al., 2006). ATP8 et ORFs ajoutés avec, respectivement, (Breton et al., 2010, 2011a). Produit avec GenomeVx (<http://wolfe.ucd.ie/GenomeVx/>).

### 1.8 M-orf et f-orf dans la région contrôle

Le gène f-orf se retrouve chez *Mytilus edulis* dans la région contrôle de synthèse d’ADN et d’ARN (D-loop) du génome F, plus particulièrement dans VD1 (domaine variable 1) (Figure 7) (Minoiu et al., 2016). Chez les bivalves, la composition de la région contrôle (CR) semble tripartite, comme celle des humains (Zouros, 2013). Elle comprend chez les deux sexes la région variable 1 (VD1) en premier, qui est la plus hautement variable entre les sexes (Cao et al., 2004b). Au milieu se trouve la région/domaine constant (CD), qui est le plus similaire entre les sexes de toute la CR, mais aussi qui évolue moins vite en général que le reste du génome (Zbawicka et al., 2007). Finalement, il y a le domaine variable 2 (VD2), qui évolue à un rythme assez comparable au reste du génome, et donc entre VD1 et CD (Cao et al., 2004b). Tout comme f-orf dans l’ADNmt F, c’est dans le domaine VD1 de l’ADNmt M que se retrouve le gène m-orf (Figure 7) (Breton et al., 2011a).



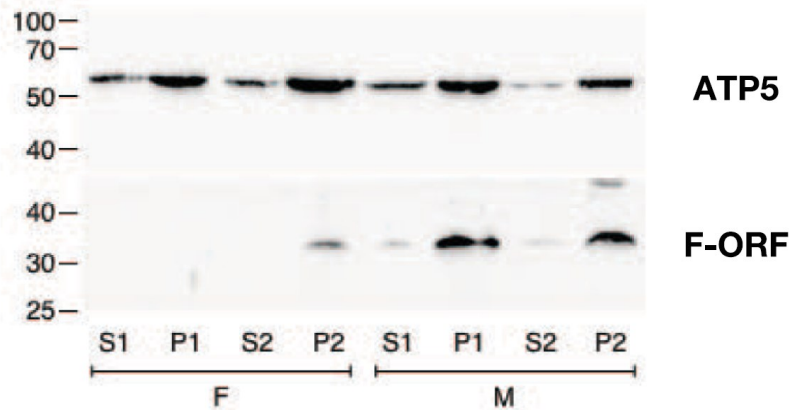
**Figure 7. – Région contrôle des génomes F (A) et M (B).** Les séquences codant pour F-ORF et M-ORF sont dans les VD1 de leurs régions contrôles respectives. Les longueurs de chaque partie sont indiquées dans les coins des boîtes. VD1 : domaine variable 1, CD : domaine constant, VD2 :

domaine variable 2. (A) tiré de (Minoiu et al., 2016), (B) produit avec annotations provenant de Breton et al. (2011a) et séquence GenBank AY823623 (Breton et al., 2006).

Il arrive parfois que l'ADNmt F et l'ADNmt M se recombinent (Hoeh et al., 1997). Le génome mitochondrial transmis par le sperme est alors très similaire à l'ADNmt F. Cela s'appelle la masculinisation. Dans tous les cas de masculinisation, observés jusqu'ici uniquement chez les Mytilidés, la seule région restant invariablement la même que dans l'ADNmt M est la région contrôle, qui contient m-orf (Burzynski, 2003; Śmietanka & Burzyński, 2017).

### **1.9 F-ORF chez *Mytilus edulis***

Ouimet et al. (2020) a été le premier à obtenir des résultats confirmant le potentiel codant de F-orf chez *M. edulis*. Des signaux protéiques ont été détectés dans la fraction mitochondriale des tissus de gonades d'individus *M. edulis* femelles comme mâles (Figure 8), et une localisation mitochondriale a été confirmée dans les mitochondries des spermatozoïdes (Figure 4). Toutefois, son expression dans les tissus somatiques n'a jamais été testée, de même que son expression temporelle et sa position intracellulaire dans les gonades femelles, ce qui serait pertinent en regard à ses fonctions potentielles. La taille attendue de la protéine est d'environ 17 kDa (kilo Daltons), mais les bandes retrouvées sur le gel SDS-PAGE sont plutôt aux environs de 33 kDa (Figure 8). Selon Ouimet et al. (2020), cela pourrait être causé par des dimères de la protéine ou encore par des modifications pré ou post traductionnelles. La présence d'une hélice transmembranaire pourrait aussi avoir contribué à une moins grande mobilité de la protéine en se liant au gel SDS-PAGE (Rath et al., 2009). La fonction exacte de la protéine ainsi que ses partenaires d'interactions restent également inconnus.



**Figure 8. – Position sur gel d'électrophorèse de la protéine F-ORF dans des tissus gonadiques mâles (M) et femelles (F) de *M. edulis*.** S1 : surnageant de la première centrifugation. P1 : fraction de larges débris et noyau. S2 : protéines solubles P2 : fraction mitochondriale. F-ORF est retrouvé dans les fraction mitochondriale des deux sexes, et beaucoup dans P1 et P2 mâle. Il y a de légères traces dans S1 et S2. Adapté de Ouimet et al. (2020).

### 1.10 M-ORF chez *Mytilus edulis*

Plusieurs analyses *in silico* de M-ORF ont été faites, mais l'existence formelle de la protéine n'a pas encore été démontrée chez *Mytilus edulis*. Cette protéine pourrait avoir un poids moléculaire d'environ 13 kDa, et faire 112 acides aminés (calculé avec Compute pI/Mw sur le serveur ExPASy (Gasteiger et al., 2005)) (Breton et al., 2011a; Milani et al., 2013). De fait, quelques informations sont connues sur le gène m-orf, mais rien n'est certain au niveau de la protéine. On ne sait pas dans quels tissus M-ORF s'exprime, à quels moments et à quel emplacement dans la cellule, ainsi que les partenaires d'interaction qu'elle pourrait avoir. Ce sont des informations pertinentes à découvrir afin de préciser sa fonction, ce qui contribuerait à notre connaissance de cette espèce économiquement et environnementalement importante.

### 1.11 Objectifs et hypothèses

Mon projet de maîtrise a pour hypothèse guide que M-ORF et F-ORF sont des protéines liées à la détermination ou la différenciation du sexe. De là, le premier objectif sera de déterminer l'expression spatiale (dans les branchies, gonades, pied, muscle) et temporelle (saison de

reproduction *versus* de quiescence) de M-ORF et F-ORF dans des individus mâles et femelles de *M. edulis*. Si F-ORF et M-ORF sont liés à la détermination ou la différenciation du sexe, comme il est théorisé pour leur fonction, leur expression devrait être la plus forte (ou spécifique) dans les œufs et spermatozoïdes (ou gonades) respectivement. L'expression devrait aussi être plus forte durant les saisons de reproduction, car les gonades ne sont développées que dans ces moments (Kautsky, 1982). Ensuite, le second objectif sera de déterminer l'emplacement subcellulaire de M-ORF et F-ORF dans des cultures cellulaires sur lamelle. Comme ce sont des protéines codées par des génomes mitochondriaux, nous nous attendons à les retrouver dans les mitochondries des cellules dans lesquelles elles sont exprimées. Si ces éléments-clés du système DUI fonctionnent pareillement chez des espèces éloignées, tel que proposé par Capt et al. (2019), on s'attend également à les retrouver dans le noyau des cellules germinales comme chez *Venustaconcha ellipsiformis* pour F-ORF (Breton et al., 2011b) et M-ORF chez *Ruditapes philippinarum*, (Milani et al., 2016). Finalement, le dernier objectif serait d'identifier de possibles partenaires d'interaction de M-ORF et F-ORF, ce qui pourrait aider à élucider leur fonction. Notre hypothèse est que les partenaires d'interactions des deux protéines seraient liés à des mécanismes connus de détermination ou de différenciation du sexe ou à des fonctions associées, comme le transport cellulaire ou l'organisation cellulaire.

## **2. Article : Validation of the male-specific ORF of the paternally-transmitted mtDNA in *Mytilus edulis* as a protein-coding gene**

Alizée Debelli<sup>1</sup>, Laura Kienzle<sup>1</sup>, Hajar Hosseini Khorami<sup>1</sup>, Annie Angers<sup>1</sup>, Sophie Breton<sup>1,\*</sup>

<sup>1</sup>Département de Sciences Biologiques, Université de Montréal, Montréal, QC H3C 3J7 Canada

J'ai fait toutes les expériences en laboratoire, l'analyse des résultats ainsi que le premier jet de l'article.

Publié dans la revue *GENE* à l'été 2023

<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0378111923004274>

## Abstract

There appears to be an additional set of sex-specific mtDNA-encoded proteins in bivalve species with doubly uniparental mitochondrial inheritance that may be involved in the transmission of the female and male mitogenomes. In the marine mussel *Mytilus edulis*, the translation of the female-specific open reading frame (F-ORF) was demonstrated but the translation of the male-specific ORF (M-ORF) remains to be shown. Here we validate the male-specific ORF of the paternal mitogenome in *M. edulis* as a protein-coding gene. The M-ORF protein was detected only in male gonads and localized in sperm mitochondria and acrosome, suggesting that it is involved in a key sperm function in *Mytilus edulis*.

**Keywords:** Mitochondria, Mitochondrial DNA, Doubly Uniparental Inheritance of mtDNA, ORF genes, Bivalvia, *Mytilus edulis*

## 1. Introduction

Many bivalve mollusks escape to the rule of strict maternal inheritance of mitochondria in animals (Birky, 2001), and exhibit “doubly uniparental inheritance” (DUI) (Zouros, Ball, et al., 1994). DUI has to this day been found in over 100 bivalve species in twelve families (Gusman et al., 2016, Chacón et al., 2020). In species with DUI, both maternal and paternal mitochondria are transmitted to the progeny, but only male individuals retain both types. Embryos thus inherit maternal and paternal mitogenomes (female- or F-type mtDNA and male- or M-type mtDNA, respectively). As individuals mature, the M-type mtDNA is presumably destroyed or lost by dilution in female embryos, and retained only in male primordial germ cell progenitors (Cao et al., 2004). This means that two divergent mtDNA types coexist in male individuals. In some marine clam and freshwater mussel species, this MmtDNA-FmtDNA divergence reaches as much as 40-45% ( Doucet-Beaupré et al., 2010; Capt et al., 2020).

The mitogenomes of species with DUI also acquired gender-specific open reading frames (ORFs) of uncertain origin and unknown function. They have been proposed to have evolved from duplicated genes (Mitchell et al., 2016; Guerra et al., 2017, 2019; Breton et al., 2022) or from the

integration of a viral gene (Milani et al., 2013; Milani et al., 2014). These gender-specific ORFs were named *f-orf* and *m-orf*, for, respectively, female-specific ORF in the F mtDNA and male-specific ORF in the M mtDNA (Breton et al., 2009; Breton et al., 2011a). The coding potential of *f-orf* and *m-orf* was first demonstrated in the freshwater mussel *Venustaconcha ellipsiformis* (Breton et al., 2009; Breton et al., 2011a). In the blue mussel *Mytilus edulis*, the coding potential of *f-orf* was first supported by its high degree of conservation at the DNA and RNA levels (Breton et al., 2011b; Minoiu et al., 2016) and later confirmed at the protein level (Ouimet et al., 2020). However, the translation of the *m-orf* sequence remains uncertain.

The aim of the present study is thus to elucidate whether the *m-orf* sequence encodes a peptide in blue mussel mitochondria bearing the M-type mtDNA. To this end, we used a combination of PCR, RT-PCR, comparative genetics, immunoassays and immunofluorescence experiments to better characterize the conservation of the *m-orf* sequence and to directly address the presence and subcellular localization of the M-ORF protein in the species *Mytilus edulis*.

## **2. Materials and methods**

### **2.1 Animal collection**

Adult mussels were bought in fish markets during their spawning period in May 2022. The sex of each individual was identified by microscopic observation of gonadal smears. Only individuals unambiguously sexed were kept for the present study. Following our precedent approach for the *M. edulis* F-ORF protein (Ouimet et al., 2020), dissections were carried on each individual to obtain mantle tissues, which contain gonads in *Mytilus* mussels (i.e. mantle is the tissue where gonad forms), as a first step to test for the presence of M-ORF. The number of specimens used for western blotting experiments included 6 males and 5 females, the number of specimens used for DNA sequencing included 9 males and the number of specimens used for RNA sequencing included 4 males (see below).



## 2.2 DNA and RNA extractions

Total genomic DNA was extracted from gonad tissues with the Qiagen DNeasy Blood & Tissue kit (QIAGEN) using the animal tissue protocol. RNA was extracted from gonad tissues with the Quick-RNA™ Miniprep kit (Zymo Research). The quality and quantity of DNA and RNA were assessed by electrophoresis on a 1% agarose gel and/or with a BioDrop μLITE spectrophotometer. Samples were kept at -80°C until used.

## 2.3 PCR, RT-PCR, sequencing and analysis of M-ORF sequences

The *m-orf* sequence was PCR-amplified in 50 μL volume comprising 5 μL of reaction buffer, 1 μL of dNTP, 2 μL of each primer specific to the male *d-loop* (5'-GGGGCCCAGTTAATTAGAGGT-3' and 5'-GTGACATACGGGCCCAATTT-3'), 0.25 μL of Taq, 1 μL of DNA, and ddH<sub>2</sub>O up to 50 μL. Reactions were performed on a TProfessional Basic Thermocycler with the following PCR amplification conditions: initial denaturation at 95°C for 2 min, followed by 35 cycles of 95°C for 20 sec, 61°C for 40 sec, and 95°C for 105 sec, followed by a final extension step at 95°C for 5 min. Resulting PCR products were visualized on 1% agarose gels under UV light with SYBR green dye (Life Technologies), and purified with the Qiagen QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol. The purified PCR products were sequenced at the Genome Quebec Innovation Centre (McGill University).

The same region (using the same primers) was also amplified using RNA extracted from gonad tissues with the SuperScript™ IV One-Step RT-PCR System (Invitrogen) according to the corresponding protocol to reverse-transcript RNA into DNA. Resulting RT-PCR products were visualized on 1% agarose gels under UV light with SYBR green dye (Life Technologies), and purified with the Qiagen QIAquick PCR Purification Kit (QIAGEN) according to the manufacturer's protocol. The purified RT-PCR products were sequenced at the Genome Quebec Innovation Centre (McGill University). Nucleotide and amino acid sequences were aligned using ClustalW (Thompson et al., 1994)

## 2.4 Western blotting

To check for the translation of *m-orf*, a polyclonal antibody against the synthetic epitope CFYTLNFPAYACNSSSRL specific to M-ORF was produced in rabbits and affinity-purified (MediMabs, Montréal, Canada). Proteins were extracted from gonad tissues by mechanical grinding and sonication in 10 mM HEPES (pH=7.4) supplemented with 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA, and protease inhibitors. Total protein concentration was estimated using the Bradford dosage method. The samples were then mixed with a Laemmli buffer containing DTT and  $\beta$ -mercaptoethanol reducing agents and heated at 95°C for 5 minutes before being loaded at equal protein concentration (100  $\mu$ g) on Tricine-SDS-PAGE gels. SDS-PAGE gels were composed of three parts (separating, spacer and compaction gels). For the transfer, nitrocellulose membranes (0,45  $\mu$ m) were used. Blocking was done with a 5% non-fat milk diluted in PBST (0.05% Tween 20, pH=8). Primary antibodies (anti-M-ORF 1:2000, anti-ATP5A (Abcam) 1:5000) were incubated for 1.5 h at room temperature (RT). To test the specificity of our antibody, the anti-M-ORF was preadsorbed with the immunogenic peptide for 1.5h at RT before incubation of the membrane. Incubation with secondary antibodies (respectively anti-rabbit and anti-mouse, both 1:2000) lasted for 30 minutes at RT. Washing with TBS-T (0.05% Tween 20, pH=7.4) was done twice, for ten minutes, after each incubation, followed by one last wash with TBS (pH=7.4). Protein signals were visualized by adding Montreal Biotech Inc.'s enhancer and substrate solutions and images were captured with a FUSION FX chemiluminescence imaging system.

## 2.5 Immunofluorescence

Male gonad tissues were dissected in salt water (prepared with 30 g per L of artificial sea salts Instant Ocean) and incubated with trypsin 0.25% for 13 minutes. Detached cells were then put on slides previously incubated with poly-D-lysine (75%). They were cultivated in L15 media (400 mM NaCl, 11 mM CaCl<sub>2</sub>, 10 mM KCl, 27 mM MgSO<sub>4</sub>, 27 mM MgCl<sub>2</sub>, 2 mM NaHCO<sub>3</sub>, 33 mM Dextrose, L15 media powder, antibiotics, 20% Fetal Calf Serum) for two days. Slides with cells were then fixed with PFA 4% (paraformaldehyde) for 30 minutes at RT, then lysed with Triton-X100 0,2%. Slides were blocked with BSA 5% with Normal Goat Serum 5% in PBS for 30 minutes at RT then incubated with primary anti-M-ORF and anti-ATP5A antibodies (at respectively 1:400 and 1:300)

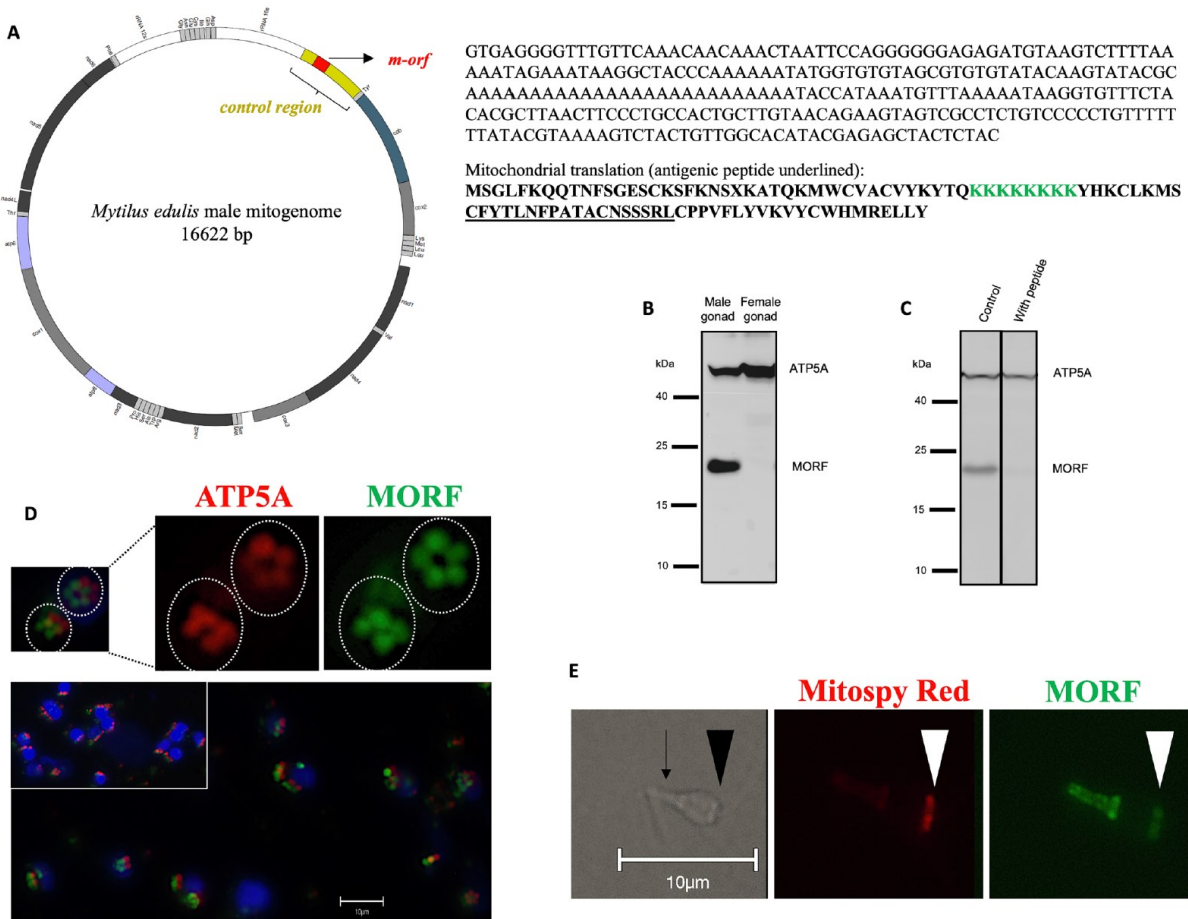
in BSA 1% overnight at 4°C. Slides were afterwards incubated with secondary antibodies (Alexa Fluor 488-goat anti-rabbit IgG green for M-ORF and Alexa Fluor 594-goat anti-mouse red for ATP5A 1:200) in BSA 1% for one hour at RT. Slides were fixed with DAPI and observed with an EVOS cell imaging system at 100X. Two controls were made, one incubated solely with BSA 1%, the other incubated with BSA 1% in place of primary antibodies and with secondary antibodies.

Gonad tissue of one male individual was dissected and agitated in PBS to promote the liberation of sperm cells. The media was centrifuged for 5 min at 3000 rpm. The pellet was kept and suspended in PBS with 1:2500 MitoSpy red CMXRos, in the dark, for 30 min at RT. After centrifugation (3000 rpm, 5 min), the supernatant was discarded. Cells were incubated in PFA 4% for 15 min at RT and the supernatant was discarded. Cells were permeabilized with Triton-X100 0.2% for 15 min at RT, followed by blocking with 2.5% BSA for 1h at RT and with primary antibodies (anti-M-ORF 1:200) in BSA 2.5% for 2.5h. Incubation with secondary antibodies (Alexa Fluor 488-goat anti-Rabbit 1:200) lasted 45 min at RT in 0.1% BSA. After three washes in PBS + BSA, a drop was mounted on a microscope slide with DAPI mounting medium for observation with the EVOS cell imaging system (100X objective). Two controls were made, one omitting all antibodies to monitor autofluorescence, and another omitting the primary antibodies. Each step was done in the dark after adding MitoSpy red.

### **3. Results and discussion**

In *M. edulis*, the *m-orf* sequence is found in the control region (CR) of the M-type mtDNA (Fig. 1A). Newly obtained M-type CR sequences indicate that *m-orf* is translated into a 94-112 amino acids long peptide (GenBank accession numbers OQ714227-OQ714235) (Supplementary Figure S1). The M-ORF protein sequence in *M. edulis* shows a string of lysines of variable length (poly-K of 8-15 aa) resulting from the translation of a poly-A nucleotide sequence of 24-45 nucleotides (Fig. 1A and Supplementary Figures S1 and S2). The high degree of conservation of the M-ORF protein sequence in the closely related species *M. galloprovincialis* and *M. trossulus*, previously reported by Milani et al. (2013), argues in favor of its functionality. At the species level, M-ORF sequences also possess a string of lysines of variable length, and are more conserved downstream the poly-K region than upstream the poly-K region (Milani et al., 2013). The analysis of all other

*M. edulis m-orf* sequences available in Genbank (n=29) reveals that many of them (n=22) have frame-disrupting mutations in the long poly-A region, which result in two overlapping ORFs: one ORF corresponding to the highly conserved amino acid sequence downstream the string of lysines and one ORF to the more variable sequence upstream the string of Ks (Supplementary Figures S2 and S3). It is plausible that these overlapping ORFs are attributable to sequencing errors in this long stretch of adenines. Indeed, high-throughput and more traditional sequencing techniques are prone to skip nucleotides in long homopolymeric sequences, thus introducing errors such as indels (Heydari et al., 2019; Yu et al., 2020; Sacristán-Horcajada et al., 2021). This idea is supported by newly obtained cDNA sequences (GenBank numbers OQ714236-OQ714239), which showed no frame-disrupting mutations, and by a re-analysis of EST expressed sequence tags and transcriptome shotgun assembly, which revealed that all the *M. edulis m-orf* sequences from these databases start or finish within the poly-A track and respectively contain the complete end or complete beginning of the M-ORF sequence (Supplementary Figure S4).



**Figure 9. – Figure 1. Expression of M-ORF protein in *Mytilus edulis* mantle tissue and sperm.**

(A) The *m-orf* gene (red) is found in the M mtDNA control region (CR, yellow). M-ORF nucleic acids and amino acids sequences with poly-K region in green and antigenic peptide underlined. (B) Western blotting of M-ORF on male and female mantle extracts. Left: proteins from male mantle, Right: proteins from female mantle. The top of the membrane was incubated with ATP5A antibody. (C) Specificity of the anti-M-ORF antibody. Left: control was incubated with anti-M-ORF antibody, Right: treatment was incubated with preadsorbed antibody. Top panel shows ATP5A immunoreactivity. (D) Enlargement of colored slide of male gonad tissue. Nucleus is in blue, mitochondria in red, and M-ORF protein in green. (E) Sperm cell from male gonad tissue. Mitospay Red CMXRos color mitochondria. Big arrowhead indicates mitochondria, small arrow indicates acrosome.

To directly address the presence of a peptide originating from *Mytilus m-orf* sequence, we designed an antibody against the most conserved region of the M-ORF amino acid sequence at the species level downstream the poly-K (CFYTLNFPAYACNSSRL). The signal produced by the antibody seemed very specific, with a single band of an apparent molecular weight of 22 kDa present only in male mantle extracts. The signal was higher than the calculated molecular mass (11 kDa) (Fig. 1B). The specificity of the antibody was further checked by adsorption of the antigenic peptide that attenuated the 22 kDa band (Fig. 1C). It is not unusual for a protein to show an apparent molecular weight divergent from the calculated mass in SDS-PAGE. Many factors can modify the migration of a protein through acrylamide gels, including post-translational modifications or dimerization.

Post-translational modifications such as glycosylation, phosphorylation, ubiquitination, acetylation, methylation or sumoylation can significantly slow down protein progression in SDS-PAGE by increasing the protein molecular weight (Guan et al., 2015). We checked for known motifs for these post-translational modifications with probabilities >80% (Wang et al., 2020), and detected two glycosylation sites and two palmytoilation sites (data not shown). It could be worth exploring the possibility that these modifications alter the structure of M-ORF.

Dimerization is another plausible cause for a protein to appear bigger than expected on SDS-PAGE. To address this possibility, male mantle protein extracts were subjected to harsh

conditions, known to promote the dissociation of unusually stable dimers (Grigorian et al., 2005). The samples were exposed to different concentrations of  $\beta$ -mercaptoethanol (0%, 5% and 10%) and different heating times (5 min, 30 min and 3 hours). None of these treatments had any effect on the migration of M-ORF, suggesting that it is not forming a dimer (Supplementary Figure S5). However, some dimers may still remain 'undisruptable' by heat and strong reducing conditions (Kolodziejewski et al., 2003). Interestingly, F-ORF also has a higher observed molecular weight than expected in *M. edulis* (Ouimet et al., 2020). Whether it is for the same reasons is still to be determined.

Immunohistochemistry experiments were performed on dissociated male mantle/gonad cells to localize the M-ORF protein. The results showed that M-ORF co-localized with the mitochondrial marker ATP5 in spermatids and mature sperm (Fig. 1D and E). These cells usually possess five big mitochondria in a star-shaped formation (Longo & Dornfeld, 1967). A signal for M-ORF was also detected in the sperm acrosome (Fig. 1E), suggesting the possibility that M-ORF is exported outside mitochondria, like F-ORF in *M. edulis* (Ouimet et al., 2020), F-ORF in *V. ellipsiformis* (Breton et al., 2011b) and M-ORF in *R. philippinarum* (Milani et al., 2016). Interestingly, other mitochondrial proteins, thought nuclear-coded, have been reported to be present in the acrosome in human and mouse, with possible functions related to spermatogenesis (Ren et al., 2019). Further testing, perhaps with immunoelectron microscopy, are needed to confirm whether M-ORF is exported outside mitochondria into the acrosome.

In conclusion, the detection of M-ORF in male gonads and its co-localization to sperm mitochondria validate *m-orf* as a protein-coding gene in *M. edulis*. In Western blot assays, M-ORF was completely absent from female samples. This contrasts with the F-ORF protein, which has been detected in both female and male gonads (specifically in sperm cells) in both *M. edulis* and *V. ellipsiformis* (Breton et al., 2011a; Shepardson et al., 2012; Ouimet et al., 2020). While sperm are homoplasmic for the M mtDNA and eggs for the F mtDNA, undifferentiated germ cells of both sexes are heteroplasmic and possess both F- and M-type mtDNAs at the organelle level (Ghiselli et al., 2019). According to Ouimet et al. (2020), the F-ORF protein might be exported from F-type mitochondria and cells and imported into M-type sperm mitochondria or F-ORF might have a long lifespan in germ cells destined to develop into mature sperm.

Breton et al. (2011a) proposed that M-ORF and F-ORF could be involved in the maintenance of DUI itself, but also in the maintenance of gonochorism. They proposed this hypothesis following the observation that in freshwater mussels (families Unionidae and Margaritiferidae), all DUI species are gonochoric whereas hermaphroditic species independently lost DUI. Hermaphroditic species also possess a highly modified version of the *f-orf* gene in their mtDNA, which was named *h-orf* (for hermaphrodite open reading frame) (Breton et al., 2011a). To date, the functions of the proteins F-ORF and M-ORF remain unknown. Their exportation outside mitochondria suggest that they may be involved in functions other than energy production (Breton et al., 2011a; Shepardson et al., 2012; Milani et al., 2016; Ouimet et al., 2020; present study). Other analyses are currently underway to further characterize both proteins.

#### **Funding statement**

This work was supported by the National Sciences and Engineering Research Council (NSERC) (grant no RGPIN-2019-04076 S.B. and RGPIN-2017-05054 A.A.).

#### **Credit authorship contribution**

**Alizée Debelli**: Methodology, analysis, writing (original draft). **Laura Kienzle**: Methodology. **Hajar Hosseini Khorami**: Methodology. **Annie Angers**: Conceptualization, funding acquisition, supervision, writing (review and editing). **Sophie Breton**: Conceptualization, funding acquisition, supervision, writing (review and editing).

#### **Declaration of competing interest**

The authors declare that they have no known competing financial interests or personal relationships that could have appeared to influence the work reported in this paper.

### 3. Résultats additionnels

*\*La section matériel et méthodes associée à cette section de résultats additionnels est en Annexe II.*

Depuis la découverte de la DUI, deux nouveaux gènes ont respectivement été identifiés dans les mitochondries ‘femelles’ et ‘mâles’ chez les bivalves, *f-orf* et *m-orf*. Le potentiel codant de ces deux nouveaux ORFs spécifiques au sexe avait d’abord été prouvé chez l’espèce de moule d’eau douce *Venustaconcha ellipsiformis* (Breton et al. 2009), mais pas chez la moule marine *Mytilus edulis*. Ce n’est que récemment que l’existence de la protéine F-ORF a été démontrée chez *M. edulis* (Ouimet et al., 2020). Les objectifs de ce projet étaient donc de démontrer l’existence de la protéine M-ORF ainsi que de préciser les fonctions potentielles des deux protéines en caractérisant leurs patrons d’expression tissulaire et temporel, leur localisation cellulaire ainsi que leurs potentiels partenaires d’interaction. Puisqu’une possible fonction en lien avec la détermination ou la différenciation du sexe a été proposée pour ces protéines (Breton et al., 2011b), les hypothèses privilégiées étaient que ces protéines seraient exprimées uniquement dans les gonades des sexes où on retrouve l’ADNmt correspondant (gonades mâles pour M-ORF et les deux pour F-ORF puisque l’ADNmt F se retrouve dans les deux types de gonades), possiblement surexprimées au moment de la reproduction, et avec des partenaires d’interaction pouvant avoir des fonctions connues liées au déterminisme sexuel.

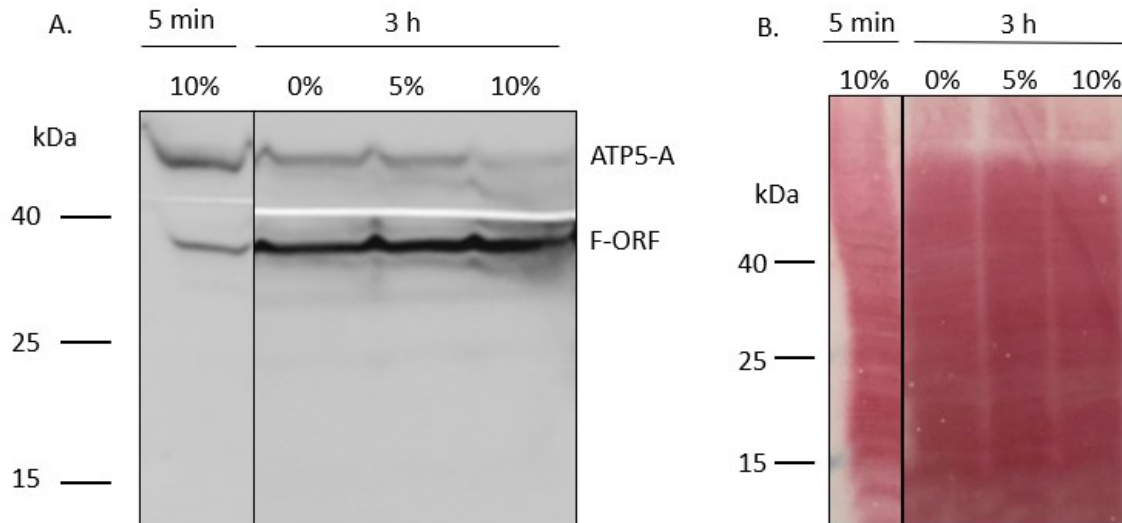
#### 3.1 Expression de F-ORF

Comme dans Ouimet et al. (2020), nous avons observé la présence de F-ORF dans les mitochondries des gonades des deux sexes, à un poids d’environ 36 kDa. Le poids attendu pour F-ORF était de 17 kDa. La protéine apparaît ainsi à environ le double du poids attendu. Les Western blot ont été faits comme dans Debelli et al. (2023).

Nous avons testé des conditions fortement dénaturantes afin de briser les possibles dimères. Pour M-ORF (Figure 16) comme pour F-ORF (Figure 10), la protéine n’a pas changé de

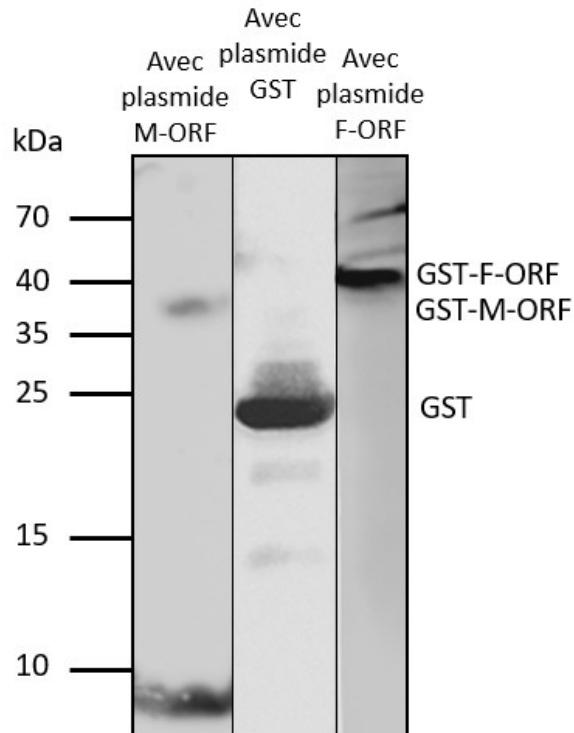


poids moléculaire malgré des conditions de plus en plus dénaturantes (i.e. jusqu'à 3 heures de chauffage et 10% de  $\beta$ -mercaptoéthanol).



**Figure 10. – Poids moléculaire de F-ORF à différentes conditions dénaturantes.** Le test a été fait à différentes concentrations de  $\beta$ -mercaptoéthanol (0%, 5%, 10%) et à différents temps de chauffage des échantillons (5 minutes, 3 heures). A. Le poids moléculaire de F-ORF ne changeait pas. B. La définition des bandes au Ponceau S diminuait après 3 heures de chauffage.

Nous avons introduit un plasmide contenant un vecteur GST-F-ORF et GST-M-ORF dans des bactéries *Escherichia coli* BL21 et avons vérifié si les protéines ainsi exprimées présentaient aussi le double du poids moléculaire attendu (Annexe II). Des immunobuvardages ont été faits sur des lysats de bactéries comme ils l'avaient été sur ceux de moules. Les résultats ont montré que la protéine fusion GST-M-ORF avait un poids moléculaire d'environ 38 kDa (Figure 11). En retirant de ce nombre le poids de GST (25 kDa), on obtient une protéine de 13 kDa, ce qui correspond au poids théorique de M-ORF. La protéine fusion GST-F-ORF avait un poids d'environ 40 kDa, suggérant que la protéine F-ORF produite était d'environ 15 kDa, ce qui correspond à son poids théorique.

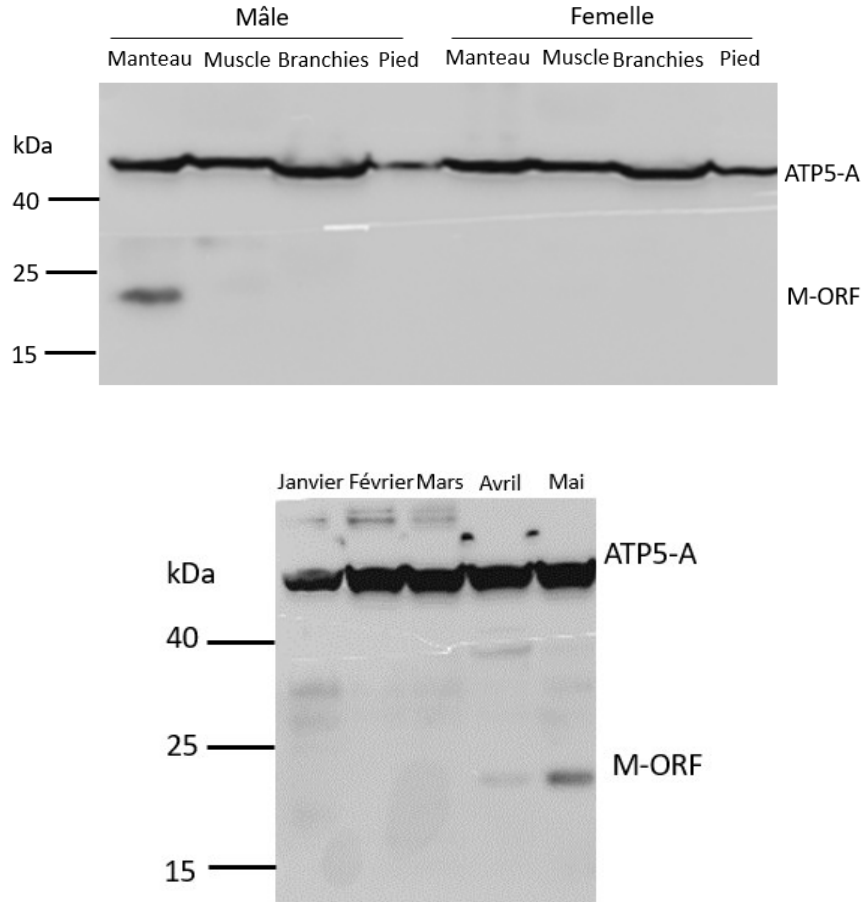


**Figure 11.** – Expression d’une protéine fusion GST-M-ORF ou GST-F-ORF dans *E. coli*. GST-M-ORF apparaît à environ 38 kDa. GST-F-ORF apparaît à 40 kDa.

### 3.2 Expression tissulaire et temporelle

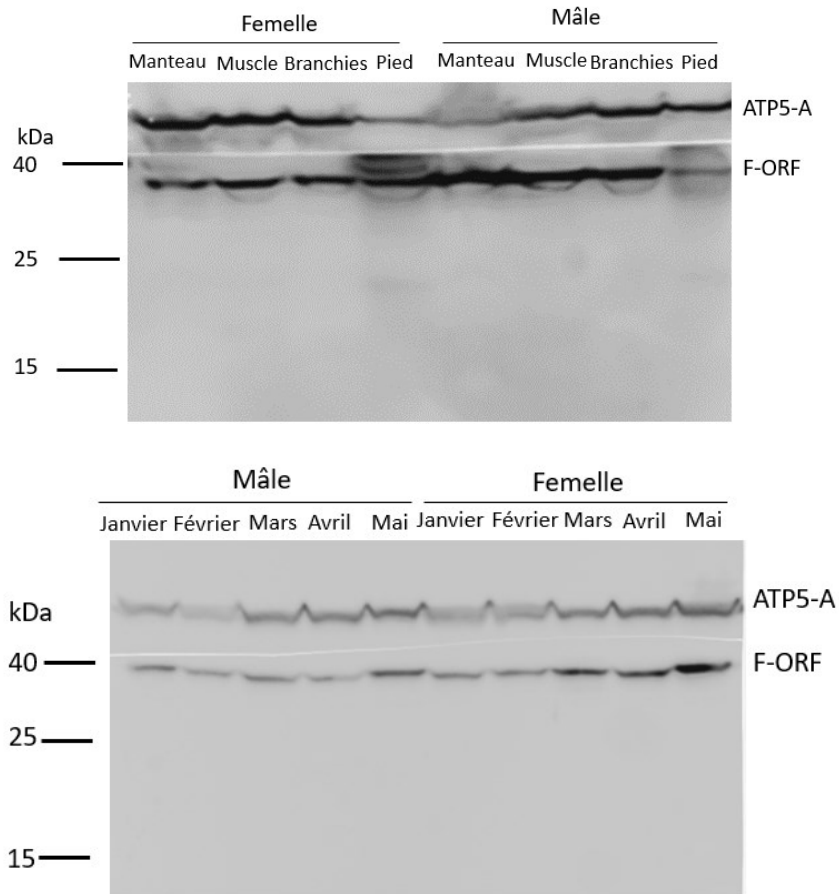
Nous avons ensuite voulu préciser l’expression tissulaire et temporelle des deux protéines, en récoltant, en plus des gonades, différents tissus somatiques (pied, branchies et muscle adducteur), et en récoltant les gonades à chaque mois à partir de janvier jusqu’au pic de la saison de reproduction (mai). Les Western blot et immunofluorescence ont été faits comme dans Debelli et al. (2023).

Il est apparu que M-ORF n’est exprimée que dans les gonades mâles (Figure 12 A). Les résultats d’expression temporelle de M-ORF sont aussi particulièrement intéressants (Figure 12 B). En effet, la protéine n’est exprimée qu’au pic de la production de spermatozoïdes (à partir de mai), lorsque les gonades sont pleines de spermatozoïdes matures.



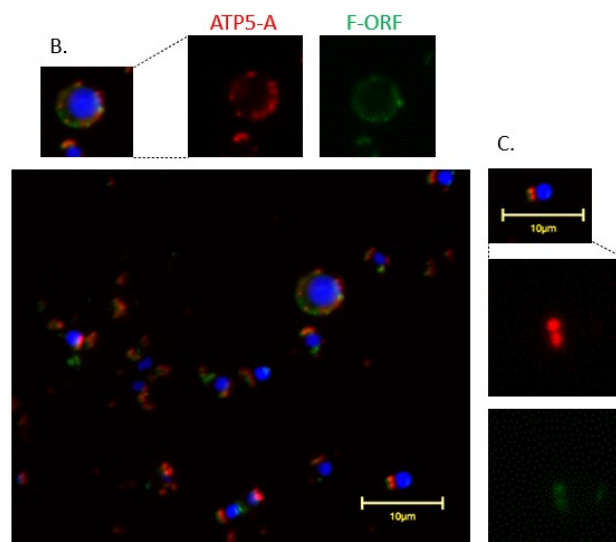
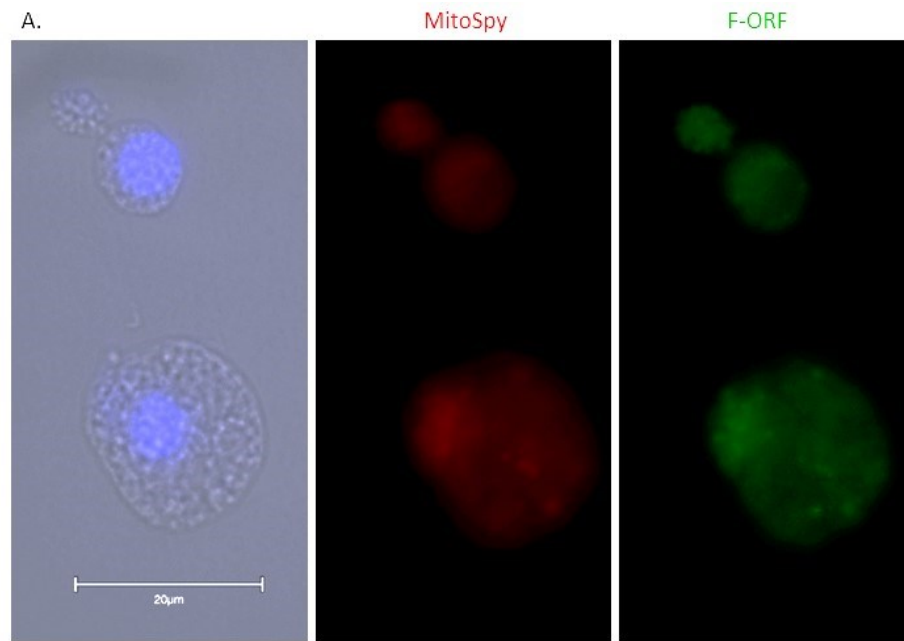
**Figure 12. – Expression tissulaire et temporelle de M-ORF.** A. Expression dans des tissus de gonades, muscle, branchies et pied d’individus mâles et femelles. La protéine est exprimée dans les gonades mâles. B. Expression temporelle de M-ORF dans la gonade mâle de janvier à mai. La protéine est exprimée en avril et en mai.

F-ORF, quant à elle, est exprimée dans tous les tissus et chez les deux sexes (Figure 13 A) à environ 36 kDa. Temporellement, F-ORF, est toujours produite, à tous les mois de l’année (Figure 13 B). L’expression de la protéine semble similaire dans tous les tissus et à tous les mois. Il ne semble pas y avoir un moment, tissu, ou sexe où l’expression de F-ORF est beaucoup plus importante (sauf peut-être une légère augmentation de l’expression dans la gonade femelle en mai).



**Figure 13. – Expression spatiale et temporelle de F-ORF.** A. Expression dans des tissus de gonades, muscle, branchies et pied d’individus mâles et femelles. B. Expression temporelle de F-ORF dans les gonades mâles et femelles de janvier à mai.

Dans les gonades femelles, l’immunofluorescence montre une colocalisation des signaux mitochondrial (MitoSpy) et de F-ORF (Figure 14 A). Sa présence dans les cellules somatiques femelles n’a pu être confirmée, car il était difficile de discerner les cellules somatiques des petits œufs non-matures.



**Figure 14. – Immunofluorescence de gonades mâles et femelles contre F-ORF.** A. Oeuf et cellules d'une gonade femelle colorés à l'aide d'un marqueur mitochondrial (MitoSpy Red) et contre la protéine F-ORF. Coloration faite sur cellules libres. Noyau en bleu. B. Cellule somatique de gonade mâle colorée contre un marqueur mitochondrial (ATP5-A) et la protéine F-ORF. Culture faite sur lamelle. C. Spermatide coloré contre un marqueur mitochondrial (ATP5-A) et la protéine F-ORF.

Dans la gonade mâle, nous avons observé un fort signal mitochondrial dans les mitochondries des spermatozoïdes mais aussi dans les mitochondries de ce qui semble être une cellule somatique (Figure 14 B). Dans cette cellule, le signal pour la protéine F-ORF est colocalisé avec le signal mitochondrial dispersé autour du noyau.

Nous avons observé dans la gonade mâle de nombreuses cellules ayant un signal mitochondrial et un signal pour F-ORF colocalisés en cinq points (en pentade), c'est-à-dire correspondant à la rosette mitochondriale caractéristique des spermatozoïdes chez *Mytilus edulis* (deux visibles sur Figure 14 C).

### **3.3 Potentiels partenaires d'interaction de M-ORF**

Afin de déterminer de potentiels partenaires d'interaction, nous avons fait des co-immunoprécipitation (co-IP) et des *pull-down assays* (avec protéine fusion GST-M-ORF) (Annexe II). Comme le nombre d'échantillons séquencés était limité, nous considérons que ces données sont préliminaires. Les résultats décrits ci-bas pour M-ORF concernent deux co-IP (versus contrôles avec sérum pré-immun) et un *pull down* (versus contrôle GST seule) réalisés avec des échantillons de gonades mâles. Ceux décrit un peu plus loin pour F-ORF concernent trois co-IP réalisés avec des échantillons de gonades mâles et une co-IP réalisée avec un échantillon de gonades femelles. Nous avons analysé les données obtenues par séquençage en spectrométrie de masse en considérant les protéines ayant été repérés trois fois ou plus dans le traitement par rapport au contrôle comme étant des partenaires potentiels d'interaction.

Pour M-ORF, lorsque comparés à la base de données de protéines de *Mytilus*, les résultats des co-IP ont révélé cinq partenaires d'interaction potentiels (Tableau I). De ces protéines, deux correspondent à des *vitelline-coat lysin proteins*. Ces protéines sont retrouvées dans l'acrosome des spermatozoïdes, et contribuent à la réaction acrosomale en permettant au spermatozoïde de percer l'enveloppe vitelline afin de transmettre son matériel à l'œuf (Dan, 1962; Yokota & Sawada, 2007).

Tableau I : Partenaires d'interaction potentiels de M-ORF par co-IP contre la base de données *Mytilus*

Protéines <sup>+</sup>	Numéro d'accès*	Fonctions
Alpha-tubulin	Q3S336	Microtubules
Elongation factor 1-alpha	Q9XY84	Lié à l'ADN/ARN
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	A0A076VC67	Métabolisme
Vitelline coat lysin M6	Q86LZ9	Réaction acrosomale
Vitelline coat lysin M7	Q867R8	Réaction acrosomale

<sup>+</sup>Le seuil de confiance de l'identification des peptides est de 95%

\*Les numéros d'accès sont pour la base de données Uniprot

Les résultats du *pull-down* ont révélé huit partenaires d'interaction potentiels (Tableau II). De ceux-ci, un est encore une fois une *vitelline coat lysin protein*, supportant les résultats des co-IP. Parmi les autres protéines, il est intéressant de noter la présence de l'*ATP synthase subunit Beta*, *complex III subunit VII* et *cytochrome c oxidase subunit 4* qui sont toutes des sous-unités de la chaîne respiratoire mitochondriale, supportant nos résultats quant à la localisation de M-ORF aux mitochondries. Ces trois protéines font partie de trois complexes différents, soient l'ATP synthase, le complexe cytochrome bc1 et le complexe de la cytochrome c oxydase, respectivement. Des protéines associées aux microtubules ont été retrouvées à la fois dans le *pull down* et dans les co-IP.

Tableau II : Partenaires d'interaction potentiels de M-ORF par *pull-down* contre la base de données *Mytilus*

Protéines	Numéro d'accès	Fonctions
ATP synthase subunit beta	Q6PTH6	Métabolisme
Tubulin beta chain	G0YFD6	Microtubules

Cytochrome c oxidase subunit 4	B6CMX3	Métabolisme
Complex III subunit VII	B6CMN2	Métabolisme
Vitelline coat lysin M3	U3Q3D0	Réaction acrosomale
NA/K-ATPase alpha subunit	Q3S334	Autres
Myosin heavy chain	Q25458	Mobilité
Putative phosphodiesterase 1	G0YFD7	Autres

Nous avons également analysé les résultats en comparant avec la base de données de protéines « Bivalvia ». Les résultats sont beaucoup plus nombreux (Annexe III Tableau SI). Une autre catégorie de protéines est ressortie : les protéines chaperonnes. L'une d'entre elles est *Heat shock cognate 71*, ou Hsc70, une protéine qui permet entre-autres le bon repliement d'autres protéines, ainsi que leur translocation et dégradation (Liu et al., 2012).

Pour le *pull-down*, l'ATP synthase est encore apparu comme potentiel partenaire (Annexe III Tableau SII). Il y a eu également un résultat pour une translocase ATP/ADP. Il s'agit d'une protéine membranaire de la mitochondrie qui travaille dans le processus de respiration cellulaire afin d'amener l'ADP pour sa transformation en ATP, puis en envoyant l'ATP vers le cytoplasme (Chevrollier et al., 2011).

### 3.4 Potentiels partenaires d'interaction de F-ORF

Pour F-ORF, nous avons analysé les données de trois co-IP réalisées avec des échantillons de gonades mâles et une co-IP réalisée avec une gonade femelle (voir plus bas). Dans le cas des gonades mâles, aucun partenaire d'interaction n'a été retrouvé dans les trois échantillons avec la base de données *Mytilus*. Chez deux échantillons, le séquençage a identifié une  $\alpha$ -tubuline (Tableau III), un résultat observé antérieurement (Ouimet, 2018). Tout comme M-ORF, F-ORF n'a pas été identifiée dans le cytoplasme chez *Mytilus edulis*.



Tableau III : Partenaires potentiels d'interaction de F-ORF par séquençage de trois échantillons de gonades mâles contre la base de données *Mytilus*

Protéines	Numéro d'accès	Fonctions
Alpha tubulin	G0YGJ3	Microtubules

Un seul échantillon chez les femelles a été séquençé. Plusieurs protéines intéressantes sont ressorties (Tableau IV). La plus présente et la plus intéressante est une protéine de l'enveloppe vitelline de l'œuf. Il est encore plus intéressant de constater que M-ORF est apparue comme un partenaire d'interaction potentiel dans la co-IP utilisant l'anticorps anti-F-ORF chez la gonade femelle.

Tableau IV : Potentiels partenaires d'interaction de F-ORF par séquençage d'un échantillon de gonade femelle contre la base de données *Mytilus*

Protéines	Numéro d'Accès	Fonctions
Vitelline envelope zona pellucida domain 9	G0YEP8	Œuf
ATP synthase subunit beta	Q6PTH6	Métabolisme
M-ORF	-----	Autres
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	A0A076VC67	Métabolisme
Elongation factor 1-alpha	Q9XY84	Lié à l'ADN/ARN
Elongation factor 1-alpha	D9IWS1	Lié à l'ADN/ARN
Elongation factor 1-alpha	D9IWS3	Lié à l'ADN/ARN
Tubulin beta chain	G0YFD6	Microtubules

Dans la base de données Bivalvia, sur les échantillons de gonades mâles, plus de protéines liées au métabolisme cellulaire et de protéines chaperonnes sont ressorties (Annexe III, Tableau SIII). De celles liées au métabolisme, plusieurs participent au cycle de Krebs, dans la mitochondrie.

Cela recoupe la localisation mitochondriale de F-ORF dans les spermatozoïdes et les cellules somatiques du manteau.

Pour l'échantillon femelle, les résultats concernent le métabolisme et les microtubules majoritairement (Annexe III, Tableau SIV). Les protéines associées au métabolisme proviennent de voies métaboliques très variées, mais quelques-unes sont mitochondriales, comme le cycle de Krebs.

Finalement, six protéines sont identiques entre les échantillons F-ORF mâles et femelle dans Bivalvia (Tableau V). Toutes sauf une sont liées au métabolisme. La dernière est liée aux microtubules.

Tableau V : Protéines communes entre les partenaires potentiels de F-ORF dans les échantillons de gonades mâles et femelle contre la base de données Bivalvia

Protéines	Numéro d'accès	Fonctions
Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	A0A6J8D3S7	Métabolisme
ALDH	A0A6J8EZQ9	Métabolisme
Dihydrolipoyl dehydrogenase	A0A6J8C385	Métabolisme
Oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring)	A0A6J8B4X1	Métabolisme
Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	A0A6J8A6D1	Métabolisme
Electromotor neuron-associated protein 2, Microtubule-associated protein futsch	A0A6J8DQP8	Microtubules

## 4. Discussion

### 4.1 Retour sur l'expression de M-ORF et F-ORF

L'existence de la protéine M-ORF chez *M. edulis* a été confirmée par immunobuvardage, et sa présence observée dans les gonades mâles uniquement à un poids moléculaire d'environ 22 kDa (Debelli et al., 2023), ce qui est le double de son poids attendu. Tel que discuté dans l'article (Debelli et al., 2023) ceci pourrait être expliqué par la formation de dimères, ou encore la présence de modifications post-traductionnelles (Zee & Garcia, 2012). En effet, les résultats ne montrent pas de modifications lors de la transcription de l'ADN en ARN (GenBank OQ714227-OQ714235 *versus* OQ714236-OQ714239 (Debelli et al. 2023)). Toutefois, la présence d'une longue série d'adénines tend à perturber le séquençage de l'ORF, en affectant le cadre de lecture. En outre, la présence de M-ORF dans les mitochondries des spermatozoïdes a été observée, ce qui soutient son origine mitochondriale. La microscopie électronique serait cependant d'intérêt afin de déterminer la position exacte de M-ORF, soit dans quel compartiment ou membrane mitochondriale. M-ORF a également été observée dans l'acrosome, un endroit qui peut d'abord paraître plutôt inusité pour une protéine d'origine mitochondriale. Cependant, il a récemment été démontré que des mitochondries condensées (ou des fragments de ces mitochondries) sont transloquées dans la lumière de l'acrosome au cours de la spermatogénèse chez la souris (Ren et al., 2022). Par rapport aux mitochondries 'orthodoxes', ces mitochondries condensées, respirent plus activement, ont une concentration plus élevée d'enzymes respiratoires et de supercomplexes et contiennent plus de protéines impliquées dans l'importation et l'expression des protéines (Ren et al., 2022). Cependant, la présence et les fonctions exactes de ces mitochondries condensées dans l'acrosome sont encore nébuleuses. M-ORF pourrait ainsi avoir une fonction dans la réaction acrosomale, ou encore avec d'autres protéines mitochondriales dans l'acrosome.

Nous avons ici confirmé encore une fois l'expression de la protéine F-ORF dans les gonades des deux sexes. Elle apparaît, comme l'avait observé Ouimet et al. (2020), à 36 kDa, soit le double de son poids moléculaire attendu. Comme pour M-ORF, il pourrait s'agir de dimères ou de modifications post-traductionnelles. Contrairement à M-ORF cependant, une analyse *in silico* de

la séquence d'acides aminés de F-ORF ne prédisait pas de modifications post-traductionnelles au-dessus d'une possibilité de 60% (seulement un site de sumoylation à 59%) (Wang et al., 2020). Il reste possible qu'il y ait des modifications post-traductionnelles *in vivo* qui ne sont pas prédictibles *in silico*.

Il est intéressant de constater qu'à la fois M-ORF et F-ORF chez *Mytilus edulis* apparaissent à environ le double de leur poids moléculaire attendu, ce qui n'est pas le cas de leurs équivalents chez *V. ellipsiformis* (Julie Brémaud, non publié) ou *Ruditapes phillipinarum* pour M-ORF (Milani et al., 2014). Il pourrait donc s'agir d'une particularité de *M. edulis*, ou encore des Mytilidae. Il serait pertinent de regarder si ce phénomène est aussi présent chez des espèces proches de *M. edulis*, comme *M. galloprovincialis* ou *M. trossulus*.

Malgré des conditions hautement dénaturantes pour les dimères, F-ORF (Figure 10) comme M-ORF (Figure 16) n'a pas changé de poids moléculaire. Cela suggère que ces protéines ne sont pas des dimères. Toutefois, il est à noter qu'il existe des dimères non séparables (Kolodziejcki et al., 2003), ce qui pourrait toujours être le cas ici pour les deux protéines.

Nous avons tenté de faire l'inverse, i.e. créer de monomères des deux protéines et leur laisser la possibilité de s'agencer en dimères. Les protéines GST-fusion, toutefois, sont apparues au poids moléculaire attendu pour des monomères (Figure 11). Il est possible que la formation de dimères ait été rendue impossible par la fusion de GST à la protéine, qui pourrait l'empêcher de prendre la configuration nécessaire. Aussi, si des modifications post-traductionnelles sont responsables des poids observés différents de ceux attendus pour les deux protéines, nos résultats suggèrent que ces modifications seraient impossibles dans un organisme bactérien. Par exemple, les procaryotes ne possèdent pas la machinerie pour faire de l'ubiquitination (Spallek et al., 2009).

#### **4.2 Expression tissulaire et temporelle**

Nous avons montré que M-ORF est exprimée uniquement dans les gonades des mâles (Figure 12A). Cela est d'intérêt particulier quant aux fonctions potentielles de la protéine dans le

déterminisme ou la différenciation du sexe, et aussi dans la transmission et rétention des mitochondries paternelles dans les embryons mâles seulement. De par sa présence dans l'acrosome (Debelli et al. 2023), M-ORF pourrait également avoir une fonction dans le processus de fécondation. La protéine pourrait aussi être amenée dans l'œuf de cette façon et être liée au déterminisme sexuel de l'embryon.

Également, M-ORF n'est exprimée que lorsque les gonades sont pleines de spermatozoïdes, aux alentours de mai (Figure 12 B). Ici encore, cela permet de supposer à la protéine une ou des fonctions liées au destin des mitochondries paternelles, ou encore au déterminisme ou différenciation du sexe, dont les mécanismes demeurent peu compris chez les bivalves.

Contrairement à M-ORF, la protéine F-ORF est exprimée dans tous les tissus échantillonnés (Figure 13 A) chez *Mytilus edulis*, ainsi qu'à tous les mois de l'année (Figure 13 B, Observations personnelles). Ceci suggérerait une fonction globale de la protéine, ou encore des fonctions multiples, qui changeraient selon le tissu ou encore le sexe. Par exemple, la protéine d'origine mitochondriale *Humanin* peut avoir des effets différents selon le type cellulaire ou le tissu où elle agit par la présence de multiples types de récepteurs, internes ou externes, pouvant interagir avec elle (Zhu et al., 2022). Elle a dans les neurones un effet neuroprotecteur (Xu et al., 2006, 2010), mais agit également comme régulateur de l'apoptose pour les muscles squelettiques (Kim et al., 2022). L'*Humanin* est aussi impliquée dans de nombreuses maladies, aussi bien cardiaques que neuronales (Hazafa et al., 2021).

Par immunofluorescence, un signal pour F-ORF a été observé en superposition à celui pour les mitochondries dans un œuf (Figure 14 A). Ceci supporte l'origine mitochondriale de la protéine et est la première confirmation de la présence de F-ORF dans les œufs de *Mytilus edulis*. Les cellules observées sont probablement des œufs à un stade intermédiaire de développement, car elles n'ont pas la taille caractéristique d'œufs matures (60 à 65  $\mu\text{m}$ ) (Berg, 1950). Dû à la dispersion des mitochondries dans les œufs observés, il est difficile de confirmer si F-ORF est présente uniquement dans les mitochondries, ou si elle pourrait également être retrouvée dans le cytoplasme de la cellule. Quoiqu'il ne semble pas y avoir d'agrégation particulière au niveau du

noyau, il ne peut être exclu que la protéine soit aussi présente dans le noyau. En effet, chez *Venustaconcha ellipsiformis*, F-ORF a été observée, par microscopie électronique, sur la membrane nucléaire des œufs et dans le cytoplasme et le nucléoplasme également (Breton et al., 2011b).

Dans les cellules somatiques du manteau mâle, il y a encore une fois superposition des signaux mitochondrial et de F-ORF, ce qui supporte l'origine mitochondriale de F-ORF. F-ORF semble donc être exprimée dans les mitochondries, pas uniquement dans les cellules gamétiques, mais aussi dans les cellules somatiques, suggérant encore une fois une fonction qui n'est pas limitée aux gamètes.

Finalement, les signaux mitochondriaux et de F-ORF sont aussi superposés dans une cellule qui semble être un stade de spermatide. Ces données confirment les observations de Ouimet et al. (2020) montrant la présence de F-ORF dans des mitochondries de spermatozoïdes matures. Chez *V. ellipsiformis*, cela avait été également observé (Shepardson et al., 2012). Malgré l'observation d'une présence extracellulaire d'autres protéines mitochondriales, notamment mtatND4 et MOTS-c, qui peuvent être retrouvés dans le plasma sanguin chez l'humain (Kienzle et al., 2022; Lee et al., 2015), le mécanisme permettant le déplacement de protéines mitochondriales vers l'extérieur de la cellule reste pour le moment inconnu. Il est également possible que la protéine F-ORF ait simplement une longue conservation dans les mitochondries. En effet, les cellules au stade débutant la spermatogénèse, soit la spermatogonie, contiennent de l'ADNmt F, qui est par la suite éliminé durant le développement en spermatozoïde (Ghiselli et al., 2019). F-ORF pourrait ainsi avoir été produite avant la spermatogénèse, et avoir été conservée.

Dans le cas de M-ORF et F-ORF, il serait pertinent de considérer la microscopie électronique pour préciser leur emplacement exact dans la cellule, car cela pourrait aider à préciser leurs fonctions. Toutefois, les images obtenues par immunofluorescence supportent une activité mitochondriale pour les deux protéines.

### 4.3 Partenaires d'interaction de M-ORF

Des *vitelline-coat lysin proteins* ont été identifiées comme potentiels partenaires d'interaction de M-ORF (Tableau I et II). Ce résultat est très intéressant car nos essais d'immunofluorescence ont montré la présence de M-ORF dans l'acrosome. Il est donc possible que M-ORF interagisse avec ces lysines relâchées par l'acrosome afin de percer l'enveloppe vitelline de l'œuf, un processus spécifique selon l'espèce. On peut donc supposer que M-ORF serait nécessaire à la fécondation, et assurerait par le fait même la transmission du matériel génétique nucléaire et mitochondrial. Dans ce cas, un spermatozoïde se retrouvant sans M-ORF serait éliminé de la compétition spermatique. Ceci pourrait être une des raisons pour lesquelles le gène *m-orf* est toujours présent, même chez les spermatozoïdes qui contiennent un mitogénome F et M recombiné (Breton et al., 2009b). Ces mitogénomes recombinés que l'on dit « récemment masculinisés » sont en majorité de type F, mais possèdent toujours la région de type M qui contient le gène *m-orf*.

Plusieurs protéines mitochondriales sont aussi retrouvées parmi les autres potentiels partenaires, supportant nos résultats quant à la localisation de M-ORF aux mitochondries. Ces protéines proviennent de trois complexes (les complexes III, IV et V) de la chaîne respiratoire mitochondriale. On pourrait se poser la question à savoir si M-ORF serait une sous-unité d'un supercomplexe réunissant ces trois complexes. Il est connu que la physiologie mitochondriale et le phénotype des spermatozoïdes d'espèces à DUI comme *Mytilus edulis* sont différents de ceux d'espèces de bivalves à transmission maternelle des mitochondries (Bettinazzi et al., 2019; Bettinazzi et al., 2020). Une action du supercomplexe sur la chaîne respiratoire pourrait être une des causes de ces différences, par exemple sur la nage plus lente des spermatozoïdes DUI (Bettinazzi et al., 2020).

L' $\alpha$ -tubulin et la tubuline- $\beta$ , des composants des microtubules, ont également été identifiées. Bien que la protéine M-ORF n'a pas été identifiée dans le cytoplasme chez *Mytilus*, cette interaction potentielle demeure intéressante dans l'optique d'un rôle de M-ORF dans la DUI. En effet, de par l'observation d'une agrégation des mitochondries paternelles dans les embryons mâles, plusieurs hypothèses ont été émises quant à un facteur pouvant expliquer ce déplacement vers la lignée germinale des mitochondries paternelles suite à la fécondation

(Breton et al., 2014; Capt et al., 2020; Tassé et al., 2022; Zouros, 2020). Si M-ORF interagissait avec les microtubules, elle pourrait participer aux déplacements préférentiels des mitochondries paternelles dans l'embryon qui donnent le motif d'agrégation observé chez les mâles.

Un autre partenaire potentiel est la protéine chaperonne Hsc70 (Annexe III Tableau SI). HSC70 est retrouvée en grande quantité dans l'embryon (Dwornczak & Mirault, 1987; Palter et al., 1986). Une liaison avec M-ORF pourrait l'empêcher de faire son rôle de dégradation, par exemple dans le contexte d'un embryon destiné à être mâle, où les mitochondries paternelles sont conservées.

Finalement, une translocase de l'ATP/ADP a été identifiée (Annexe III Tableau SII). Si M-ORF interagissait avec cette translocase, elle pourrait, encore une fois, avoir un effet sur la physiologie mitochondriale.

Dû au nombre limité d'échantillons, les résultats sont encore préliminaires, et d'autres essais doivent être effectués afin de les confirmer. Toutefois, de différentes façons, une interaction de M-ORF avec les protéines identifiées ici pourrait contribuer au maintien de la DUI.

#### **4.4 Partenaires d'interaction de F-ORF**

Chez les gonades mâles, une seule protéine a été identifiée comme partenaire potentiel de F-ORF. Il s'agit de l' $\alpha$ -tubulin (Tableau III). Une interaction de F-ORF avec la tubuline pourrait contribuer au positionnement des mitochondries paternelles dans l'embryon, et donc participer au maintien de la DUI. Mitchell et al. (2016) suggérait que F-ORF pourrait avoir un rôle dans le transport cellulaire, ce qui se recoupe avec l'apparition de protéines liées aux microtubules dans nos résultats. Les auteurs cependant considéraient les F-ORF des Unionidae, qui divergent grandement en séquence de ceux de Mytilidae. Il est ainsi plus complexe de spéculer sur la fonction potentielle de F-ORF puisqu'on retrouve la protéine dans tous les tissus chez les deux sexes. Plusieurs autres expériences seront nécessaires afin de valider ces résultats.

Dans les gonades femelles, une interaction pourrait être présente entre F-ORF et des protéines de l'enveloppe vitelline de l'œuf (Tableau IV). F-ORF pourrait ainsi avoir un rôle dans la



fécondation par une interaction avec des protéines acrosomales du spermatozoïde, dont M-ORF qui interagit elle-même avec les *vitelline-coat lysin protein* (voir ci-haut).

Également, M-ORF a été identifiée comme potentiel partenaire de F-ORF. L'apparition de M-ORF est inattendue, car cette protéine devrait être limitée aux gonades mâles. Cela peut toutefois s'expliquer par la possibilité d'une contamination par les spermatozoïdes, particulièrement lorsque femelles et mâles partagent un espace clos avant dissection des tissus, ou encore par une contamination croisée par le matériel de dissection. Également, le processus de fécondation aurait pu être en cours dans certains œufs, ce qui pourrait expliquer la présence de M-ORF, quoique la fécondation est généralement externe chez *M. edulis* (Kautsky, 1982). Il faudra donc tenter de démontrer expérimentalement cette interaction potentielle entre F-ORF et M-ORF.

En cherchant dans la base de données Bivalvia, des partenaires potentiels de F-ORF ont été identifiés pour les gonades mâles (Annexe III, Tableau SIII). Plusieurs étaient des protéines participant à la respiration cellulaire, dans la mitochondrie. Bien que ces protéines soient dans les mitochondries tout comme F-ORF, il est difficile de spéculer comment ces interactions pourraient jouer sur le mécanisme de la respiration cellulaire.

D'autres partenaires identifiés étaient les protéines chaperonnes. Une interaction avec F-ORF pourrait leur permettre ensemble d'influencer la fonctionnalité d'autres protéines. Certaines pourraient être bien repliées, d'autres dégradées. Ceci pourrait permettre à F-ORF de jouer un rôle féminisant en permettant la bonne production de certains autres facteurs importants pour le sexe.

Comme dans les gonades mâles, des protéines du cycle de Krebs ont été identifiées dans l'échantillon de gonade femelle (Annexe III, Tableau SIV). Toutefois, il est encore ici difficile de dire où dans ce mécanisme F-ORF pourrait intervenir.

Finalement, quelques protéines ont été identifiées en commun chez les gonades mâles et femelles (Tableau V). Une fonction commune de F-ORF entre les deux est ainsi envisageable, particulièrement dans les tissus somatiques. Il s'agit ici d'immunoprécipitations réalisées sur des tissus gamétiques. Afin de préciser le rôle de F-ORF dans la cellule et de confirmer ces résultats,

il est impératif de faire des co-immunoprécipitations supplémentaires, particulièrement chez les femelles et idéalement aussi dans les tissus somatiques.

## Conclusion

Nous avons réussi à démontrer la fonctionnalité du gène mitochondrial m-orf qui produit la protéine M-ORF. Nous avons montré la localisation cellulaire de M-ORF dans les cellules gamétiques mâles. La protéine est présente non seulement dans les mitochondries, mais également dans l'acrosome des spermatozoïdes. Selon nos résultats, M-ORF n'est produite que lors du pic de la reproduction, uniquement dans les gonades mâles. Ceci indique une fonction spécifique aux mâles et suggère un rôle dans le déterminisme sexuel, la différenciation du sexe, la reproduction, ou le maintien de la DUI. Nos résultats ont également confirmé la production de F-ORF chez les deux sexes, comme cela avait déjà été démontré, mais ont aussi montré la présence de F-ORF dans les tissus somatiques chez *Mytilus edulis*. L'omniprésence de F-ORF dans tous les tissus ne permet pas de préciser un rôle particulier pour cette protéine dans la DUI ou le déterminisme sexuel, mais pointe plutôt vers un rôle à l'échelle de l'organisme. La présence de F-ORF a été observée dans les mitochondries des œufs et des cellules somatiques. De par les limitations de la méthode, il était impossible de préciser si F-ORF et M-ORF étaient par exemple à la surface de la membrane externe mitochondriale ou à l'intérieur des mitochondries. Une meilleure microscopie, par exemple électronique, serait à utiliser afin de préciser la localisation subcellulaire des protéines.

Les résultats ne sont pas concluants quant aux partenaires potentiels de F-ORF. Plusieurs options, avec des fonctions très variables, se sont révélées. L'utilisation des pull-down n'a pas fonctionné et les co-IP ont donc dû être privilégiées. Pour M-ORF, les *vitelline coat lysin protein* sont ressorties à la fois des *pull-down* et co-IP. De par le nombre limité d'échantillons pour ces résultats, d'autres essais seront nécessaires afin de préciser les fonctions des protéines M-ORF et F-ORF.

Une comparaison des résultats spatio-temporels et des partenaires d'interaction de F-ORF et M-ORF avec leurs équivalents chez d'autres espèces permettra de préciser les fonctions de ces protéines chez les espèces à DUI ainsi que d'éclairer la raison du maintien de ce système de transmission mitochondriale unique chez les espèces animales.

## Références bibliographiques

- Anderson, S., Bankier, A. T., Barrell, B. G., de Bruijn, M. H. L., Coulson, A. R., Drouin, J., Eperon, I. C., Nierlich, D. P., Roe, B. A., Sanger, F., Schreier, P. H., Smith, A. J. H., Staden, R., & Young, I. G. (1981). Sequence and organization of the human mitochondrial genome. *Nature*, *290*(5806), 457-465. <https://doi.org/10.1038/290457a0>
- Andersson, S. G. E., Zomorodipour, A., Andersson, J. O., Sicheritz-Pontén, T., Alsmark, U. C. M., Podowski, R. M., Näslund, A. K., Eriksson, A.-S., Winkler, H. H., & Kurland, C. G. (1998). The genome sequence of *Rickettsia prowazekii* and the origin of mitochondria. *Nature*, *396*(6707), 133-140. <https://doi.org/10.1038/24094>
- Berg, W. E. (1950). LYTIC EFFECTS OF SPERM EXTRACTS ON THE EGGS OF MYTILUS EDULIS. *The Biological Bulletin*, *98*(2), 128-138. <https://doi.org/10.2307/1538574>
- Bettinazzi, S., Nadarajah, S., Dalpé, A., Milani, L., Blier, P. U., & Breton, S. (2020). Linking paternally inherited mtDNA variants and sperm performance. *Philosophical Transactions of the Royal Society B: Biological Sciences*, *375*(1790), 20190177. <https://doi.org/10.1098/rstb.2019.0177>
- Birky, C. W. (2001). The Inheritance of Genes in Mitochondria and Chloroplasts: Laws, Mechanisms, and Models. *Annual Review of Genetics*, *35*(1), 125-148. <https://doi.org/10.1146/annurev.genet.35.102401.090231>
- Boore, J. L. (1999). Animal mitochondrial genomes. *Nucleic Acids Research*, *27*(8), 1767-1780. <https://doi.org/10.1093/nar/27.8.1767>

- Boore, J. L., Medina, M., & Rosenberg, L. A. (2004). Complete Sequences of the Highly Rearranged Molluscan Mitochondrial Genomes of the Scaphopod *Graptacme eborea* and the Bivalve *Mytilus edulis*. *Molecular Biology and Evolution*, 21(8), 1492-1503. <https://doi.org/10.1093/molbev/msh090>
- Bouaouina, M., Goult, B. T., Huet-Calderwood, C., Bate, N., Brahme, N. N., Barsukov, I. L., Critchley, D. R., & Calderwood, D. A. (2012). A Conserved Lipid-binding Loop in the Kindlin FERM F1 Domain Is Required for Kindlin-mediated  $\alpha\text{IIb}\beta\text{3}$  Integrin Coactivation. *Journal of Biological Chemistry*, 287(10), 6979-6990. <https://doi.org/10.1074/jbc.M111.330845>
- Breton, S., Burger, G., Stewart, D. T., & Blier, P. U. (2006). Comparative Analysis of Gender-Associated Complete Mitochondrial Genomes in Marine Mussels ( *Mytilus* spp.). *Genetics*, 172(2), 1107-1119. <https://doi.org/10.1534/genetics.105.047159>
- Breton, S., Doucet-Beaupré, H., Stewart, D. T., Piontkivska, H., Karmakar, M., Bogan, A. E., Blier, P. U., & Hoeh, W. R. (2009a). 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(4), 1575-1589. <https://doi.org/10.1534/genetics.109.110700>
- Breton, S., Ghiselli, F., Passamonti, M., Milani, L., Stewart, D. T., & Hoeh, W. R. (2011a). Evidence for a Fourteenth mtDNA-Encoded Protein in the Female-Transmitted mtDNA of Marine Mussels (Bivalvia : Mytilidae). *PLoS ONE*, 6(4), e19365. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0019365>
- Breton, S., Milani, L., Ghiselli, F., Guerra, D., Stewart, D. T., & Passamonti, M. (2014). A resourceful genome : Updating the functional repertoire and evolutionary role of animal

- mitochondrial DNAs. *Trends in Genetics*, 30(12), 555-564.  
<https://doi.org/10.1016/j.tig.2014.09.002>
- Breton, S., Stewart, D. T., & Blier, P. U. (2009b). Role-reversal of gender-associated mitochondrial DNA affects mitochondrial function in *Mytilus edulis* (Bivalvia : Mytilidae). *Journal of Experimental Zoology Part B: Molecular and Developmental Evolution*, 312B(2), 108-117.  
<https://doi.org/10.1002/jez.b.20251>
- Breton, S., Stewart, D. T., Brémaud, J., Havird, J. C., Smith, C. H., & Hoeh, W. R. (2022). Did doubly uniparental inheritance (DUI) of mtDNA originate as a cytoplasmic male sterility (CMS) system? *BioEssays*, 44(4), 2100283. <https://doi.org/10.1002/bies.202100283>
- Breton, S., Stewart, D. T., & Hoeh, W. R. (2010). Characterization of a mitochondrial ORF from the gender-associated mtDNAs of *Mytilus* spp. (Bivalvia : Mytilidae): Identification of the “missing” ATPase 8 gene. *Marine Genomics*, 3(1), 11-18.  
<https://doi.org/10.1016/j.margen.2010.01.001>
- Breton, S., Stewart, D. T., Shepardson, S., Trdan, R. J., Bogan, A. E., Chapman, E. G., Ruminas, A. J., Piontkivska, H., & Hoeh, W. R. (2011b). Novel Protein Genes in Animal mtDNA : A New Sex Determination System in Freshwater Mussels (Bivalvia: Unionoida)? *Molecular Biology and Evolution*, 28(5), 1645-1659. <https://doi.org/10.1093/molbev/msq345>
- Burger, G., Gray, M. W., & Franz Lang, B. (2003). Mitochondrial genomes : Anything goes. *Trends in Genetics*, 19(12), 709-716. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2003.10.012>
- Burzynski, A. (2003). Evidence for Recombination of mtDNA in the Marine Mussel *Mytilus trossulus* from the Baltic. *Molecular Biology and Evolution*, 20(3), 388-392.  
<https://doi.org/10.1093/molbev/msg058>

- Cao, L., Kenchington, E., & Zouros, E. (2004a). Differential Segregation Patterns of Sperm Mitochondria in Embryos of the Blue Mussel ( *Mytilus edulis* ). *Genetics*, *166*(2), 883-894. <https://doi.org/10.1534/genetics.166.2.883>
- Cao, L., Kenchington, E., Zouros, E., & Rodakis, G. C. (2004b). Evidence That the Large Noncoding Sequence Is the Main Control Region of Maternally and Paternally Transmitted Mitochondrial Genomes of the Marine Mussel (*Mytilus* spp.). *Genetics*, *167*(2), 835-850. <https://doi.org/10.1534/genetics.103.026187>
- Capt, C., Bouvet, K., Guerra, D., Robicheau, B. M., Stewart, D. T., Pante, E., & Breton, S. (2020). Unorthodox features in two venerid bivalves with doubly uniparental inheritance of mitochondria. *Scientific Reports*, *10*(1), 1-13. <https://doi.org/10.1038/s41598-020-57975-y>
- Chacón, G. M., Arias-Pérez, A., Freire, R., Martínez, L., Nóvoa, S., Naveira, H., & Insua, A. (2020). Evidence of doubly uniparental inheritance of the mitochondrial DNA in *Polititapes rhomboides* (Bivalvia, Veneridae) : Evolutionary and population genetic analysis of F and M mitotypes. *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, *58*(2), 541-560. <https://doi.org/10.1111/jzs.12267>
- Chakrabarti, R., Walker, J. M., Chapman, E. G., Shepardson, S. P., Trdan, R. J., Curole, J. P., Watters, G. T., Stewart, D. T., Vijayaraghavan, S., & Hoeh, W. R. (2007). Reproductive function for a C-terminus extended, male-transmitted cytochrome c oxidase subunit II protein expressed in both spermatozoa and eggs. *FEBS Letters*, *581*(27), 5213-5219. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2007.10.006>

- Chase, C. D. (2007). Cytoplasmic male sterility : A window to the world of plant mitochondrial–nuclear interactions. *Trends in Genetics*, 23(2), 81-90. <https://doi.org/10.1016/j.tig.2006.12.004>
- Chevrollier, A., Loiseau, D., Reynier, P., & Stepien, G. (2011). Adenine nucleotide translocase 2 is a key mitochondrial protein in cancer metabolism. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Bioenergetics*, 1807(6), 562-567. <https://doi.org/10.1016/j.bbabi.2010.10.008>
- Curole, J. P., & Kocher, T. D. (2005). Evolution of a Unique Mitotype-Specific Protein-Coding Extension of the Cytochrome c Oxidase II Gene in Freshwater Mussels (Bivalvia : Unionoida). *Journal of Molecular Evolution*, 61(3), 381-389. <https://doi.org/10.1007/s00239-004-0192-7>
- Dan, J. C. (1962). The vitelline coat of the Mytilus egg. I. Normal structure and effect of acrosomal lysin. *The Biological Bulletin*, 123(3). <https://doi.org/10.2307/1539574>
- Debelli, A., Kienzle, L., Khorami, H. H., Angers, A., & Breton, S. (2023). Validation of the male-specific ORF of the paternally-transmitted mtDNA in *Mytilus edulis* as a protein-coding gene. *Gene*, 879, 147586. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2023.147586>
- Doucet-Beaupré, H., Breton, S., Chapman, E. G., Blier, P. U., Bogan, A. E., Stewart, D. T., & Hoeh, W. R. (2010). Mitochondrial phylogenomics of the Bivalvia (Mollusca) : Searching for the origin and mitogenomic correlates of doubly uniparental inheritance of mtDNA. *BMC Evolutionary Biology*, 10(1), 50. <https://doi.org/10.1186/1471-2148-10-50>
- Dwornczak, B., & Mirault, M.-E. (1987). Structure and expression of a human gene coding for a 71 kd heat shock 'cognate' protein. *Nucleic Acids Research*, 15(13), 5181-5197. <https://doi.org/10.1093/nar/15.13.5181>



- Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S., Wilkins, M. R., Appel, R. D., & Bairoch, A. (2005). Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In J. M. Walker (Éd.), *The Proteomics Protocols Handbook* (p. 571-607). Humana Press. <https://doi.org/10.1385/1-59259-890-0:571>
- Ghiselli, F., Maurizii, M. G., Reunov, A., Ariño-Bassols, H., Cifaldi, C., Pecci, A., Alexandrova, Y., Bettini, S., Passamonti, M., Franceschini, V., & Milani, L. (2019). Natural Heteroplasmy and Mitochondrial Inheritance in Bivalve Molluscs. *Integrative and Comparative Biology*, *59*(4), 1016-1032. <https://doi.org/10.1093/icb/icz061>
- Gissi, C., Iannelli, F., & Pesole, G. (2008). Evolution of the mitochondrial genome of Metazoa as exemplified by comparison of congeneric species. *Heredity*, *101*(4), 301-320. <https://doi.org/10.1038/hdy.2008.62>
- Grigorian, A. L., Bustamante, J. J., Hernandez, P., Martinez, A. O., & Haro, L. S. (2005). Extraordinarily stable disulfide-linked homodimer of human growth hormone. *Protein Science*, *14*(4), 902-913. <https://doi.org/10.1110/ps.041048805>
- Guan, Y., Zhu, Q., Huang, D., Zhao, S., Jan Lo, L., & Peng, J. (2015). An equation to estimate the difference between theoretically predicted and SDS PAGE-displayed molecular weights for an acidic peptide. *Scientific Reports*, *5*(1), 13370. <https://doi.org/10.1038/srep13370>
- Guerra, D., Lopes-Lima, M., Froufe, E., Gan, H. M., Ondina, P., Amaro, R., Klunzinger, M. W., Callil, C., Prié, V., Bogan, A. E., Stewart, D. T., & Breton, S. (2019). Variability of mitochondrial ORFans hints at possible differences in the system of doubly uniparental inheritance of mitochondria among families of freshwater mussels (Bivalvia: Unionida). *BMC Evolutionary Biology*, *19*(1), 229. <https://doi.org/10.1186/s12862-019-1554-5>

- Guerra, D., Plazzi, F., Stewart, D. T., Bogan, A. E., Hoeh, W. R., & Breton, S. (2017). Evolution of sex-dependent mtDNA transmission in freshwater mussels (Bivalvia : Unionida). *Scientific Reports*, 7(1), 1551. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-01708-1>
- Gusman, A., Lecomte, S., Stewart, D. T., Passamonti, M., & Breton, S. (2016). Pursuing the quest for better understanding the taxonomic distribution of the system of doubly uniparental inheritance of mtDNA. *PeerJ*, 4, e2760. <https://doi.org/10.7717/peerj.2760>
- Gyllensten, U., Wharton, D., Josefsson, A., & Wilson, A. C. (1991). Paternal inheritance of mitochondrial DNA in mice. *Nature*. <https://doi.org/10.1038/352255a0>
- Hatefi, Y. (1985). THE MITOCHONDRIAL ELECTRON TRANSPORT AND OXIDATIVE PHOSPHORYLATION SYSTEM. *Annual Review of Biochemistry*, 54(1), 1015-1069. <https://doi.org/10.1146/annurev.bi.54.070185.005055>
- Hazafa, A., Batool, A., Ahmad, S., Amjad, M., Chaudhry, S. N., Asad, J., Ghuman, H. F., Khan, H. M., Naeem, M., & Ghani, U. (2021). Humanin : A mitochondrial-derived peptide in the treatment of apoptosis-related diseases. *Life Sciences*, 264, 118679. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2020.118679>
- Heydari, M., Miclotte, G., Van de Peer, Y., & Fostier, J. (2019). Illumina error correction near highly repetitive DNA regions improves de novo genome assembly. *BMC Bioinformatics*, 20(1), 298. <https://doi.org/10.1186/s12859-019-2906-2>
- Hoeh, W., Blakley, K., & Brown, W. (1991). Heteroplasmy suggests limited biparental inheritance of Mytilus mitochondrial DNA. *Science*, 251(5000), 1488-1490. <https://doi.org/10.1126/science.1672472>

- Hoeh, W. R., Stewart, D. T., Saavedra, C., Sutherland, B. W., & Zouros, E. (1997). Phylogenetic evidence for role-reversals of gender-associated mitochondrial DNA in *Mytilus* (Bivalvia : Mytilidae). *Molecular Biology and Evolution*, *14*(9), 959-967.  
<https://doi.org/10.1093/oxfordjournals.molbev.a025839>
- Hoffmann, R. J., Boore, J. L., & Brown, W. M. (1992). A novel mitochondrial genome organization for the blue mussel, *Mytilus edulis*. *Genetics*, *131*(2), 397-412.  
<https://doi.org/10.1093/genetics/131.2.397>
- Hutchison, C. A., Newbold, J. E., Potter, S. S., & Edgell, M. H. (1974). Maternal inheritance of mammalian mitochondrial DNA. *Nature*, *251*(5475), 536-538.  
<https://doi.org/10.1038/251536a0>
- Kautsky, N. (1982). Quantitative studies on gonad cycle, fecundity, reproductive output and recruitment in a baltic *Mytilus edulis* population. *Marine Biology*, *68*(2), 143-160.  
<https://doi.org/10.1007/BF00397601>
- Kienzle, L., Bettinazzi, S., Brunet, M., Choquette, T., Khorami, H. H., Roucou, X., Landry, C. R., Angers, A., & Breton, S. (2022). *MTALTND4, a second protein coded by nd4 impacts mitochondrial bioenergetics* [Preprint]. *Molecular Biology*.  
<https://doi.org/10.1101/2022.04.28.489924>
- Kim, S.-J., Devgan, A., Miller, B., Lee, S. M., Kumagai, H., Wilson, K. A., Wassef, G., Wong, R., Mehta, H. H., Cohen, P., & Yen, K. (2022). Humanin-induced autophagy plays important roles in skeletal muscle function and lifespan extension. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects*, *1866*(1), 130017.  
<https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2021.130017>

- Kolodziejki, P. J., Rashid, M. B., & Eissa, N. T. (2003). Intracellular formation of « undisruptable » dimers of inducible nitric oxide synthase. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 100(24), 14263-14268.  
<https://doi.org/10.1073/pnas.2435290100>
- Lee, C., Zeng, J., Drew, B. G., Sallam, T., Martin-Montalvo, A., Wan, J., Kim, S.-J., Mehta, H., Hevener, A. L., de Cabo, R., & Cohen, P. (2015). The Mitochondrial-Derived Peptide MOTSc Promotes Metabolic Homeostasis and Reduces Obesity and Insulin Resistance. *Cell Metabolism*, 21(3), 443-454. <https://doi.org/10.1016/j.cmet.2015.02.009>
- Liu, T., Daniels, C. K., & Cao, S. (2012). Comprehensive review on the HSC70 functions, interactions with related molecules and involvement in clinical diseases and therapeutic potential. *Pharmacology & Therapeutics*, 136(3).  
<https://doi.org/10.1016/j.pharmthera.2012.08.014>
- Longo, F. J., & Dornfeld, E. J. (1967). The fine structure of spermatid differentiation in the mussel, *Mytilus edulis*. *Journal of Ultrastructure Research*, 20(5-6), 462-480.  
[https://doi.org/10.1016/S0022-5320\(67\)80113-8](https://doi.org/10.1016/S0022-5320(67)80113-8)
- Manna, S. (2015). An overview of pentatricopeptide repeat proteins and their applications. *Biochimie*, 113, 93-99. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2015.04.004>
- Martijn, J., Vosseberg, J., Guy, L., Offre, P., & Ettema, T. J. G. (2018). Deep mitochondrial origin outside the sampled alphaproteobacteria. *Nature*, 557(7703), 101-105.  
<https://doi.org/10.1038/s41586-018-0059-5>
- 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 Biology and Evolution*, 5(7), 1408-1434.  
<https://doi.org/10.1093/gbe/evt101>
- Milani, L., Ghiselli, F., Maurizii, M. G., Nuzhdin, S. V., & Passamonti, M. (2014). Paternally Transmitted Mitochondria Express a New Gene of Potential Viral Origin. *Genome Biology and Evolution*, 6(2), 391-405. <https://doi.org/10.1093/gbe/evu021>
- Milani, L., Ghiselli, F., & Passamonti, M. (2016). Mitochondrial selfish elements and the evolution of biological novelties. *Current Zoology*, 62(6), 687-697.  
<https://doi.org/10.1093/cz/zow044>
- Minoiu, I., Burzyński, A., & Breton, S. (2016). Analysis of the coding potential of the ORF in the control region of the female-transmitted *Mytilus* mtDNA. *Gene*, 576(1), 586-588.  
<https://doi.org/10.1016/j.gene.2015.09.065>
- 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(1), 597. <https://doi.org/10.1186/s12864-016-2986-6>
- Osabe, K., Kawanabe, T., Sasaki, T., Ishikawa, R., Okazaki, K., Dennis, E. S., Kazama, T., & Fujimoto, R. (2012). Multiple Mechanisms and Challenges for the Application of Allopolyploidy in Plants. *International Journal of Molecular Sciences*, 13(7), 8696-8721.  
<https://doi.org/10.3390/ijms13078696>
- Ouimet, P. (2018). *Caractérisation fonctionnelle de nouveaux gènes mitochondriaux chez les espèces à DUI : étude du gène f-orf chez la moule marine Mytilus edulis* [Mémoire, Université de Montréal]. <http://hdl.handle.net/1866/22250>

- Ouimet, P., Kienzle, L., Lubosny, M., Burzyński, A., Angers, A., & Breton, S. (2020). The ORF in the control region of the female-transmitted *Mytilus* mtDNA codes for a protein. *Gene*, 725. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2019.144161>
- Palter, K. B., Watanabe, M., Stinson, L., Mahowald, A. P., & Craig, E. A. (1986). Expression and localization of *Drosophila melanogaster* hsp70 cognate proteins. *Molecular and Cellular Biology*, 6(4), 1187-1203. <https://doi.org/10.1128/MCB.6.4.1187>
- Rand, D. M., Haney, R. A., & Fry, A. J. (2004). Cytonuclear coevolution : The genomics of cooperation. *Trends in Ecology & Evolution*, 19(12), 645-653. <https://doi.org/10.1016/j.tree.2004.10.003>
- Rath, A., Glibowicka, M., Nadeau, V. G., Chen, G., & Deber, C. M. (2009). Detergent binding explains anomalous SDS-PAGE migration of membrane proteins. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 106(6), 1760-1765. <https://doi.org/10.1073/pnas.0813167106>
- Ren, M., Xu, Y., Erdjument-Bromage, H., Donelian, A., Phoon, C. K. L., Terada, N., Strathdee, D., Neubert, T. A., & Schlame, M. (2019). Extramitochondrial cardiolipin suggests a novel function of mitochondria in spermatogenesis. *Journal of Cell Biology*, 218(5), 1491-1502. <https://doi.org/10.1083/jcb.201808131>
- Sacristán-Horcajada, E., González-de la Fuente, S., Peiró-Pastor, R., Carrasco-Ramiro, F., Amils, R., Requena, J. M., Berenguer, J., & Aguado, B. (2021). ARAMIS : From systematic errors of NGS long reads to accurate assemblies. *Briefings in Bioinformatics*, 22(6), bbab170. <https://doi.org/10.1093/bib/bbab170>

- Sato, M., & Sato, K. (2013). Maternal inheritance of mitochondrial DNA by diverse mechanisms to eliminate paternal mitochondrial DNA. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research*, 1833(8), 1979-1984. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2013.03.010>
- Schapira, A. H. (2006). Mitochondrial disease. *The Lancet*, 368(9529), 70-82. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(06\)68970-8](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(06)68970-8)
- Shepardson, S. P., Heard, W. H., Breton, S., & Hoeh, W. R. (2012). Light and Transmission Electron Microscopy of Two Spermatogenic Pathways and Unimorphic Spermatozoa in *Venustaconcha ellipsiformis* (Conrad, 1836) (Bivalvia : Unionoida). *Malacologia*, 55(2), 263-284. <https://doi.org/10.4002/040.055.0207>
- Śmietanka, B., & Burzyński, A. (2017). Disruption of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA associated with hybridization area of European *Mytilus edulis* and *Mytilus trossulus* in Norway. *Marine Biology*, 164(11), 209. <https://doi.org/10.1007/s00227-017-3235-5>
- Spallek, T., Robatzek, S., & Göhre, V. (2009). How microbes utilize host ubiquitination. *Cellular Microbiology*, 11(10), 1425-1434. <https://doi.org/10.1111/j.1462-5822.2009.01346.x>
- Sutherland, B., Stewart, D., Kenchington, E. R., & Zouros, E. (1998). The fate of paternal mitochondrial DNA in developing female mussels, *Mytilus edulis* : Implications for the mechanism of doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA. *Genetics*, 148(1), 341-347. <https://doi.org/10.1093/genetics/148.1.341>
- Tassé, M., Choquette, T., Angers, A., Stewart, D. T., Pante, E., & Breton, S. (2022). The longest mitochondrial protein in metazoans is encoded by the male-transmitted mitogenome of

- the bivalve *Scrobicularia plana*. *Biology Letters*, 18(6), 20220122.  
<https://doi.org/10.1098/rsbl.2022.0122>
- Vercellino, I., & Sazanov, L. A. (2022). The assembly, regulation and function of the mitochondrial respiratory chain. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*, 23(2), 141-161.  
<https://doi.org/10.1038/s41580-021-00415-0>
- Wang, D., Liu, D., Yuchi, J., He, F., Jiang, Y., Cai, S., Li, J., & Xu, D. (2020). MusiteDeep : A deep-learning based webserver for protein post-translational modification site prediction and visualization. *Nucleic Acids Research*, 48(W1), W140-W146.  
<https://doi.org/10.1093/nar/gkaa275>
- Xu, X., Chua, C. C., Gao, J., Hamdy, R. C., & Chua, B. H. L. (2006). Humanin Is a Novel Neuroprotective Agent Against Stroke. *Stroke*, 37(10), 2613-2619.  
<https://doi.org/10.1161/01.STR.0000242772.94277.1f>
- Xu, X., Chua, K.-W., Chua, C. C., Liu, C.-F., Hamdy, R. C., & Chua, B. H. L. (2010). Synergistic protective effects of humanin and necrostatin-1 on hypoxia and ischemia/reperfusion injury. *Brain Research*, 1355, 189-194. <https://doi.org/10.1016/j.brainres.2010.07.080>
- Yokota, N., & Sawada, H. (2007). Sperm proteasomes are responsible for the acrosome reaction and sperm penetration of the vitelline envelope during fertilization of the sea urchin *Pseudocentrotus depressus*. *Developmental Biology*, 308(1), 222-231.  
<https://doi.org/10.1016/j.ydbio.2007.05.025>
- Yu, F., Zhang, Y., Cheng, C., Wang, W., Zhou, Z., Rang, W., Yu, H., Wei, Y., Wu, Q., & Zhang, Y. (2020). Poly(A)-seq : A method for direct sequencing and analysis of the transcriptomic poly(A)-tails. *PLOS ONE*, 15(6), e0234696. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0234696>



- Zbawicka, M., Burzyński, A., & Wenne, R. (2007). Complete sequences of mitochondrial genomes from the Baltic mussel *Mytilus trossulus*. *Gene*, *406*(1-2), 191-198. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2007.10.003>
- Zee, B. M., & Garcia, B. A. (2012). Discovery of lysine post-translational modifications through mass spectrometric detection. *Essays in Biochemistry*, *52*, 147-163. <https://doi.org/10.1042/bse0520147>
- Zhang, Z.-W., Cheng, J., Xu, F., Chen, Y.-E., Du, J.-B., Yuan, M., Zhu, F., Xu, X.-C., & Yuan, S. (2011). Red blood cell extrudes nucleus and mitochondria against oxidative stress. *IUBMB Life*, *63*(7), 560-565. <https://doi.org/10.1002/iub.490>
- Zhu, S., Hu, X., Bennett, S., Xu, J., & Mai, Y. (2022). The Molecular Structure and Role of Humanin in Neural and Skeletal Diseases, and in Tissue Regeneration. *Frontiers in Cell and Developmental Biology*, *10*, 823354. <https://doi.org/10.3389/fcell.2022.823354>
- Zouros, E. (2013). Biparental Inheritance Through Uniparental Transmission : The Doubly Uniparental Inheritance (DUI) of Mitochondrial DNA. *Evolutionary Biology*, *40*(1), 1-31. <https://doi.org/10.1007/s11692-012-9195-2>
- Zouros, E. (2020). Doubly uniparental inheritance of mitochondrial DNA : Might it be simpler than we thought? *Journal of Zoological Systematics and Evolutionary Research*, *58*(2), 624-631. <https://doi.org/10.1111/jzs.12364>
- Zouros, E., Ball, A. O., Saavedra, C., & Freeman, K. R. (1994). Mitochondrial DNA inheritance. *Nature*, *368*(6474), 818-818. <https://doi.org/10.1038/368818a0>

Zouros, E., Oberhauser Ball, A., Saavedra, C., & Freeman, K. R. (1994). An unusual type of mitochondrial DNA inheritance in the blue mussel *Mytilus*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*, 91(16), 7463-7467.

## Annexes

### Annexe I

Matériel supplémentaire de Debelli et al. 2023

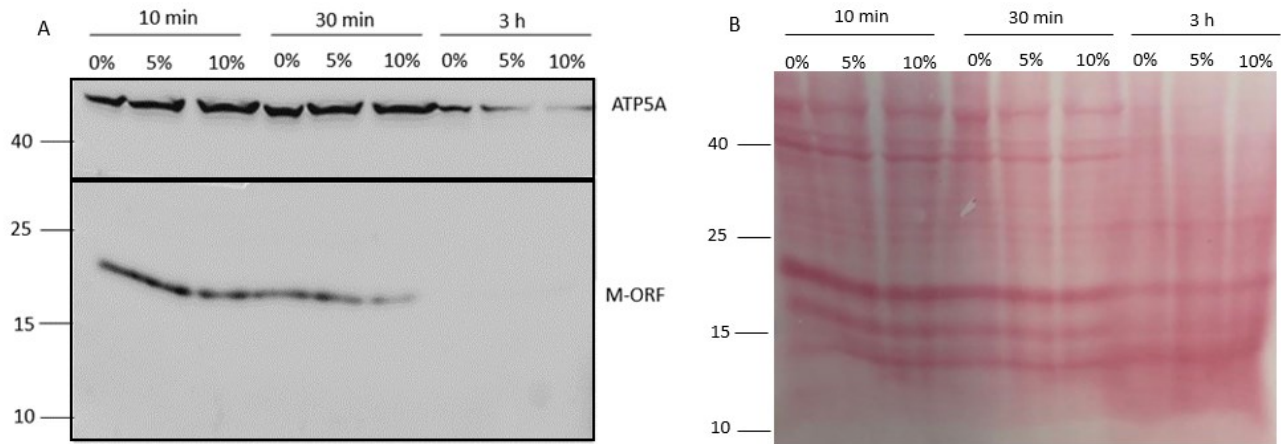
Les séquences ont été alignées avec MUSCLE (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/muscle/>) avec les paramètres par défaut.

#### SUPPLEMENTARY MATERIAL

```
OQ714232.1  SGLFKQQTNSSGESRKSFKNSNKATQKMWCVACVYKYTQ----KXXXXXXXXXXHKCLKMSC
OQ714233.1  SGLFKQQTNSSGEGCKSFKNSNKATQKMWCVACVYKYTQ----KXXXXXXXXXXHKCLKMSC
OQ714228.1  SGLFKQQTNSSGESCKSFKNSNKATQKMWCVACVYKYTQKXXXXXXXXXXHKCLKMSC
OQ714229.1  -----GESCKSFKNSNKATQKMWCVACVYKYTQ----KXXXXXXXXXXHKCLKMSC
OQ714234.1  -----GESCKSFKNSNKATQKMWCVACVYKYTQ----KXXXXXXXXXXHKCLKMSC
OQ714227.1  SGLFKQQTNSSGESCKSFKNSNKATQKMWCVACVYKYTQ-KXXXXXXXXXXHKCLKMSC
OQ714230.1  SGLFKQQTNSSGESCKSFKNSNKATQKMWCVACVYKYTQ----KXXXXXXXXXXHKCLKMSC
OQ714231.1  SGLFKQQTNSSGESCKSFKNSNKATQKMWCVACVYKYTQ----KXXXXXXXXXXHKCLKMSC
OQ714235.1  SGLFKQQTNSSGESCKSFKNSNKATQKMWCVACVYKYTQ----KXXXXXXXXXXHKCLKMSC
                ** . *****

OQ714232.1  FYTLNFPATACNSGSRLCPPVFLYVKVYCWHRMRELLY
OQ714233.1  FYTLNFPATACNSSSRLCPPVFLYVKVYCWHRMRELLY
OQ714228.1  FYTLKFPAIACNSSSRLCPPVFLYVKVYCWHRMRELLY
OQ714229.1  FYTLNFPATACKSSSRLCPPVFLYVKVYCWHRMRELLY
OQ714234.1  FYTLNFPATACNSSSRLCPPVFLYVKVCCWHRMRELLY
OQ714227.1  FYTLNFPATACNSSSRLCPPVFLYVKVYCWHRMRELLY
OQ714230.1  FYTLNFPATACNSSSRLCPPVFLYVKVYCWHRMRELLY
OQ714231.1  FYTLNFPATACNSSSRLCPPVFLYVKVYCWHRMRELLY
OQ714235.1  FYTLNFPATACNSSSRLCPPVFLYVKVYCWHRMRELLY
                ****:*** **:*. ***** ** .*****
```

**Figure 15.** – Fig. S1. Alignment of M-ORF from nine male *Mytilus edulis* individuals. (accession numbers : OQ714227 to OQ714234).



**Figure 16.** – Fig. S2. Apparent molecular weight of M-ORF at different  $\beta$ -mercaptoethanol concentrations (0%, 5%, 10%) and different heating times (10 min, 30 min, 3 hours). (A) Western blot of M-ORF and ATP5A. (B) Ponceau S staining of the same membrane. Molecular weight was not affected. Under strong denaturing conditions, proteins could not be recognized by their associated antibody.

Supplementary data 1

**tBLASTn protein blast translated nucleotide sequences (nucleotide collection nr/nt)**

***Complete MORF sequences***

```
AY350792.1 MSGLFKQQTNSSG-ESCESFKNSNKATQKMWCVACVYKYTQKKKKKKKK---YHKCLKMS
AY823624.1 MSGLFKQQTNFSG-ESCKSFKNSXKATQKMWCVACVYKYTQKKKKKKKK---YHKCLKMS
AY823623.1 MWGVCSNNKLIPG-ESCKSFKNSNKATQKMWCVACVYKYTQKKKKKKKK---YHKCLKMS
AY115482.1 MGGVCSNNKLILGGKSVSLLKNENKATQKMWCVACVYKYTQKKKKKKKK---SHKCLKMS
MN546819.1 MGGVCSNNKLILGVKSVSLLKNKNKATQKMWCVACVYKYTQKKKKKKKKKKKYHKCLKMS
EF434634.1 MWGVCSNNKLILGGKSVSLLKNKNKATQKMWCVACVYKYTQKKKKKKKK---YHKCLKMS
MN546818.1 MWGVCSNNKLILGGKSVSLLKNKNKATQKMWCVACVYKYTQKKKKKKKKKKKKNYHKCLKMS
* *: .:;. * :* . :**. *****
```

```
AY350792.1 CFYTLNFPATACNSSSRLCPPVFLYVKVYCWHMRELLY----
AY823624.1 CFYTLNFPATACNSSSRLCPPVFLYVKVYCWHMRELLY----
AY823623.1 CFYTLNFPATACNSSSRLCPPVFLYVKVYCWHMRELLYXNNL
AY115482.1 YFYTLNFPATACNSSSRLCSPVFLYVKVYCWHMWELLYWNNL
MN546819.1 YFYTLNFPATACDSSSRLCPPVFLYVKVYCWHMWELLYWNNL
EF434634.1 YFYTLNFPATACNSSSRLCPPVFLYVKVYCWHMWELLYWNNL
MN546818.1 YFYTLNFPATACNSSSRLCSPVFLYVKVYCWHMWELLYWNNL
*****:*****_*****_****
```

*Two overlapping ORFs (ORF1 upstream the poly-Ks and ORF2 downstream the poly-Ks)*

```
AF188279.1. ORF1 MSGL-FKQQTNSSGEGCKSFKNSNKATQKMWCVACVYKYTQKKKKK-----
EF434636.1. ORF1 MWGVCSNNKLILGGKSVSLLKNSNKATQKMWCVACVYKYTQKKKKKKKKKKKKKKITMN
EU344826.1. ORF1 MWGVCSNNKLILGGKSVSLLKNKNKATQKMWCVAX-----MN
AF188279.1. ORF2 -----KKKKKKKKYHKC
EU344826.1. ORF2 -----MVC-----SXHKC
EF434636.1. ORF2 -----MVCVCMQVYAKKKKKKKKKKKKKKKNYHKC
* *: .:;. * :* . :**. ***** * * *****
```

```
AF188279.1. ORF1 -----
EF434636.1. ORF1 VWK-----
EU344826.1. ORF1 VWK-----
AF188279.1. ORF2 LKMSCFYTLNFPATACNSSSRLCPPVFLYVKVYCWHMRELLY----
EU344826.1. ORF2 LKMSYFYTLNFPATACNSSSRLCPPVFLYVKVYCWHMWELLYWNNL
EF434636.1. ORF2 LKMSYFYTLNFPATACNSSSRLCPPVFLYVKVYCWHMWELLYWNNL
* *****_****
```

**tBLASTn nucleotide blast against EST expressed sequence tags**

```
AM880936      KKKKKKKTVKCLGMSCFYTLSFLAIACNSSNRLGSSVFLHVKVPWHTWEPPY
AM880727      ---KKKKTVKCLGMSCFYTLSFLVIACNKSRLCSSVFLHVKVPWHTWEPPY
                ***** .**** .**** *****
```

**tBLASTn nucleotide blast against Transcriptome shotgun assembly**

```
GHII01098672.1  -----KKYHKCLKMSYFYTLNFPATACNKSSRLCSPVFLYVKV
GIVC01444028.1  -----KKKKKKYHKCLKMSCFYTLNFPATACNSSSRLCPPVFLYVKV
GIVC01444027.1  -----KKKKKKYHKCLKMSCFYTLNFPATACNSSSRLCPPVFLYVKV
HBWX01435949.1  KKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKKYHKCLKMSYFYTLNFPATACNSSSCLCPPVFLYVKV
GIVC01444029.1  -----KKKKKKYHKCLKMSYFYTLNFPATACNSSSRLCPPVFLYVKV
HBDQ01187591.1  -----KKKKKKYHKCLKMSYFYTLNFPATACNSSSRLCPPVFLYVKV
                ***** ***** .** ** .*****
```

```
GHII01098672.1  YCWHVWELLYWNNL
GIVC01444028.1  YCWHMRELLY----
GIVC01444027.1  YCWHMRELLY----
HBWX01435949.1  YCWHMWELLYWNNL
GIVC01444029.1  YCWHMWELLYWNNL
HBDQ01187591.1  YCWHMWELLYWNNL
                ****: .****
```

```
GIVC01220074.1  MSGL - FKQQTNSSGESCKSFKNSNKATQKMWCVACVYKYTQKKKKKK ---
HBDQ01068142.1  MSGL - FKQQTNSSGESCKSFKNSNKTTQKMWCVACVYKYTQKKKKKK ---
GIVC01220075.1  MKGL - FKQQTNSSGESCKSFKNSNKATQKMWCVACVYKYTQKKKKKK ---
HBWX01414747.1  MWGVCSNNKLILSGKSVSLLKNKNKAIQKMWCVACVYKYTQKKKKKKKKK
                * *: ::: **: * . :** .** : *****
```

## Annexe II

### Matériel et Méthodes

#### 1. Introduction d'un vecteur plasmide dans *E. coli*

Les transformations bactériennes ont été réalisées suivant le protocole du fabricant (Thermo Scientific™ BL21(DE3) Competent Cells). Les plasmides vecteurs GST-F-ORF (séquence insérée dans un vecteur pGEX-6p1, décrit dans (Ouimet, 2018)) et GST-M-ORF (construit par LifeTein) étaient conservés sur glace lorsque non-utilisés. Un plasmide exprimant uniquement GST (vecteur pGEX-4-T1 de Amersham) servait de contrôle. Dans un tube eppendorf, 1 µL de plasmide (0,1 µg/µL) a été ajouté à 50 µL de bactéries *E. coli* BL21. Les tubes ont été incubés sur glace pour 30 min puis ont reçu un choc thermique de 30 sec dans un bain-marie à 42°C. Après 2 minutes supplémentaires sur glace, 250 µL de milieu de culture SOC a été ajouté à chaque tube pour une incubation de 1h à 37°C avec agitation à 200 rpm.

Après avoir étaler 50 µL d'ampicilline sur une gélose, les bactéries transformées étaient ensuite ajoutées et étalées. Après une incubation *overnight* à 37°C, une colonie transformée par pétri était conservée dans un mélange 1:1 de milieu de croissance LB et de glycérol au -80°C.

Une goutte de bactéries transformées et 5 µL d'ampicilline ont été ajoutés à 5 mL de bouillon de croissance LB stérilisé pour repartir des cultures. Après une incubation *overnight* à 37°C avec agitation, les tubes étaient centrifugés et les culots resuspendus dans 10 mL de bouillon LB avec 10 µL d'ampicilline pour 2h d'incubation à 37°C avec agitation, suivit par un ajout de 10 µL d'IPTG pour une incubation de 2h30 à 37°C avec agitation. Les cultures ont été centrifugées 10 minutes à 2500 rpm et leur culot resuspendus dans 500 µL de PBS 1X et soniqués. Les lysats ont été incubés avec du Triton 10% sur glace pour 15 minutes puis centrifugés à 15 000 rpm pour 15 minutes. Le surnageant était conservé pour un western blot réalisé comme dans Debelli et al. (2023) pour observer la production des protéines fusion GST-F-ORF ou GST-M-ORF.

#### 2. Co-immunoprécipitation

Un mg de protéines des échantillons sélectionnés préparés comme dans Debelli et al. (2023) (3 réplicats) a été centrifugé 15 minutes à 15 000 rpm pour ne garder que le surnageant. Le surnageant a été incubé durant 2h à température ambiante avec 20 µL de billes protéine A agarose. La même quantité de billes A agarose a été incubée avec 50 µL de sérum anti-F-ORF ou anti-M-ORF, selon le cas, pour 2h à température pièce. Un contrôle négatif a été préparé en fournissant à l'échantillon les 20 µL de billes et 50 µL de sérum pré-immun à la place des anticorps. Une autre centrifugation fut faite à 15 000 rpm pour 1 minute afin de précipiter les billes et protéines attachées. Le surnageant des protéines des échantillons sélectionnés et le culot des billes avec anticorps ont été incubés ensemble pour toute la nuit à 4°C, puis centrifugés. Le culot a été gardé et lavé avec du tampon de lyse 10 mM HEPES (pH=7.4) avec 0.25 M sucrose, 1 mM EDTA. Les lavages ont été faits cinq fois, puis le culot était resuspendu dans du tampon de lyse.

Une partie du culot a servi à un western blot, et l'autre a été conservée pour séquençage. Le western blot a été réalisé comme dans Debelli et al. (2023). Les échantillons où la présence de M-ORF ou F-ORF était confirmée ont été séquencés par spectrométrie de masse à la plateforme de protéomique de l'institut de recherche McGill University Health Center (MUHC). Les échantillons ont été mis sur gel pour retirer les lipides, détergents et sels. La bande contenant les protéines était ensuite réduite avec du DTT, alcalisée avec de l'acide iodoactétique et digérée avec de la trypsine. Deux µg de protéines étaient ensuite resolubilisés dans de l'acide formique 0.1% et chargés dans une pré-colonne Thermo Acclaim Pepmap (Thermo, 75µM ID X 2 cm C18 3 µM billes) puis dans une colonne Acclaim Pepmap Easyspray (Thermo, 75 µM X 15 cm with 2 µM C18 billes) avec un Dionex Ultimate 3000 uHPLC à 250 nl·min<sup>-1</sup> avec un gradient de 2-35% organique (acide formique 0.1% dans de l'acétonitrile) pour 3h. Les peptides étaient ensuite analysés avec un spectromètre de masse Thermo Orbitrap Fusion à 120 000 résolutions (FWHM dans MS1) avec séquençage HCD à la vitesse maximale pour tous les peptides de charge 2+ ou plus grand. Les données ont été converties en format \*.mgf (Mascot generic format) pour une recherche utilisant le moteur de recherche Mascot 2.6.2 (Matrix Science) contre des séquences Uniprot de *Mytilus* et de *Bivalvia*. Les résultats ont été visualisés et analysés avec Scaffold Q+ (Proteome Science) et Excel.



### 3. Essais pull-down

Un culot de bactéries dans lesquelles le plasmide F-ORF ou M-ORF ou GST (contrôle) a été introduit a été resuspendu dans 1 mL de PBS 1X avec de l'urée 8M et des inhibiteurs de protéase. Les bactéries ont été soniquées, incubées 20 min à 4°C avec du Triton 10%, puis centrifugées 30 min à 4000 rpm. Le surnageant a été mélangé à 100 µL de billes glutathion sépharose (Abcam) et incubé toute la nuit à 4°C pour le pré-couplage. Les billes ont été lavées trois fois et resuspendues avec du PBS 1X. Une estimation de la quantité de protéines fusion GST-F-ORF ou GST-M-ORF et de GST, selon le cas, a été faite en comparaison avec une échelle de BSA sur gel d'électrophorèse coloré à l'*Imperial stain protein* pour 1h à température pièce et décoloré pour 2h à température pièce à l'eau distillée.

Un mg de protéines par échantillon de gonades lysées sélectionnées (3 réplicats) a été incubé avec 50 uL de billes glutathion sépharose et 25 ug de GST synthétique pour 2h à 4°C. Les surnageants ont été conservés et ajoutés à environ 10 µg de billes glutathion sépharose pré-couplées aux protéines fusion pour une incubation toute la nuit à 4°C.

Comme pour les co-immunoprécipitations, les culots des pull-down ont été lavés six fois avec du PBS 1X puis ont été resuspendus dans du PBS 1X. Comme pour les co-immunoprécipitations, une partie a servi pour un western blot, et l'autre a été envoyée pour séquençage et a été analysée comme décrit plus haut.

### Annexe III

Tableau SI : Partenaires d'interaction potentiels de M-ORF par co-IP de deux échantillons mâles contre la base de données Bivalvia

Protéines	Numéro d'accès	Fonctions	Mâle 1 Nombre de spectres	Mâle 2 Nombre de spectres
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	A0A6J8A4N7	Métabolisme	19	3
Vitelline coat lysin M6	Q86LZ9	Réaction acrosomale	17	24
E2.7.3.3	A0A6J8ETN6	Lié à l'ADN/ARN	17	11
Tubulin alpha chain	A0A6J8ACG4	Microtubules	17	11
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	A0A6J8CM22	Métabolisme	14	3
Heat shock cognate 71	Q3LF65	Protéines chaperonnes	13	10
Vitelline coat lysin M7	Q86M03	Réaction acrosomale	11	15
Elongation factor 1-alpha	Q9XY84	Lié à l'ADN/ARN	11	10
Byssal HSP-like protein 1	A0A193DU97	Protéines chaperonnes	10	8
6-phosphofructokinase	A0A6J8B376	Métabolisme	9	5
Tubulin beta chain	A0A6J8EQD7	Microtubules	8	11
ECI2	A0A6J8DY69	Métabolisme	8	9
Isocitrate dehydrogenase [NADP]	I1VYX2	Métabolisme	6	5
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	A0A076V861	Métabolisme	5	8
Cysteinyl-tRNA synthetase	A0A6J8AIN6	Lié à l'ADN/ARN	5	4
IDH3 OS= <i>Mytilus coruscus</i>	A0A6J8BM61	Métabolisme	4	5

Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	A0A076VC67	Métabolisme	4	4
EEF2	A0A6J8EJ35	Lié à l'ADN/ARN	4	3
Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	A0A6J8E460	Métabolisme	4	3
Glutamate dehydrogenase	A0A6J8DP66	Métabolisme	4	3
Cluster of Heat shock protein 90	C0Z203	Protéines chaperonnes	3	4

Tableau SII : Partenaires d'interaction potentiels de M-ORF par *pull-down* d'un échantillon de gonade mâle contre la base de données Bivalvia

Protéines	Numéro d'accès	Fonctions	Nombre de spectres
Tubulin beta chain	Q5Y1E4	Microtubules	40
Tubulin beta chain	A0A6J8EQD7	Microtubules	38
Tubulin beta chain	A0A0G2R2A9	Microtubules	23
ATP synthase subunit beta	Q6PTH6	Métabolisme	21
Tubulin beta chain	A0A6J8CLP6	Microtubules	20
Tubulin beta chain	G3ET72	Microtubules	19
Tubulin beta chain	A0A6J8CJC0	Microtubules	19
Tubulin beta chain	A0A6J8CLH2	Microtubules	18
ATPeF1A	A0A6J8BYY1	Métabolisme	17
Guanylate cyclase	A0A6J8DFU9	Métabolisme	17
Isocitrate dehydrogenase [NADP]	I1VYX2	Métabolisme	15
ADP/ATP translocase	A0A6J8D0Q2	Autres	15
ATP synthase subunit beta	Q6PTI1	Métabolisme	14
Tubulin beta chain	A0A6J8CI29	Microtubules	11

NCL	A0A6J8AW18	Lié à l'ADN/ARN	10
Succinate--CoA ligase [ADP-forming] subunit beta, mitochondrial	A0A6J8E460	Métabolisme	10
IDH3	A0A6J8BM61	Métabolisme	9
Myosin heavy chain	Q9U0S7	Mobilité	9
GST class-pi	Q8MUC3	Métabolisme	8
Sodium/potassium-transporting ATPase subunit alpha	A0A6J8E7R0	Métabolisme	8
MYH6_7	A0A6J8D3J1	Mobilité	7
H(+)-transporting two-sector ATPase	A0A076NAK9	Métabolisme	6
Tubulin beta chain	A0A6J8DDA2	Microtubules	6
Phosphate carrier protein, mitochondrial	A0A077GYV9	Autres	6
Complex III subunit VII	A0A3G1CJK0	Métabolisme	6
Glutathione transferase	J7IB22	Métabolisme	6
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	K1Q9G3	Métabolisme	6
Tektin	A0A6J8DPV4	Microtubules	6
KLHL10	A0A6J8CDI9	Protéines spermatiques	6
Tubulin alpha chain	A0A6J8ACG4	Microtubules	5
Tubulin alpha chain	A0A6J8BU11	Microtubules	5
Electron transfer flavoprotein subunit alpha	A0A6J8CPT2	Autres	5
Cysteine desulfurase, mitochondrial	A0A6J8AZZ6	Métabolisme	5
Cytochrome c oxidase subunit 4	B6CMX3	Métabolisme	5

ATPeF0F	A0A6J8C7Z5	Autres	4
YWHAB_Q_Z	A0A6J8AM43	Autres	4
MICOS complex subunit MIC60	A0A6J8AEM5	Autres	4
Cytochrome c oxidase subunit 4	A0A077GZL0	Métabolisme	4
Tektin	A0A6J8BSI9	Microtubules	4
Complex I-49kD	A0A6J8CY23	Métabolisme	4
Natriuretic 1-like peptide receptor	A0A409V6J1	Autres	4
Isocitrate dehydrogenase [NAD] subunit, mitochondrial	A0A6J8C1H6	Métabolisme	4
ACAT	A0A6J8A1T6	Métabolisme	4
Cluster of SFRS4_5_6	A0A6J8A423	Métabolisme	3
Tubulin alpha chain	A0A6J8C1I9	Microtubules	3
VDAC2	A0A6J8DNW3	Autres	3
SFRS4_5_6	A0A6J8A423	Métabolisme	3
Prohibitin	A0A6J8DK88	Autres	3
Paramyosin	O96064	Mobilité	3
Paramyosin, Myosin-7	A0A6J8ESP8	Mobilité	3
Atp gamma synthase	A0A3R5Q3I4	Métabolisme	3
Vitelline coat lysin M3	U3Q3D0	Réaction acrosomale	3
Protein boule, Protein boule-like	A0A6J8D436	Lié à l'ADN/ARN	3
Cysteine desulfurase, mitochondrial	K1QKG9	Métabolisme	3
ALDH9A1	A0A6J8CZP9	Métabolisme	3
Tektin	A0A210QGA9	Microtubules	3
Tektin	A0A6J8BBL7	Microtubules	3
Ropporin-1-like protein	A0A210QPC1	Protéines spermatiques	3

Cytochrome b-c1 complex subunit Rieske, mitochondrial	A0A3G1CJM5	Métabolisme	3
Stomatin-like 2-like protein	A0A3L5TTK6	Autres	3
ATP synthase subunit O, mitochondrial	A0A6J8F3Y7	Métabolisme	3
NOP58	A0A6J8BZ79	Lié à l'ADN/ARN	3
Aconitate hydratase, mitochondrial	A0A6J8DKQ6	Métabolisme	3
RBM4	A0A6J8EIH3	Lié à l'ADN/ARN	3
Cilia- and flagella-associated protein 52	A0A6J8EWP4	Mobilité	3
Putative binding	G0YFD5	Autres	3
SLC25A20_29	A0A6J8E215	Autres	3
EFHC1	A0A6J8DBD6	Autres	3
Putative phosphodiesterase 1	G0YFD7	Métabolisme	3
ABCB1	A0A4Y6GUC0	Autres	3

Tableau SIII : Potentiels partenaires d'interaction de F-ORF par séquençage de trois échantillons de gonades mâles contre la base de données Bivalvia

Protéines	Numéro d'accès	Fonctions	Mâle 1 Nombre de spectres	Mâle 2 Nombre de spectres	Mâle 3 Nombre de spectres
Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	A0A6J8D3S7	Métabolisme	24	18	30
ALDH	A0A6J8EZQ9	Métabolisme	17	11	12
Dihydrolipoyl dehydrogenase	A0A6J8C385	Métabolisme	14	8	5
Oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring)	A0A6J8B4X1	Métabolisme	12	15	10

Cysteinylglycine-S-conjugate dipeptidase	A0A6J8EK18	Métabolisme	7	6	7
Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	A0A6J8A6D1	Métabolisme	6	10	12
Heat shock protein	C3V2R2	Protéines chaperonnes	18	0	10
CCT-alpha	A0A6J8CLN0	Protéines chaperonnes	12	0	4
RNA helicase	A0A6J8E2U7	Lié à l'ADN/ARN	7	3	0
Pyruvate dehydrogenase E1 component subunit alpha	A0A6J8A0D9	Métabolisme	7	1	5
T-complex protein 1 subunit delta	A0A6J8C941	Protéines chaperonnes	7	-3	5
DECR1	A0A6J8BU40	Métabolisme	5	3	0
CCT-beta	A0A6J8C1Y4	Protéines chaperonnes	4	-5	5
Heat shock cognate 71	Q3LF65	Protéines chaperonnes	4	-8	8
IGF2BP1	A0A6J8CLZ4	Lié à l'ADN/ARN	3	8	0
Electromotor neuron-associated protein 2, Microtubule-associated protein futsch	A0A6J8DQP8	Microtubules	3	4	2
UDP-glucose 6-dehydrogenase	A0A6J7ZZ90	Métabolisme	3	3	0
UBA domain-containing protein	A0A6J8ADK6	Autres	2	5	5
Intraflagellar transport protein 46 homolog	A0A6J8AV75	Mobilité	0	6	4

Tableau SIV : Potentiels partenaires d'interaction de F-ORF par séquençage d'un échantillon de gonade femelle contre la base de données Bivalvia

Protéines	Numéro d'accès	Fonctions	Nombres de spectres
Tryptophanyl-tRNA synthetase	A0A6J8DID6	Métabolisme	40
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	A0A6J8A4N7	Métabolisme	40

Tryptophanyl-tRNA synthetase	A0A6J8D8B3	Métabolisme	34
Tryptophanyl-tRNA synthetase	A0A3L5TT13	Métabolisme	29
ALDH	A0A6J8EZQ9	Métabolisme	22
Oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring)	A0A6J8B4X1	Métabolisme	20
Oxoglutarate dehydrogenase (succinyl-transferring)	A0A6J8BAA0	Métabolisme	19
UTP--glucose-1-phosphate uridylyltransferase	A0A6J8CLI4	Métabolisme	17
Vitelline envelope zona pellucida domain 9	G0YEP8	Œuf	16
ATP synthase subunit beta	Q6PTH6	Métabolisme	15
Dihydrolipoyllysine-residue succinyltransferase component of 2-oxoglutarate dehydrogenase complex, mitochondrial	A0A6J8D3S7	Métabolisme	15
Tubulin beta chain	A0A6J8EQD7	Microtubules	14
Phosphoenolpyruvate carboxykinase (GTP)	A0A6J8CM22	Métabolisme	14
ATP synthase subunit beta	Q6PTI1	Métabolisme	13
Clustered mitochondria protein homolog	A0A6J8C1J5	Autres	13
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	A0A076V861	Métabolisme	11
Tubulin beta chain	Q5Y1E4	Microtubules	10
ATPeF1A	A0A6J8BYY1	Métabolisme	10
Tubulin alpha chain	A0A6J8AU27	Microtubules	10
Tubulin alpha chain	A0A6J8ACG4	Microtubules	9
Tubulin beta chain	A0A0G2R2A9	Microtubules	8



Tubulin alpha chain	A0A6J8B263	Microtubules	8
Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	A0A076VC67	Métabolisme	8
Tubulin beta chain	A0A6J8CLH2	Microtubules	7
Isocitrate dehydrogenase [NADP]	I1VYX2	Métabolisme	7
Tubulin alpha chain	A0A6J8CI40	Microtubules	7
Uncharacterized oxidoreductase C513.07	A0A6J8CSZ8 (+1)	Autres	7
Endophilin-B1	A0A6J8ASQ8	Autres	7
Propionyl-CoA carboxylase beta chain, mitochondrial	A0A210PUA9	Métabolisme	7
ADP/ATP translocase	A0A6J8D0Q2	Autres	6
Elongation factor 1-alpha	Q9XY84	Lié à l'ADN/ARN	6
Tubulin beta chain	A0A6J8CLP6	Microtubules	5
Tubulin beta chain	G3ET72	Microtubules	5
STK31	A0A6J8AFH6	Autres	5
General vesicular transport factor p115	A0A6J8BM67	Autres	5
Electromotor neuron-associated protein 2, Microtubule-associated protein futsch	A0A6J8DQP8	Microtubules	5
Acetyltransferase component of pyruvate dehydrogenase complex	A0A6J8A6D1	Métabolisme	5
Vesicle-fusing ATPase	A0A6J8B7T5	Métabolisme	5
NCL	A0A6J8AW18	Lié à l'ADN/ARN	4
HNRNPABD	A0A6J8ESL8	Lié à l'ADN/ARN	4
ACTB_G1	A0A6J8EID8	Mobilité	4
Major vault protein	A0A6J8EF03	Autres	4

Aldo_ket_red domain-containing protein	A0A6J8E0X9	Métabolisme	4
Propanoyl-CoA:carbon dioxide ligase subunit alpha	A0A6J8C3G0	Métabolisme	4
Elongation factor 1-alpha	D9IWS1	Lié à l'ADN/ARN	4
PCCB	A0A6J8CF45	Métabolisme	4
Dihydrolipoyl dehydrogenase	A0A6J8C385	Métabolisme	4
Nacre c1q domain-containing protein 1	A0A0K0PUN7	Autres	4
Tubulin beta chain	A0A6J8CJC0	Microtubules	3
Tubulin beta chain	A0A6J8CI29	Microtubules	3
H(+)-transporting two-sector ATPase	A0A076NAK9	Métabolisme	3
Tubulin alpha chain	A0A6J8BU11	Microtubules	3
ATPeF0F	A0A6J8C7Z5	Autres	3
Cluster of YWHAB_Q_Z	A0A6J8AM43	Autres	3
DNAJC7	A0A6J8E5G5	Protéines chaperonnes	3
RP-S3e	A0A6J8BKP4	Lié à l'ADN/ARN	3
Serine/threonine-protein phosphatase	A0A210PQQ0	Métabolisme	3
ABCE1	A0A6J8CWK1	Lié à l'ADN/ARN	3
LLGL	A0A6J8ECT2	Autres	3
Phosphonopyruvate decarboxylase	A0A409V7H0	Métabolisme	3
RBBP4	A0A6J8ATP0	Lié à l'ADN/ARN	3
Purine nucleoside phosphorylase	A0A6J8BJQ5	Métabolisme	3
Major vault protein	A0A6J8EG45	Autres	3
PSMD3	A0A6J8CRE6	Métabolisme	3

F-actin-capping protein subunit alpha	A0A6J8E5Q5	Mobilité	3
CCT-epsilon	A0A6J8CWJ7	Lié à l'ADN/ARN	3
Elongation factor 1-alpha	D9IWS3	Lié à l'ADN/ARN	3